



Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Studentski trg 12-16 * P. fah 51 * 11158 Beograd 118 * PAK: 105305 * Tel/faks: 011-2184330 * <http://helix.chem.bg.ac.rs/>

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jelena M. A imovi

MODIFIKACIJA –SH GRUPE PROTEINA
 α -DIKARBONILNIM JEDINJENJIMA:
IDENTIFIKACIJA PROIZVODA,
MOGU NOSTI ODRE IVANJA I
PRIMENE U KLINI KOJ PRAKSI

doktorska disertacija

Beograd, 2012



University of Belgrade - Faculty of Chemistry

Studentski trg 12-16 * P. O. Box 51 * 11158 Belgrade 118 * PAC: 105305 * Serbia * Phone/fax: +381-11-2184330 * <http://helix.chem.bg.ac.rs/>

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena M. A imovi

MODIFICATION OF PROTEIN -SH
GROUP WITH α -DICARBONYL
COMPOUNDS: IDENTIFICATION OF
PRODUCTS, THE POSSIBILITIES OF
DETERMINATION AND APPLICATION IN
CLINICAL PRACTICE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentor: dr Ljuba M. Mandić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije: dr Ljuba M. Mandić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

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

dr Mihajlo B. Spasić,
Naučni savetnik IBISS

Datum odbrane doktorske teze: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u istraživačkoj laboratoriji br 403, na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. Ljubi Mandić na površnosti, savetima i podršci u radu na ovoj disertaciji. Zhvaljujem se kolegama koji su neposredno doprineli izradi ove disertacije: mr Vesni Jovanović, mr Bojani Stanimirović, Anji Penezić-Romanjuk i Ivanu Pavićeviću.

Zahvaljujem se studentima koji su radili svoje diplomske radove u našoj laboratoriji dali svoj doprinos - Jeleni Tolimir, Jeleni Ivanovskoj i Jeleni Janković, Milici Veselinović i Bojanu Vujiću.

Zahvaljujem se mojim roditeljima Olgi i Milanu Anđeliću, i mojoj porodici: majkama Mariji Simić i Branki Mladenović, Srećanu i Radmili Mladenović, na ljubavi, razumevanju i podršci.

MODIFIKACIJA –SH GRUPE PROTEINA α - DIKARBONILNIM JEDINJENJIMA: IDENTIFIKACIJA PROIZVODA, MOGUĆNOSTI ODREĐIVANJA I PRIMENE U KLINIČKOJ PRAKSI

-Dikarbonilna jedinjenja su veoma reaktivna, reaguju sa nukleofilnim grupama bo njih ostataka Lys i Arg, N-terminalnom amino-grupom i tiol-grupom ostatka Cys na površini molekula proteina i tako ih modifikuju. U disertaciji je ispitan doprinos tiol-grupe modifikaciji proteina metilglioksalom (MG), kinetika i konkurentnost ove reakcije u odnosu na reakcije amino- i guanidino-grupe. Načeno je da i pored male zastupljenosti tiol-grupe na površini molekula proteina (kod HSA oko 80 puta manja u odnosu na ukupan broj amino- i guanidino-grupa) ona reaguje u velikom procentu (do 65 %), u estvuje u umrežavanju molekula proteina (stvaranju dimera i oligomera) preko nagra enih HSA-MG (HSA-amino-MG ili HSA-SH-MG) intermedijera sa udelom od 4% u slučaju nedovoljne količine metilglioksala. Povećanje koncentracije metilglioksala utiče na brzinu reakcije sa tiol-grupom, na vreme uspostavljanja ravnoteže, na doprinos tiol-grupe modifikaciji molekula proteina, ali ne utiče na procenat izreagovanih grupa u stanju ravnoteže (60 %), što omogućava ekstrapolaciju dobijenih rezultata na niže, fiziološke koncentracije metilglioksala.

U okviru teze su razvijene spektrofotometrijske metode zasnovane na reakciji amino-grupa sa p-benzohinonom i guanidino-grupa sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit. Metode su precizne (RSD u opsegu 1.2-1.8 %, odnosno 0.9–2.0 %, resp.) i tačne (100.6 \pm 1.2 %, 99.8 \pm 0.8 %, redom), što ih čini pogodnim za kvantifikaciju ovih grupa za vreme karbonilovanja in vitro.

Uticao je mikrookoline tiol-grupe na njenu reakciju sa metilglioksalom ispitan je sa aminokiselinama (Cys, NAcCys i CMC), peptidom (GSH) i proteinom (HSA). Utvrđeno je da mikrookolina –SH grupe utiče na njenu reaktivnost i na prinos proizvoda reakcije. Reaktivnost tiol-grupe opada u nizu Cys>GSH>NAcCys, za sve ispitivane odnose koncentracija reaktanata. CMC ne reaguje sa metilglioksalom. Prisustvo amino-merkapto-etanske grupe u tiol-jedinjenju povećava reaktivnost tiol-grupe.

Preloženi je reakcioni put za reakciju Cys i metilglioksala po kome slobodna amino-grupa molekula Cys (čija je tiol-grupa u reakciji sa metilglioksalom već nagradila hemitioacetal), reaguje sa slobodnom acetil-karbonilnom grupom hemitioacetala. Stvara se tiazolidinski intermedijer, koji dalje prelazi u stabilniji

proizvod Cys-MG-glikozilamin. U ravnoteži je prisutno oko 40 % hemitioacetala i oko 60 % Cys-MG-glikozilamina.

Ispitivanje efikasnosti tiola male molekulske mase (GSH, NAcCys, Cys i penicilamina) i metformina u spremanju modifikacije HSA metilglioksalom pokazala su da se supstance koje sadrže α -amino- γ -merkapto-etansku grupu (Cys i penicilamin) kao farmakoforu, mogu koristiti kao efikasni hvatači i metilglioksla. Njihova prednost (u odnosu na metformin) je što omogućavaju zaštitu tiol-grupe HSA i očuvanje njegovog antioksidativnog potencijala, koji je veoma bitan za njegovu funkciju in vivo.

Primenom razvijenih spektrofotometrijskih metoda za određivanje sadržaja slobodnih α -amino-, guanidino- i tiol-grupa na HSA izolovanom iz seruma pacijanata obolelih od tipa 2 dijabetesa i iz seruma kontrolne grupe nađeno je da je sadržaj HSA guanidino-, α -amino i tiol-grupa kod dijabetičara statistički značajno niži ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, redom) u odnosu na njihov sadržaj u kontrolnoj grupi. Praćenje promena sadržaja α -amino-kiselinskih ostataka strukturno dobro okarakterisanog izolovanog proteina (kao što je HSA) omogućava uvid u modifikacije proteina u uslovima karbonskog stresa in vivo, razmatranje efekata ovih promena na njegovu aktivnost i primenu kao pokazatelja patološkog stanja u kliničkoj praksi. Kako su metode za određivanje guanidino- i α -amino-grupe precizne i jednostavne i ne zahtevaju mnogo vremena, pogodne su za određivanje stepena karbonilovanja proteina u različitim bolestima i za praćenje terapije (tj. kapaciteta leka u zaštiti od delovanja reaktivnih α -oksoaldehida) u kliničkoj praksi.

Ključne reči: α -dikarbonilna jedinjenja, metilglioksal, neenzimsko glikozilovanje proteina, modifikacija tiol-grupe, humani serum albumin, tioli male molekulske mase, krajnji proizvodi glikacije - AGEs, dijabetes, karbonilovanje α - i guanidino-grupa

Naučna oblast: biohemija

MODIFICATION OF PROTEIN -SH GROUP WITH α -DICARBONYL COMPOUNDS: IDENTIFICATION OF PRODUCTS, THE POSSIBILITIES OF DETERMINATION AND APPLICATION IN CLINICAL PRACTICE

-Dicarbonyles are reactive compounds that react with the nucleophilic groups of Lys and Arg side chains, thiol group of Cys and N-terminal amino on the protein surface, modifying them. In this thesis, the contribution of thiol group to protein modification with methylglyoxal (MG), kinetics and competitiveness of this reaction with those of amino and guanidino groups reactions were investigated. Although less abundant, thiol groups present on the protein surface (approx. 80 times lower than total number of amino and guanidino groups in HSA), are found to be reactive in considerable percentage (up to 65 %) and are participated in protein cross-linking (dimer and oligomer production), through HSA-MG intermediates (HSA-amino-MG or HSA-SH-MG), with 4% in case of insufficient amount of MG. Increase in methylglyoxal concentration influences the reaction rate with thiol group, the time for the reaction to reach equilibrium and the contribution of thiol group to modification of proteins, yet it has no influence on the percent of reacted groups (60 %) when chemical equilibrium is reached, enabling extrapolation of the obtained results to lower, physiological concentrations of methylglyoxal.

Spectrophotometric methods, based on the reaction of amino groups with p-benzoquinone and guanidino groups with thimol and sodium hypobromite reagent, have been developed. The methods are precise (RSD 1.2-1.8 % and 0.9–2.0 %, respectively) and accurate (100.6 ± 1.2 %; 99.8 ± 0.8 %, resp.), and therefore suitable for quantification of these groups during carbonylation process in vitro.

The influence of microenvironment of thiol group on its reactivity with MG has been examined using amino acids (Cys, NAcCys and CMC), peptide (GSH) and protein (HSA). It has been shown that microenvironment of thiol group influences its reactivity and the product yield. The reactivity of thiol group decreases in the order Cys>GSH>NAcCys, for all concentration ratios examined. CMC doesn't react with MG. The presence of -amino- -mercapto ethane group in thiol compound increases the reactivity of thiol group.

The reaction pathway for Cys and MG reaction was proposed, in which the free -amino group of Cys (whose thiol group is already in the form of hemithioacetal with

MG) reacts with the free acetyl carbonyl group of hemithioacetale. Thiazolidine intermediate is formed, followed by transformation into more stable product, Cys-MG glucosylamine. 40% of hemithioacetale and 60% of Cys-MG glucosylamine are present in the equilibrium.

Examinations of low molecular mass thiols (GSH, NAcCys, Cys and penicillamine) and metformin efficiency in prevention of MG HSA modification showed that the substances containing α -amino- β -mercapto ethane group (Cys and penicillamine) as a pharmacophore can be used as successful scavengers of MG. These substances are advantageous since they protect free HSA thiol group preserving its antioxidative capacity, an important HSA function *in vivo*.

Application of developed spectrophotometric methods for quantification of free amino, guanidino and thiol groups in HSA isolated from type 2 diabetic patients sera and control sera, showed that the content of HSA guanidino, amino and thiol groups in diabetic patients is significantly lower ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, respectively) comparing to control group. Monitoring of amino acid content changes of well characterised protein (such as HSA) allows insight into the process of protein modification in carbonyl stress *in vivo*, consideration of the effects of these changes on protein function and could be also applied as the marker of pathological state in clinical practice. Being precise and accurate, simple and not time consuming, these methods are suitable for quantification of protein carbonylation level in different pathological states as well as for drug therapy monitoring (i.e. monitoring the drug's capacity to protect the proteins against reactive α -oxoaldehydes) in clinical practice.

Key words: α -dicarbonyl compounds, methylglyoxal, protein glycation, thiol group, methylglyoxal, human serum albumin, low molecular mass thiols, advanced glycation end products - AGEs, diabetes, carbonylation of amino and guanidine groups

Area of science: biochemistry

Lista skraćenica

AGEs – krajnji proizvodi glikacije (Advanced Glycation End products)

AOPPs –krajnji proizvodi oksidacije proteina

APP – amiloidni prekursorski protein

APS – amonijum-persulfat

Apo B – apolipoprotein B

CEC – karboksietil cistein

CEL – karboksietil lizin

CMC – karboksimetil-cistein,

G – glioksal

CML – karboksimetil-lizin

DOGDIC – deoksiglukozon-imidazolonsko umreženje

DOLD – deoksiglukozon-lizin dimer

Egr-1 – nuklearni transkripcioni faktor

G- glioksal

GALA – glikolaldehid lizin amid

GODIC – glioksal-imidazolonsko umreženje

GOLA – glioksal-lizin amid

GOLD – glioksal-lizin dimer

HMGB1 – proteinski kompleks visoke mobilnosti 1

ICAM-1 – unutar ćelijski adhezioni molekul 1

IL 6 – interleukin -6

MAC – 1 glikoprotein makrofaga 1

MG – metilglioksal

MODIC – metilglioksal-imidazolonsko umreženje

MOLD – metilglioksal lizin dimer

NAcCys – N-acetilcistein

NF- B – nuklearni transkripcioni faktor

PTB- N – fenaciltiazolijum-bromid

RAGE – receptori za AGEs (krajnje proizvode glikacije)

REP – relativna elektroforetska pokretljivost

RCS – reaktivne karbonilne vrste (reactive carbonyl species)

ROS – reaktivne kiseonikne vrste

SSAO – semikarbazid-inhibirana aminooksidaza

TNF- – -faktor nekroze tumora

VCAM-1 – vaskularni elijski adhezioni molekul 1

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Pregled literature.....	5
2.1. Maillard-ova reakcija.....	5
2.2. Neenzimsko glikozilovanje (glikacija) in vivo	8
2.3. Krajnji proizvodi reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina (AGEs)	10
2.3.1. AGEs koji fluoresciraju i predstavljaju mesta umrežavanja u proteinima... 12	
2.3.2. AGEs koji ne fluoresciraju, ali predstavljaju mesta umrežavanja u proteinima.....	15
2.3.3. AGEs koji nisu umrežene strukture	16
2.4. Efekti (posledice) reakcija neenzimskog glikozilovanja i nastanka krajnjih proizvoda glikacije	18
2.5. Receptori za krajnje proizvode glikacije	28
2.6. Biološki mehanizmi za sprečavanje neenzimskog glikozilovanja	31
2.7. Reaktivna dikarbonilna jedinjenja.....	33
2.8. Metilgliksal	37
2.8.1. Metabolizam metilgliksala.	39
2.8.2. Mehanizmi detoksifikacije metilgliksala.	40
2.8.3. Krajnji proizvodi glikacije koji su derivati metilgliksala.....	43
2.9. Reakcija tiola sa dikarbonilnim jedinjenjima	46
2.10. Humani serum albumin – model za ispitivanje modifikacije proteina.....	48
2.11. Sprečavanje karbonilnog stresa i procesa glikacije	52
2.11.1. Tioli malih molekulskih masa kao inhibitori glikacije	59
2.12. Klinički značaj određivanja proizvoda glikacije proteina	60
3. Materijal i metode.....	64
3.1. Hemikalije i reagensi.....	64
3.2. Aparati	70
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih amino-grupa na površini molekula proteina sa p-benzohinonom	70
3.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja amino-grupa u aminokiselinama sa ninhidrinom	70
3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih-guanidino grupa na površini molekula proteina sa timol-natrijum-hipobromitom u alkalnoj sredini.....	71

3.6. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih tiol-grupa na površini molekula proteina, u aminokiselinama i glutationu	71
3.7. Spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije proteina i albumina	71
3.8. Ispitivanje uzoraka HSA nativnom i SDS PAG elektroforezom	72
3.9. Praćenje reakcije metilglioksala sa bojenim ostacima aminokiselina, koji se nalaze na površini molekula HSA.....	74
3.10. Ispitivanje reakcije tiol-grupe u jedinjenjima male molekulske mase sa metilglioksalom	74
3.10.1 ¹ H NMR spektroskopska karakterizacija proizvoda reakcije tiol-grupa i metilglioksala.....	74
3.10.2 Izračunavanje dostupnosti ostatka HSA-Cys 34 rastvara u	75
3.10.3 Izračunavanje hidrofobnosti aminokiselinskih ostataka u okolini HSA-Cys 34.....	75
3.11. Ispitivanje efikasnosti tiola male molekulske mase kao "hvatača" metilglioksala u spremanju glikacije HSA	75
3.11.1 Spektrofluorimetrijska analiza modifikacija HSA molekula	76
3.11.2 Snimanje CD spektara modifikovanih HSA molekula.....	76
3.12. Kvantitativno praćenje promena u sadržaju bojenih ostataka amino-, guanidino- i tiol-grupa bojenih ostataka HSA izolovanog iz seruma dijabetičara	77
4. Rezultati i diskusija.....	78
4.1. Spektrofotometrijska metoda za praćenje promena sadržaja amino-grupa na površini molekula proteina u toku reakcije karbonilovanja in vitro i in vivo.....	78
Ispitivanje uslova za određivanje sadržaja amino grupa p-benzohinonom	79
Validacija metode.....	82
4.2. Spektrofotometrijska metoda za praćenje promena sadržaja guanidino-grupa u toku karbonilovanja proteina	86
Optimizacija uslova za određivanja guanidino-grupa sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit	87
Validacija metode.....	88
4.3. Ispitivanje doprinosa reakcije tiol-grupe modifikaciji proteina dikarbonilnim jedinjenjima	89
4.3.1. Modifikacija HSA metilglioksalom, kada je on prisutan u višku u odnosu na broj reaktivnih grupa na površini proteina	90

4.3.2. Modifikacija HSA sa metilglioksalom kada je on prisutan u manjku u odnosu na broj reaktivnih grupa na površini proteina	95
4.4. Uticaj mikrookoline tiol-grupe jedinjenja male molekulske mase i u serum albuminu, na reakciju sa metilglioksalom	101
4.4.1. Karakterizacija reakcije cisteina i metilglioksala	101
4.4.2. Karakterizacija reakcije tiol-grupe N-acetil-cisteina i metilglioksala	105
4.4.3. Reakcija tiol-grupe glutationa i metilglioksala	107
4.4.4. Hemijske reakcije koje se dešavaju u reakcionoj smeši Cys i metilglioksala	111
4.4.5. Uticaj mikrookoline na reaktivnost tiol-grupe HSA i tiol-grupe jedinjenja malih molekulskih masa	115
4.5. Ispitivanje efikasnosti malih tiola kao „hvata a“ metilglioksala u spre avanju glikacije HSA sa metilglioksalom	119
4.5.1. Ispitivanje kinetike reakcija penicilamina i metformina sa metilglioksalom	120
4.5.2. Ispitivanje efikasnosti tiola malih molekulskih masa i metformina u spre avanju modifikacije HSA sa metilglioksalom	122
Elektroforetsko pra enje promena HSA u reakciji sa metilglioksalom u prisustvu i bez prisustva hvata a metilglioksala	124
Spektrofluorimetrijsko ispitivanje promena konformacije HSA u reakciji sa metilglioksalom, u prisustvu i bez prisustva hvata a metilglioksala	126
4.6. Monitoring stepena karbonilovanja HSA in vivo preko odre ivanja sadržaja amino-, guanidino- i tiol- grupa	131
5. Zaključak	137
6. Literatura	141

1.Uvod

U nekim patološkim stanjima (dijabetes, uremija, ateroskleroza, oksidativni stres, inflamacija), i pri starenju, dolazi do povećanja nivoa α -dikarbonilnih jedinjenja (kao što su metilglioksal, glioksal, 3-deoksiglukozon) i glikoaldehida (Desai et al, 2010; Lo et al, 1994; Lu et al, 2010; Odani et al, 1999), odnosno dolazi do karbonilnog stresa.

α -Dikarbonilna jedinjenja se generišu iz Amadori proizvoda, nastalog u Maillard-ovoj reakciji glukoze i amino grupe proteina (neenzimsko glikozilovanje), u nizu reakcija oksidacije, dehidratacije i ciklizacije (Westwood i Thornalley, 1995), reakcija koje dovode do stvaranja takozvanih krajnjih proizvoda glikacije (Advanced Glycation End products –AGEs, Brownlee et al, 1988). Metilglioksal (MG) se u ćelijama stvara najviše iz intermedijera glikolize, dihidroksiaceton-fosfata i gliceraldehid-3-fosfata, u reakciji koju katalizuje enzim triozofosfat-izomeraza (praktično kao sporedan proizvod), kao i spontanom eliminacijom fosfata. Nastaje i autooksidacijom i degradacijom same glukoze, peroksidacijom lipida i oksidacijom acetona i acetoacetata, kao i u katabolizmu treonina i glicina. U ćelijama postoji enzimski sistem glioksalaza, čija je uloga uklanjanje nastalog metilglioksala, odnosno sprečavanje njegovog štetnog delovanja. U hiperglikemiji i oksidativnom stresu u dijabetesu (Lapolla et al, 2003), u uremiji (Odani et al, 1999), inflamaciji i starenju (Grillo i Colombatto, 2008) brzina nastajanja metilglioksala prevazilazi brzinu njegovog uklanjanja. Budući da su dikarbonilna jedinjenja vrlo reaktivna, oko 20 000 puta reaktivnija od glukoze, ona reaguju sa funkcionalnim grupama na proteinima, DNK i lipidima, (Thornalley, 2003a) što dovodi do modifikacije ovih jedinjenja. Biomolekuli modifikovani metilglioksalom mogu dalje da dovedu do promena funkcija ćelije preko uticaja na ekspresiju gena (Yao et al, 2006), mogu doprineti stvaranju molekula koji u estvuju u regulaciji procesa inflamacije i oštećenja tkiva - preko interakcija sa receptorima za krajnje proizvode glikacije – RAGE, (Kalapos, 2008; Nagai et al, 2007), mogu u estvovati u poprečnom vezivanju proteina i apoptozi (Ramasamy et al, 2006), mogu da dovedu do mikro- i makrovaskularnih komplikacija u dijabetesu (Baynes i Thorpe, 2000).

U reakcijama modifikacije proteina α -dikarbonilnim jedinjenjima u estvuju amino- (N-terminalna i ϵ -amino grupa bočnog ostatka Lys), guanidino- (bočnog ostatka Arg) (Baynes i Thorpe, 2000) i tiol-grupe (bočnog ostatka Cys) (Lo et al, 1994). Tiol-grupa proteina je pri fiziološkom pH jači nukleofil od amino- i guanidino-grupe, pa ipak

uloga -SH grupe u modifikaciji proteina metilglioksalom i dikarbonilnim jedinjenjima nije dovoljno ispitana. U in vitro eksperimentima pokazano je da pri inkubiranju enzima koji imaju tiol-grupu u aktivnom mestu (gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza, Morgan et al, 2002 i kreatin-kinaza, Zeng i Davies, 2005) sa metilglioksalom, dolazi do modifikacije bo njih ostataka Cys i inaktivacije enzima. Utvrđeno je da je reakcija metilglioksala i Cys brza i reverzibilna, da pri fiziološkim in vitro uslovima dovodi do stvaranja hemitioacetala (Kalapos, 2008; Lo et al, 1994). Predložen je mehanizam reakcije po kojem dolazi do stvaranja hemitioacetala (Lo et al, 1994) koji se dalje u reakciji premeštanja prevodi u S-(karboksietil)-cistein, (Zeng i Davies, 2005). Pokušano je određivanje krajnjih proizvoda glikacije protein-tiol grupe metilglioksalom in vivo. Pokazano je da je nivo karboksietil-cisteina i karboksimetil-cisteina (nastalog u reakciji sa glioksalom) povećan u hidrolizatu proteina seruma pacijenata obolelih od dijabetesa sa nefropatijom u odnosu na kontrolu. Stoga je predložena primena karboksietil-cisteina (i karboksimetil-cisteina) kao markera u patološkim stanjima (Mostafa et al, 2007). Potencijalni značaj reakcije tiol-grupe proteina i α -dikarbonilnih jedinjenja (posebno metilglioksala) u umrežavanju proteina istaknut je do sada samo u radu Zeng i Davies-a (2006). Oni su predložili da proizvod po etne reakcije -SH grupe i metilglioksala, hemitioacetal, može dalje biti meta za reakciju sa amino-grupom.

Da bi se sprečile modifikacije proteina u uslovima karbonilnog stresa ispitivani su mnogi prirodni i sintetički inhibitori glikacije, kao što su aminoguanidin, piridoksamin, metformin i karnozin (Edelstein i Brownlee, 1992; Rahbar i Figarola, 2003; Ruggiero-Lopez et al, 1999). Potencijal tiola kao hvatača dikarbonilnih jedinjenja do sada nije dovoljno ispitan (Wondrak et al, 2002). Pokazano je da su pojedini tioli male molekulske mase potentniji inhibitori glikacije od poznatih inhibitora metformina, piridoksamina i karnozina (Wondrak et al, 2002; Zeng i Davies, 2006) i da je njihov potencijal da spreče umrežavanje proteina pod dejstvom metilglioksala približan potencijalu aminoguanidina.

Zastupljenost tiol-grupe na površini molekula proteina je znatno manja u odnosu na zastupljenost amino- i guanidino-grupa. Zato su se dosadašnja ispitivanja modifikacija proteina α -dikarbonilnim jedinjenjima bavila uglavnom njihovom reakcijom sa amino- i guanidino-grupama, iako je reaktivnost tiol-grupe proteina veoma velika.

Sve navedeno je doprinelo da ciljevi ove doktorske teze budu:

W Utvrđivanje doprinosa reakcije tiol-grupe i metilglioksala ukupnoj modifikaciji proteina, promenama njihovih svojstava i funkcija. Kao model-sistem za ispitivanje

procesa karbonilovanja proteina izabran je humani serum albumin (HSA), strukturno okarakterisan protein, koji ima samo jednu -SH grupu (Cys 34) na površini molekula, a 59 amino- i 24 guanidino-grupa (Westwood i Thornalley, 1995). HSA je najzastupljeniji protein plazme (koncentracije HSA iznosi oko 0.6 mM, što ini oko 60 % sadržaja ukupnih proteina plazme). Udeo Cys 34 tiol-grupe u sadržaju ukupnih tiola plazme ini oko 80 % i stoga ima značajnu ulogu u karbonilnom i oksidativnom stresu. Hvata je hidroksil-radikala (Bourdon i Blache, 2001). Antioksidativni kapacitet HSA se smanjuje reakcijama karbonilovanja (Faure et al, 2008). Promene na albuminu izazvane karbonilnim i oksidativnim stresom mogu da dovedu do promena njegove strukture, a time i do promena njegovih fizioloških funkcija (Schram et al, 2005).

W Utvrđivanje doprinosa reakcije karbonilovanja tiol-grupe metilgliksalom umrežavanju proteina (odnosno značaj ove reakcije u patogenezi mikro- i makroangiopatskih oboljenja).

W Ispitivanje kinetike i kompetitivnosti reakcija metilgliksala sa amino-, guanidino- i tiol-grupom ostataka aminokiselina na površini proteina.

W Razvijanje novih jednostavnih, preciznih i tačnih metoda za praćenje toka reakcije amino- i guanidino-grupa sa metilgliksalom. Metode su zasnovane na reakcijama sa p-benzohinonom (određivanje sadržaja amino-grupe) i sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit (određivanje sadržaja guanidino-grupe). Tok reakcije tiol-grupe praćen je spektrofotometrijskom metodom sa ditionitrobenzoevom kiselinom kao reagensom.

W Ispitivanje uticaja mikrookoline tiol-grupe na reakciju sa metilgliksalom. Ispitivanja su rađena sa proteinom (HSA) i tiolima male molekulske mase (Cys, N-acetil-cisteinom, karboksimetil-cisteinom i glutationom) u cilju predlaganja mehanizma reakcije. Reakcija tiola male molekulske mase i metilgliksala praćena je ¹H-NMR spektroskopijom, a promena sadržaja tiol-grupe u reakcionoj smeši praćena je spektrofotometrijski.

W Ispitivanje efikasnosti tiola male molekulske mase (GSH i NAcCys), a posebno tiola s -amino- -merkaptometanskom grupom (Cys i penicilamina) kao inhibitora reakcije HSA i metilgliksala. Pored tiola, u ovom ispitivanju upotrebljen je i metformin, lek koji se koristi u terapiji metaboličkog sindroma i dijabetesa. Modifikacija HSA molekula praćena je tokom vremena spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja neizreagovanih amino-, guanidino- i tiol-grupa, spektrofluorimetrijski i nativnom i SDS PAG elektroforezom. Ispitivanje promena u sekundarnoj strukturi rađeno je snimanjem CD spektara HSA u dalekoj UV oblasti.

W Ispitivanje mogu nosti primene odre ivanja sadržaja amino-, guanidino- i tiol-grupa na površini HSA kao markera karbonilnog stresa u klini koj praksi. Do sada nije razvijena metoda za detektovanje AGEs koja je opšte prihva ena ili u širokoj primeni, niti postoji dostupan kit za odre ivanje AGEs u dijagnosti ke svrhe. Naj eš e primenjene metode za detektovanje AGEs su HPLC, ELISA i imunohistohemijske. Pra enje promena u sadržaju bo nih ostataka aminokiselina na strukturno okarakterisanom, izolovanom proteinu, kao što je HSA, omogu ilo bi uvid u modifikaciju proteina u uslovima karbonilnog stresa in vivo (efekat ovih promena na njegovu funkciju) i njegovu primenu kao markera karbonilnog stresa u klini koj praksi. Zato je odre ivan sadržaj slobodnih amino-, guanidino- i tiol-grupa na HSA, izolovanom iz seruma pacijanata obolelih od dijabetesa tip 2 (koji su bili hospitalizovani zbog loše metaboli ke kontrole dijabetesa) kao i iz seruma zdravih osoba (kontrolne grupe).

2. Pregled literature

Neenzimsko glikozilovanje (ili glikacija) je reakcija redukcije šećera, sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama, koja se odvija bez učestvovanja enzima. Početkom prošlog veka, primenjeno je da se pri termičnoj obradi hrane dešava reakcija između amino-grupe aminokiselina i aldehidne grupe šećera (glukoze). Utvrđeno je da između redukcije šećera i amino-kiselina dolazi do reaktivnog niza reakcija, koje se označavaju kao Maillard-ova reakcija. Neenzimsko glikozilovanje, odnosno reakcije redukcije šećera i aldehida sa nukleofilima na biomolekulima odvijaju se i pri blagim, fiziološkim uslovima *in vivo*, a nastali proizvodi ovih reakcija se označavaju kao krajnji proizvodi glikacije, skraćeno AGEs (od eng. Advanced Glycation End products).

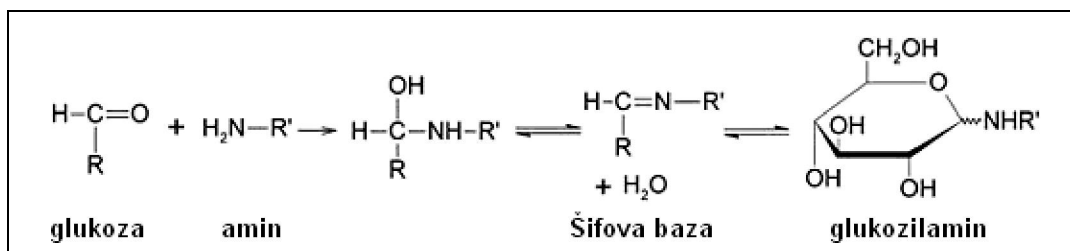
2.1. Maillard-ova reakcija

Louis Camille Maillard je 1912., ispitivao reakciju glukoze i glicina pri zagrevanju i otkrio da redukcija šećera reaguje sa aminokiselinama i daju žuto-brončane proizvode. Reakcija inicijalno počinje kada aldehidna grupa redukcije šećera reaguje sa amino grupom (nukleofilnom grupom) aminokiseline, peptida ili proteina. Reakcija je veoma kompleksna, naime dolazi do višestrukih reakcija premeštanja i fragmentacije šećerne komponente, usled čega postoje brojna grananja u reakcionom putu. Maillard-ova reakcija može da dovede do nastanka velikog broja jedinjenja koja utiču na aromu, ukus i boju hrane. Upravo zbog toga, u industriji hrane i aroma Maillard-ova reakcija ili neenzimsko tamnjenje hrane ima veliki značaj (Peng et al, 2011).

Maillard-ova reakcija se može podeliti na tri faze. Reakcija počinje brzim reverzibilnim kovalentnim vezivanjem redukcije šećera, odnosno aldehidne grupe za N-terminalnu ili α -amino-grupu proteina, ili amino grupu fosfolipida i nukleinskih kiselina, pri čemu nastaje Šifova baza, odnosno nestabilni N-supstituisan glikozilamin (i oslobađa se jedan molekul vode, Slika 1).

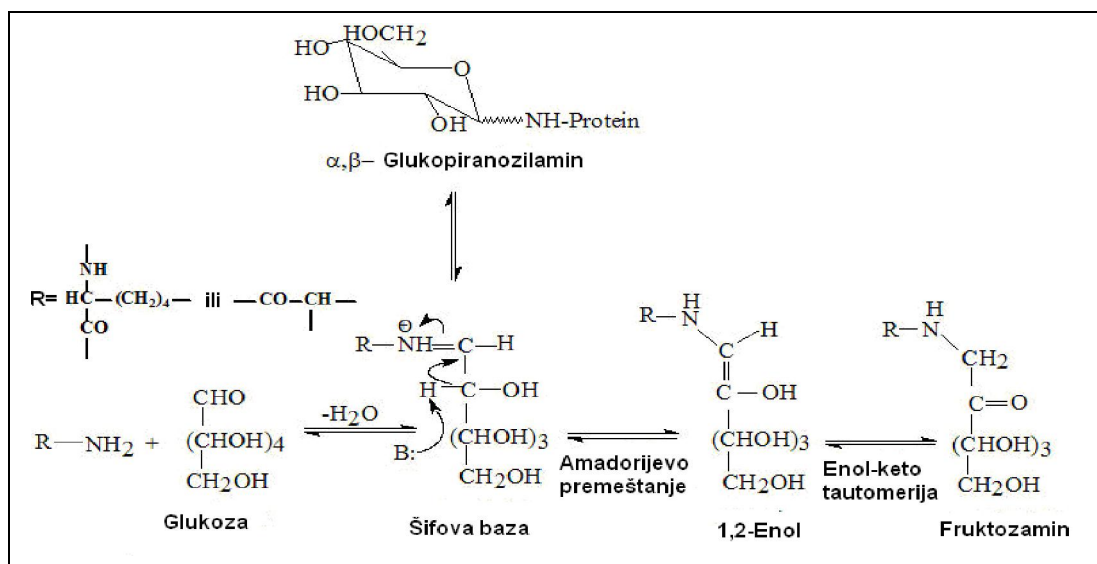
U drugoj fazi glikozilamin, u ravnoteži sa Šifovom bazom, podleže reakciji takozvanog Amadorijevog premeštanja. Dolazi do izomerizacije Šifove baze, pri čemu nastaju stabilniji proizvodi, uglavnom ketozamini (1-amino-1-deoksi-2-ketoza; u slučaju

glukoze fruktozamin, Slika 2). Smatra se da se Amadorijevo premeštanje odvija preko intermedijera enolnog oblika (enaminal intermedijera, Ulrich i Cerami, 2001).



Slika 1. Prva faza Maillard-ove reakcije – nastanak N-supstituisanog glukozilamina (Peng et al, 2011)

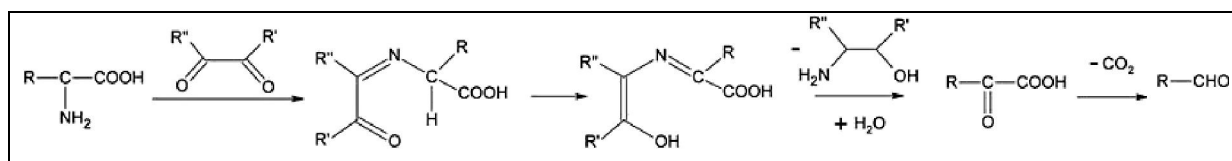
Druga faza Maillard-ove reakcije je sporija od nastanka Šifove baze (prva faza reakcije se odvija u toku nekoliko sati, a druga u toku više dana), ali dovoljno je brza da dovede do akumuliranja ovih adukata u proteinima.



Slika 2. Druga faza Maillard-ove reakcije – Šifova baza podleže Amadorijevom premeštanju pri emu nastaje fruktozamin (Zheng et al, 2012)

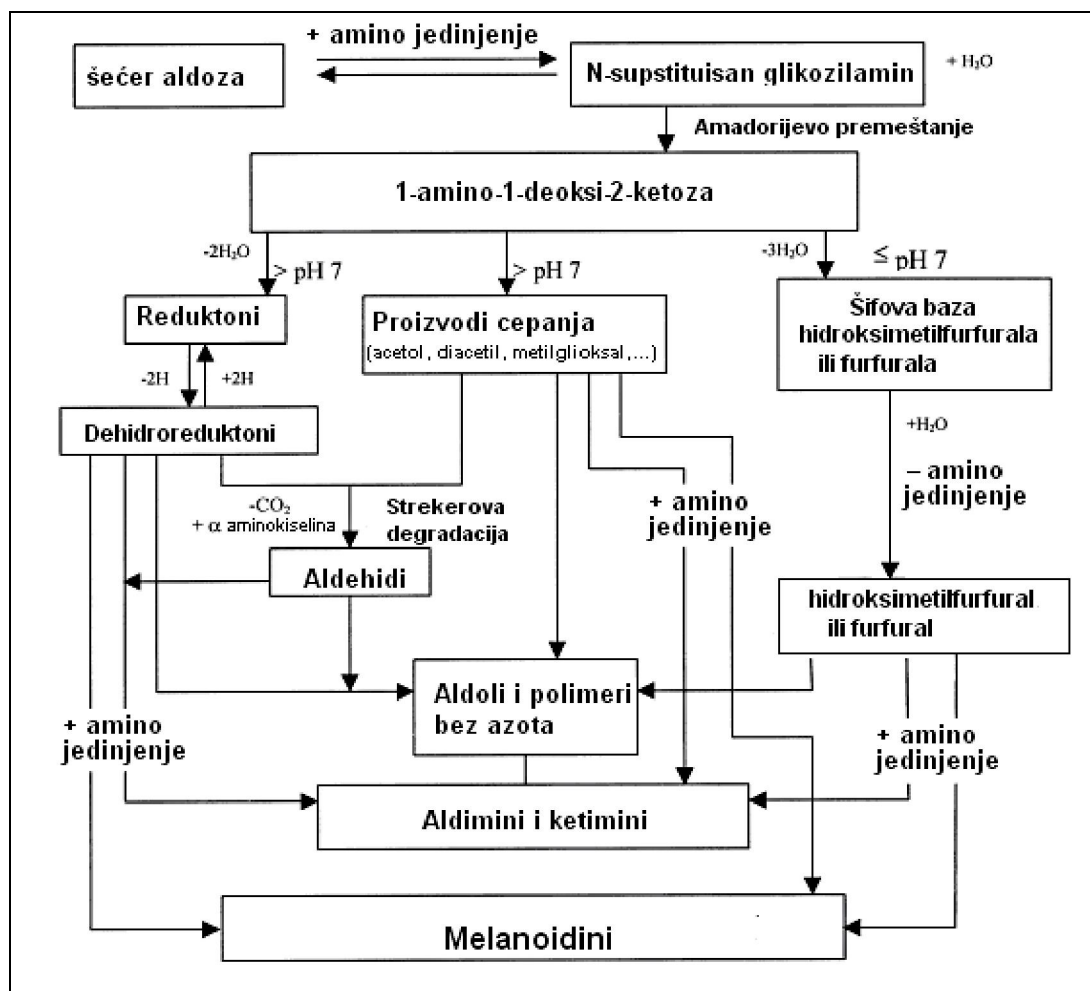
U tre ojoj, završnoj fazi Maillard-ove reakcije, nastali ketozamin se dalje može transformisati na više na ina. Može do i do dalje dehidratacije (uz gubitak još dva molekula vode) pri emu nastaju proizvodi karamelizacije – reduktoni i dehidroreduktoni. Drugi put transformacije ketozamina dovodi do nastajanja kratkolan anih proizvoda – kao što su diacetil, acetol, metilglioksal. Ova dikarbonilna

jedinjenja mogu dalje u estrovati u Strekerovoj degradaciji (Slika 3), odnosno reagovati sa drugom aminokiselinom, grade i aldehid, ili pak može do i do njihove aldolne kondenzacije, pri emu nastaju neaminski derivati.



Slika 3. Tre a faza Maillard-ove reakcije, Strekerova degradacija (Ulrich i Cerami, 2001)

Tre i put vodi od Šifove baze do furfurala, koji u reakcijama sa aminokiselinama (uz gubitak tri molekula vode), dovodi do stvaranja polimera i kopolimera koji sadrže azot, i koji se nazivaju melanoidi (Slika 4).

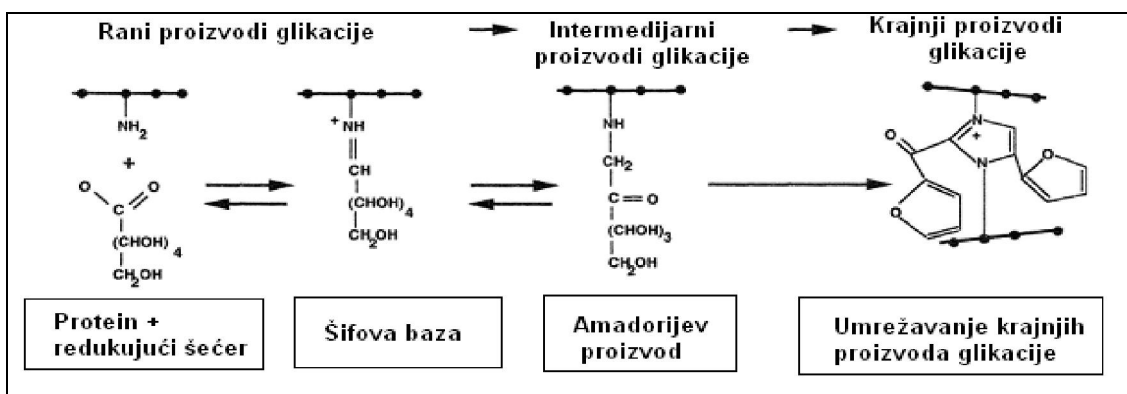


Slika 4. Šematski prikaz Maillard-ove reakcije (prema Hodge, 1955).

2.2. Neenzimsko glikozilovanje (glikacija) in vivo

Proces neenzimskog glikozilovanja in vivo, koji se odvija pri fiziološkim uslovima, može se uporediti sa Maillard-ovom reakcijom u hrani, pa se ove reakcije esto označavaju kao reakcije Maillard-ovog tipa. Većina, ili čak sve žive ćelije su zavisne od monosaharida kao što je glukoza, kao izvora energije i ugljenika. Većina iz ove činjenice proističe da je neenzimsko glikozilovanje neizbežna reakcija u živim sistemima.

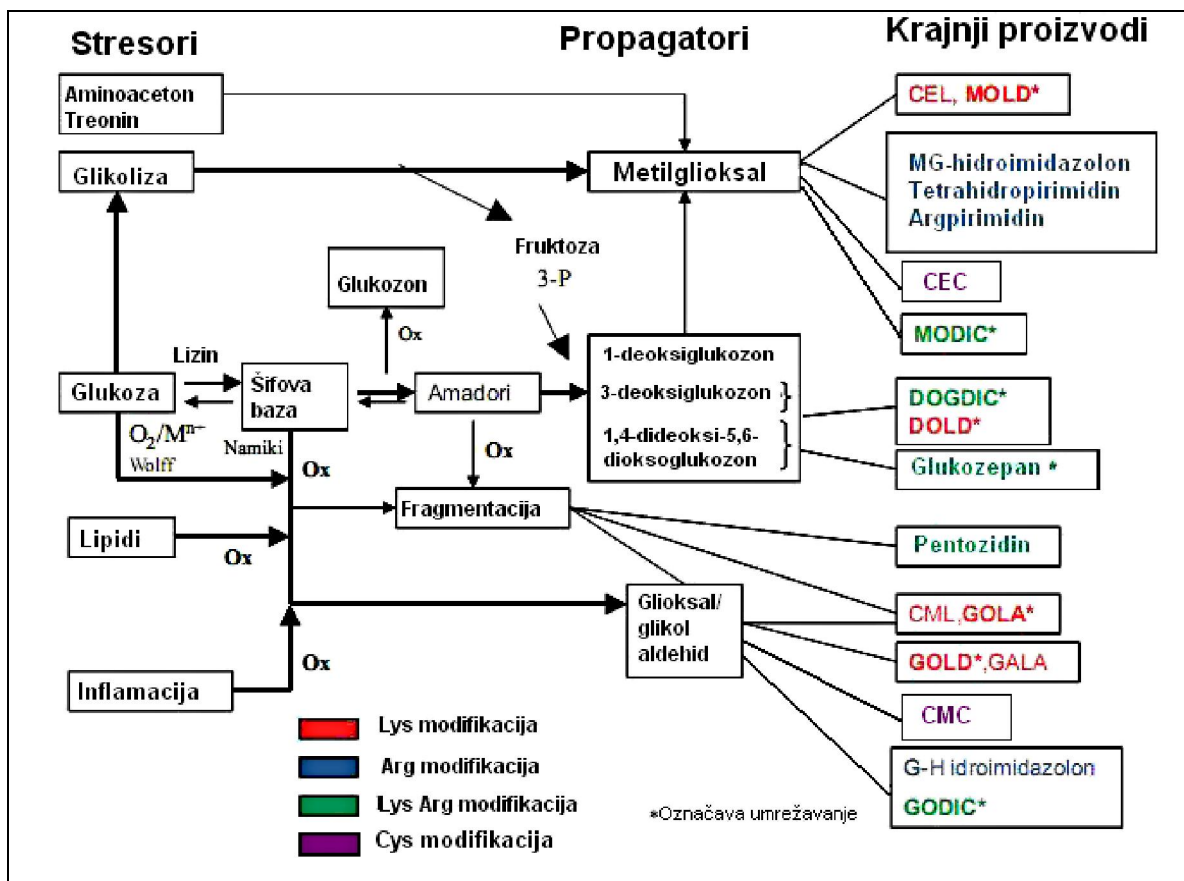
Na Slici 5. šematski je prikazan glavni reakcioni put nastanka krajnjih proizvoda glikacije u Maillard-ovoj reakciji amino-grupe proteina (N-terminalne ili -) in vivo. U reakciji kondenzacije, redukuju i šećer i amino-grupa makromolekula grade reverzibilan adukt Šifovu bazu, aldimin. Reverzibilno intramolekulsko premeštanje dovodi do stvaranja stabilnijeg, Amadorijevog proizvoda, ketoamina (npr. fruktozo-lizina u slučaju reakcije glukoze sa α -amino-grupom lizina). Dalje premeštanje, dehidratacija, β -eliminacija i kondenzacija dovode do ireverzibilnog nastanka krajnjeg proizvoda, koji može praktično predstavljati umreženi protein, odnosno biomakromolekul, preko amino-grupe (Bierhaus et al, 1998a).



Slika 5. Nastanak umreženih krajnjih proizvoda glikacije u Maillard-ovoj reakciji in vivo (Bierhaus et al, 1998a).

Maillard-ova reakcija in vivo obuhvata tri kinetička faktora: stresore, molekule koji su izvor karbonilnih vrsta i koji pokreću reakcije glikacije; propagatore - reaktivna karbonilna jedinjenja kao što su metilgliksal, gliksal, 3-deoksiglukozon i krajnje proizvode glikacije, koji nastaju reakcijom reaktivnih karbonilnih vrsta sa bo-nim

aminokiselinskim ostacima proteina (Slika 6.). Inicijatori Maillard-ove reakcije in vivo su glukoza i intermedijeri glikolize. Metabolizam aminokiselina Gly i Tre, lipida i ketonskih tela, i proces inflamacije, dovode do stvaranja proizvoda glikacije. U daljim reakcijama nastaju dikarbonilna jedinjenja, koja su propagatori reakcija neenzimskog glikozilovanja (Slika 6., (Monnier, 2003)).



Slika 6. Reakcije dikarbonilnih intermedijera sa bo nim aminokiselinskim ostacima na proteinima i krajnji proizvodi glikacije, prema (Monnier, 2003; Zeng i Davies, 2006). CEL-karboksietil-lizin, MOLD-metilglioksal lizin dimer, MG-metilglioksal, CEC-karboksietil-cistein, MODIC-metilglioksal-imidazolonsko umreženje, DOGDIC-deoksi-glukozon -imidazolonsko umreženje, DOLD-deoksi-glukozon lizin dimer CML-karboksietil-lizin GOLA- glioksal lizin amid GOLD-glioksal lizin dimer GALA-glikolaldehid lizin amid CMC-karboksietil-cistein, G-glioksal, GODIC-glioksal-imidazolonsko umreženje.

Maillard-ova reakcija se u živim sistemima odvija u tri faze. U prvoj fazi, nastaju Amadorijevi proizvodi u reakciji glukoze (ili drugih redukuju ih še era – fruktoze, galaktoze, manoze, askorbata, ksiluloze) sa amino-grupama proteina,

nukleinskih kiselina i lipida. U in vivo uslovima nastajanje Amadorijevog proizvoda dostiže stanje ravnoteže posle približno 15-20 dana i ovi proizvodi se akumuliraju u proteinima, posebno u onima sa dugim plizivotom. U intermedijernoj fazi Maillard-ove reakcije in vivo, dolazi do reakcija oksidacije i dehidracije, Amadorijevi proizvodi se razlažu, nastaju dikarbonilna jedinjenja. Ova jedinjenja, kao mnogo reaktivnija od samog šeera od kojeg potiču, deluju kao propagatori reakcije i opet reaguju sa amino-grupama proteina. U kasnom stadijumu glikacije dolazi do daljih reakcija oksidacije, dehidracije i ciklizacije, nastaju esto žuto do braon proizvodi, esto fluorescentna nerastvorna jedinjenja – krajnji proizvodi glikacije (AGEs). AGEs dovode do oštećenja tkiva (Lapolla et al, 2005) usled umrežavanja ekstracelularnih proteina, interakcija sa specifičnim receptorima na ćelijama i glikacije unutar samih ćelija (Lapolla et al, 2005).

2.3. Krajnji proizvodi reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina (AGEs)

Ispitivanjem reakcije kondenzacije D-glukoze sa aromatičnim aminima Mario Amadori je pokazao da nastaju dva strukturno različita izomera: jedan N-glukozilamin, koji je nestabilniji i podložniji razlaganju u prisustvu vazduha, i drugi, Šifova baza, za koji je smatrao da je stabilniji (Amadori, 1929). Kasnije je utvrđeno da stabilniji proizvod nije Šifova baza, već da stabilniji proizvod fruktozamin nastaje upravo molekulskim preureivanjem (Amadorijevim premeštanjem) Šifove baze (Hodge, 1953). Fruktozamin se dalje razgrađuje do glukazona i drugih proizvoda putem enolizacije, oksidacije i reakcija fragmentacije.

Rahbar S. je 1968. godine prvi utvrdio brze hemoglobinske trake na elektroforegramu hemoglobina iz uzoraka krvi dijabetičara na acetatu celuloze (Rahbar, 1968). Tako je otkriven Amadorijev proizvod reakcije neenzimskog glikozilovanja hemoglobina – glikozilovan hemoglobin, HbA1c. Kod zdravih osoba zastupljenost ove hemoglobinske frakcije je minorna, ali kod osoba obolelih od dijabetesa dolazi do povećanog formiranja glikozilovanog hemoglobina. Ova modifikacija hemoglobina nastaje reakcijom glukoze sa amino grupom N-terminalnog ostatka valinlanca hemoglobina. Pokazano je da određivanje udela HbA1c kod dijabetičara omogućava procenu kakva je bila regulacija nivoa glukoze u krvi u vremenskom periodu od 6 – 8 nedelja, koji je prethodio uzimanju uzorka (Koenig et al, 1976).

Po etkom 80-tih godina, prepoznat je značaj kompleksnih procesa u završnim fazama Maillard-ove reakcije. Proteini koji sadrže Amadorijeve proizvode označavaju se kao neenzimski glikozilovani (glikovani) proteini, a proces kao glikacija (da bi se napravila razlika u odnosu na enzimski katalizovan proces glikozilovanja proteina, Ulrich i Cerami, 2001). Cerami i saradnici (1986) su prvi upotreбили termin advanced glycation end products (AGEs), da označe "braon fluorescentne pigmente koji umrežavaju proteine", a koji nastaju u toku razgradnje fruktozamina. Oni su primetili da u zidu arterija pacova sa dijabetesom dolazi do povećanog umrežavanja kolagena i da nastala AGEs jedinjenja pokazuju fluorescenciju. Tako je uveden pojam AGEs - proizvoda koji nastaju u poslednjim fazama procesa glikacije proteina, odnosno u toku Maillard-ove reakcije in vivo. Tokom 80-tih i 90-tih godina veliki broj radova je ukazao na to da su AGEs medijatori brojnih komplikacija u dijabetesu i starenju. Do danas se intenzivno razvijaju lekovi i vrše klinička ispitivanja u cilju sprečavanja posledica nastanka AGEs. Krajnji proizvodi reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina su veoma heterogena grupa jedinjenja. Mnoga ova jedinjenja su prvo dobijena in vitro a zatim identifikovana i in vivo. U Tabeli 1. dat je pregled komercijalno dostupnih AGEs.

Tabela 1. Pregled komercijalno dostupnih krajnjih proizvoda reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina (PolyPeptide Group u saradnji sa IMARS-Medjunarodnim društvom za Maillard-ovu reakciju, <http://www.imars.org/online>)

Skraćenice i trivijalni nazivi	Nazivi	Karakteristike
Argpirimidin	(2S)-2-amino-5-(5-hidroksi-4,6-dimetil-pirimidin-2-il-amino)-pentanska kiselina.	Argpirimidin je fluorescentni adukt metilglioksala i ostatka Arg
CEL	-N-karboksietil-L-lizin (smeša 2 dijastereizomera)	Proizvod Maillard-ove reakcije koji se može koristiti kao marker u dijabetesu
CML	-N-karboksimetil-L-lizin	Proizvod Maillard-ove reakcije koji se može koristiti kao marker u dijabetesu, patologiji starenja ili u ispitivanju termičkog oštećenja hrane
G-H1	(2S)-2-amino-5-(4-okso-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il-amino)-pentanska kiselina (smeša dva izomera)	Izomer hidroimidazolona dobijen u reakciji glioksala i ostatka Arg

Tabela 1. nastavak

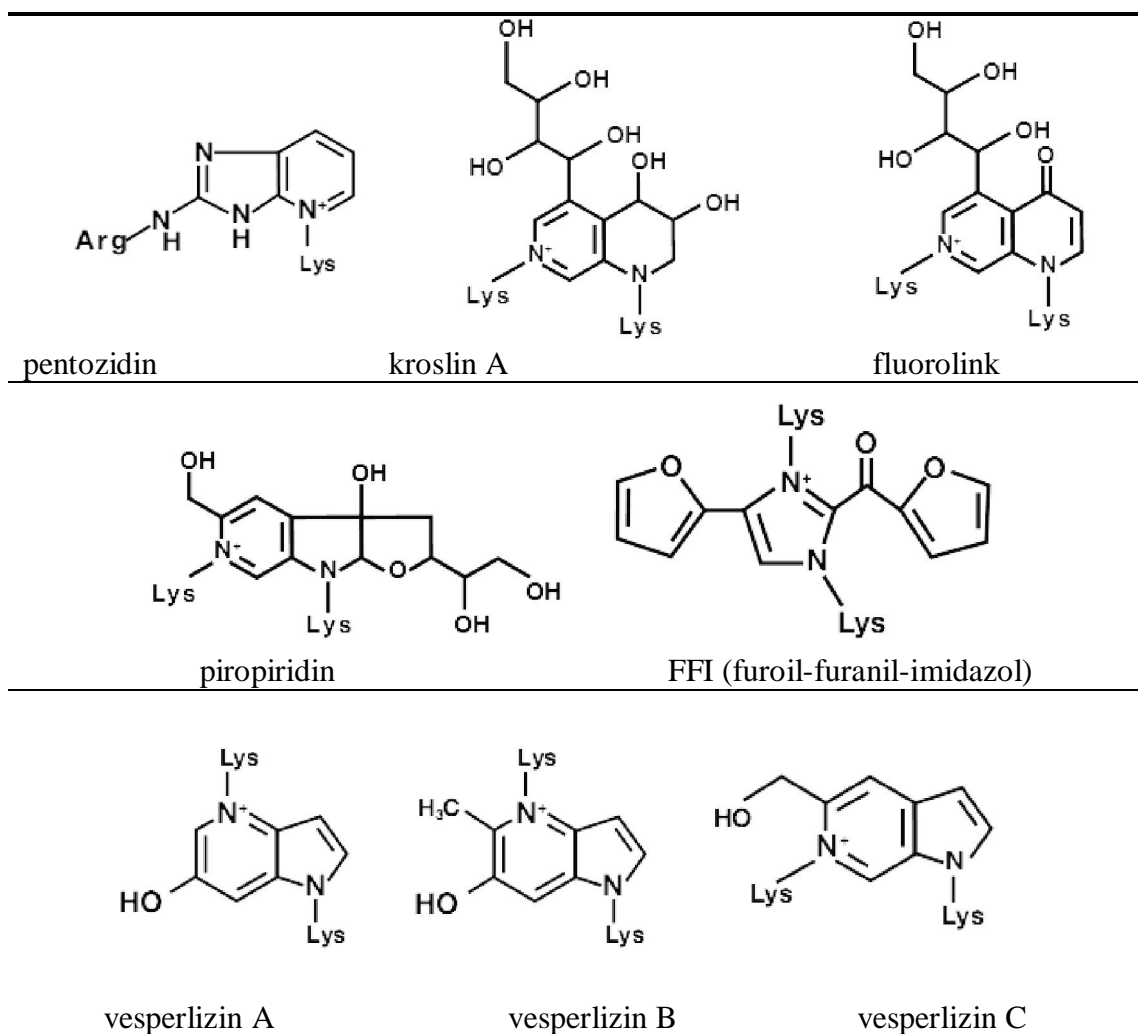
G-H2	(2S)-2-amino-5-(2-amino-4-okso-	
------	---------------------------------	--

	4,5-dihidro-imidazol-1-il)-pentanska kiselina	Izomer hidroimidazolona dobijeni u reakciji glioksala i ostatka Arg
G-H3	(2S)-2-amino-5-(2-amino-5-okso-4,5-dihidro-imidazol-1-il)-pentanska kiselina.	
GALA	(2S)-2-amino-6-(2-hidroksi-acetilamino)-heksanska kiselina	Dobijen iz Amadori proizvoda glukoze i ostatka Lys
GOLA	(2S)-2-amino-6-(((5S)-5-amino-5-karboksi-pentilkarbamoil)-metilamino]-heksanska kiselina	Dobijen iz Amadori proizvoda glukoze i ostatka Lys
GOLD	1,3-bis(5-amino-5-karboksipentil)-3H-imidazolijum acetat	Imidazolijumsko umreženje nastalo od glioksala i ostatka Lys.
MOLD	1,3-bis(5-amino-5-carboksipentil)-4-metil-3H-imidazolijum acetat	Imidazolijumsko umreženje nastalo od metilglioksala i ostatka Lys.
MG-H1	(2S)-2-amino-5-(5-metil-4-okso-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il-amino)-pentanska kiselina (smeša 4 izomera)	
MG-H2	(2S)-2-amino-5-(2-amino-5-methyl-4-okso-4,5-dihidro-imidazol-1-il)-pentanska kiselina, acetat (smeša 2 dijastereoizomera)	Izomeri hidroimidazolona dobijeni od metilglioksala i ostatka Arg
MG-H3	(2S)-2-amino-5-(2-amino-4-metil-5-okso-4,5-dihidro-imidazol-1-il)-pentanska kiselina (smeša 2 dijastereoizomera.)	
Zašti en DHP-Lizin	(2S)-Boc-2-amino-6-(3,5-diformil-4-metil-4H-piridin-1-il)-heksanska kiselina, t-butyl estar	Posle uklanjanja Boc i t-butanol grupe (protokol dostupan uz proizvod), ovaj dihidropiridinski derivat se može koristiti kao umreženi proizvod dobijen od malondialdehida i ostatka Lys.
Pentozidin		Fluorescentno umreženje nastalo od ostataka Lys i Arg, preko pentoze. Može se koristiti kao marker u starenju i bolesti. Može se odrediti HPLC metodom.
Piralin	(2S)-2-amino-6-(2-formil-5-hidroksimetil-pirol-1-il)-heksanska kiselina	Proizvod dobijen u reakciji glukoze i ostatka Lys
(+)-Deoksi-piridinolin		Umreženje kolagena kostiju, detektovan u humanom urinu, koristi se kao marker bolesti kostiju, osteoporoze, i kancera kostiju. Referentni je standard u dijagnostici bolesti (HPLC metoda).

2.3.1. AGEs koji fluoresciraju i predstavljaju mesta umrežavanja u proteinima

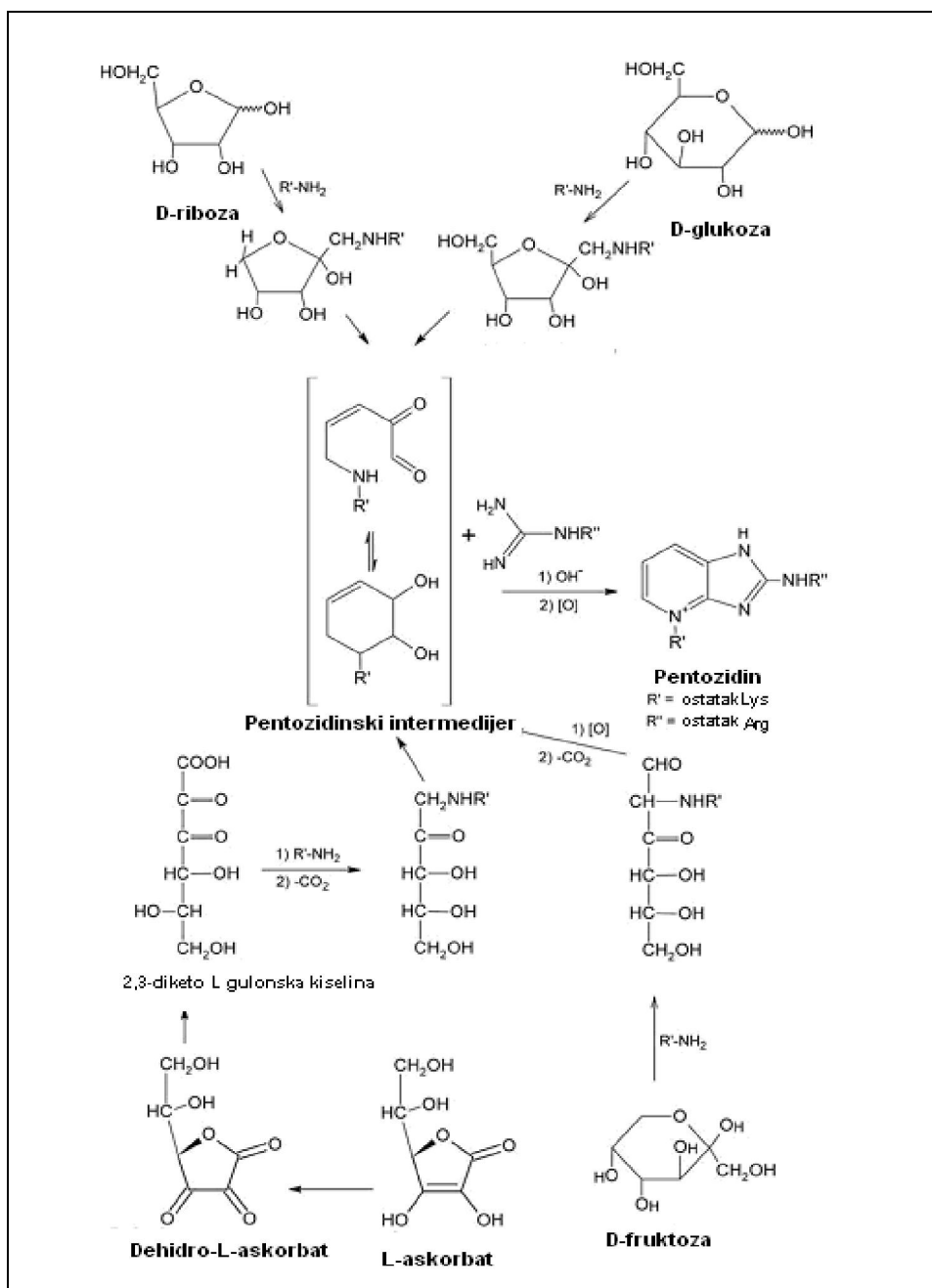
Pored mrke boje, svojstvo fluorescencije je, sa stanovišta detekcije, važno kvalitativno svojstvo nekih, do sada poznatih, krajnjih proizvoda glikacije. U literaturi se ovo svojstvo navodi kao fluorescencija Maillard-ovog tipa. Upravo zahvaljuju i fluorescenciji su bili detektovani i izolovani prvi AGEs, kao što je pentozidin. Na ovom svojstvu zasniva se kvantitativno određivanje tzv ukupnih AGEs u biološkim uzorcima i u in vitro ispitivanjima; primenom fluorescentne spektroskopije (meri se emisija na 440 nm posle eksitacije na 370 nm). Primeri struktura umreženih AGEs koji fluoresciraju dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. Pregled strukturalnih formula krajnjih proizvoda reakcije neenzimskog glikozilovanja, odnosno AGEs koji fluoresciraju i koji predstavljaju mesta umreženja proteina.



Prvi od krajnjih proizvoda glikacije koji je izolovan iz kolagena, kao fluorescentno jedinjenje stabilno u kiseloj sredini bio je pentozidin (Sell i Monnier, 1989). Pokazano je da nastaje u reakciji Lys i Arg bojih ostataka proteina bilo sa

glukozom, fruktozom ili askorbatom u aerobnim uslovima. Dakle, predstavlja strukturu nastalu umrežavanjem ova dva bo na ostatka proteina (Slika 8, Grandhee i Monnier, 1991).



Slika 7. Nastajanje pentozidina, kao fluorescentnog mesta umreženja ostatka Lys i Arg, (prema Grandhee i Monnier, 1991)

Pentozidin je jedan od najviše proučavanih krajnjih proizvoda glikacije i smatra se markerom oštećenja proteina usled neenzimskog glikozilovanja. Do sada je identifikovan u brojnim tkivima. Detektovan je u kolagenu kože i proteinima soiva,

gde se nagomilava sa starenjem i u dijabetesu. Pokazano je da je kod pacijenata obolelih od dijabetesa 2 koji imaju nefropatiju, značajno povišen nivo pentozidina u kolagenu kože (Beisswenger et al, 1993) u plazmi i u urinu (Calabrese et al, 2007), i.

U literaturi su navođeni još neki AGEs, koji fluoresciraju i predstavljaju mesta umrežavanja proteina (Tabela 2), od kojih su in vivo detektovani kroslini A i B i vesperlizini A, B i C (Ulrich i Cerami, 2001).

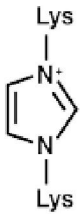
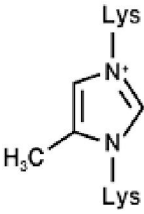
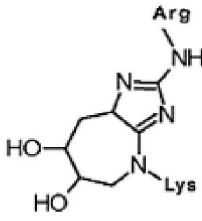
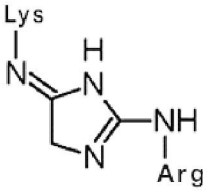
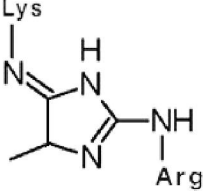
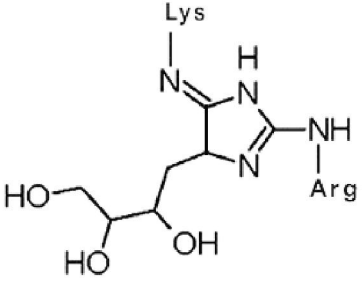
2.3.2. AGEs koji ne fluoresciraju, ali predstavljaju mesta umrežavanja u proteinima

Smatra se da od svih AGEs koja su mesta umrežavanja u proteinima in vivo, samo jedan procenat ima one strukture koje imaju svojstvo fluorescencije. Može se zaključiti da AGEs, koji su značajni za umrežavanja proteina in vivo, možda još nisu identifikovani (Ulrich i Cerami, 2001). Strukture AGEs koji nastaju pod fiziološkim uslovima i učestvuju u umrežavanju proteina, a ne fluoresciraju, dati su u Tabeli 3.

Imidazolske i lizinske strukture, GOLD (glioksal-lizin dimer) i MOLD (metilglioksal-lizin dimer), nastaju u reakciji dva lizinska boja sa ostacima glioksalom odnosno metilglioksalom. Načeno je da su u proteinima tkiva, osoba obolelih od dijabetesa i ateroskleroze, ove strukture prisutne u 10-50 puta većoj koncentraciji od pentozidina (Degenhardt et al, 1998). Oni su glavni krajnji proizvodi glikacije proteina i njihov nivo i njihova koncentracija raste sa starenjem (Ulrich i Cerami, 2001).

Lizinsko-argininske strukture. Pretpostavka Eble i saradnika (1983) da su glavne umrežene strukture krajnjih proizvoda glikacije možda nestabilne u uslovima kisele hidrolize proteina i da se zato ne mogu detektovati, dovela je do enzimске digestije glikovanih proteina. Hidroliza HSA modifikovanog sa glukozom i dikarbonilnim intermedijerima in vitro, pokazala je da do umrežavanja dolazi i izmeđubojnih ostataka lizina i arginina. Dobijene strukture su označene kao GODIC (dobijena sa glioksalom, kao imidazolijum-umrežavanje), MODIC (dobijena sa metilglioksalom, kao imidazolijum-umrežavanje), DOGDIC (dobijena sa 3-deoksiglukonozonom, kao imidazolijum-umrežavanje) i glukozepan. MODIC, GODIC i glukozepan strukture se stvaraju in vivo i mogu biti važni markeri u procesu starenja i patogenezi komplikacija u dijabetesu (Biemel et al, 2002).

Tabela 3. Pregled strukturnih formula AGEs koji ne fluoresciraju, a koji predstavljaju mesta umrežavanja u proteinima

		
glioksal-lizin dimer, GOLD	metilglioksal-lizin dimer, MOLD	glukozezan
		
glioksal-imidazolonsko umreženje, GODIC	metilglioksal- imidazolonsko umreženje, MODIC	3-deoksiglukozon- imidazolonsko umreženje, DOGDIC

Glukozezan je lizinsko-argininski derivat koji nastaje umrežavanjem ovih ostataka u proteinima u prisustvu metilglioksala, glioksala, 3-deoksiglukozona ili glukoze. Identifikovan je u vezivnom tkivu – kolagenu, u kristalinu oka i bazalnoj membrani glomerula. Akumulira se u kolagenu u dijabetesu i sa starenjem. Procenjeno je da je u kolagenu dijabeti ara prisutno jedno glukozezansko umreženje na 2 svaka molekula kolagena, dok je kod zdravih osoba prisutno jedno glukozezansko umreženje na 5 molekula kolagena. Glukozezan je mnogo u estaliji AGEs u kolagenu nego pentozidin, pošto se jedna struktura pentozidina pojavljuje na 20 molekula kolagena. Glukozezanske strukture dovode do nemogu nosti digestije kolagena i time do poreme aja u njegovom metabolizmu (turnover) u koži dijabeti ara. U so ivu oka glukozezan predstavlja minornu strukturu (Sell et al, 2005).

2.3.3. AGEs koji nisu umrežene strukture

Pored AGEs koji su mesta umrežavanja proteina, kao proizvodi neenzimskog glikozilovanja proteina identifikovane su i neumrežene strukture AGEs (Tabela 4.)

Tabela 4. Pregled AGEs koji nisu umrežene strukture

Jedinjenja koja su proizvodi ostatka Lys			
karboksimetil-lizin, CML	karboksietil-lizin, CEL	piralin (pirol aldehyd)	
Jedinjenja koja su proizvodi ostatka Arg			
argpirimidin	metilgliksal-hidroimidazon, MG-H1	karboksimetil-arginin, CMA	3DG-imidazon, 3DG-H
Jedinjenja koja su proizvodi ostatka Cys			
karboksimetil-cistein		karboksietil-cistein	

Derivati ostatka Lys, karboksimetil-lizin (CML) i karboksietil-lizin (CEL), nastaju oksidativnim razlaganjem ranog proizvoda glikacije nastalog u reakciji bo nog ostatka lizina sa glukozom, odnosno razlaganjem fruktozilina. Reakcija lizina sa dikarbonilnim jedinjenjima, gliksalom i metilgliksalom i reakcija sa askorbinskom kiselinom, tako e dovodi do stvaranja CML (Peng et al, 2011). U organizmu, CML nastaje razlaganjem proteina ošte enih glikacijom, tako da pored toga što se nalazi u obliku vezanom za proteine, nalazi se i u slobodnom obliku. CML ini 30-40 % svih

lizinskih krajnjih adukata glikacije u humanom urinu. Detektovan je u serumu i urinu pacova, i predložen je da bude pokazatelj glikoksidativnog oštećenja bubrega pacova usled starenja. U kolagenu kože dijabetičara zastupljenost CML je dvostruko veća u odnosu na kolagen kože zdravih ljudi. Pokazano je da i kada se ne detekuje značajno povećanje CML u proteinima plazme dijabetičara tipa 1, ipak dolazi do višestrukog povećanja slobodnog CML u plazmi, i do dvostrukog povećanja CML u urinu u odnosu na kontrolu (Ahmed et al, 2005).

Piralin je struktura koja nastaje u reakciji 3-deoksiglukoza sa bovinim ostatkom lizina. Detektovan je u mozgu pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti (Sell et al, 2005).

Imidazoloni su strukture koje nastaju kao derivati Argbovinih ostataka u reakciji sa gliksalom, a hidroimidazoloni u reakciji sa metilgliksalom. Zastupljenost ovih struktura u tkivu oka in vivo je najveća u odnosu na sve do sada poznate krajnje proizvode glikacije (Sell et al, 2005). Smatra se da imidazon H1 i hidroimidazon H1 stvoreni in vivo, imaju relativno kratak polужivot od 2-6 nedelja (Popova et al, 2010). Glavni adukti u proteinima plazme dijabetičara su hidroimidazoloni MG-H1 i 3DG-H.

Modifikacija -SH grupa proteina je manje izučena od modifikacija amino- i guanidino-grupa. Derivati ostatka Cys karboksimetil-cistein (nastao u reakciji sa gliksalom) i karboksietil-cistein (nastao u reakciji sa metilgliksalom) su identifikovani kao AGEs u hidrolizatu proteina i predloženi kao dobri markeri za detektovanje povećanog nivoa dikarbonila u patološkim stanjima. Pokazano je da je nivo karboksietil-cisteina i karboksimetil-cisteina povećan u hidrolizatu proteina seruma pacijenata obolelih od dijabetesa sa nefropatijom u odnosu na kontrolu (Alt et al, 2004; Mostafa et al, 2007; Thorpe i Baynes, 2003).

2.4. Efekti (posledice) reakcija neenzimskog glikozilovanja i nastanka krajnjih proizvoda glikacije

Glikacija proteina. Neenzimsko glikozilovanje je u fiziološkim uslovima spor proces, koji dovodi do modifikacije Lys i Argbovinih ostataka proteina i unutar i van

elije. Unutar elija, nasuprot uticaju glikacije deluje velika brzina biosinteze i razgradnje proteina, uticaj glikacije na pojedine proteine upravo zavisi od dužine njihovog poluživota. U proteinima sa dugim poluživotom dolazi do akumuliranja AGEs struktura, čak i do 10 puta više nego u proteinima sa kratkim poluživotom (Popova et al, 2010).

Prve otkrivene AGEs strukture in vivo su bile na molekulu hemoglobina, čiji poluživot iznosi oko 120 dana. Glikacija hemoglobina ima za posledicu da on lakše podleže oksidaciji. Većina efekata glikacije, koja dovodi do komplikacija u dijabetesu i starenju, posledica je promena na proteinima sa dugim poluživotom, kao što su kolagen i kristalinonogostiva. Posebno su značajne ovakve promene na kolagenu krvnih sudova, koje dovode do ateroskleroze i koronarnih bolesti, oštećenja bubrega, retine, slabe periferne cirkulacije.

Tokom normalnog formiranja fibrila kolagena, lizil-oksidaza katalizuje oksidaciju α -amino grupe nekih ostataka hidrosilizina i lizina do aldehida. Ovi aldehidi zatim reakcijom sa ostacima lizina i hidrosilizina na susednim molekulima kolagena dovode do umrežavanja i formiranja kolagenskih fibrila. Ovaj proces je samoograničen time, što kad dođe do nastanka fibrila, ne može doći do daljeg umrežavanja molekula kolagena pošto kolagen u fibrilu ne može više biti supstrat za lizil-oksidazu (dolazi do sternih smetnji). Evolutivno je rešeno da se završetkom ovog procesa na taj način dobijaju kolagenski fibrili koji imaju optimalno uravnotežene vrstoću i fleksibilnost. Međutim, proces umrežavanja kolagenskih krajnjih proizvoda glikacija nema ovakvih ograničenja, prisutan je i u zrelih molekulima kolagena i dovodi do preteranog umrežavanja što za posledicu ima gubitak elastičnosti, fleksibilnosti i povećanje krutosti. Istovremeno dolazi i do vezivanja egzogenih molekula za kolagen, čime se površina kolagena patološki menja što može dovesti do preteranog aktiviranja mehanizma za reparaciju tkiva.

Glikacija i umrežavanje molekula kolagena vaskularnog tkiva dovodi do komplikacija u cirkulaciji u dijabetesu, kao što je smanjena elastičnost krvnih sudova i disfunkcija miokarda. Akumuliranje proteina plazme na strukturnim proteinima dovodi do formiranja zadebljanja na bazalnoj membrani i nastajanja ateroskleroze. Kod životinja i kod ljudi pokazano je da postoji značajna korelacija između gubitka elastičnosti strukturnog kolagena i starenja (Ulrich i Cerami, 2001).

U eukariotskim ćelijama izmenjeni proteini mogu biti eliminisani delovanjem lizozoma i proteazoma. Sa starenjem i u patološkim stanjima ovi mehanizmi imaju vrlo ograničen potencijal da spreče akumuliranje krajnjih proizvoda neenzimskog

glikozilovanja. U procesu starenja dolazi do smanjenja funkcije lizozoma i sistemskog smanjenja funkcije proteazoma. Pored toga u mnogim tipovima elija dolazi do različitih uticaja na funkciju proteazoma. Većina umreženih struktura krajnjih proizvoda glikacije, koje nastaju u nekoliko neurodegenerativnih bolesti, ne može više da se "uklapa" u proteazome. Akumuliranje oštećenih proteina inhibira aktivnost proteazoma. Tako se protein Ab, koji se akumulira u Alchajmerovoj bolesti, može vezati za proteazom i tako ga inhibirati (Grillo i Colombatto, 2008).

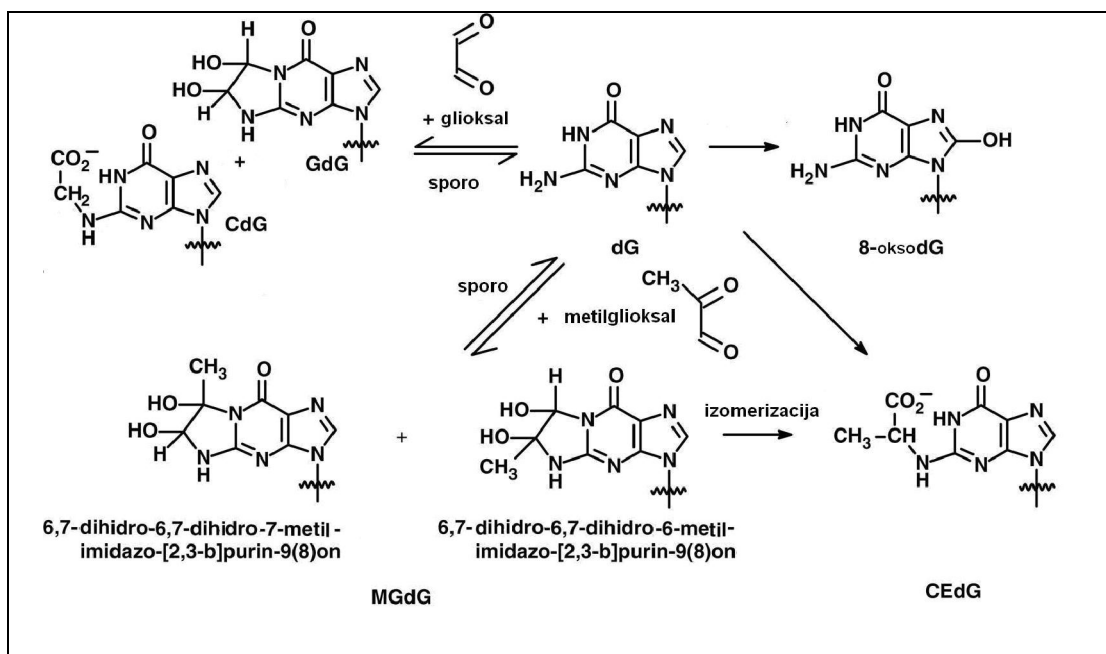
Kod viših organizama prisutan je enzim amadorijaza, fruktozo-lizin-3-kinaza, koji fosforiluje Amadorijev proizvod (rani proizvod glikacije), pri čemu nastaje fruktozolizin-3-fosfat koji se hidrolizuje na nemodifikovan ostatak lizina, neorganski fosfat i deoksiglukozon. To je unutar elijski enzim, koji ne deluje na deglikaciju van elijskog matriksa. Sa druge strane, deoksiglukozon koji se oslobađa a ponovo dovodi do glikacije. Enzim sličan fruktozamin-3-kinazi, pronađen je u humanim eritrocitima i ima drugu specifičnost. Katalizuje fosforilaciju proteina sa proizvodima ribulozaminom i psikozaminom, ali ne i fruktozaminom. Predloženo je da inhibicija ove fruktozo-lizin-3-kinaze može biti na in situ avanja komplikacija u dijabetesu, a kojima je uzrok stvaranje krajnjih proizvoda glikacije (Grillo i Colombatto, 2008).

Glikacija DNK. DNK molekul ima slobodne amino-grupe. Najreaktivnija je 2-amino-grupa guanozina. Guaninske baze nukleotida reaguju sa gliksalom i metilgliksalom pri fiziološkim uslovima. Nastaju imidazopurinoni – u slučaju gliksala 3-(2'-deoksiribozil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroksiimidazo[2,3-b] purin-9(8)on (GdG), a u slučaju metilgliksala nastaje smeša 2 izomera, 3-(2'-deoksiribozil)-6,7-dihidro-6,7-dihidroksi-6/7-metilimidazo-[2,3-b] purin-9(8)on (MGdG). Tako nastaju i N²-karboksimetil-deoksiguanozin (CMdG) i N²-(1,R/S-karboksietil)-deoksiguanozin (CEdG) (Slika 8.). CMdG nastaje in vitro u tumorskim elijama, i in vivo u mononuklearnim leukocitima, što upućuje na zaključak da su izolovani imidazopurinoni glavni adukti endogenog oštećenja DNK u uslovima karbonilnog stresa (Thornalley et al, 2010)

Metilgliksal dovodi i do umrežavanja guanina templatnog lanca DNK i obolnih ostataka DNK polimeraze (Murata-Kamiya i Kamiya, 2001). Ovo može dovesti do zaustavljanja replikacije, do pogrešnog okvira čitanja templatnog lanca, rasplitanja dvostrukog heliksa, mutacija, do nemogućnosti vezivanja faktora transkripcije.

Na elijama sisara u kulturi, pokazano je da formiranje krajnjih proizvoda glikacije na DNK može dovesti do insercije ponavljajućih sekvenci Alu familije, što

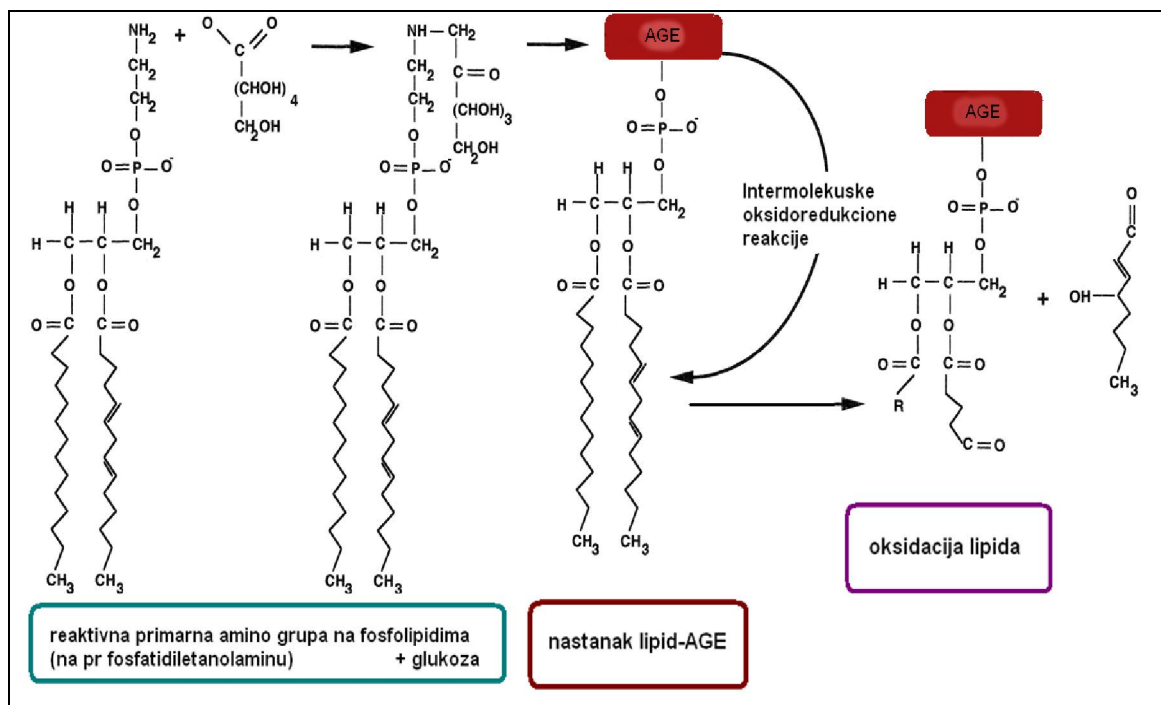
dovodi do poremećaja u humanim genima. Moguće je da AGEs indukuju genetičke promene, ima važne implikacije, na primer može biti objašnjenje za pojavu naslednjih malformacija kod novorođenčadi koje su majki dijabetičari tipa 1, sa slabom glikemijom kontrolom (Ulrich i Cerami, 2001). Glikacija DNK, dakle, dovodi do narušavanja i integriteta genoma i do promena na nivou ekspresiranja gena (Pun i Murphy, 2012).



Slika 8. AGEs koji nastaju u reakciji dikarbonila (metilglioksala i glioksala) i guaninske baze DNK (prema Thornalley et al, 2010).

Glikacija lipida. Do nastajanja krajnjih proizvoda glikacije LDL dolazi na amino-grupama apolipoproteina i na amino-grupama lipidnih komponenti fosfatidiletanolamina i fosfatidilserina. Glikacija apolipoproteina B (Apo B) u LDL se smatra proaterogenom modifikacijom, koja doprinosi nastanku ateroskleroze. Naime, glikacija Apo B može dovesti do umrežavanja LDL i kolagena u zidu krvnih sudova. Makrofagi privučeni postojanjem izmenjenih struktura na kolagenu zida krvnih sudova mogu nagomilavati modifikovan LDL i postati tzv penaste ćelije, za koje se smatra da imaju značajnu ulogu u procesu nastanka ateroskleroze. Pokazano je da je lizosomalna razgradnja glikovanog LDL u makrofagima sporija od razgradnje acetilovanog ili oksidovanog LDL. Glikacija LDL može da dovede do produženja njegovog polужivota u plazmi, usled blokiranja mesta vezivanja za receptor, čija je funkcija da ga uklanja iz cirkulacije.

Kada se formiraju krajnji proizvodi glikacije na LDL, intramolekulske oksidacijo-redukcijske reakcije mogu dovesti do oksidacije nezasitanih lipida LDL (Slika 9.). Dolazi do remećenja interakcije LDL sa receptorima na endotelijama koje bi trebalo da ga unesu, tako da samo makrofagi mogu da internalizuju LDL (Bierhaus et al, 1998b; Popova et al, 2010; Ulrich i Cerami, 2001).



Slika 9. Reakcijom fosfatidiletanolamina sa glukozom nastaje lipidni proizvod glikacije koji daljim reakcijama dovodi do oksidacije lipidne komponente (prema Bierhaus et al, 1998a).

Na nastanak ateroskleroze utiču i kvantitativni i kvalitativni poremećaji lipoproteina. Glikacijom i glikoksidacijom izmenjeni lipoproteini mogu postati imunogeni, mogu dovesti do stvaranja i deponovanja imunih kompleksa i formiranja penastih elija. U ovim procesima dolazi do oslobađanja slobodnih radikala što dodatno dovodi do oštećenja krvnih sudova (Lapolla et al, 2001).

Glikacija komponenta mitohondrija -dikarbonilnim jedinjenjima. Kada nastanu u eliji -dikarbonilna jedinjenja mogu difundovati kroz membranu i reagovati sa lipidima mitohondrijalne membrane, mitohondrijalnim proteinima i mitohondrijalnom DNK. U uslovima karbonilnog stresa dolazi do glikacije fosfatidiletanolamina u membrani mitohondrija, što može da utiče na proces oksidativne

fosforilacije i disfunkciju mitohondrija. Ovaj proces može biti uzrok disfunkcije mitohondrija koja je primećena u hiperglikemiji i u procesu starenja. Na eksperimentalnom modelu dijabetesa tipa 1 miševa utvrđeno je da dolazi do promena u ekspresiji mitohondrijalnih proteina u Švanovim ćelijama. Karbonilovanje, oksidacija i nitrozilovanje pojedinih mitohondrijalnih proteina naeno je i kod nekih neurodegenerativnih poremećaja (Pun i Murphy, 2012).

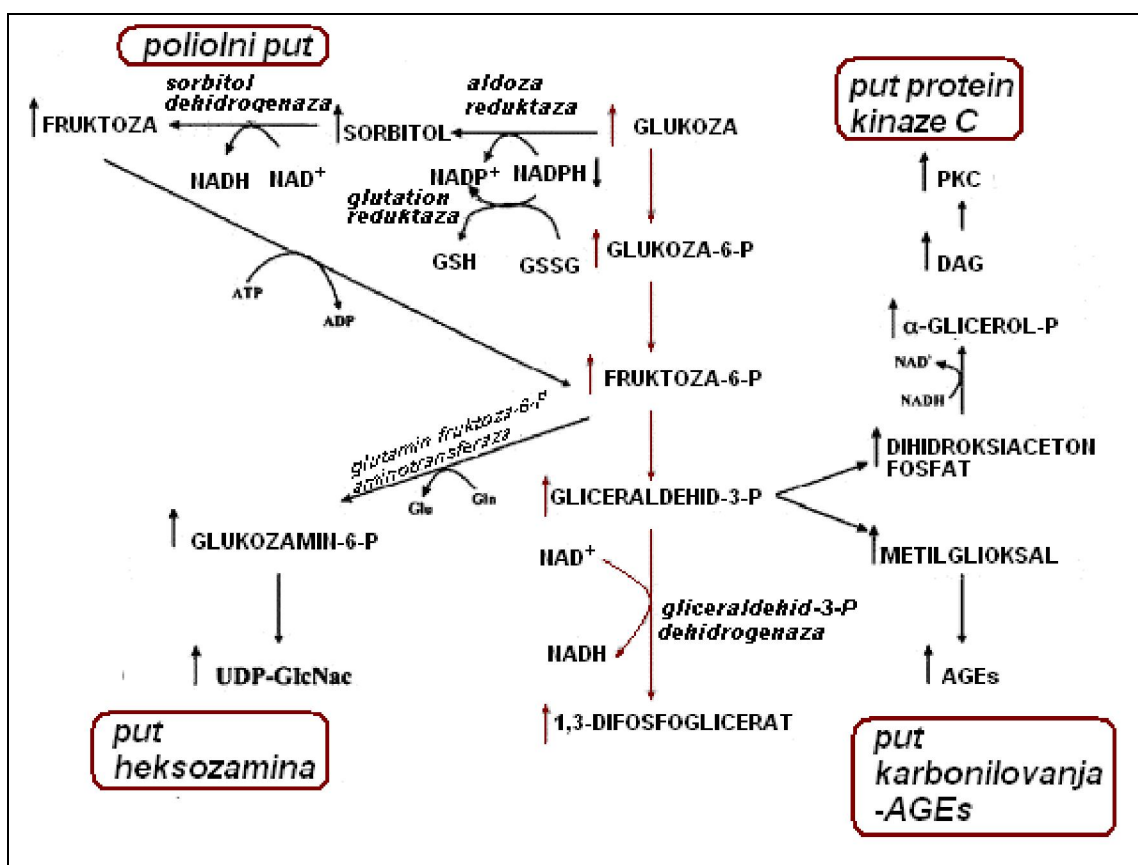
Karbonilovanje proteina u mitohondrijama imalo je za posledicu smanjenje aktivnosti kompleksa I, poremećenu funkciju u elektron-transportnom lancu, smanjenje membranskog potencijala i povećanu produkciju superoksidanjon-radikala. Karbonilovanje dovodi do disfunkcije mitohondrija posredovane citokinima i moguće je da je u vezi sa razvojem insulinske rezistencije u adipocitima (na eksperimentalnom 3T3-L1 ćelijskom modelu pokazano je da karbonilovanje dovodi do inaktivacije fosfatnog nosača i kompleksa NADH-dehidrogenaze 1, subkompleksa 2 ili 3, Curtis et al, 2012). U mitohondrijalnoj DNK sadržaj CEdG bio je za oko tri puta veći u odnosu na nuklearnu DNK u kulturi fibroblasa, što može biti posledica odsustva zaštite histonskih proteina (Pun i Murphy, 2012).

Glikacija u dijabetesu i pri starenju. Nekoliko patoloških stanja, kao što su dijabetes, Alchajmerova bolest i ateroskleroza su povezani sa oštećenjima koja su izazvana glikacijom i oksidativnim stresom. U ovim patofiziološkim stanjima i u starenju dolazi do povećanja nivoa krajnjih proizvoda glikacije u krvi i tkivima (Aso et al, 2000; Berg et al, 1997.;Popova et al, 2010.)

Dijabetes je heterogena bolest povezana sa višestrukim komplikacijama. Hiperglikemija je najznačajniji faktor u pojavi i progresu komplikacija u oba tipa dijabetesa. Do hiperglikemije dolazi zbog nedostatka insulina (tip 1) ili zbog neosetljivosti metabolizma glukoze i lipida na delovanje insulina u perifernim tkivima (tip 2). Povećan sadržaj glukoze dovodi do prekomernog nastajanja krajnjih proizvoda glikacije. To predstavlja glavni razlog nastanka komplikacija u dijabetesu. Povećani nivo AGEs dovodi do oštećenja upravo onih ćelija koje ne mogu da smanje unutar ćelijski nivo glukoze, endotelnih ćelija kapilara mrežnjače, mezengijalnih ćelija glomerulaa bubrega, nervnih i Švanovih ćelija perifernih nerava.

Prema Brownlee (2001) i Rolo i Palmeira (2006), glavni putevi koji dovode do nastajanja oštećenja u dijabetesu (Slika 10.) su :

- Poliolni put, koji dovodi do pove anja nivoa sorbitola i fruktoze i nedostatka GSH. Hiperglikemija dovodi do pove anog fluksa u poliolnom putu u kojem aldoza-reduktaza ima važnu ulogu. Funkcija aldoza-reduktaze je da u estvuje u detoksifikaciji reaktivnih aldehida do alkohola. Kada je koncentracija glukoze visoka ovaj enzim katalizuje redukciju glukoze do sorbitola, uz utrošak NADPH. Nedostatak NADPH ima za posledicu pove anu potrošnju, odnosno nedostatak glutaciona, što dovodi do pove ane osetljivosti elija na oksidativni stres



Slika 10. Shematski prikaz mehanizama koji dovode do ošte enja u hiperglikemiji (prema Rolo i Palmeira, 2006).

- Heksozaminski put, u kome pove anje fruktozo-6-fosfata dovodi do pove anog stvaranja UDP-N-acetilglukozamina, odnosno do pove ane O-glikozilacije transkripcionih faktora N-acetilglukozaminom i do pove ane produkcije citokina kao TGF- 1

- Aktivacija izoformi protein kinaze C. Hiperglikemija dovodi do povećanja nivoa diacilglicerola, što dovodi do aktiviranja β -protein kinaze C, što utiče na eksprimiranje brojnih citokina
- Povećani nastanak AGEs. Hiperglikemija dovodi do povećanja nivoa reaktivnih dikarbonilnih jedinjenja (kao što je metilgliksal) koja dovode do povećanog nastanka krajnjih proizvoda glikacije.

Povećana produkcija ROS je vezana za patologiju komplikacija u dijabetesu. Povećana produkcija superoksid-radikala u mitohondrijama usled hiperglikemije, dovodi do delimične inhibicije glikolitičkog enzima gliceraldehid 3-fosfat-dehidrogenaze, što utiče na povećanje nivoa intermedijera u glikolizi uzvodno, a što može biti jedinstven mehanizam koji dovodi do povećanog aktiviranja sva 4 napred navedena metabolička puta (Brownlee, 2001). H_2O_2 je vrlo reaktivna kiseonikova vrsta, koja se povećano stvara kod dijabetičara. Nedavno je pokazano da se H_2O_2 može smatrati kao sekundarni glasnik, koji putuje između i aktivira signalne molekule, što dovodi do aktiviranja transkripcionih faktora, kao što su nuklearni faktor NF- κ B kojim se regulišu oslobađanje pojedinih citokina i aktivnost azot-oksida sintaze (Popova et al, 2010).

Nastanak krajnjih proizvoda glikacije ima važnu ulogu u strukturnim i funkcionalnim promenama proteina u starenju i dijabetesu. Hronična hiperglikemija u dijabetesu dovodi do stvaranja sekundarnih komplikacija kao što su nefropatija, retinopatija, neuropatija i angiopatija. Pacijenti sa dijabetesom imaju manje povoljne ishode nakon infarkta miokarda i nakon koronarne intervencije; poremećena glikemijska homeostaza ima direktan uticaj na nastanak aterosklerotskih zadebljanja (Popova et al, 2010).

Retinopatija i katarakta. Protein kristalin ljudskog sočiva ima dug vek, verovatno traje tokom celog života. Mada kristalini imaju svojstvo da zadržavaju optičku bistriću jako dugo, sa starenjem se formiraju krajnji proizvodi glikacije. Više od 60% obolelih od dijabetesa će imati neki stepen retinopatije 20 godina nakon početka bolesti. Najranije patohistološko obeležje dijabetične retinopatije je gubitak pericita, koji održavaju tonus kapilara. Periciti retine akumuliraju krajnje proizvode glikacije tokom dijabetesa, što dovodi do zastoja u rastu i do njihove apoptoze. AGEs deluju na pericite tako da oni oslobađaju vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), koji utiče na propustljivost kapilara, a za koji se smatra da je ključni faktor u patogenezi

proliferativne dijabeti ke retinopatije (Popova et al, 2010; Yamagishi et al, 2002). Debljanje bazalne membrane do kojeg dolazi i pove ano deponovanje komponenti ekstracelularnog matriksa, može da doprinese razvoju abnormalne hemodinamike retine (Ulrich i Cerami, 2001).

Krajnji proizvodi glikacije u hiperglikemiji doprinose formiranju katarakte, što je vode i uzrok slepila. Katarakte su agregati koji nastaju usled disfunkcionalnih proteinskih interakcija. Glikacija dovodi do umrežavanja proteina, ova mesta pak mogu biti mesta dalje nukleacije i dalje agregacije. U normalnom so ivu, pojedini proteini asosuju posredstvom hidrofobnih interakcija i formiraju agregate od nekoliko miliona Da. Glikacijom modifikovane amino grupe u kristalinu dovode do konformacionih promena usled kojih SH grupe postaju izložene, dolazi do njihove autooksidacije i nastajanja intermolekulskih disulfidnih mostova usled ega se formiraju superagregati. Ove strukture mogu biti dovoljne veli ine da rasipaju svetlost i dovedu do katarakte. U nekoj meri nastaju i superagregati iji mehanizam nastanka ne uklju uje samo nastajanje intermolekulskih disulfidnih mostova. Glikacija dovodi i do smanjenja funkcije i inaktivacije šaperona -kristalina (Yan i Harding, 2006). Zbog pove ane proizvodnje slobodnih radikala kod dijabeti ara smatra da oksidativni stres, tako e, dovodi do katarakte i makularne degeneracije. Nivo glutationa, AGEs i aktivnost superoksid-dismutaze zna ajno su pove ani kod pacijenata obolelih od dijabeti ne senilne katarakte u odnosu na kontrolu (Popova et al, 2010; Ulrich i Cerami, 2001).

Neuropatija. Dijabeti na neuropatija se karakteriše morfološkim promenama, koje su povezane sa smanjenjem brzine provo enja signala u senzornim i motornim neuronima, kao što su degeneracija aksona i delimi na demijelinizacija. Akumuliranje AGEs na tubulinu dovodi do poreme aja transporta u aksonu i do atrofije i degeneracije aksona, do pove ane permeabilnosti i tromboze na vasa nervorum (splet arterijskih kapilara koji snabdevaju krvlju periferne nerve) što dovodi do za epljenja zida kapilara i ishemije neurona (Lapolla et al, 2001). Dijabetes melitus je glavni uzrok periferne neuropatije, koja se manifestuje kao distalna simetri na polineuropatija. Dolazi do zadebljanja bazalne membrane i degeneracije pericita. Interakcija izme u mijelina modifikovanog krajnjim proizvodima glikacije i makrofaga može dovesti do delimi nog ošte enja mijelinskog omota a neurona (Popova et al, 2010).

Nefropatija. U dijabeti noj nefropatiji dolazi do promena na glomerularnim kapilarima, ime je smanjena sposobnost filtracije urina bubrega. Pokazano je da su akumulirani AGEs u lezijama mezengijalnog tkiva i nodulima CML i pentozidin (Tanji

et al, 2000). Krajnji proizvodi glikacije dovode do apoptoze elija i do osloba anja vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) mezengijalnih elija u kulturi. Predloženo je da oksidativni stres igra ključnu ulogu u patogenezi dijabetesa tipa 2. Usled povećanog nastanka reaktivnih kiseoniknih vrsta (ROS) ubrazano je akumuliranje krajnjih proizvoda glikacije, i obrnuto, nastali proizvodi glikacije dovode do povećanja ROS. Tokom ovih reakcija nastaju jedinjenja sa karbonilnom ili dikarbonilnom grupom. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između sadržaja karbonilovanih proteina i ekspresiranja proteina toplotnog šoka, hsp60, u limfocitima (Ulrich i Cerami, 2001).

U dijabetičnoj nefropatiji dolazi do patološkog deponovanja matriksa u mezengijumu glomerula, što dovodi do glomeruloskleroze. Akumuliranje proteina srodnih kolagenu na bazalnoj membrani arterija dovodi do progresivnog oštećenja glomerula. Glikovani albumin dovodi do povećanog stvaranja H_2O_2 u elijama glomerula, smanjuje sposobnost proliferacije mezengijalnih elija. Mezigijalne elije povećano sintetizuju kolagen tipa IV koji se akumulira u van elijskom matriksu. Makrofagi preko receptora za AGEs internalizuju modifikovane proteine i posle digestije oslobađaju male peptide ($Mr < 10kDa$). Bubrezi dijabetičara gube kapacitet da uklanjaju ove peptide iz plazme, oni kao reaktivni peptidi glikozilovane strukture interaguju sa lipoproteinima i kolagenom, što dalje dovodi do progresije komplikacija u dijabetesu (Lapolla et al, 2001).

Neurodegenerativne bolesti. Krajnji proizvodi glikacije imaju ulogu u abnormalnoj agregaciji proteina u Alchajmerovoj bolesti. Materijal sličan amiloidnim naslagama kod bolesnika od Alchajmerove bolesti nađen je i kod zdravih ljudi istih godina u kontrolnoj grupi. Ali amiloidni agregati kod bolesnika od Alchajmerove bolesti imaju 3 puta veći sadržaj krajnjih proizvoda glikacije u odnosu na iste agregate kod zdravih ljudi. S obzirom da nivo ovih glikovanih struktura raste u toku vremena, jedno od objašnjenja ove pojave može biti poremećaj mehanizama uklanjanja amiloidnih struktura. Glikovane amiloidne strukture podležu umrežavanju, što dodatno pojačava njihovu otpornost na proteolizu i uklanjanje. Povećan nivo ovih struktura takođe je pronađen u olfaktornom bulbusu, do kojih promena dolazi u ranim fazama Alchajmerove bolesti. Krajnji proizvodi glikacije učestvuju u patogenezi familijarne amiloidne polineuropatije (Popova et al, 2010; Ulrich i Cerami, 2001). Povećan nivo krajnjih produkata glikacije u serumu ne reflektuje povećan nivo ovih struktura u mozgu u Alchajmerovoj bolesti, što znači da je akumuliranje krajnjih proizvoda glikacije proces specifičan za moždano tkivo.

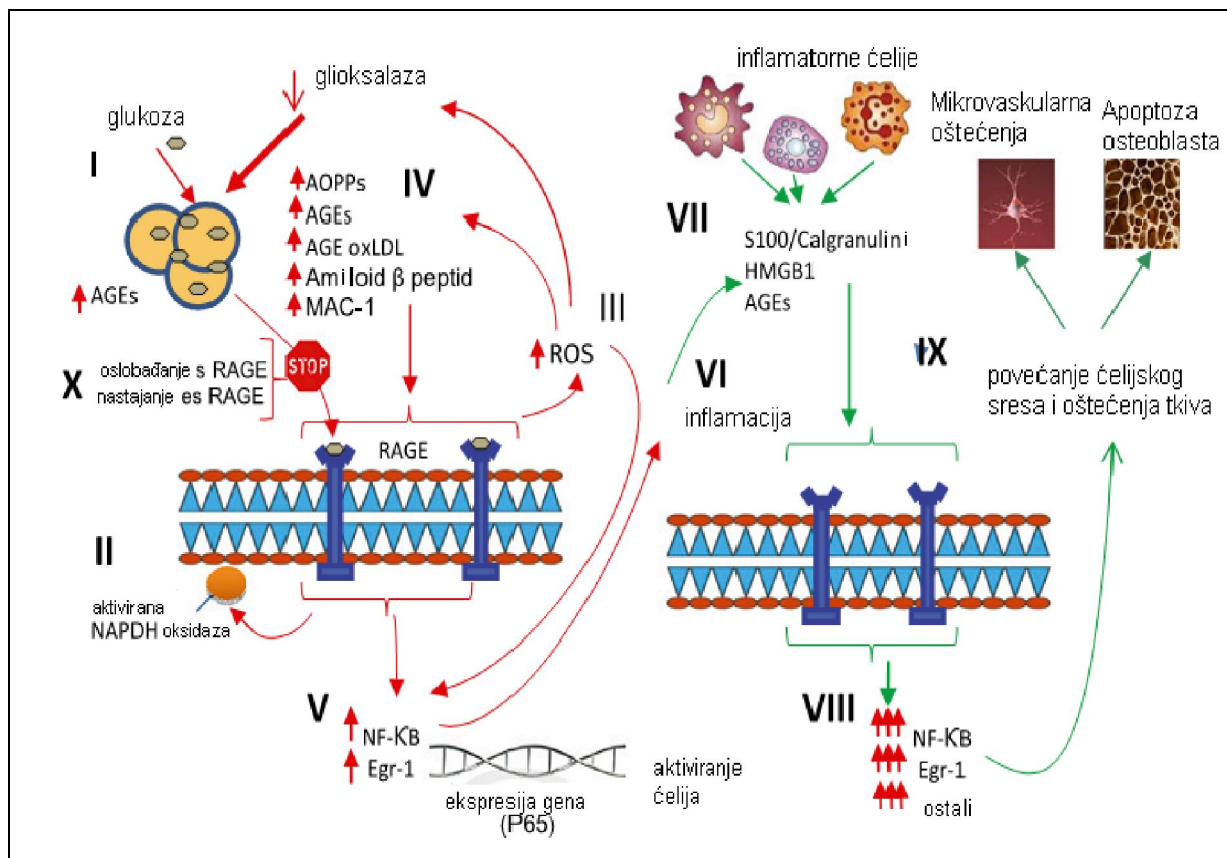
Tokom starenja u mozgu dolazi do akumuliranja AGEs i unutar elija i u van elijskom prostoru. U Alchajmerovoj bolesti dolazi do deponovanja amiloidne strukture u van eliskom prostoru. Glavni protein je Ab koji se sastoji od 28 aminokiselina koje se pružaju van membrane i 11-14 ostataka koji poti u od hidrofobnog transmembranskog domena prekursorskog proteina – amiloidnog prekursorskog proteina (APP). Prisustvo krajnjih proizvoda glikacije koji dovode do proteinskog umrežavanja, ubrzava polimerizaciju Ab. Brzina stvaranja amiloidnih agregata uti e direktno na progresiju bolesti. Neurofibrilarna umreženja sadrže visokofosforilovan tau protein pridružen mikrotubulima koji je modifikovan krajnjim proizvodima glikozilovanja. Tau protein je u neošte enim neuronima i u neuronima zdravog mozga slobodan i nije modifikovan. Na proces transglikacije u Alchajmerovoj bolesti, koji dovodi do formiranja umreženja, uti e i oksidativni stres. Mogu e je i da NO u estvuje u ovom procesu (Grillo i Colombatto, 2008).

2.5. Receptori za krajnje proizvode glikacije

Pošto je prona eno da je koli ina AGEs koja se nalazi u tkivima manja nego što se moglo o ekivati prema brzini reakcije glikacije, prepostavilo se da postoje mehanizmi koji omogu avaju njihovo uklanjanje. Otkriveni su proteini koji vezuju ove strukture, receptori za AGEs (RAGE). RAGE pripadaju superfamiliji imunoglobulina. Sastoje se iz, po ev od N terminalnog kraja, 3 imunoglobulinska van elijska domena, jednog V (varijabilnog) i dva C (konstantnog tipa), transmembranskog regiona i kratkog unutar elijskog C terminalnog repa. RAGE gen se nalazi na hromozomu 6 u glavnom kompleksu histokompatibilnosti, izme u gena za klasu II i klasu III. RAGE su zastupljeni na površini razli itih elija – na endotelnim elijama, glatkim miši nim elijama, limfocitima, monocitima i neuronima. U patološkim procesima pove ava se ekspimiranje i pozitivna uzvodna regulacija RAGE. Vezivanje krajnjih proizvoda glikacije za RAGE dovodi do transdukcije signala i aktiviranja NF-kB transkripcionog faktora, koji dovodi do osloba anja proinflamatornih faktora. Signal se amplifikuje pošto dolazi do pove anog ekspimiranja RAGE. Promotor gena za RAGE ima dva funkcionalna mesta vezivanja NF-kB. RAGE nisu samo receptori za krajnje proizvode glikacije ve i za neke druge molekule, koji tako e deluju proinflamatorno (Grillo i Colombatto, 2008; Rojas i Morales, 2004).

Veživanje AGEs za RAGE na endotelnim ćelijama smatra se da dovodi do iniciranja i razvoja vaskularnih komplikacija u dijabetesu i to putem više mehanizama. Glikovani proteini dovode do veće permeabilnosti krvnih sudova putem aktiviranja protein kinaze C i do veće produkcije VEGF. Pored toga, pokazano je da krajnji proizvodi glikacije mogu da dovedu do nedostataka faktora vazodilatacije. Oni mogu da vezuju NO, i da smanjuju nivo prostaciklina PGI₂ (glikovani albumin), dok istovremeno dovode do povećanja oslobađanja vazokonstriktora endotelina 1 (Rojas i Morales, 2004).

Odnos između veživanja krajnjih proizvoda glikacije za receptore, inflamacije, ekspresije gena, oksidativnog stresa i oštećenja makro i mikrovaskulature prikazan je na Slici 11. Modifikacija proteina u hiperglikemiji dovodi do povećanja stvaranja AGEs (I), koji se vezuju za transmembranske receptore RAGE. Pokrenuti signalni put aktivira NADPH oksidazu (II), što dovodi do povećanja stvaranja reaktivnih kiseoniknih vrsta (ROS) (III). Povećani nivo ROS dovodi do povećanja stvaranja krajnjih proizvoda oksidacije proteina (AOPPs), daljeg povećanja stvaranja AGEs i modifikacije i oksidacije LDL (oxLDL). Osim toga, povećanje ROS može iscrpeti sadržaj glutaciona i time dovesti do supresije aktivnosti glioksalaze I, što favorizuje dalje akumuliranje AGEs (IV). Krajnji proizvodi glikacije, glikoprotein makrofaga (MAC-1) i krajnji proizvodi glikoksidacije LDL se vezuju i dovode do dalje aktivacije RAGE, što zajedno sa povećanjem ROS dovodi do aktiviranja ključnih transkripcionih faktora, kao što su nuklearni faktori - κ B (NF- κ B) i Egr-1 (V). Ovo dovodi do povećanja nivoa faktora transkripcije gena i aktiviranja mehanizama inflamacije (VI). Kao rezultat povećanja se migracija i aktiviraju se neutrofilni, monociti i makrofagi, T-ćelije i dendritske ćelije koje imaju RAGE (VII). Oslobađaju se proinflamatorni ligandi za RAGE, S100/kalgranulini i protein HMGB1 (proteinski kompleks visoke mobilnosti 1). U ovom inflamatornom stresu, može doći i do daljeg nastajanja krajnjih proizvoda glikacije. Preko interakcije sa RAGE, krajnji proizvodi glikacije povećavaju aktivaciju NF- κ B, AGR-1, kao i drugih faktora (VIII), čime se pojačava ćelijski stres i dolazi do oštećenja tkiva, što dovodi do neurovaskularne i koštane disfunkcije. Slobodni RAGE označeni kao sRAGE, nastaju cepanjem RAGE delovanjem dizintegrina kao što su ADAM 10, metaloproteinaze, -i- sekretaze. Postoje i slobodni receptori označeni kao esRAGE, koji nastaju alternativnom obradom primarnog transkripta za RAGE.



Slika 11. Odnos između vezivanja krajnjih proizvoda glikacije za receptore, inflamacije, ekspresije gena, oksidativnog stresa i makro- i mikrovaskularnih oštećenja (Vinik, 2011)

Slobodni receptori kompetitivno vezuju ligande za transmembranske RAGE, a upravo njihova deficijencija mogla bi da dovede do aktiviranja inflamatorne kaskade, kada dolazi do povećane ekspresije proinflamatornih citokina E - selektina, tkivnog faktora endotelina-1, vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), kao i drugih proinflamatornih citokina – interleukina -6 (IL 6) i -faktora nekroze tumora (TNF). Sve navedeno ima za posledicu oštećenje neurona, bubrega, oka, krvnih sudova, pa čak i kostiju. Povećanje nivoa sRAGE ili njihova administracija, mogla bi prema tome kompetitivno da smanji aktivaciju AGE / RAGE puta i navedene posledice (Vinik, 2011). Krajnji proizvodi glikacije vezivanjem za RAGE utiču na ekspimiranje ćelijskih adhezionih molekula i migraciju leukocita jer dovode do povećanog ekspimiranja VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina na leukocitima i na endotelnim ćelijama. Oni tako i indukuju angiogenezu (Rojas i Morales, 2004).

Receptori RAGE i sRAGE se nalaze na sinusoidnim elijama jetre, na Kupferovim i endotelnim elijama. Smatra se da su važni medijatori u uklanjanju glikovanih proteina iz plazme (Rojas i Morales, 2004).

U eš e RAGE je potvr eno i u patogenezi Alchajmerove bolesti. Normalno, RAGE se nalaze na neuronima, mikroglialnim elijama i astrocitima u mozgu. Postoje tri izoforme RAGE receptora –celoviti RAGE, sekretorni - sRAGE i RAGE bez dela N terminalnog kraja – NtRAGE. Od ove tri izoforme, najzastupljenija forma u mozgu zdravih ljudi je sRAGE. Smatra se da su njihovi specifi ni ligandi razli iti, a na razli itim elijama (elijama mikroglije, astrocitima i neuronima) vezivanje liganada za RAGE može dovoditi do razli itih efekata. Izgleda da degradacija Ab po vezivanju za RAGE, može doprinositi disfunkciji i smrti neurona i progresiji bolesti (Grillo i Colombatto, 2008).

Prema jednoj od hipoteza o molekulskim osnovama nastanka Alchajmerove bolesti, dominantan uzrok ove bolesti je vezivanje AGEs za receptore. Prema Sato (Sato et al, 2006) , samo AGEs nastali od gliceraldehida i glikoaldehida (i od glukoze u mnogo manjoj meri), su toksi ni AGEs, vezuju se za RAGE u nervnom tkivu ispoljavaju neurotoksi ni efekat. Ostali krajnji proizvodi glikacije su netoksi ni, nemaju direktan uticaj na nervne elije. Oni mogu da se akumuliraju kod zdravih osoba bez toga da izazovu Alchajmerovu bolest. Bolest je posledica samo direktne neurotoksi nosti.

2.6. Biološki mehanizmi za spre avanje neenzimskog glikozilovanja

Pošto neenzimsko glikozilovanje dovodi do ozbiljnih posledica, razni organizmi su razvili mehanizme (pasivne i aktivne) za zaštitu od neenzimskog glikozilovanja, sli no kao što su aerobni organizmi razvili mehanizme za zaštitu od štetnog dejstva kiseonika.

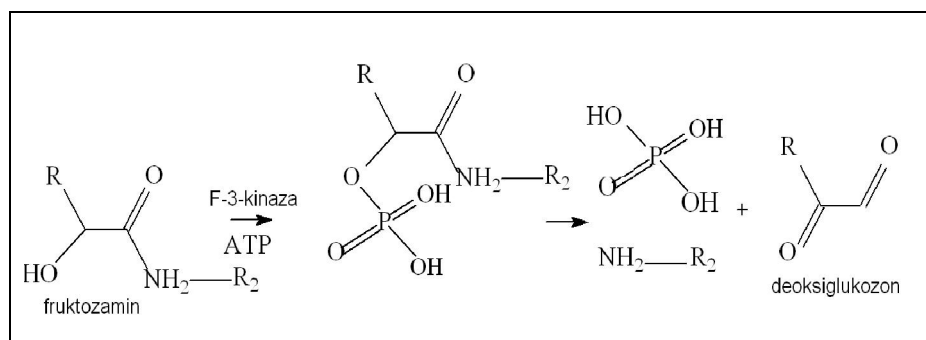
Mehanizam (pasivni), koji je evolutivno razvijen i sveopšte prisutan, je upotreba glukoze kao primarnog izvora ugljenika i energije. U odnosu na proces neenzimskog glikozilovanja, glukoza je najpogodniji monosaharid, s obzirom na to da u izuzetno malom udelu postoji u formi otvorenog lanca (neophodnoj za glikaciju) i da je od svih monosaharida najmanje reaktivna prema aminima. (Bunn i Higgins, 1981). Nivo glukoze je tako e strogo regulisan (unutar opsega 5-10 mM) kontinualnim

mehanizmom povratne sprege, koji uključuje pankreasne β -celije, jetru i skeletne mišiće i ravnotežu efekata hormona, kao što su insulin i glukagon.

Neke β -celije poput eritrocita ptica i svinja direktno koriste glukozu kao izvor energije umesto ATP. Većina insekata koristi neredukovan šećer trehalozu, kao izvor ugljenika i energije u hemolimfi, koja se odmah po unosu u β -celije hidrolizuje do glukoze. Trehaloza se unosi u β -celije samo srazmerno potrebama tih β -celija za glukozom.

U aktivne mehanizme ubrajaju se:

- Mehanizmi koji deluju direktno na glukozu i njene prve metabolite. Jedan od prvih ovakvih mehanizama smatra se da je transglikacija glikozilamina (i drugih Šifovih baza). Transglikaciju omogućavaju fiziološki nukleofili, kao što su glutation, amino-kiseline, aminotiol i poliamini. Pokazano je da taurin (koji je prisutan u tkivima većine životinja) i karnozin (koji se nalazi u u mišićnom i moždanom tkivu) smanjuju nastanak krajnjih proizvoda glikacije (Popova, 2010)
- Mehanizmi koji deluju direktno na dialdehide metilgliksal i gliksal (proizvode metabolizma glukoze), kao što je sistem gliksalaza, aldozo-reduktaza i aldehyd-dehidrogenaza
- Postojanje enzima koji katalizuju deglikaciju ranih proizvoda neenzimskog glikozilovanja. Tako, fruktozamin 3-kinaza (u skeletnim mišićima i srcu) fosforiluje fruktozamin. Nastali fruktozamin-3 fosfat je nestabilan, razlaže se i nastaje 3-deoksiglukozon (Slika 12.). Slični enzimi postoje i kod biljaka u kloroplastima. Enzimi koji deluju na amadorijeve adukte pronađeni su i kod mikroorganizama (Popova, 2010).

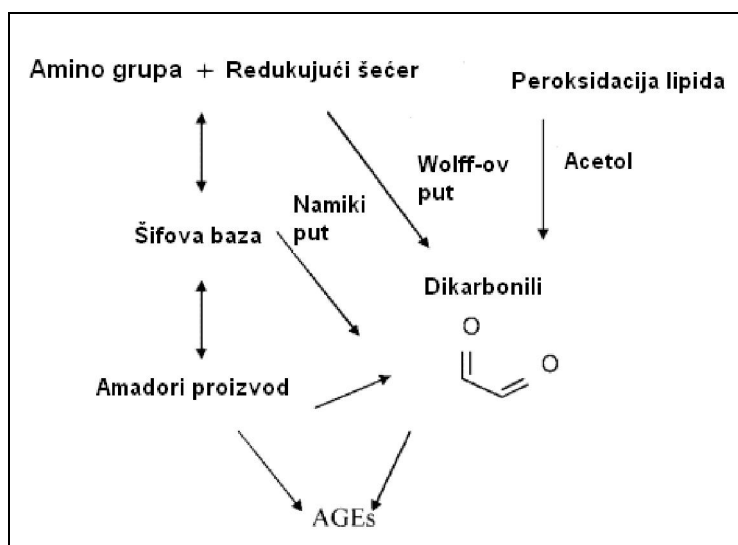


Slika 12. Enzim fruktozamin-3 kinaza katalizuje reakciju deglikacije ranih proizvoda neenzimskog glikozilovanja

- Receptori za AGEs i njihova uloga u uklanjanju AGEs struktura. Kako je već detaljno opisano u poglavlju 2.5., mnoge ćelije na svojoj površini (makrofagi, limfociti, endotelne i mezengijalne ćelije) imaju receptore, koji imaju afinitet za vezivanje AGEs struktura. Kada se AGEs vežu za receptore, ćelije ih fagocitiraju i hidrolizuju ostarele proteine modifikovane AGEs strukturama. Oslobođeni peptidi sa AGEs strukturama, koji se ekskretuju urinom. Unos proteina sa AGEs strukturama može dovesti do sinteze i oslobađanja određenih citokina i faktora rasta, koji mogu podstaći ponovnu sintezu proteina koji su bili uklonjeni fagocitozom. Ako ovaj proces nije dobro regulisan može doći i do razvoja bolesti.

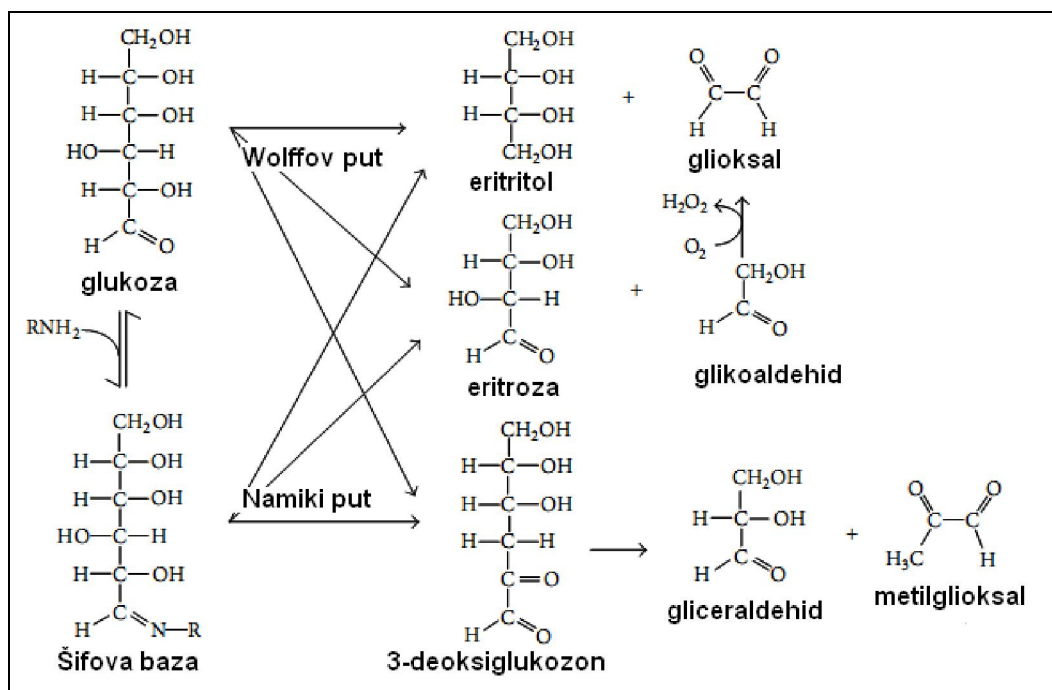
2.7. Reaktivna dikarbonilna jedinjenja

Krajnji proizvodi glikacije nastaju prvenstveno direktno iz Amadorijevog proizvoda u reakcijama dehidratacije, premeštanja i oksidacije. Oksidativnom degradacijom Amadorijevog proizvoda nastaju dikarbonilna jedinjenja. Reaktivna dikarbonilna jedinjenja nastaju i u reakcijama autooksidacije redukuju ih šećeri i oksidacijom šifove baze i peroksidacijom lipida (Slika 13.).



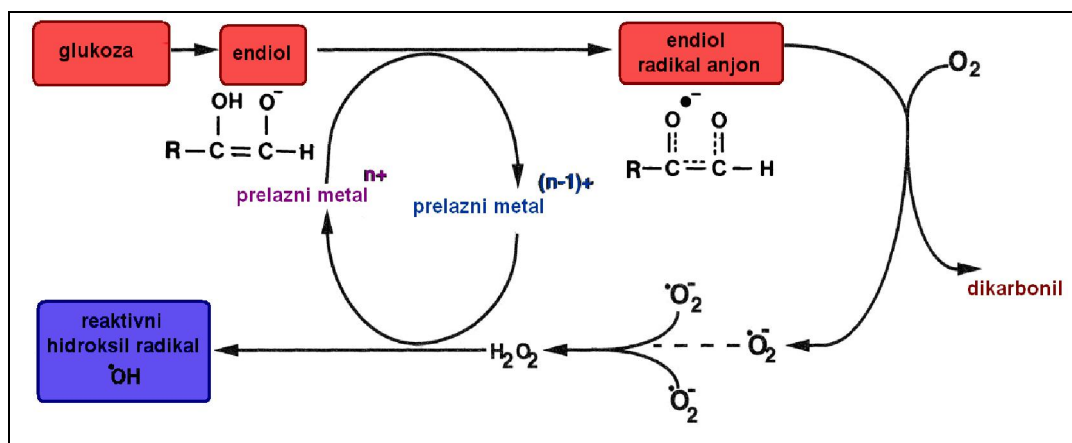
Slika 13. Putevi nastanka α,β -dikarbonilnih jedinjenja (Peng et al, 2011).

Acikli ni oblik glukoze može podle i autooksidaciji u prisustvu jona metala (Cu^{2+} i Fe^{3+}), preko tzv Wolff-ovog puta, pri emu nastaju -dikarbonilna jedinjenja gliksal ili 3-deoksiglukozon (od kojeg dalje nastaju gliceraldehid i metilgliksal, Slika 14.).



Slika 14. Šematski prikaz nastanka -oksoaldehida iz glukoze (Pun i Murphy, 2012).

Gliksal može nastati iz glukoze retroaldolnom kondenzacijom, koja zapo inje deprotonovanjem hidroksilne grupe na 2C ili 3C atomu, ili autooksidacijom glikoaldehida (koji se stvara u po etnim fazama glikacije, a može nastati i oksidacijom serina). Autooksidacija glukoze u prisustvu jona metala pra ena je nastankom superoksid-anjon-radikala (O_2^-). Superoksid-anjon-radikal se dismutacijom prevodi u vodonik-peroksid koji u prisustvu jona prelaznih metala daje hidroksil-radikal (Fentonova reakcija, Slika 15., Bierhaus et al, 1998a).

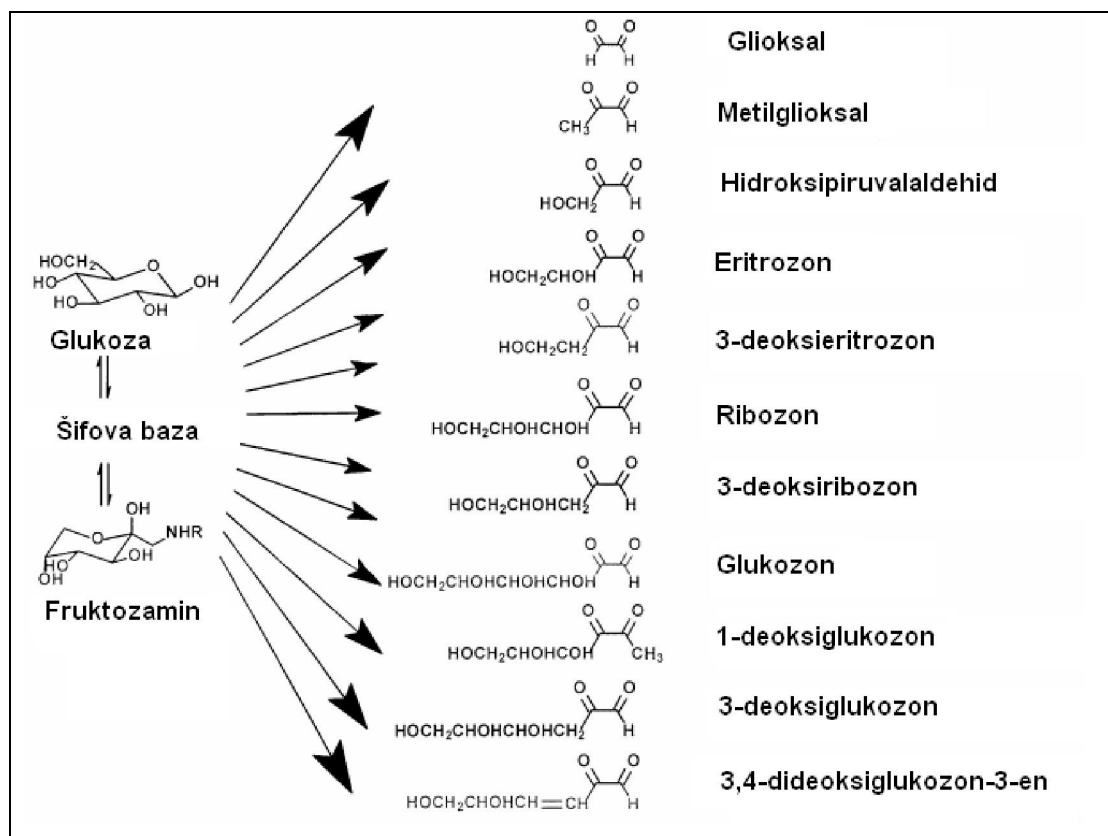


Slika 15. Autooksidacija glukoze u prisustvu jona prelaznih metala se odvija paralelno sa Fentonovom reakcijom, tj. nastankom reaktivnih kiseoni nih vrsta, prema (Bierhaus et al, 1998a).

Glioksal, metilglioksal i 3-deoksiglukozon mogu nastati i iz Šifove baze u Namiki putu (Slika 14). Naime, prisustvo aldiminske grupe ubrzava nastajanje -oksoaldehida (Pun i Murphy, 2012; Thornalley et al, 1999). Glioksal se stvara i u lipidnoj peroksidaciji i u metabolizmu aminokiseline treonina.

Glukozon i 3-deoksiglukozon inicijalno nastaju deprotonovanjem hidroksilne grupe na 2-C atomu glukoze, kada nastaje 1-diol, 2,3-enol, i na kraju 3-deoksiglukozon. Fragmentacijom 3-deoksiglukozona nastaje metilglioksal. Kao što je već navedeno, 3-deoksiglukozon nastaje i iz fruktozamina spontanom hidrolizom fruktozamin-3-fosfata. (Thornalley et al, 1999)

Thornalley je (2005) naveo jedanaest dikarbonilnih intermedijera koji nastaju od monosaharida u reakcijama Maillard-ovog tipa, a koji su predmet izuavanja glikacije u hemiji hrane i glikacije pod fiziološkim uslovima (Slika 16.). Glioksal, metilglioksal, glikoaldehid, 3-deoksiglukozon i dehidroaskorbat nastaju iz ugljenih hidrata i askorbata. Glioksal, malondialdehid, hidroksinonenal i akrolein nastaju peroksidacijom lipida, odnosno polinezasi enih masnih kiselina. Glioksal, metilglioksal, akrolein i glikoaldehid nastaju i u metabolizmu aminokiselina aktivnošću u mijeloperksidaze.



Slika 16. -Oksoaldehidi koji su intermedijeri u Maillard-ovoj reakciji (Thornalley, 2005).

Nastala dikarbonilna jedinjenja su mnogo reaktivnija od gukoze, do oko 20000 puta (Thornalley, 2005). Po analogiji sa oksidativnim stresom, uveden je pojam karbonilnog stresa, koji opisuje stanje u kojem je povišen nivo reaktivnih karbonilnih vrsta (reactive carbonyl spesies, RCS). Karbonilni stres je posledica neravnoteže, do koje dolazi zbog prekomernog nastajanja reaktivnih karbonilnih jedinjenja (glikacija, autooksidacija še era, metabolizam aminokiselina, peroksidacija lipida), i zbog njihovog nedovoljnog uklanjanja (Desai et al, 2010).

Amadorijevi adukti i krajnji proizvodi glikacije podležu autooksidaciji više od same glukoze i mogu da imaju prooksidativni efekat na druge molekule. Enolne strukture (Slika 2) mogu podle i oksidaciji (gubitak jednog elektrona) i dovesti do formiranja radikala. Dalja oksidacija nastalih radikala može dovesti do fragmentacije (tako na primer nastaje karboksimetil-lizin). Nastali radikal može vezati atom vodonika sa susednog biomolekula pri emu ovaj postaje radikal - dolazi do dalje autooksidacije krajnjih proizvoda glikacije (Ulrich i Cerami, 2001). Krajnji proizvodi glikacije mogu

tako e indirektno, putem osloba anja citokina usled vezivanja za RAGE, dovesti do pove anja reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS, Grillo i Colombatto, 2008).

Zbog svega navedenog Baynes i Thorpe (1999) smatraju da su oksidativni i karbonilni stres neodvojivo isprepletani u procesu nastanka komplikacija u dijabetesu. Oksidativni stres je pove an u dijabetesu, ali pitanje je da li je on primaran uzrok u patogenezi komplikacija, ili je pak posledica ošte enja tkiva. Neki od krajnjih proizvoda glikacije nastaju nezavisno od oksidacije. Predložen je mehanizam po kojem je pove ana hemijska modifikacija proteina u dijabetesu rezultat nedovoljnog kapaciteta metaboli kih puteva, koji su uklju eni u detoksifikaciju RCS, što dovodi do pove anog nivoa karbonilnih jedinjenja nastalih i oksidativnim i neoksidativnim reakcijama, a onda, na kraju dolazi do oksidativnog stresa i ošte enja tkiva. Uvedeni pojmovi glikoksidacija i lipoksidacija ukazuju na sinergisti ko dejstvo nastajanja krajnjih proizvoda glikacije i procesa oksidacije, koji zajedno dovode do ošte enja tkiva.

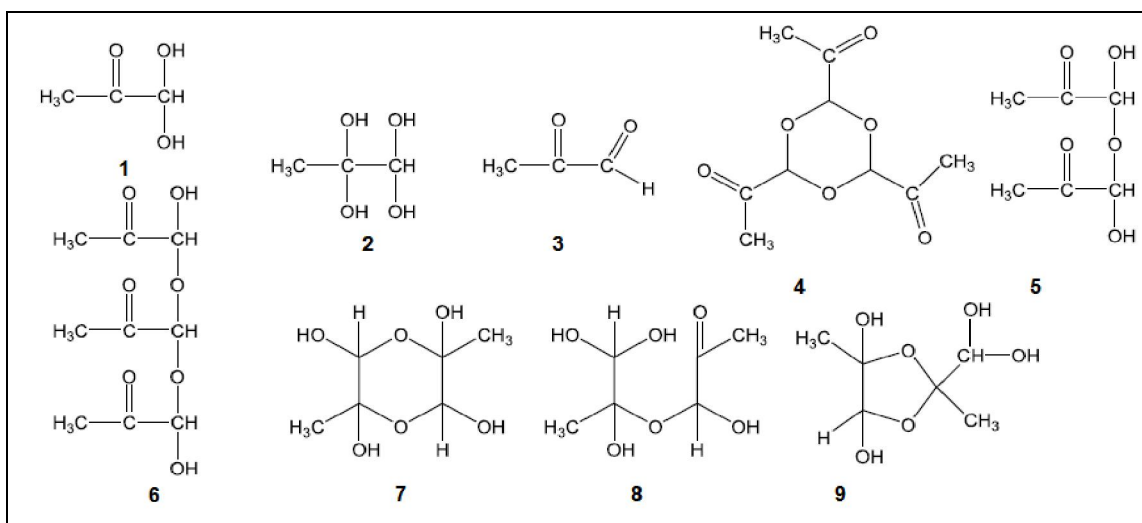
2.8. Metilglioksal

Neuberg i saradnici su još 1913. našli da u tkivu sisara u toku inkubiranja sa fruktozo-1,6-bisfosfatom (koji se prevodi u triozofosfate aktivniš u aldolaze) dolazi do nastanka metilglioksala. 30-tih godina prošlog veka, smatralo se (pogrešno) da je metilglioksal jedan od intermedijera u glikoliti kom putu nastanka laktata. Šezdesetih godina izneta je pretpostavka o u eš u metilglioksala i glioksalaze I u regulaciji deobe elija. Prvi eksperimentalni podaci o nastanku metilglioksala u fiziološkim uslovima, putem neenzimske razgradnje gliceraldehid-3-fosfata, objavljeni su u radu Bonsignore i saradnika (1973). Takahashi i saradnici su opisali reakciju aminokiselina sa metilglioksalom (i glioksalom). Utvrdili su da se argininski bo ni ostatak dominantno modifikuje u reakciji sa metilglioksalom, pri emu nastaje hidroimidazon, ija je struktura tada i prvi put predložena (Takahashi, 1977). Ukazano je na postojanje veze izme u hiperglikemije u dijabetesu i pove anog fluksa nastajanja metilglioksala (Thornalley, 1988). Metilglioksal je poslednjih dvadesetak godina ponovo u fokusu interesovanja nau nih istraživanja, kao uzro nik patoloških promena u dijabetesu i drugim bolestima.

Metilglioksal (2-oksopropanal), reaktivni elektrofilni -oksoaldehid je fiziološki metabolit. Nastaje u svim elijama i organizmima. Iako je udeo metilglioksala u fluksu

glukotrioza u normoglikemiji vrlo mali (0.1 % fluksa, a brzina sinteze je 120 μM /danu) posledice su vrlo značajne, s obzirom na to da je metilgliksal jako reaktivan prema nukleinskim kiselinama i proteinima.

U vodenom rastvoru, na pH 7, metilgliksal postoji u tri oblika koji su u ravnoteži: kao nehidratisan oblik (1 %), monohidrat (71 %) i dihidrat (28 %). Smatra se da samo nehidratisan oblik metilgliksala uestvuje u reakcijama glikacije. Metilgliksal pokazuje keto-enol tautomeriju, ravnoteža se pomera ka enolnom obliku sa porastom pH. U baznoj sredini metilgliksal podleže Kanicarovom premeštanju daju i laktat. Metilgliksal podleže i reakcijama plimerizacije, ciklizacije i hidratacije. U vodenom rastvoru metilgliksala izloženom dehidrataciji, pokazano je da postoje brojni oblici u kojima se metilgliksal nalazi (Slika 17.; prikazane strukture imaju više diastereoizmera, npr. struktura 8 ih ima 5).



Slika 17. Strukture metilgliksala: monohidrat-1, dihidrat-2, nehidratisan keto-aldehid, najreaktivniji izomer-3, trioksan-4, aciklični dimeri-5,8, ciklički dimeri -7,9, i trimer-6, (Nemet et al, 2006).

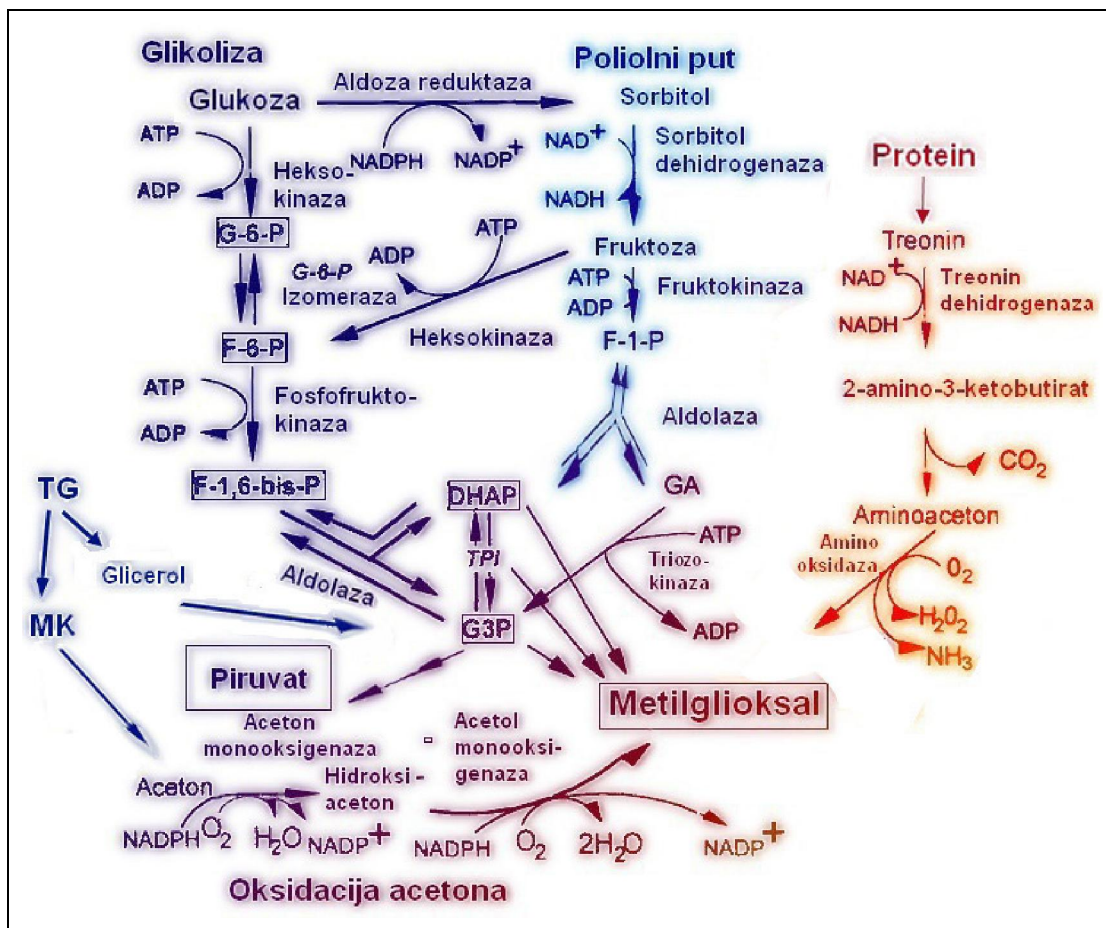
Prisustvo organskih rastvarača, temperature i količine dostupne vode su faktori koji utiču na ravnotežu različitih oblika metilgliksala i stoga na njegovu reaktivnost. S obzirom na to da se ne radi o homogenim sredinama, odnosno da je u njihovim odeljcima jako različita dostupnost vode i organskih molekula, reaktivnost metilgliksala u različitim delovima ćelije i tkiva može biti vrlo različita, odnosno različita tkiva mogu biti različito osetljiva na delovanje metilgliksala (Nemet et al, 2006).

2.8.1. Metabolizam metilglioksala.

Kako je već istaknuto u prethodnom poglavlju, metilglioksal nastaje u metabolizmu glukoze i u poliolnom putu, u metabolizmu triglicerida i treonina. Kao reaktivni metaboli koji su intermedijer u estvuje u nastanku AGEs i ROS, a glavni metaboli koji put uklanjanja metilglioksala odvija se preko enzimskog sistema glioksalaza.

Pregled metaboličkih puteva nastanka metilglioksala dat je na Slici 18. Metilglioksal može nastati:

- fragmentacijom i eliminacijom fosfata iz fosfo-enol-diolatnog oblika gliceraldehid-3-fosfata i dihidroksiacetonfosfata. Ova reakcija može biti katalizovana triozofosfat-izomerazom, kada praktično dolazi do curenja fosfo-enol-diolata sa aktivnog mesta enzima, ali do ovih reakcija može doći i bez enzimske katalize, spontanom eliminacijom fosfata
- u direktnoj sintezi katalizovanoj metilglioksal-sintetazom, enzimom koji je nađen i kod prokariota i kod sisara. Aktivnost ovog enzima regulisana je fosfatom, kao inhibitorom. Smatra se da je na taj način u zavisnosti od dostupnosti fosfata u ćeliji, ovaj enzim ima ulogu u kontroli glikolize.
- iz acetona (nastalog u metabolizmu masnih kiselina) i acetoacetata (nastalog u metabolizmu ketonskih tela) Citohrom P450 2E1 katalizuje nastajanje hidroksiacetona (acetol) iz acetona, a zatim i metilglioksala, uz utrošak jednog molekula NADPH.
- aktivnošću u mijeloperoksidaze i aminooksidaze;
- oksidacijom aminoacetona, nastalog u katabolizmu treonina i glicina. Aminooksidaze su velika familija enzima sisara, a enzimi koji katalizuju ovu reakciju pripadaju tzv. semikarbazid-inhibiranim aminooksidazama (SSAO). Mogu se nalaziti ili u plazmi, ili u tkivima kao membranski proteini.
- u reakcijama Mejlardovog tipa i u peroksidaciji lipida;
- metilglioksala se stvara u hrani i pićima koja sadrže ugljene hidrate kao proizvod Maillard-ove reakcije, kao i iz lipida i mikroorganizama, u toku industrijske prerade, kuvanja i dugog čuvanja hrane.



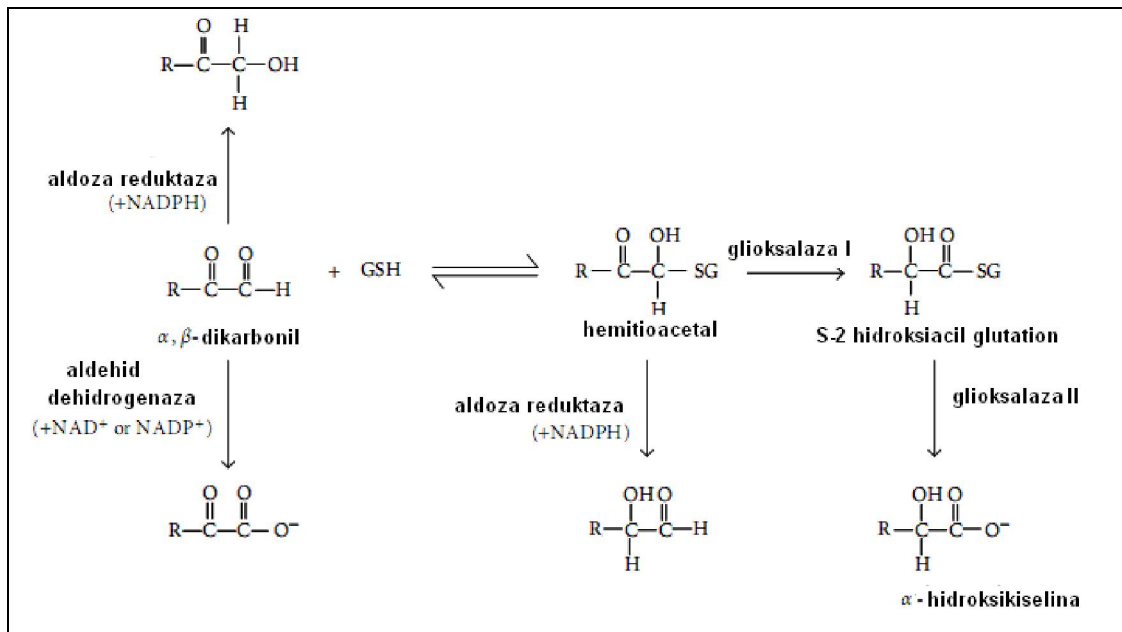
Slika 18. Putevi nastanka metilglioksala (G-6-P, glukozo-6 fosfat; F-1-P, fruktozo-1-fosfat; F-1,6-P, fruktozo-1,6-bisfosfat; F-6-P, frktozo-6-fosfat; DHAP, dihidroxiacetonfosfat; G3P, gliceraldehid-3-fosfat; TPI, triozofosfat izomeraza; GA, gliceraldehid; TG, trigliceridi; MK, masne kiseline, prema Thornalley, 1996).

2.8.2. Mehanizmi detoksifikacije metilglioksala.

Postoji više enzima i enzimskih sistema koji uklanjaju metilglioksal: NADPH-zavisna aldoza-reduktaza, aldehyd-dehidrogenaza, 2-oksoaldehid dehidrogenaza i sistem glioksalaza (Slika 19.). U razli itim organima i tkivima zastupljenost ovih enzima je razli ita.

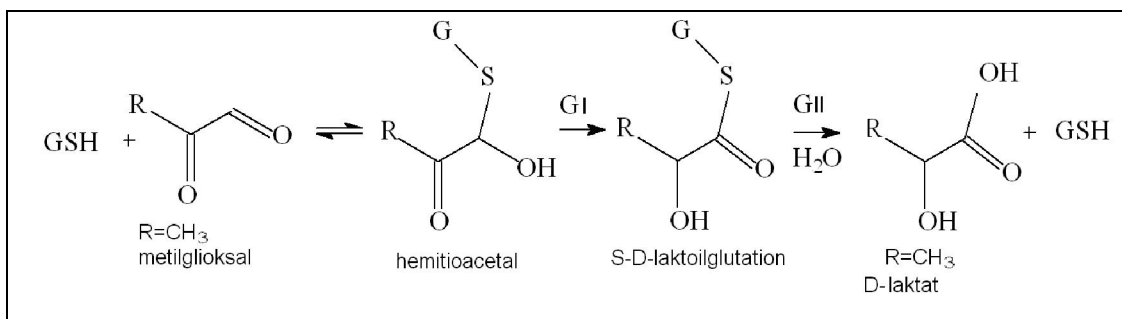
Sistem glioksalaza je glavni enzimski sistem za detoksifikaciju metilglioksala. Detoksifikacija metilglioksala predstavlja zaobilaznicu u glikolizi, put kojim se od triozofosfata dobija piruvat. Sistem glioksalaza ine dva enzima, glioksalaza I i glioksalaza II, kao i kataliti ka koji ina glutaciona, koji je prakti no kofaktor za ovaj

sistem. To je vrlo jednostavan metaboli ki put za uklanjanje metilgliksala kao štetnog fiziološkog metabolita.



Slika 19. Fiziološki mehanizmi detoksifikacije metilgliksala (Pun i Murphy, 2012).

Glioksalaza I katalizuje nasatanak S-D-laktil-glutationa, preko glutation-hemithioacetala. Glioksalaza II katalizuje hidrolizu S-D-laktil-glutationa (ili S-hidroksiacetyl-glutationa) do laktata (α -hidroksi kiseline), pri emu se regeneriše redukovan glutation. D-laktat se dalje oksiduje do piruvata u mitohondrijama sisara dejstvom D-laktat-dehidrogenaze (Slika 20).



Slika 20. Detoksifikacija metolgliksala sistemom glioksalaza (GI – glioksalaza 1, GII – glioksalaza 2, Thornalley, 1996).

Glioksalaza I se nalazi u citosolu svih elija, a glioksalaza II u citosolu i mitohondrijama. One su široko rasprostranjene u živom svetu.

Kod ljudi postoje 2 alela glioksalaze 1: GLO1 i GLO2. Enzim je dimer, pa postoje tri aloenzima, za koje je pokazano da se ne razlikuju u kinetici. Obe subjedinice sadrže Zn^{2+} . Aktivnost Glioksalaze I je regulisana fosforilovanjem i na nivou sinteze. Fiziološki supstrati glioksalaza, pored metilglioksala su glioksal i 4,5-diokso-valerat koji nastaje u oksidativnom katabolizmu 5-aminolevulinata (prekursora hema). Glioksalaze u estvuju i u redukciji α -ketoglutarata (Grillo i Colombatto, 2008; Thornalley, 1996).

Postoji više teorija o biološkim ulogama sistema glioksalaza. Uloga ovog sistema svakako je detoksifikacija metilglioksala. No pošto je ovaj put toliko rasprostranjen, postavlja se pitanje da li je evolutivno to bila njegova prva i osnovna funkcija. Jedno od mogućih objašnjenja je da je ovaj put bio anaplerotički put za reduktivni ciklus limunske kiseline. Moguće je da je supstrat bio u stvari formaldehid. Postoji teorija da je jedna od uloga glioksalaza u regulisanju elijske deobe. Pretpostavka je da je sistem glioksalaza neophodan za održanje života, od najranijih stadijuma u embriogenezi, tokom rasta i razvoja, pa sve do kraja života; da on u estvuje u kontroli rasta i deobe elija.

Pokazano je da aldehidi imaju kancerostatsko dejstvo. Tumorsko tkivo ima abnormalno visok nivo anaerobne glikolize i tako e visok nivo metilglioksala, ali i povišenu aktivnost i ekspimiranje glioksalaze I. Rezistencija tumora na više lekova (MDR-multidrug resistance) povezana je sa povećanom ekspresijom gena za glioksalazu 1. Delovanjem visoko afinitetnih inhibitora na glioksalazu bilo bi moguće lečenje tumora kod kojih je povećano njeno ekspimiranje. U toku su preklinička ispitivanja ovih inhibitora (Grillo i Colombatto, 2008; Thornalley i Rabbani, 2011). U studiji na miševima pokazano da inhibitor glioksalaze I (S-p-bromobenzilglutation) dovodi do povećanja metilglioksala u eliji i do apoptoze (Thornalley, 1996).

Pošto je u dijabetesu povećano nastajanje metilglioksala i istovremeno smanjen nivo GSH, usled nedovoljne aktivnosti glioksalaze 1 i povećanog oksidativnog i karbonilnog stresa, dolazi do oštećenja tkiva.

Metilglioksal se tako e metaboliše aldoza-reduktazom, NADPH zavisnom aldehyd reduktazom, koja je uključena u detoksifikaciju aldehida i osmoregulaciju (Slika 18.) Metilglioksal se tako prevodi u hidroksiaceton (95 %) i D-laktaldehid (5%). Hidroksiaceton se dalje redukuje do L-propan-1,2-diola. Ovaj sistem je veoma zastupljen u meduli bubrega. Betain-aldehyd-dehidrogenaza katalizuje NAD zavisnu oksidaciju metilglioksala u piruvat, mada sa manjom efikasnošću u odnosu na svoj prirodni supstrat betain-aldehyd (Thornalley, 1996). Enzim 2-oksoaldehyd-dehidrogenaza,

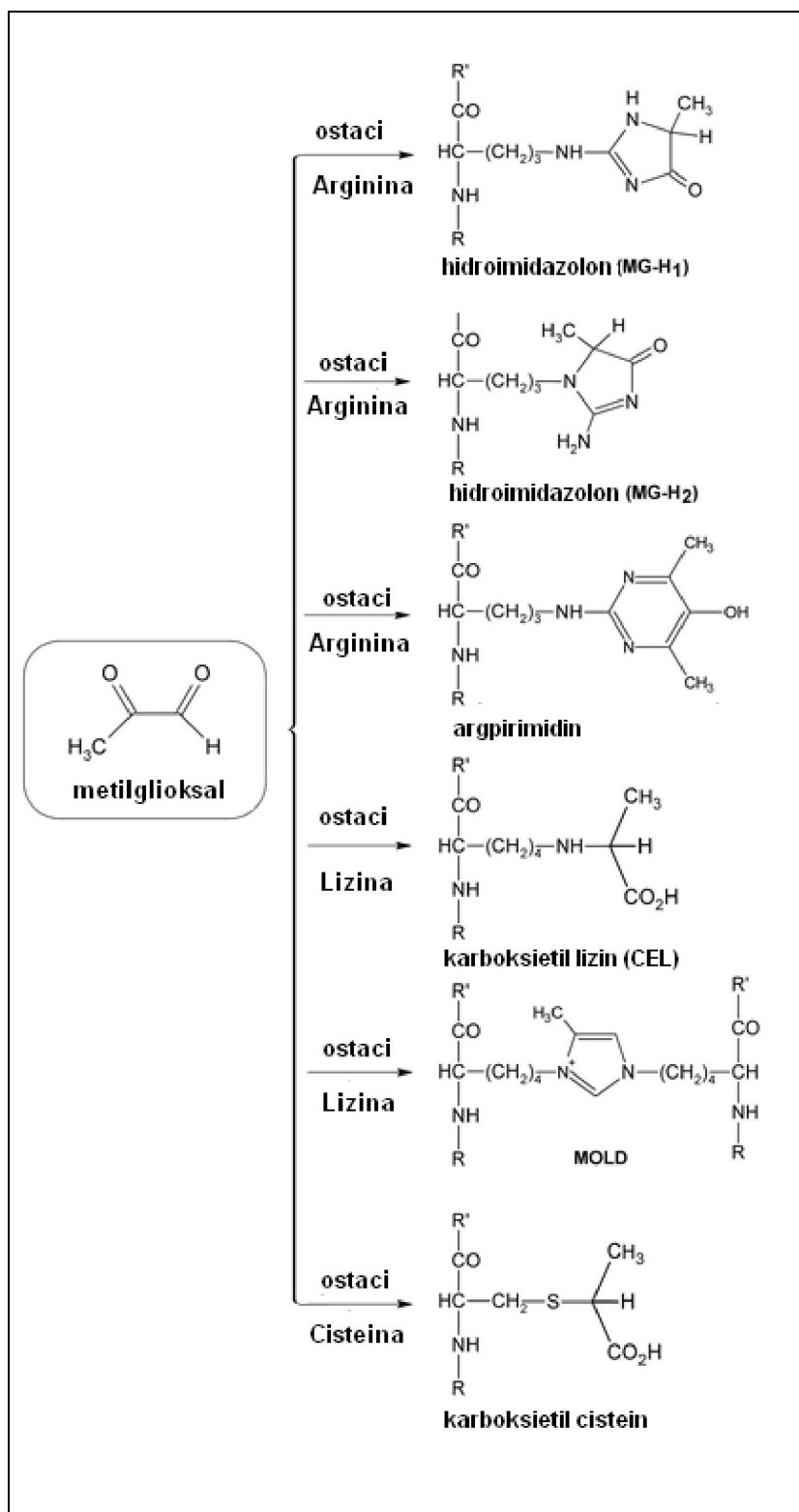
katalizuje oksidaciju metilglioksala u piruvat, u jetri. Pokazano je da i NADP^+ i NAD^+ mogu biti koenzimi za ovaj enzim (Thornalley, 2003a). Metilglioksal se može vezati za glutation i nagraditi D-laktaldehid koji je bolji supstrat za aldoza-reduktazu, a koja se ga dalje redukovati do propandiola. Pri smanjenim koncentracijama glutationa, aldoza reduktaza može redukovati metilglioksal do acetola. Aldoza-reduktaza zato u hiperglikemiji može imati i važniju ulogu od sistema glioksalaza, s obzirom na nedostatak glutationa (VanderJagt et al, 2001).

2.8.3. Krajnji proizvodi glikacije koji su derivati metilglioksala.

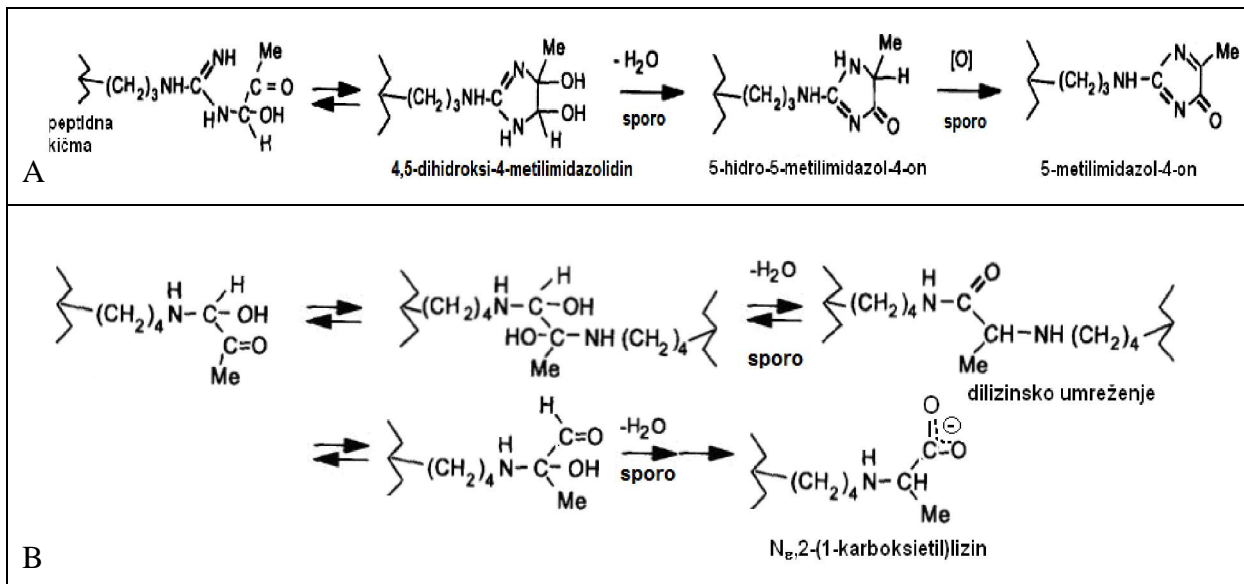
Metilglioksal pri fiziološkim uslovima interaguje sa N-terminalnom amino-grupom i bočnim ostacima proteina: amino-grupom lizina, guanidino-grupom arginina i tiol-grupom cisteina, pri čemu nastaju krajnji proizvodi glikacije proteina (Slika 21.). Reakcijom između metilglioksala i guanidino grupe Arg dolazi do formiranja imidazolona kao što su N-(5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il)-L-ornitin ili 5-metilimidazol-4-on (MG-H1), 2-amino-5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazol-1-il)-pentanska kiselina (MG-H2) i argipirimidin. U reakciji sa lizinom nastaju karboksietil-lizin i bis(lizil)glikozilamin (MOLD), a u reakciji sa tiol-grupom cisteina dobija se karboksietil-cistein (Slika 21). Predlog mehanizama nastanka proizvoda glikacije ostataka Arg i Lys proteina sa metilglioksalom dat je na Slici 22.

Do povećanja nivoa metilglioksala dolazi u hiperglikemiji u dijabetesu, uremiji, inflamaciji, uslovima povećanog oksidativnog stresa i u procesu starenja (Slika 23.) Metilglioksal reaguje i modifikuje proteine, lipide i DNK, dovodi do nastajanja krajnjih proizvoda glikacije. Nastali adukti, preko interakcije sa RAGE, utiču na regulisanje procesa inflamacije, transkripciju gena, umrežavanje proteina i apoptozu.

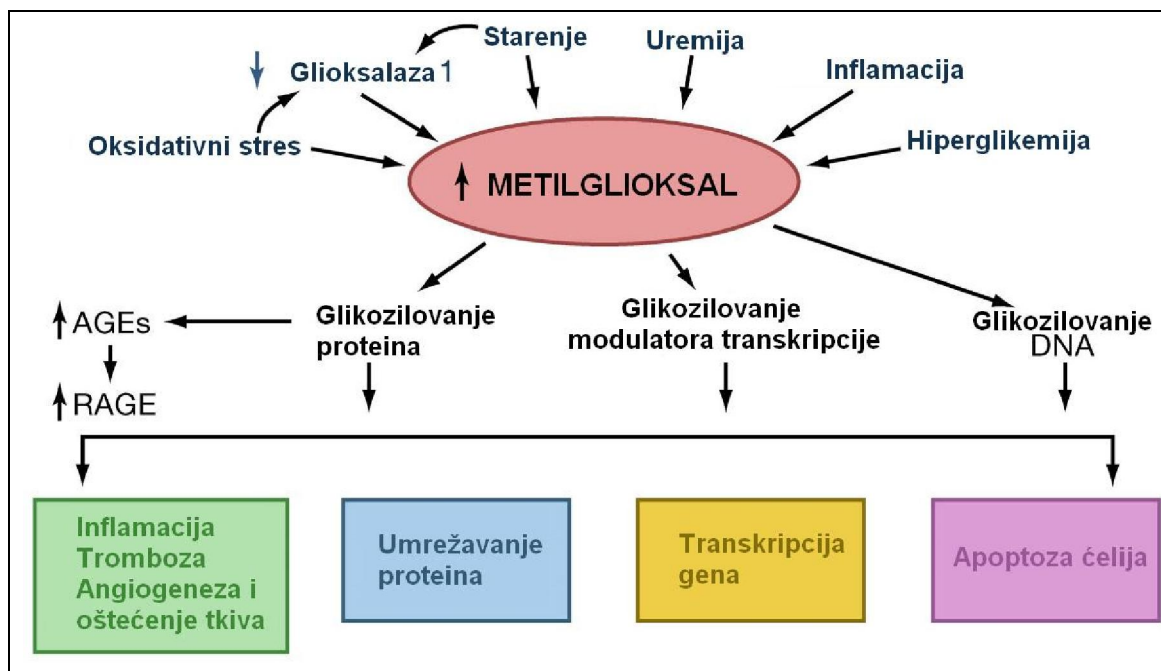
Proteini modifikovani metilglioksalom vezuju se za receptore na površini monocita i makrofaga, dolazi do endocitoze i degradacije kompleksa u lizozomima. Pokazano je in vitro, da HSA modifikovan metilglioksalom stimuliše sintezu i sekreciju IL-1 u humanim monocitima THP-1 ćelijama. Takođe, on dovodi do oslobađanja CSF-1 koji, stimuliše proliferaciju ovih monocita.



Slika 21. Krajni proizvodi glikacije proteina nastali reakcijom sa metilglioksalom (Peng et al, 2011).



Slika 22. Reakcije ostataka Arg (A) i Lys (B) proteina sa metilglioksalom i nastanak krajnjih proizvoda glikacije (prema Thornalley, 1996).



Slika 23. Stanja u kojima dolazi do pove anja nivoa metilglioksala uticaj na genom i proteom (Ramasamy et al, 2006).

U uslovima gladovanja lipidi postaju glavni izvor energije. Aktivira se lipoliza, inhibira glikoliza, dolazi do pove anja koncentracije ketonskih tela, a posebno acetona, u plazmi. Nivo metilglioksala u plazmi je znatno povišen ve pri gladovanju od 24h. U

toku gladovanja, do 2/3 acetona u cirkulaciji se prevodi u glukozu. Glukoneogeneza iz acetona mogu e je da se odvija preko puteva koji uklju uju metilgliksal i 1,2-propandiol. Smatra se da u uslovima gladovanja, dolazi do pove ane modifikacije proteina metilgliksalom, stimulacije sinteze i sekrecije IL-1 i CSF-1 u monocitima i makrofagima, što može doprineti promenama u imunom sistemu u anoreksiji. Pokazano je da pove ana sekrecija IL-1 i CSF-1 doprinosi razvoju ateroskleroze kod makrovaskularne bolesti i glomeruloskleroze vezane za nefropatiju (Thornalley, 1996).

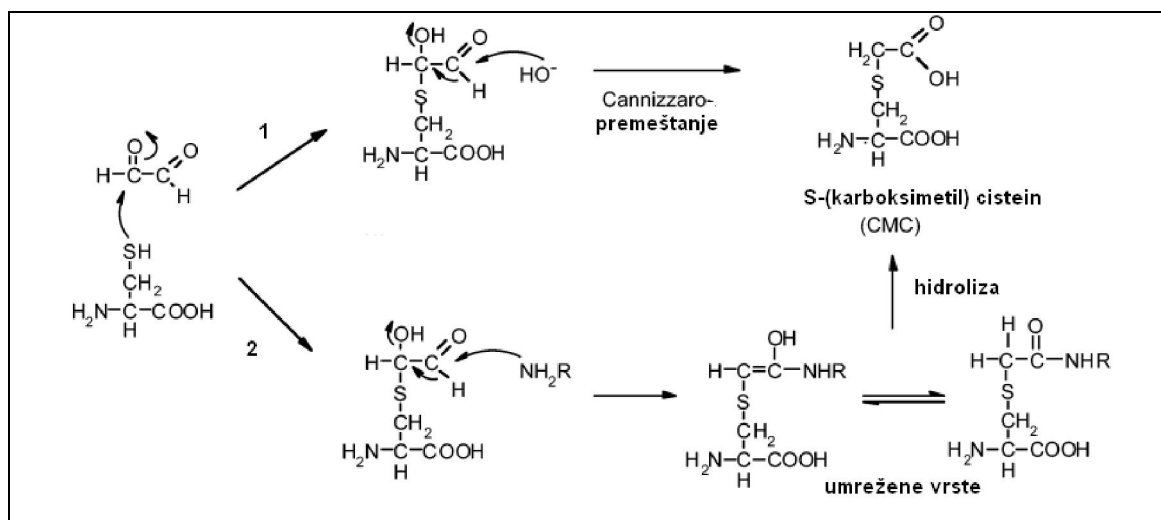
U hiperglikemiji i dijabetesu dolazi do pove anja koncentracije metilgliksala. U in vitro eksperimentima, sa pove anjem glikemije raste fluks metilgliksala u eritrocitima koji se metaboliše sistemom gliksalaze. Kod pacova sa dijabetesom (indukovanim streptozotocinom) koncentracija metilgliksala je pove ana u korteksu i meduli bubrega, so ivu i cirkulaciji. Srednja vrednost koncentracije metilgliksla u serumu dijabeti ara tipa 2 je 2-3 puta ve a nego kod zdravih osoba, dok je kod dijabeti ara tipa 1, 5-6 puta ve a. Kod oba tipa dijabeti ara utvr eno je zna ajno pove anje aktivnosti gliksalaze I u eritorcitima, verovatno zbog pove anog eksprimiranja ovog gena u prekursorskim elijama eritrocita, usled hroni no pove ane koncentracije metilgliksala. Kod dijabeti ara tip 1 koncentracija metilgliksala u krvi korelira sa trajanjem dijabetesa i raste za oko 10 % kontrolne vrednosti, godišnje. Mogu e da je uzrok tome indukcija citohroma P450 2E1 i pove ano stvaranje metilgliksala iz acetona i ketonskih tela. Budu i da je na ena zna ajna pozitivna korelacija trajanja dijabetesa (sa retinopatijom) i nivoa HbA1c i negativna korelacija sa nivoom D-laktata, pove anje metilgliksala može biti posledica smanjene sposobnosti detoksifikacije metilgliksala. Trajanje dijabetesa je u korelaciji sa razvojem retinopatije, neuropatije i nefropatije, kao i sa kombinacijom ovih komplikacija (Thornalley, 1996).

2.9. Reakcija tiola sa dikarbonilnim jedinjenjima

Najve i broj studija koje su prou avale reakcije Maillard-ovog tipa in vivo bio je fokusiran na modifikacije ostataka lizina i arginina, mada je upravo tiol-grupa ostatka cisteina, jak nukleofil i stoga podleže reakciji sa dikarbonilnim jedinjenjima. Tiol-grupa ostatka cisteina u proteinima u fiziološkim uslovima primarno je u obliku tiolatnog anjona. Naime nominalna pKa vrednost tiol-grupe cisteina je približno 8, ali u

proteinima zbog mikrookoline može biti relativno niska i stoga na fiziološkom pH u ve o j meri ili potpuno deprotonovana.

U literaturi je malo radova o zna aju tiol-grupe u reakcijama glikacije i umrežavanju proteina, verovatno zbog njene male zastupljenosti na površini molekula proteina. U in vitro eksperimentima pokazano je da pri inkubiranju enzima koji imaju tiol-grupu u aktivnom mestu (gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza, Morgan et al, 2002) i kreatin-kinaza (Zeng i Davies, 2005)) metilgliksalom, dolazi do modifikacije bo nih ostataka Cys i inaktivacije enzima. Ispitivanje reakcije metilgliksala i Cys je pokazalo da je reakcija brza i reverzibilna pri uslovima sli nim fiziološkim i da dolazi do stvaranja hemitioacetala (Kalapos, 2008; Lo et al, 1994). Na osnovu ispitivanja reakcije tiol-grupe proteina i gliksala (Thorpe i Baynes, 2003; Zeng i Davies, 2005) predložen je mehanizam reakcije po kojem se pri nukleofilnoj adiciji tiol-grupe Cys na karbonilnu grupu gliksala prvo stvara hemitioacetal, koji zatim podleže Kanizarovom premeštanju i nastaje S-karboksimetil-cistein CMC, Slika 24.).



Slika 24. Mehanizam reakcije Cys-tiol grupe i metilgliksala; stvaranje karboksimetil-cisteina.

Karboksimetil-cistein (i karboksietil-cistein) su identifikovani kao AGEs (u hidrolizatu proteina) i predloženi kao dobri markeri za detektovanje pove anog nivoa dikarbonila u biološkim sistemima (Alt et al, 2004; Mostafa et al, 2007; Thorpe i Baynes, 2003). Pove anje nivoa CMC na eno je u tkivima u dijabetesu, kao i u elijama u kulturi koje su izložene oksidativnom stresu i visokoj koncentraciji glukoze. Koncentracija CMC je uporediva sa koncentracijom CML, uprkos tome što je znatno

manja zastupljenost ostataka Cys u odnosu na ostatke Lys u proteinima. Monokarbonili, kao što je glukoza, u reakciji sa Cys, tako e daju hemitioacetal, me utim, on ne podleže dalje en-diol tj. Amadorijevom premeštanju i reakcijama degradovanja. Stoga je CMC verovatno samo adukt reakcije ostataka Cys sa dikarbonilima.

Ireverzibilna modifikacija tiol-grupe može direktno da uti e na regulatorne procese, u odgovoru elije na eksterne uticaje kao što su inflamacija, osmotski ili termalni šok, pove anje nivoa supstrata ili hormona (Thorpe i Baynes, 2003). Poznato je da ovi stresori indukuju regulatorne mehanizme koji uklju uju reverzibilne reakcije tiol-grupe – oksidaciju do cistina, vezivanje glutaciona i nitrozilovanje. Ireverzibilna modifikacija tiol grupe karbonilnim jedinjenjima bi, stoga uticala na ograni enje mogu nosti odgovora elije na stres preko transdukcije signala i regulatorne adaptacije. Time karbonilovanje tiol-grupe može direktno uticati na biološke procese kao što su apoptoza i nekroza elija.

Uloga amino- i tiol-grupe u popre nom vezivanju preko reaktivnih jedinjenja kao što su glutaraldehid (Okuda, 1991), 4-hidroksinonenal (Ishii et al, 2003) i akrolein (Furuhata et al, 2002) je bila ranije ispitivana.

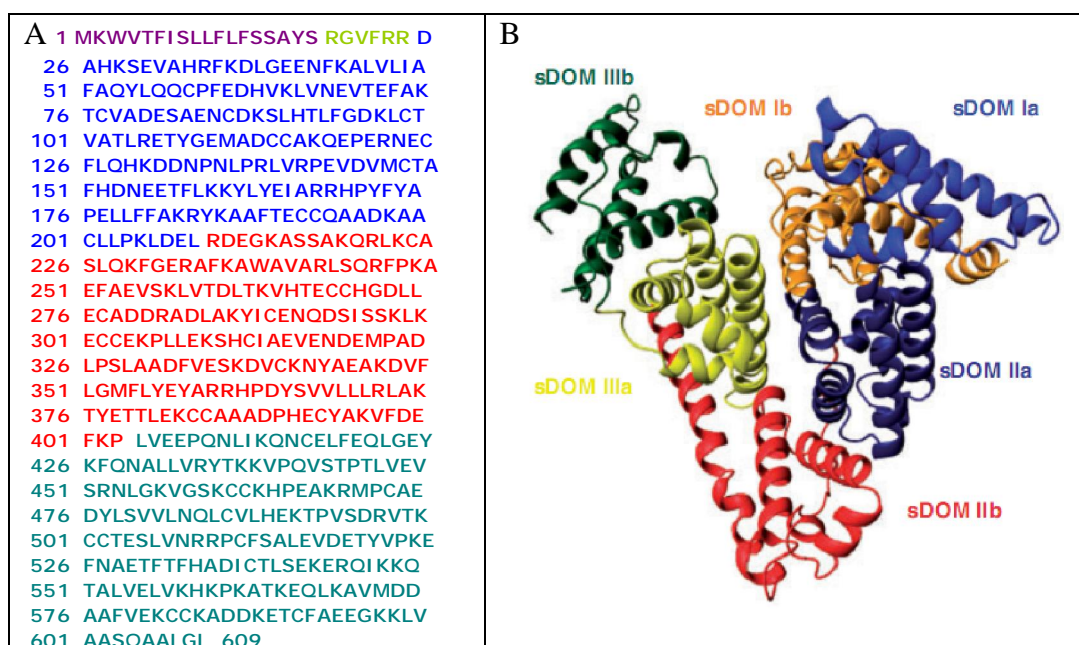
Potencijalni zna aj reakcije tiol-grupe proteina i -dikarbonilnih jedinjenja (metilglioksala) u umrežavanju proteina istaknut je do sada samo od strane Zeng-a i Davies-a (2006). Oni su predložili da proizvod po etne reakcije -SH grupe i metilglioksala, hemitioacetal, može dalje biti meta za reakciju sa amino-grupom (Slika 24.), što dovodi do stvaranja umreženih vrsta. Tek kada se umreženi protein hidrolizuje, dobija se tiol-AGE, odnosno karboksimetil-cistein (ili karboksietil-cistein). Karboksimetil-cistein verovatno ne postoji per se u tkivu, ve nastaje tek u procesu hidrolize proteina.

2.10. Humani serum albumin – model za ispitivanje modifikacije proteina

Albumin je najzastupljeniji protein plazme ija je normalna koncentracija 35-50 g/L, a prose na koncentracija 43 g/L (oko 0.6 mM). ini više od 50 % ukupnih proteina plazme (Turell et al, 2009). Sintetiše se u hepatocirima u jetri. Gen za albumin se nalazi na etvrtom hromozomu. Primarni transkript je preproalbumin, koji sadrži 609 aminokiselinskih ostataka. Pri osloba anju preproalbumina iz granuliranog

endoplazmatski nog retikulum odseca se signalni N-terminalni peptid od 18 ostataka aminokiselina, a u Goldžijevoj oblasti se odseca N-terminalni heksapeptid i tako nastaje albumin (Slika 25.A.). Po sintezi, odmah se sekretuje u cirkulaciju. Može da se prenese u ekstravaskularni prostor i ponovo vrati u plazmu prose no jedanput u 23 sata. Zna i, iako je albumin protein plazme, znaćan udeo albumina (više od 50 %) se nalazi van cirkulacije, uglavnom u koži i miši ima.

Molekulska masa je oko 67 kDa, ima 585 aminokiselinskih ostataka (Slika 25.A.), me u kojima je 6 Met, 18 Tyr, 1 Trp, 17 disulfidnih mostova i jednu slobodnu tiol-grupu Cys-34. Nativni albumin nije glikozilovan. pI vrednost iznosi 5.2, što zna i da je na fiziološkom pH negativno naelektrisan (na pH 7.4 ima 19 negativnih šarži). Odre ena mu je kristalna struktura. Monomer je, srcolikog oblika, sa oko 67 % sekvence u α -heliksu, nema β -plo ice (Slika 25.B.). Ima tri homologa domena I, II i III od kojih svaki ima po 2 subdomena (A i B). Domenska i subdomenska struktura daje albuminu fleksibilnost, a disulfidni mostovi mu obezbe uju u odre enoj meri rigidnost unutar svakog subdomena. Jedini slobodni ostatak Cys je u 9.5 Å dubokom džepu u blizini tri polarna ostatka Asp 38, His 39 i Tyr 84 (Torres et al, 2012).

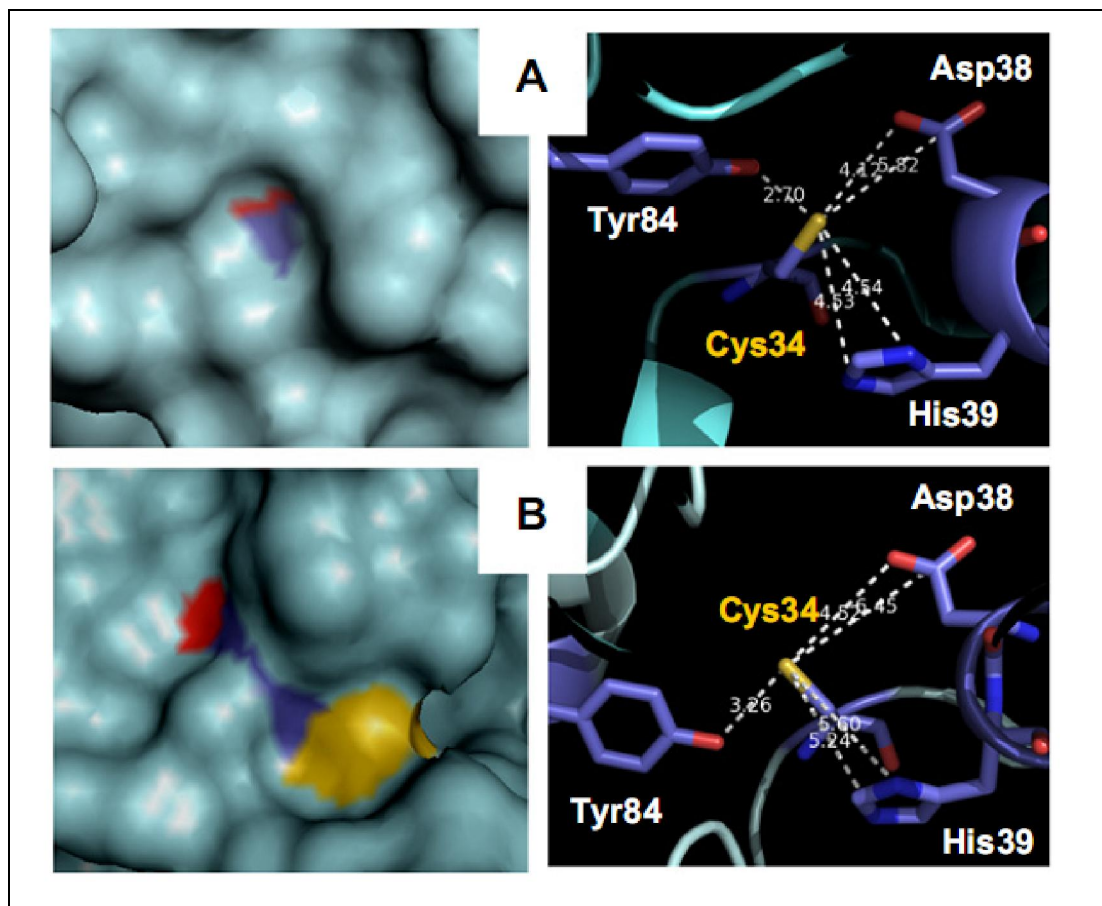


Slika 25. Sekvenca primarnog transkripta (A) i model molekula HSA koji prikazuje domensku strukturu (B, prema Saito et al, 2011). Razli itim bojama su ozna eni domeni i subdomeni (sDOM Ia,..., sDOM IIIb).

Njegova najvažnija uloga je održavanje koloidnog osmotskog pritiska, vezivanje i transport liganada kao što su slobodne masne kiseline, metalni joni, hormoni i lekovi. Albumin je uključen u farmakokinetiku mnogih lekova, kao što su peptidi i citokini. Vezivna mesta za lekove sa najvećim afinitetom su mesto I na subdomenu IIA, mesto II je na subdomenu IIIA, dok N-terminus ima visok afinitet za vezivanje jona metala (Co^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+}). Mesto I i II su hidrofobni džepovi za koje se specifično vezuju aromati i heterocikli i ligandi. Mesto I je vrlo fleksibilno i vezuje veće endogene molekule (bilirubin i porfirine). Ovo mesto može imati više konformacija zavisno od liganda koji vezuje. Mesto vezivanja lekova II je manje zapremine i manje fleksibilno, indukuje vezivanje koje je više stereospecifično (npr. paracetamol se vezuje u okviru subdomena IIIA). Masne kiseline se vezuju za hidrofobne džepove koji se nalaze na subdomenima IB, IIIA i IIIB. Pokazano je da ostaci cisteina, lizina, serina i arginina na albuminu mogu kovalentno da vezuju lekove, posebno je značajno vezivanje lekova za slobodnu tiol-grupu Cys 34.

Oko 70 % HSA se nalazi u redukovanom obliku, dakle sa slobodnom tiol-grupom, dok je ostatak HSA uglavnom u obliku mešovitog disulfida (u najvećoj meri sa Cys, ali i sa drugim malim tiolima u cirkulaciji (Bar-Or et al, 2005; Kleinova et al, 2005). Minornu albuminsku frakciju čine oksidovane forme albumina, sulfinska kiselina ($\text{HSA-SO}_2\text{H}$) i sulfonska kiselina ($\text{HSA-SO}_3\text{H}$). Do povećanja udela ovih oksidovanih formi dolazi u patološkim stanjima. Stoga su minorne oksidovane forme HSA predložene kao markeri u kliničkoj praksi (Torres et al, 2012).

Slobodna tiol-grupa HSA čini 80% od ukupnih tiola plazme (oko 500 $\mu\text{mol/l}$) (Faure et al, 2008). Cys34 se nalazi u neposrednoj blizini α -heliksa na N-terminalnom kraju HSA kojeg grade aminokiselinski ostaci 37-56. Na osnovu kristalografske analize, utvrđeno je da odmašćen HSA ima konformaciju u kojoj se Cys34 nalazi unutar šupljine duboke oko 9.5 Å i da je njegova dostupnost stoga oko 0.7 % (na osnovu PDB strukture 1AO6, Slika 26.A.). Vezivanjem masnih kiselina dolazi do promene konformacije HSA, šupljina se otvara i dostupnost Cys 34 biva veća (oko 4.9%, na osnovu PDB strukture 1E7I, HSA kompleksiranog sa stearatom, Slika 26.B.). Menjaju se relativna rastojanja ostataka Tyr84, Asp38 i His39, koji izgleda da stabilizuju tiolatni anjon i tako doprinose smanjenju pKa Cys34 od 7.9 do 7.4. Samim tim dolazi do višestrukog povećanja reaktivnosti tiol-grupe, na šta sigurno utiče i povećanje njene dostupnosti (Torres et al, 2012).



Slika 26. Izloženost ostatka Cys34 u odmaš enom HSA (A) i u HSA sa vezanim stearatom (B) (modeli atoma elemenata su prikazani: C-ljubi asto, O-crveno, N-plavo, S-žuto, razdaljine izme u atoma su prikazane u Å; prema Torres et al, 2012).

Albumin ima ulogu kao antioksidant upravo zahvaljuju i prisustvu slobodne tiol-grupe Cys34. Dodatno albumin deluje kao antioksidant jer vezuje prooksidante metalne jone i potencijalni antioksidant bilirubin. Albumin ima aktivnost lipidne hidroperoksid-reduktaze zavisne od tioredoksina u kojoj ušestvuje disulfid Cys 392-Cys 438 (pokazano je in vitro). Albumin deluje zaštitno na endotel, može da inhibira vezivanje polimorfonuklearnih leukocita za endotelne elije u kulturi.

Zbog svih navedenih karakteristika u ovom radu je HSA koriš en kao model-sistem za ispitivanje modifikacija tiol-grupe dikarbonilnim jedinjenjima. Treba napomenuti, me utim, da se u ve ini studija koje su prou avale strukturne i funkcionalne promene albumina do kojih dolazi glikacijom, ispitivanje radilo sa komercijalnim BSA izloženim in vitro glikaciji, malo je radova koji su poredili promene

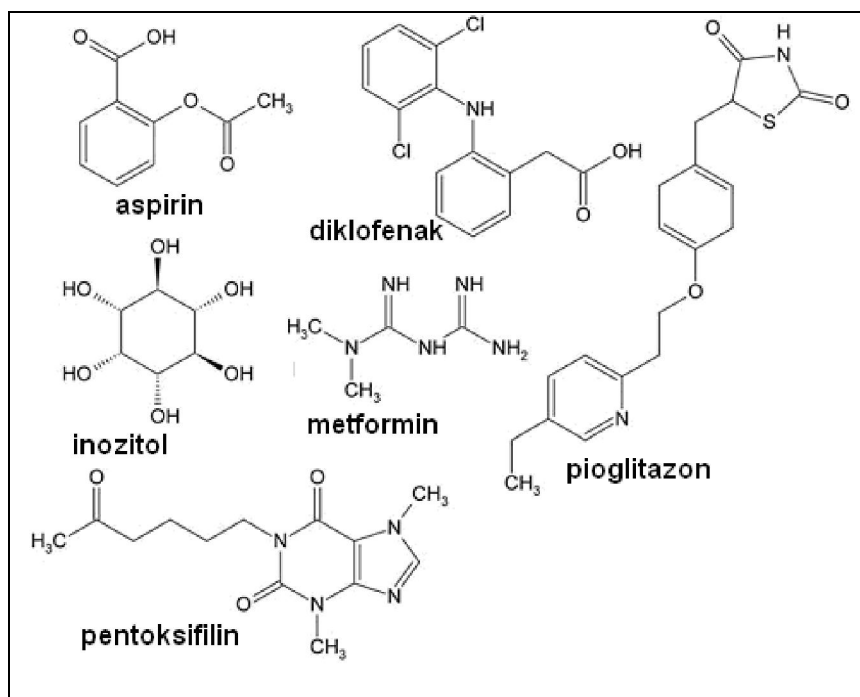
u strukturi i funkciji in vitro glikovanog HSA sa HSA u hiperglikemiji in vivo (Guerin-Dubourg et al, 2012).

2.11. Spremanje karbonilnog stresa i procesa glikacije

U prethodnim poglavljima više puta je isticano da proces glikacije doprinosi brojnim patološkim stanjima, nastanku komplikacija u dijabetesu, mikro- i makrovaskularnim bolestima, Alchajmerovoj bolesti, cirozi, uremiji, artritisu i promenama u procesu starenja (Peng et al, 2011).

Velike kliničke studije (DCCTRG, 1993; UKPDS, 1998) su pokazale da kontrola glikemije ili krvnog pritiska smanjuje rizik od pojave i progresije vaskularnih komplikacija kod pacijenata obolelih od dijabetesa. Na osnovu njihovih rezultata ustanovljen je koncept postojanja tzv. metaboličke memorije u patogenezi vaskularnih komplikacija u dijabetesu. Jedan primer koji ilustruje ovaj koncept je da je značajno smanjenje rizika od progresivne retinopatije i nefropatije kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 1, koji su u toku studije bili pod terapijom, bilo je prisutno i nekoliko godina po završetku studije i prestanku terapije, bez obzira na povećanje hiperglikemije. S druge strane, zaključeno je da se hronične patološke promene na krvnim sudovima ne mogu lako otkloniti, čak ni postizanjem relativno dobre glikemijske kontrole. Kontrola glikemije u ranim fazama bolesti ima dugoročni preventivni uticaj na rizik od komplikacija u dijabetesu i od smrti, kod oba tipa dijabetesa. Među različitim biohemijskim putevima za koje se smatra da su uključeni u razvoj vaskularnih komplikacija u dijabetesu, biohemijska priroda krajnjih proizvoda glikacije i mehanizmi njihovog delovanja najviše su kompatibilni sa konceptom "metaboličke memorije" (Yamagishi, 2011). Budući da je teško postići i održati normalnu glikemiju u dijabetesu (Monnier, 2003), spremanje stvaranja krajnjih proizvoda glikacije je izuzetno važno u prevenciji i u terapiji komplikacija, u dijabetesu i drugim patološkim stanjima u kojima je prisutan karbonilni stres. Do sada je predloženo više potencijalnih inhibitora nastanka krajnjih proizvoda glikacije, nekoliko njih je predmet završnih faza kliničkih studija. Inhibitori umrežavanja proteina: karnozin, aminoguanidin, metformin, akarboza i piridoksamin su komercijalno dostupni. U 2005. godini navedeno je oko 850 jedinjenja, potencijalnih inhibitora umrežavanja proteina.

Inhibitori nastanka ranih proizvoda glikacije. Lekovi koji mogu da spre avaju nastanak ranih proizvoda glikacije, odnosno da spre e reakciju redukovanog še era i amino-grupe, i time nastanak Šifove baze, su: aspirin, diklofenak i inozitol (Slika 27.).

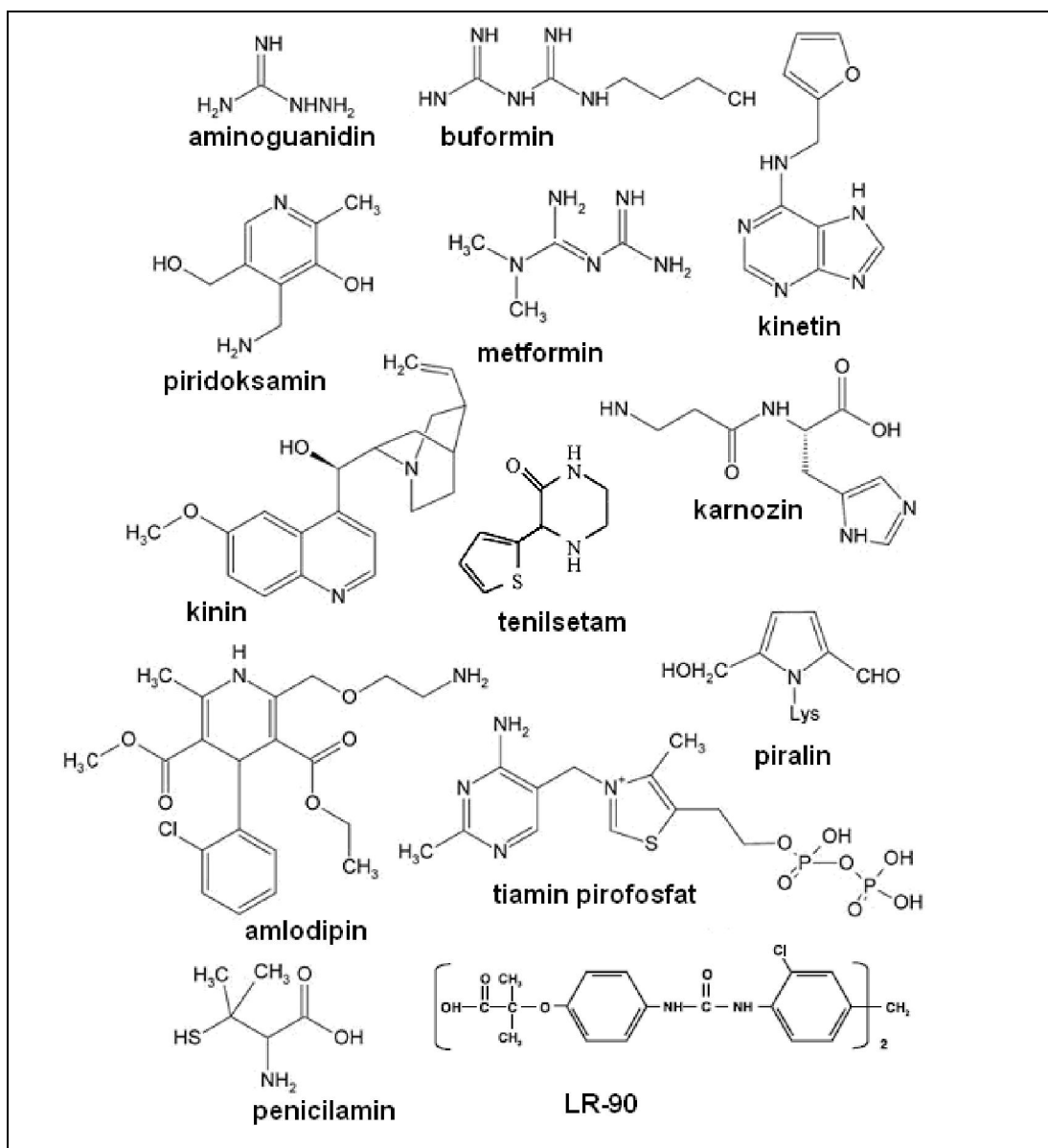


Slika 27. Inhibitori nastanka ranih proizvoda glikacije (prema Peng et al, 2011).

Aspirin (acetilsalicilna kiselina) inhibira proces glikacije acilovanjem slobodnih amino-grupa proteina, ime se spre ava vezivanje redukuju eg še era. Primenom aspirina spre avaju se neke komplikacije u dijabetesu, kao katarakta izazavana hiperglikemijom. Antiinflamatorni lek diklofenak mogao bi da spre ava glikaciju proteina vezivanjem za protein nekovalentnim interakcijama. Vezivanjem diklofenaka za albumin spre ava se glikovanje nekih od glavnih mesta glikacije. Inozitol je potencijalni inhibitor glikacije, dovodi do smanjenja glikacije proteina humanog so iva (za 57-67 %) time što vezuje glukozu. Prisustvo arginina i arginil-lizina zna ajno smanjuje vezivanje glukoze i spre ava nastanak Amadorijevog proizvoda u vlaknima iz tetiva repa pacova. Pioglitazon, metformin i pentoksifilin, tako e, inhibiraju reakcije ranih faza glikacije, ali nisu dovoljno poznati mehanizmi po kojima se to dešava (Peng et al, 2011).

Inhibitori nastanka kasnih proizvoda glikacije. Ve ina lekova koji deluju na proces glikovanja su inhibitori nastanka krajnjih proizvoda glikacije. Naj eš e su to, supstance koje vezuju reaktivna karbonilna jedinjenja i radikale, koji u ovim procesima

nastaju (Slika 28). Aminoguanidin i piridoksamin se smatraju potentnim hvata ima karbonilnih jedinjenja, ispitivani su kao tipi ni inhibitori stvaranja krajnjih proizvoda glikacije.



Slika 28. Inhibitori nastanka kasnih proizvoda glikacije (Peng et al, 2011)

Aminoguanidin, nukleofilni derivat hidrazina, je dobar hvata dikarbonilnih intermedijera koji nastaju u procesu glikacije. Smanjuje razvoj komplikacija u dijabetesu kod eksperimentalnih životinja, a pokazao je i dobre rezultate u prvim klini kim ispitivanjima ura enim 90-tih godina (Ulrich i Cerami, 2001). Klini ke studije u fazi II pokazale su da aminoguanidin dovodi do zna ajnog smanjenja LDL u cirkulaciji, do smanjenja albuminurije, smanjenja degeneracije retine i da njegova primena spre ava

gubak bubrežne funkcije (Ulrich i Cerami, 2001). Dalja klinička ispitivanja su prekinuta (u fazi III) jer lek nije pokazao dovoljnu efikasnost i primećeni su ozbiljni sporedni efekti, kao što su gastrointestinalni poremećaji, promene na jetri, anemija i simptomi slični gripu i lupusu (Thornalley, 2003b).

Piridoksamin je efikasan inhibitor nastajanja krajnjih proizvoda glikacije, *in vitro*. Utvrđeno je da sprečava napredovanje bolesti bubrega pacova, smanjuje hiperlipidemiju kod pacova sa eksperimentalnim dijabetesom tip 1. Utiče na pad serumskog kreatinina kod pacijenata sa dijabetičkom nefropatijom u odnosu na kontrolu (klinička studija, faza II), ali kod ovih pacijenata ne dovodi do poboljšanja u pogledu parametra albuminurije. Novija klinička istraživanja pokazuju poboljšanje renalne funkcije u kombinovanoj terapiji sa vitaminima B6, B9 i B12, ali se time postavlja pitanje efekta korišćenja samog piridoksamina (Schalkwijk i Miyata, 2012).

Kao hvatači i dikarbonilnih jedinjenja i inhibitori nastanka krajnjih proizvoda glikacije navode se tenilsetam, metformin, buformin i karnozin.

Tenilsetam (3-(2-tienil)-2-piperazinon) se kovalentno vezuje za glikovane proteine. Hvata je dikarbonilnih jedinjenja u milimolarnim koncentracijama i helator jona prelaznih metala (gvožđa) u mikromolarnim koncentracijama. Reaguje sa Amadorijevim proizvodom i tako sprečava dalje umrežavanje proteina. Pokazuje efekat zaštite u ranim fazama dijabetičke retinopatije na osnovu eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 2 (Hoffmann et al, 2006), sprečava akumuliranje krajnjih proizvoda glikacije u korteksu bubrega i aorti (Dukic-Stefanovic et al, 2001).

Metformin (dimetilbiguanidin) ima sposobnost vezivanja karbonilnih jedinjenja, reaguje sa gliksalom i metilgliksalom (ali ne i 3-deoksiglukozonom). Sa metilgliksalom gradi guanidin-dikarbonil-ciklični adukt (triazepinon), koji se zatim eliminiše iz tkiva (Ruggiero-Lopez et al, 1999). Sprečava umrežavanje fibrina i smanjuje rizik od tromboze kod poremećaja zgrušavanja krvi (Standeven et al, 2002). Smanjuje formiranje krajnjih proizvoda glikacije u kolagenu (na modelu dijabetesa kod pasa), kao i oštećenje nerava nastalo umrežavanjem proteina kod dijabetičkih pacova (Tanaka et al, 1999). Koristi kao lek za lečenje komplikacija kod oba tipa dijabetesa. Metformin je efikasan inhibitor glikacije, snižava holesterol, smanjuje količinu masti u telu, ima antioksidativnu aktivnost (Ginsberg et al, 1999). Snižava nivo glikemije tako što smanjuje rezistenciju perifernih tkiva na insulin, odnosno povećava ulazak glukoze u mišiće. Aktivira transporter glukoze GLUT-4 preko AMP zavisne protein-kinaze, što omogućava veći unos glukoze u mišiće. AMP zavisna kinaza aktivira glikolitičke enzime (heksokinazu i fosfofruktokinazu), a inhibira glukoneogenezu (enzime fosfoenol-

piruvat-karboksikinazu i glukozo-6-fosfatazu) u hepatocitima. Pošto, prema nekim istraživanjima, metformin inhibira kompleks I respiratornog lanca u mitohondrijama i inhibira stvaranje ATP, moguće je da upravo smanjenjem odnosa ATP/ADP ili ATP/AMP aktivira AMP zavisnu kinazu (Chai et al, 2012).

Dipeptid karnozin (β-alanil-L-histidin) je prirodni metabolit koji se nalazi najviše u srčanom i skeletnim mišićima i u mozgu (Gariballa i Sinclair, 2000). Vezuje molekule sa slobodnom karbonylnom grupom. Deluje kao inhibitor umrežavanja proteina i umrežavanja proteina sa DNK, jer se vezuje za slobodne karbonylne grupe na izmenjenom proteinu (praktično ga "karnoziluje"). Proces karnozilovanja proteina omogućava uklanjanje ostarelih i izmenjenih proteina, proteina sa akumuliranim krajnjim proizvodima glikacije, jer stimuliše i poboljšava proces proteolize u proteasomu (Hippkiss et al, 2002). Primenjuje se za sprečavanje i lečenje katarakte (nastale procesom starenja), glaukoma i drugih bolesti oka uslovljenih nastajanjem krajnjih proizvoda glikacije i akumuliranjem proteinskih agregata u sočivu oka.

Za neka druga jedinjenja kao što su amlodipin, kinetin, kinin i 6-dimetilaminopiridoksamin, pokazano je da usporavaju ili sprečavaju nastajanje krajnjih proizvoda glikacije, verovatno zahvaljujući svojoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Piralin je inhibitor glikacije koji se vezuje za nastali Amadorijev proizvod na proteinu i sprečava dalje reakcije umrežavanja proteina.

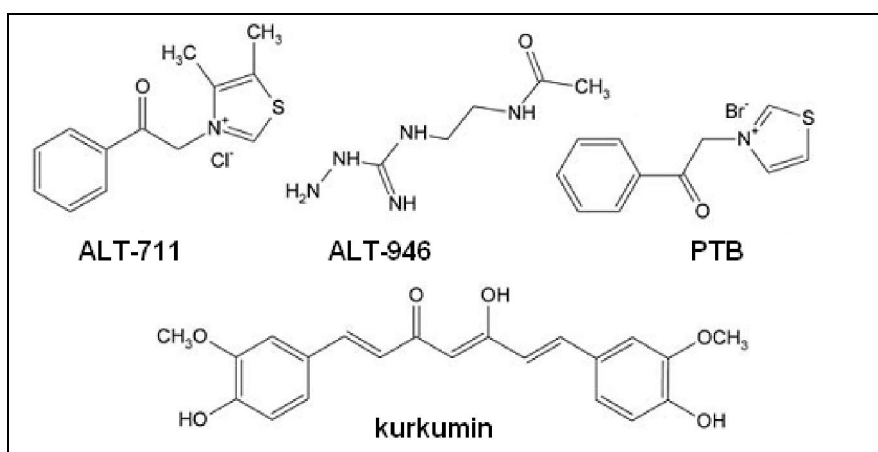
Penicilamin smanjuje nastajanje Amadorijevog proizvoda i smanjuje nivo krajnjih proizvoda glikacije. Bolji je hvata β-oksoaldehida od aminoguanidina, u reakciji sa njim nastaje 2-aciltiazolidinski derivat (Wondrak et al, 2002).

Etanol pokazuje inhibitorno dejstvo na nastanak krajnjih proizvoda glikacije. Metaboliše se u acetaldehid koji reaguje sa Amadorijevim proizvodima na proteinima, koji onda ne mogu dalje da se umrežavaju (Peng et al, 2011).

ALT-946, N-(2-acetamidetil) hidrazin karboksimidamid hidrohlorid, guanidinski lek, pokazano je da smanjuje akumuliranje krajnjih proizvoda glikacije i degeneraciju kortikalnih tubula bubrega u većoj meri nego aminoguanidin i za razliku od aminoguanidina, smanjuje albuminuriju u eksperimentalnom dijabetesu tipa 2 na pacovima. Nema publikovanih rezultata ispitivanja na ljudima (Schalkwijk i Miyata, 2012).

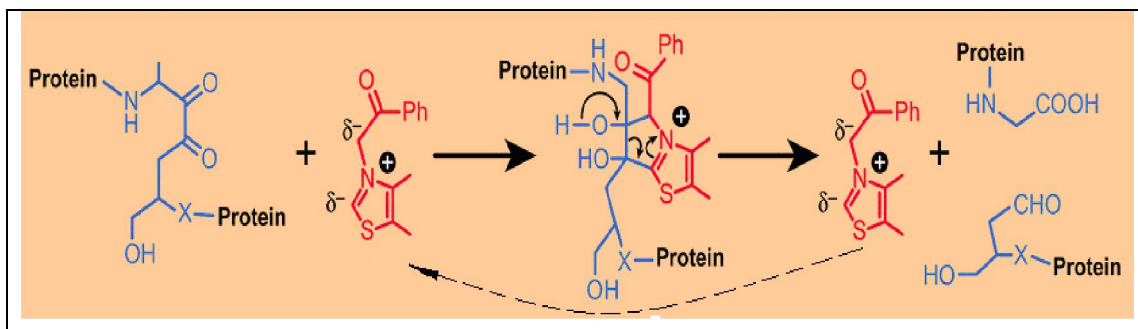
Lekovi koji dovode do raskidanja umreženih glikovanih struktura (Slika 29.). Važno ograničenje u primeni inhibitora nastanka krajnjih proizvoda glikacije je to što oni ne mogu da utiču na već nastale adukte i oštećenja u tkivima. Kada su u pitanju promene na proteinima sa dugim plućivotom, bilo bi dobro razviti lek koji bi mogao da

direktno deluje na ve nastala umreženja u proteinima, jer bi potencijalno omogu avao ponovno uspostavljanje normalne funkcije ošte enog tkiva. Sredinom 90-tih godina prošlog veka, ispitivan je N-fenaciltiazolijum-bromid (PTB), kao jedinjenje pogodno za raskidanje umreženih struktura. U in vitro eksperimentima pokazano je da PTB može da raskine neke umrežene strukture, a u eksperimentima na životinjama da dovodi do smanjenja akumuliranja krajnjih proizvoda glikacije (Goh i Cooper, 2008). Nisu vršena dalja ispitivanja sa ovim jedinjenjem, jer je ono bilo nedovoljno stabilno u vodenim rastvorima. Me utim, pokazano je da supstance koje raskidaju umrežene strukture mogu biti potencijalni lekovi.



Slika 29. Lekovi koji potencijalno raskidaju umrežene glikovane strukture (Peng et al, 2011).

Dizajnirana je nova klasa lekova, koji imaju tiazolijumsku strukturu, i koji bi mogli da hemijski dovedu do raskidanja C-C veze izme u susjednih karbonilnih atoma ugljenika u Amadori-dikarbonilnim strukturama (Slika 30., Ulrich i Cerami, 2001).



Slika 30. Mehanizam kojim ALT-711 dovodi do raskidanja umreženja sa diketonskom grupom u proteinima, (prema Ulrich i Cerami, 2001).

Uprkos tome, što do sada nije bila potvrđena važna fiziološka uloga umreženih struktura koje sadrže α -diketon kao funkcionalnu grupu, vršena su opsežna istraživanja o mogućnosti primene ove klase lekova.

Jedna od posledica akumuliranja krajnjih proizvoda glikacije u kardiovaskularnom sistemu je povećana rigidnost krvnih sudova, što je faktor rizika od razvoja bolesti ovog sistema i krajnjeg smrtnog ishoda. Razvijan je lek algebrijum (ALT-711), koji je ispitan u prekliničkim i kliničkim studijama desetak godina. Iako je ALT-711 (4,5-dimetil-3-(2-okso-2-feniletil)-tiazolium hlorid) bio relativno nestabilan u vodenim rastvorima, ispitan je mogućnost njegove primene kao leka za kardiovaskularne bolesti i za hipertenziju. U eksperimentima sa životinjama pokazano je da smanjuje rigidnost arterija, smanjuje brzinu pulsa, poboljšava funkcije srca, da usporava razvoj ateroskleroze i dijabetične nefropatije, da smanjuje nivo krajnjih proizvoda glikacije u bubrezima i nivo medijatora oštećenja tkiva bubrega. To je jedini lek, sa hipotetičkim dejstvom da raskida umrežene strukture koji je u završnim fazama kliničkih ispitivanja (Schalkwijk i Miyata, 2012). U Tabeli 5. dat je kratak pregled efekata lekova koji deluju na procese glikacije in vivo.

Tabela 5. Kratak pregled lekova koji deluju na proces glikacije in vivo prema (Goh i Cooper, 2008)

Dejstvo	Supstanca/lek	Efekti na životinama	Kliničke studije (faza)	Neželjene propratne pojave
Inhibicija nastajanja krajnjih proizvoda glikacije	aminoguanidin	neuropatija nefropatija retinopatija	nefropatija retinopatija (III)	glomerulonefritis vitamin B6 iNO-sintaza
	ALT-946	nefropatija bubrežni AGEs		
	piridoksamin	nefropatija retinopatija holesterol telesna masa		
	OPB-9195	nefropatija stenoza krvni pritisak		vitamin B6
	LR-90	nefropatija oksidativni stres fibroza		povećanje telesne mase

Tabela 5. Nastavak

	PTB	AGEs	
	alagebrium	nefropatija	rigidnost arterija
Raskida i umreženja proteina	(ALT-711)	krvni pritisak	krvni pritisak dijastolna funkcija srca (III)
Uklanjanje krajnjih proizvoda glikacije	lizozim	nefropatija AGE ateroskleroza	
Smanjeno unošenje AGEs	ishrana sa niskim sadržajem AGEs		AGE C-reaktivni protein

2.11.1. Tioli malih molekulskih masa kao inhibitori glikacije

Postavlja se pitanje kakav je značaj tiol-jedinjenja male molekulske mase u prevenciji modifikacija proteina sa α -oksoaldehidima. Potencijal tiola kao hvatača i dikarbonilnih jedinjenja do sada nije dovoljno ispitan. U radu Wondrak-a (Wondrak et al, 2002) pokazano je da NAcCys, Cys i GSH dovode do smanjivanja fluorescencije koja potiče od AGEs u in vitro ispitivanjima. Sharma (Sharma i Santhoshkumar, 2009) je ispitivao efikasnost tiolnih jedinjenja male molekulske mase kao inhibitora glikacije proteina do koje dolazi u reakciji sa metilglioksalom. Najpotentniji inhibitor bio je Cys, a zatim GSH, pa NAcCys. Njihova efikasnost bila je veća od efikasnosti metformina, za koji je već bilo utvrđeno da je potentan inhibitor glikacije (Beisswenger et al, 1999; Rahbar i Figarola, 2003). Pokazano je, takođe, da su ovi mali tioli bolji inhibitori od karnozina i piridoksamina (Rahbar i Figarola, 2003; Ruggiero-Lopez et al, 1999).

U biološkim sistemima, pored HSA, nosioci tiol- grupe u cirkulaciji su mali molekuli kao što su GSH i cistein. S obzirom na nukleofilnost ovih malih tiola, oni mogu biti dobri hvatači i dikarbonilnih jedinjenja i stoga endogeni inhibitori reakcije proteina i metilglioksala.

2.12. Klinički značaj određivanja proizvoda glikacije proteina

Određivanje proizvoda reakcija glikacije ima višestruki klinički značaj. Određivanje ranih proizvoda glikacije proteina (zavisno od poluživota proteina) omogućava procenu nivoa glikemije i izloženosti glukozi, odnosno procenu metaboličke kontrole u dijabetesu. Određivanje intermedijarnih i kasnih proizvoda glikacije daje uvid u povezanost proizvoda glikacije i modifikacija tkiva, pomaže ispitivanju i praćenju patogeneze hroničnih komplikacija (Lapolla et al, 2005).

Određivanje ranih proizvoda glikacije

Određivanje glikozilovanog (glikovanog) hemoglobina, HbA1c. Minorna komponenta glavne izoforme hemoglobina nastaje neenzimskom glikacijom amino-grupe valina i lizina lanca hemoglobina. Pod pojmom glikovani hemoglobin podrazumevaju se sve hemoglobinske vrste nastale reakcijom bilo kog šećera sa terminalnim valinom globinskog lanca. HbA1c predstavlja rani proizvod glikacije proteina. Udeo HbA1c zavisi od glikemije i reflektuje izloženost hemoglobina glukozi u periodu 4-8 nedelja pre testiranja, što je potvrđeno u kliničkim studijama (Lapolla et al, 2005). Mnoge studije su ukazale na povezanost između dugoročne glikemije i razvoja komplikacija u dijabetesu, kao što su retinopatija, nefropatija, neuropatija i makrovaskularne i bolesti srca kod ljudi obolelih od dijabetesa tipa 1 i tipa 2. U ovim studijama osnovna metoda za procenu dugoročne glikemijske kontrole bilo je određivanje HbA1c. Kao parametar HbA1c je relativno neosetljiv na fluktuacije glikemije. Pokazano je naime, da pacijenti koji imaju epizode sa povećanom ili smanjenom glikemijom, ali konstantnom prosečnom glikemijom, imaju slične vrednosti HbA1c. Iz tog razloga, predloženo je da se variranje nivoa glukoze prati zajedno sa HbA1c. Zajedno, ova dva parametra su pouzdaniji indikatori glikemijske kontrole i procene rizika od dugoročnih komplikacija u dijabetesu, nego samo praćenje HbA1c (Nemet et al, 2006).

Određivanje glikovanih proteina seruma. Ovo određivanje daje informaciju kakva je bila metabolička kontrola u periodu od 2 nedelje pre testiranja. U tu svrhu se određuje sadržaj fruktozamina, kolorimetrijskom metodom koja je zasnovana na svojstvu ketoamina da redukuje tetrazolijum-nitro-plavo boju. Stvara se bojeni proizvod koji apsorbuje na 525 nm. Problemi primene ove metode su brojni: reakcija nije

dovoljno specifična, brojne supstance seruma interferiraju, glikovan albumin kao najzastupljeniji protein seruma utiče na određivanje, pa se postavlja pitanje da li dobijena vrednost treba da se koriguje i izražava prema ukupnim proteinima seruma ili prema albuminu (Lapolla et al, 2005).

Određivanje glikovanog albumina. Glikovani albumin nastaje u reakciji glikacije albumina sa glukozom. Nivo glikovanog albumina je u korelaciji sa nivoom fruktozamina (Faure et al, 2008). Glikovani albumin reflektuje glikemijsku kontrolu u prethodne 2-3 nedelje pre uzimanja uzorka za određivanja (stoga se može klasifikovati kao relativno kratkoročni ili intermedijerni marker glikemijske kontrole, za razliku od HbA1c koji je dugoročni marker, Kim i Lee, 2012, Takahashi 2007). Promena koncentracije albumina ne utiče na rezultat, jer sadržaj glikovanog albumina predstavlja udeo glikovanog u ukupnom albuminu seruma. Sa druge strane, u nekim patološkim stanjima, kakvo je npr. ciroza jetre ili hipotireoidizam, produžen je poluživot albumina, pa se dobijaju povišene vrednosti i za glikovani albumin. U patološkim stanjima za koja je karakterističan kratak i poluživot albumina (u hipertireoidizmu i kod hronične bolesti bubrega sa proteinurijom), vrednost ovog parametra je snižena. Uprkos navedenom, bolja korelacija između glikovanog albumina i glikemije, u odnosu na HbA1c, je utvrđena kod pacijenata sa uznapredovalom hroničnom bolešću u bubrega. Kod pacijenata obolelih od dijabetesa, kod kojih su prisutne velike fluktuacije glikemije, glikovani albumin kao intermedijerni parametar bolje odlikava metaboličku kontrolu nego HbA1c. Ovo važi i za sva patološka stanja poput anemije, hemoglobinopatija, kao i u trudnoći.

Pored navedenog, predloženo je da glikovani albumin može biti marker vaskularnih komplikacija, jer glikovani albumin preko vezivanja za RAGE dovodi do razvoja vaskularnih komplikacija i učestvuje u patogenezi ateroskleroze (Torres et al, 2012). Glikovani albumin stimuliše adheziju monocita za endotelne ćelije putem povećanja transkripcije RNK za adhezione proteine na površini endotela (VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina) (Dai et al, 2004). Albumin modifikovan u reakciji sa glukozom, ali i sa drugim aldehydima, označava se kao albumin modifikovan krajnjim proizvodima glikacije AGE-albumin. Pokazano je da AGE-albumin ima proaterogeni efekat na razne tipove ćelija – endotelne, mezenglijalne, mezotelijalne, monocite i makrofage, vaskularne glatke miši ćelije. Dovodi do povećanja aktivnosti NO sintaze i do NO zavisne apoptoze (Popova et al, 2010).

Određivanje intermedijernih proizvoda glikacije

Pod određivanjem intermedijernih proizvoda glikacije uobičajeno se podrazumeva određivanje glioksala, metilglioksala i deoksiglukozona u serumu i urinu. Određivanje se vrši HPLC metodama ili GC/MS. Pokazano je da je nivo metilglioksala u serumu pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 1 5-6 puta viši u odnosu na kontrolu, a kod pacijenata obolelih od dijabetesa tip 2, za 2-3 puta viši.

Određivanje krajnjih proizvoda glikacije

Kliničke studije su pokazale da nivo krajnjih proizvoda glikacije u cirkulaciji može biti u vezi sa postojanjem komplikacija u dijabetesu. Međutim, za određivanje krajnjih proizvoda glikacije u biološkim uzorcima potrebne su sofisticirane i skupe laboratorijske tehnike kao što su masena spektrometrija i gasna ili tečna hromatografija, što je otežavalo napore da se određivanje krajnjih proizvoda glikacije uvede u široku kliničku praksu. Ne postoji metoda za određivanje krajnjih proizvoda glikacije koja je opšte prihvatljiva, ne postoji interni standard niti internacionalna standardna jedinica merjenja, što otežava upoređivanje rezultata određivanja dobijenih u različitim laboratorijama. Uzorkovanje krvi za određivanje krajnjih proizvoda glikacije je mnogo pogodnije od biopsijskog uzorkovanja tkiva, ali je pitanje kolika je klinička relevantnost AGEs u krvi u odnosu na AGEs u tkivima (Goh i Cooper, 2008).

Termin fluorescentni krajnji proizvodi glikacije odnosi se na biološki materijal koji ima svojstvo fluorescencije, gde je talasna dužina ekscitacije na 370 nm, a maksimum emisionog spektra na oko 440nm. Prve studije pokazale su da postoji dobra korelacija između fluorescencije kolagena u koži dijabetičara i stepena razvoja komplikacija u dijabetesu retinopatije i nefropatije, rigidnosti arterija i zglobova (Monnier et al, 2005). Razvijena je neinvazivna metoda merjenja autofluorescencije u koži. U manjim kliničkim studijama pokazano je da su rezultati dobijeni ovom metodom u korelaciji sa nivoom pentozidina u tkivima, nivoom CML, parametrima dugotrajne glikemijske kontrole i prisustvom dijabetičkih komplikacija. Pokazano je, takođe, da bi autofluorescencija kože mogla biti marker vaskularnih oštećenja i pokazatelj rizika od mogućeg smrtnog ishoda zbog bolesti srca u dijabetesu oba tipa. Potrebna su dodatna klinička ispitivanja koja bi ovo potvrdila (Goh i Cooper, 2008). Za kliničku primenu dostupan je aparat AGE-ita koji direktno meri autofluorescenciju u koži pacijenata (Jiang et al, 2012).

Krajnji proizvodi glikacije u kolagenu kože, pentozidin i CML određeni su HPLC i GC/MS metodama i pokazano je da je njihov nivo u korelaciji sa mikrovaskularnim komplikacijama u dijabetesu (Monnier et al, 2005)

Nedostatak određivanja pentozidina HPLC metodom je što pri kiselj hidrolizi proteina može doći do nastanka artefakata koji mogu da interferiraju. ELISA metode za određivanje pentozidina imaju nedovoljnu osetljivost. Nivo pentozidina u plazmi je povezan sa hipertenzijom i ishemijskom bolesti srca i kalcifikacijom aorte u dijabetesu (Monnier et al, 2005).

CML se najpreciznije određuje GC/MS ili LC/MS. Razvijeni su brojni ELISA eseji sa poliklonskim i monoklonskim antitelima za određivanje CML, no problem većine ovih eseja je odsustvo linearnosti i što ne pokazuju dobre rezultate sa intaktnim proteinima. Kod nekih ELISA eseja za određivanje CML ovaj problem je izbegnut ako se proteinski uzorak enzimski hidrolizuje pre određivanja. Nivo CML u serumu je u korelaciji sa mikrovaskularnom bolešću, ali nije u korelaciji sa makrovaskularnim komplikacijama (Monnier et al, 2005).

U literaturi se često navodi da su za određivanje nivoa krajnjih proizvoda glikacije (kao ukupnih proizvoda) korišćena komercijalno dostupna AGEs antitela. Pitanje je kako su dobijena ova antitela, jer se često radi o smeši antitela na CML i još na neke druge strukture. Pokazano je da je u dijabetesu tipa 2 nivo imunoreaktivnih AGEs u korelaciji sa retinopatijom i nefropatijom. Utvrđena je korelacija nivoa AGEs sa koronarnom bolešću u srca, poremećenom vazodilatacijom endotela i C-reaktivnim proteinom, markerom inflamacije (Monnier et al, 2005).

3. Materijal i metode

3.1. Hemikalije i reagensi

Hemikalije

Sve hemikalije koje su u radu korišćene, nabavljene su od proizvođača Sigma (Nemačka), osim navedenih u nastavku. Rastvori HSA (20%) nabavljeni su od Oktafarma (Štokholm, Švedska), od Bakster (Beč, Austrija) i od Human (Visbaden, Nemačka). Kit za određivanje koncentracije albumina u serumu sa bromkrezol-zelenim (3',3'',5',5''-tetrabromo-m-krezolsulfonftaleinom, Albumin Liquicolor) bio je od proizvođača Human (Visbaden, Nemačka). Glacijalna sirćetna kiselina, akrilamid, bisakrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), glicerol, β-merkaptoetanol, timol, brom, p-benzohinon i Folin-Ciocalteu-ov rastvor su nabavljeni od Merck-a (Darmstadt, Nemačka). Metanol, natrijum-acetat, n-butanol i koncentracija hlorovodnične kiseline su od Zorke pharm (Šabac, Srbija), Tris od ICN-Galenika (Beograd, Srbija), matriks za afinitetnu kolonu Cibacron Blue F3G-A Sepharose CL-6B od Pharmacia Biotech (Upsala, Švedska).

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih amino-grupa na površini molekula proteina sa p-benzohinonom

Standard: 40 mM rastvor Ala – 89.1 mg Ala se rastvori u 25 mL destilovane vode.

Pufer: 0.1 M kalijum fosfatni pufer pH 7.4 – 0.53 g KH_2PO_4 i 1.07 g K_2HPO_4 rastvori se u 100 mL destilovane vode, po potrebi se dotitruje do pH 7.4.

Reagens: 0.1 M p-benzohinon u dimetilsulfoksidu – 10.8 mg p-benzohinona rastvori se u 10 mL dimetilsulfoksida.

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja amino-grupa u aminokiselinama sa ninhidrinom

Standard: 1mM rastvor Ala – 8.9 mg Ala se rastvori u 100 mL destilovane vode

Reagens 1: 0.028 M ninhidrinski rastvor pH 6.8 – 10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ i 6 g KH_2PO_4 se rastvori u 100 mL destilovane vode, dotitruje do pH 6.8, u ovom puferu rastvori se 0.50 g ninhidrina.

Reagens 2: rastvor za izazivanje boje 0.12 M KJ u 38% ethanolu – u 100 mL 38 % rastvora etanola doda se 2 g KJ.

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih guanidino-grupa na površini molekula proteina, sa timol-natrijum-hipobromitom u alkalnoj sredini

Standard: 40 mM rastvor Arg – 174.2 mg Arg rastvoriti u 25 mL destilovane vode

Reagens 1: 0.01% rastvor timola u 0.5 M NaOH – 0.01 g timola i 2 g NaOH rastvoriti u 100 mL destilovane vode.

Reagens 2: rastvor natrijum-hipobromita, 2% brom u 5% (w/v) NaOH – 0.68 mL Br_2 dodati u rastvor napravljen rastvaranjem 5 g NaOH u 100 mL destilovane vode.

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih tiol-grupa na površini molekula proteina, u aminokiselinama i glutationu

Standard: 2 mM rastvor Cys – 12.1 mg Cys rastvoriti u 50 mL destilovane vode

Pufer: 1 M Tris pufer pH 8.0 – 12.1g Tris rastvoriti u 100 mL dest. H_2O , dotitrovati do pH 8.0.

Reagens: 2 mM rastvor DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeve kiseline) – 19.8 mg DTNB rastvoriti u 25 mL rastvora koji sadrži 0.170 g Na-acetata.

Reagensi za određivanje koncentracije proteina i koncentracije albumina

Reagensi za Biuretsku metodu za određivanje koncentracije proteina

Standard: 2 mg/mL rastvor HSA

Biuretski reagens: rastvor CuSO_4 , K, Na-tartarata, KJ i NaOH u vodi – rastvoriti posebno u malo destilovane vode po 4 g NaOH, 1.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 2.5 g KJ, rastvore spojiti i dopuniti destilovanom vodom do 500 mL.

Reagensi za određivanje koncentracije proteina po Loriju

Standard: 66.5 mg/mL rastvor HSA

Reagens A: 20 g anhidrovanog Na_2CO_3 rastvoriti u 1000 mL 0,1 M NaOH

Reagens B: 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ rastvoriti u 100 mL destilovane vode

Reagens C: 2 g K,Na-tartarata rastvoriti u 100 mL destilovane vode

Reagens D: pomešati redom, 1 zapreminu rastvora B, 1 zapreminu rastvora C i 50 zapremina rastvora A neposredno pre odre ivanja

Folin-Ciocalteu -ov rastvor -razblaži se sa destilovanom vodom u odnosu 1 : 3 v/v; priprema se neposredno pre odre ivanja.

Reagensi za odre ivanje koncentracije albimina bromkrezol-zelenim (kit Albumin Liquicolor)

Standard: HSA, 40 mg/mL,

Reagens: 30 mM citratni pufer pH 4.2, 260 μM bromkrezol-zeleno

Reagensi za pra enje reakcije metilglioksala sa bo nim ostacima aminokiselina na površini molekula proteina

Pufer 1: 0.1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4 – 0.534 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 1.64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rastvoriti u 100 mL destilovane vode, po potrebi dotitrovati pH 7.4

Pufer 2: 0.02 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4 – 0.1 M fosfatni pufer razblažiti 5 puta destilovanom vodom

Rastvor HSA: 1 mM rastvor HSA u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 – 1 mL 20 % rastvora HSA (3 mM, Bakster ili Oktafarma) dodati u 2 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 7.4

Rastvor metilglioksala, 200 mM – 307.7 μl koncentrovanog rastvora metilglioksala (40 %, tj. 6.5 M rastvor, Sigma) dodati u 10 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 7.4

Rastvor metilglioksala, 20 mM – 30.76 μl koncentrovanog rastvora metilglioksala (40 %, tj. 6.5 M rastvor, Sigma) dodati u 10 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 7.4

Inkubaciona smeša 0.5 mM HSA sa 100 mM metilglioksalom – rastvoru 1 mM HSA u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 dodati 200 mM rastvor metilglioksala u istom puferu u odnosu 1:1, inkubirati u zatvorenim do vrha napunjenim epruvetama ili mikrocentrifuškim kivetama na 37 °C. Inkubacioni rastvori se za višednevno inkubiranje pripremaju pod sterilnim uslovima (u sterilnoj zoni, sterilisano posu e, pufer sterilisan cedjenjem kroz membranu 0.02 μm) i razlivaju u mikrocentrifuške kivete (napunjene do vrha, da bi se spre ıla oksidacija vazduhom).

Inkubaciona smeša 0.5 mM HSA sa 10 mM metilglioksalom – rastvoru 1 mM HSA u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 dodati 20 mM rastvor metilglioksala u istom puferu u odnosu 1:1, inkubirati u zatvorenim do vrha napunjenim epruvetama ili mikrocentrifuškim kivetama na 37 °C.

Inkubaciona smeša 0.5 mM HSA sa 10 mM metilglioksalom i 10 mM metforminom – rastvoru 1 mM HSA u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 dodaje se prvo vrst metformin (3.3 mg na 1 mL, tako da je koncentracija 20 mM) i kad se rastvori, dodaje se 20 mM rastvor metilglioksala u istom puferu u odnosu 1:1. Inkubirati u zatvorenim, do vrha napunjenim, epruvetama ili mikrocentrifuškim kivetama na 37 °C.

Napomena - u uzorcima je odmah odre ivan sadržaj slobodnih SH grupa Elmanovom metodom, a ostatak je dijalizovan naspram destilovane vode 4 sata (uz promenu vode na pola sata). Posle dijalizovanja (naspram razblaženog pufera) odre ivan je sadržaj slobodnih amino- i guanidino-grupa, snimani su apsorpcioni spektri (uzorci su bili razblaženi 20 puta razblaženim puferom), a alikvoti uzoraka su zamrznuti za elektroforetska ispitivanja.

Reagensi za ispitivanje reakcije tiol-grupe HSA i tiol-grupe jedinjenja malih molekulskih masa (aminokiselina i GSH), sa metilglioksalom

Pufer: 0.1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4; 0.534 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 1.64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rastvori se u 100 mL destilovane vode, po potrebi se dotitruje do pH 7.4

Rastvori aminokiselina Cys, NAcCys i karboksimetil-cisteina i peptida GSH za spektrofotometrijska odre ivanja se prave rastvaranjem vrstih supstanci u puferu, tako da finalna koncentracija u reakcionim smešama posle mešanja sa rastvorom metilglioksala (u molskim odnosima 1:1, 1:2 i 1:5) bude 2 mM.

Rastvori aminokiselina Cys, NAcCys i karboksimetil-cisteina i peptida GSH za snimanje NMR spektara se pripremaju rastvaranjem vstih supstanci u puferu sa 10% D_2O tako da je finalna koncentracija u inkubacionoj smeši 40 mM.

Rastvori metilglioksala: 4 mM, 8 mM, 20 mM rastvor metilglioksala u fosfatnom puferu, i 40, 80 i 200 mM rastvor metilglioksala u puferu sa 10% D_2O .

Reagensi za ispitivanje efikasnosti niskomolekulskih tiola kao hvata a metilglioksala u spre avanju glikacije HSA sa metilglioksalom

Pufer 1: 0.1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4 – 0.534 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 1.64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rastvoriti u 100 mL destilovane vode, po potrebi se dotitruje na pH 7.4

Pufer 2: 0.02 M natrijum fosfatni-pufer pH 7.4 – 0.1 M fosfatni pufer se razblaži 5 puta destilovanom vodom

Rastvor HSA: 1 mM rastvor HSA u 0.1 M puferu pH 7.4 – 1 mL 20 % rastvora HSA (tj. 3 mM, Bakster ili Oktafarma) se dodaje u 2 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 7.4

Rastvor metilglioksala, 82 mM ; 129.2 μL koncentrovanog rastvora metilglioksala (40 %, tj 6.5 M rastvor, Sigma) dodaje se u 10 mL 0.1 M fosfatnog pufera pH 7.4

Inkubaciona smeša 0.5 mM HSA sa 42 mM metilglioksalom i 21 mM hvata em dikarbonilnih jedinjenja: rastvoru 1 mM HSA u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 dodaje se prvo vrst hvata – Cys, penicilamin, NAcCys, GSH ili metformin, tako da je koncentracija hvata a u rastvoru HSA 42 mM. Kad se rastvori, dodaje se 82 mM rastvor metilglioksala u istom puferu u odnosu 1:1 (tako da je finalna koncentracija HSA 0.5 mM, metilglioksala 42 mM i hvata a 21 mM). Inkubira se u zatvorenim do vrha napunjenim epruvetama ili mikrocentrifuškim kivetama na 37 °C.

Reagensi za kvantitativno pra enje promena u sadržaju bo nih ostataka amino-, guanidino- i tiol-grupa na površini molekula HSA izolovanog iz seruma dijabeti ara

Uzorci: HSA je izolovan iz seruma dijabeti ara i zdravih osoba afinitetnom hromatografijom. Po 300 μL seruma je nanošeno na kolonu.

Regensi za afinitetnu hromatografiju:

Kolona: Cibacron Blue F3G-A Sepharose CL-6B dimenzija 4.3x0.8 cm.

Pufer 1: 0.02 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.2 – 1.38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 2.68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rastvori se u 1 L destilovane vode, po potrebi se dotitruje na pH 7.2

Pufer 2: 1.5 M NaCl, 0.02 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.2 – 43.9 g NaCl se rastvori u 500 mL pufera 1

Reagensi za ispitivanje uzoraka HSA nativnom i SDS PAG elektroforezom

Osnovni rastvori za nativnu PAG elektroforezu

Monomerni rastvor za razdvajaju i gel (40% suva masa , 5% bisakrilamid u odnosu na suhu masu): 38 g akrilamid, 2.0 g bisakrilamid i destilovana voda do 100 mL.

Monomerni rastvor za koncentruju i gel (6.25% suva masa, 20% bisakrilamid u odnosu na suhu masu): 5.0 g akrilamid, 2.0 g bisakrilamid i dest. voda do 100 mL.

Pufer za razdvajaju i gel (947 mM Tris, pH 8.48): 11.47 g Tris, destilovana voda do 100 mL, dotitruje se do pH 8.48 sa 4 M HCl.

Pufer za koncentruju i gel (158 mM Tris, pH 6.90): 1.92 g Tris, destilovana voda do 100 mL, dotitruje se do pH 6.90 sa 1 M H₃PO₄.

Inicijator polimerizacije: amonijum-persulfat (APS) 10 % w/v. 0.1 g APS i voda do 10 mL.

Rastvor za nadslojavanje (n-butanol zasi en vodom): Rastvor je pre upotrebe promukati i ostavljen da se slojevi razdvoje. Koristi se gornji sloj.

Pufer za obradu uzoraka (50% saharoza, 0.1% bromfenol-plavo): 5 g saharoze, 1mL 1% rastvora bromfenol-plavog i destilovana voda do 10 mL.

Donji pufer za elektroforezu (63 mM Tris, pH 7.47): 22.7 g Tris i destilovana voda do 3 L. Dotitrovati do pH 7.47 sa 4M HCl .

Gornji pufer za elektroforezu (37.6 mM Tris, 40 mM glicin, pH 8.89): 4.56 g Tris, 3.0 g glicin i destilovana voda do 1L.

Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50 % metanol, 10 % sir etna kiselina): 500 mL metanol, 100 mL sir etna kiselina i destilovana voda do 1L.

Rastvor boje (0.25 % rastvor boje Coomassie Brilliant Blue – CBB G-250): 0.5 g CBB i destolovana voda do 200 mL.

Rastvor za obezbojavanje (5 % metanol, 7 % sir etna kiselina): 50 mL metanol, sir etna 70 mL kiselina i destilovana voda do 1 L.

Osnovni rastvori za SDS-PAG elektroforezu

Koriste se isti osnovni rastvori kao za nativnu PAG elektroforezu osim

Rastvor SDS, 10 %: 50 g SDS i destilovana voda do 500 mL

Pufer za obradu uzoraka (0.125 M Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% -merkaptoetanol, 1% bromfenol-plavo): 2.5 mL Tris pufera za koncentruju i gel, 4 mL rastvora SDS, 2 mL glicerola, 1 mL -merkaptoetanol, 0.1 g bromfenol-plavog i destilovana voda do 10 mL.

Gornji i donji pufer za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8.3, 0.1% SDS): 6 g Tris, 28.8 g glicin, 40 mL rastvora SDS i destilovana voda do 2L.

3.2. Aparati

U radu su korišteni sledeći aparati i uređaji: UV/VIS spektrofotometar Beckman DU-50; Spektrofluorimetar Fluro-max 4 Yobin Ivon; NMR Bruker AVANCE III 500 spektrometar; JASCO J-815 CD spektrometar; analitička vaga Mettler; tehnička vaga Chyo MK 500C; magnetna mešalica Labortechnik; vorteks Tehnica EF 102; pH-metar Radiometar PHM 26; centrifuga Tehnica LC 320; sušnica Instrumentaria ST 05; jedinice za ultrafiltraciju (sa membranama propustnim za molekule < 10 kDa i za molekule < 30 kDa, Millipore, Carrigtwohill, Irska); membranski filteri za sterilizaciju 0.45 µ Flowpore ICN, Irvin, Velika Britanija; vodeni termostat Neomedica; ispravlja Iskra MA 8902; kada za vertikalnu elektroforezu Hoefer SE 260.

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih amino-grupa na površini molekula proteina sa p-benzohinonom

Amino grupe proteina određene su spektrofotometrijski sa p-benzohinonom na sledeći način: 100 µl uzorka je dodato u 1360 µl 0.1 M kalijum-fosfatnog pufera pH 7.4. Posle dodatka 40 µl 0.1M p-benzohinona u dimetilsulfoksidu smeša je inkubirana 15 minuta na 37 °C. Nakon toga merene su apsorbanca na talasnoj dužini od 480 nm u odnosu na slepu probu reagensa i slepu probu uzorka. Standardna prava konstruisana je sa rastvorom HSA, sa sadržajem slobodnih amino grupa u opsegu koncentracija od 3 do 30 mM ($Y=0.02182X +0.02611$, $r=0.9988$, $p < 0.0001$).

3.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja amino-grupa u aminokiselinama sa ninhidrinom

Amino-grupe aminokiselina i GSH određene su spektrofotometrijski sa ninhidrinom (Pfenninger 1993) na sledeći način: 800 µL uzorka (standarda) i 400 µL 0.028 M ninhidrinskog puferovanog reagensa (0.28 M Na₂HPO₄ i 0.44 M KH₂PO₄, pH 6.8) su pomešani i inkubirani 16 min u ključalom vodenom kupatilu, zatim ohlađeni do sobne temperature (u hladnom vodenom kupatilu) u toku 15 min. Apсорbanca na 570

nm je merena naspram slepe probe reagensa, posle dodavanja 2 mL 0.12 M KJ u 38% etanolu. Standardna prava je konstruisana sa standardnim rastvorima alanina u opsegu koncentracija od 0.1 do 1 mM ($Y = -0.07221 + 0.91014X$, $r = 0.9991$, $p < 0.0001$).

3.5. Spektrofotometrijsko odre ivanje sadržaja slobodnih-guanidino grupa na površini molekula proteina sa timolom i natrijum-hipobromitom u alkalnoj sredini

Slobodne guanidino grupe proteina odre ene su spektrofotometrijski (Sastry i Tummuru, 1984; A imovi et al, 2012). U 2 mL rastvora 0.01% timola u 0.5 M NaOH dodato je 10 μ l uzorka. Merena je apsorbanc na talasnoj dužini 480 nm, odmah po mešanju reaktanata, u odnosu na slepu probu reagensa. Standardna prava konstruisana je za arginin u opsegu koncentracija 0.125-1.250 mM ($Y = -0.01407 + 0.30933X$, $r = 0.9992$, $p < 0.0001$).

3.6. Spektrofotometrijsko odre ivanje sadržaja slobodnih tiol-grupa na površini molekula proteina, u aminokiselinama i glutationu

Sadržaj tiol-grupa na molekulima proteina, u GSH i aminokiselinama odre ivanje je spektrofotometrijski prema Ellman-ovoj metodi (Bulaj et al, 1998). Rastvor 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeve kiseline) (DTNB, 100 μ l 2 mM rastvora) je pomešan sa 100 μ l uzorka, 100 μ l TRIS-a (pH 8.0) i dopunjen destilovanom vodom do 1000 μ l. Apsorbanc je merena na 412 nm nakon 30 minuta, naspram slepe probe uzorka. Standardna prava konstruisana je za Cys (0.10-1.4 mM); $Y = -0.00935 + 0.00136X$; $r = 0.9999$, $p < 0.0001$.

3.7. Spektrofotometrijske metode za odre ivanje koncentracije proteina i albumina

Biuretska metoda za odre ivanje koncentracije proteina (prema Slater, 1986)

U 20 μ L uzorka dodato je 1 mL Biuretskog reagensa i posle 30 min merena je apsorbanc na 546 nm prema slepoj probi reagensa. Standardna prava je konstruisana sa

HSA (sadržaja 1-100 mg/mL): $Y = 0.0061 + 0.0051X$; $r = 0.9992$, $p < 0.0001$; odnosno sa HSA (koncentracija 0.015-1.5 mM): $Y = 0.3333x - 0.00364$, $r = 0.9998$, $p < 0.001$. Za izra unavanje koncentracije proteina u mM, vrednosti dobijene prema prvoj pravoj deljene su sa 66,5.

Metoda za odre ivanje koncentracije proteina po Loriju (prema Peterson, 1983)

U 0.1 mL uzorka (po potrebi razblaženog puferom) dodato je 2 mL rastvora D i smeša je ostavljena na sobnoj temperaturi 10 min, zatim je dodat Folin-Ciocalteu -ov rastvor i posle 40 min merena apsorbanca na 700 nm. Kalibraciona prava je snimljena sa HSA (sadržaja 0.05-1 mg/mL): $Y = 0.6219X + 0.03145$, $r = 0.9961$, $p < 0.0001$. Za izra unavanje koncentracije proteina u mM, vrednosti dobijene prema pravoj deljene su sa 66,5.

Odre ivanje koncentracije albimina bromkrezol-zelenim primenom kita Albumin Liquicolor

Prema uputstvu proizvo a a (Human, Nem ka, Doumas et al, 1971), 10 μ L uzorka je dodato u 1 mL reagensa i merena je apsorbanca na 578 nm prema slepoj probi reagensa, posle 10 min stajanja na sobnoj temperaturi. Kalibraciona prava je snimljena sa standardom HSA (sadržaja 1-100 mg/mL); $Y = -0.06113 + 0.02017 X$; $r = 0.9990$, $p < 0.0001$. Za izra unavanje koncentracije proteina u mM, vrednosti dobijene prema pravoj deljene su sa 66,5.

3.8. Ispitivanje uzoraka HSA nativnom i SDS PAG elektroforezom

Nativnom i SDS PAG elektroforezom (Hoeffler Sci, 1991) ispitivani su uzorci HSA iz inkubacionih smeša posle uklanjanja malih molekula, bilo dijalizom (4 sata, sa promenom pufera na pola sata, naspram 0.02 M fosfatnog pufera pH 7.4), ili ultrafiltracijom (Ultracel centrifugalna jedinica sa membranom propusnom za molekule <10 kDa). U Tabeli 6 date su zapremine monomernih rastvora i reagenasa od kojih su pravljene gelovi za nativnu i SDS PAG elektroforezu.

Tabela 6. Zapremine monomernih rastvora i reagenasa za pravljenje gelova za PAG elektroforezu.

Tabela 6a. Zapremine monomernih rastvora i reagenasa za pravljenje gelova za nativnu PAG elektroforezu.			
Gel je pripreman mešanjem slede ih rastvora:	Razdvajaju i gel (9 %)	Razdvajaju i gel (10 %)	Koncentruju i gel (4 %)
Monomerni rastvor 1	2.25 mL	2.5 mL	-
Monomerni rastvor 2	-	-	2 mL
Tris pH 8.48	2.5 mL	2.5 mL	-
Tris pH 6.90	-	-	1 mL
H ₂ O	5.25 mL	5.0 mL	0.75 mL
APS	100 µL	100 µL	75 µL
Dezaeracija 5-10 minuta			
TEMED	10 µL	10 µL	5 µL
Tabela 6b Zapremine monomernih rastvora i reagenasa za pravljenje gelova za SDS-PAG elektroforezu.			
Gel je pripreman mešanjem slede ih rastvora:	Razdvajaju i gel (10 %)		Koncentruju i gel (4 %)
Monomerni rastvor 1	2.5 mL		-
Monomerni rastvor 2	-		2 mL
Tris pH 8.48	2.5 mL		-
Tris pH 6.90	-		1 mL
H ₂ O	4.9 mL		0.71 mL
APS	100 µL		75 µL
Dezaeracija 5-10 minuta			
TEMED	7 µL		5 µL
SDS	100 µL		40 µL

Ispitivani su uzorci HSA inkubirani sa metilglioksalom.

3.9. Pra enje reakcije metilglioksala sa bo nim ostacima aminokiselina, koji se nalaze na površini molekula HSA

Alikvoti inkubacionih smeša HSA i metilglioksala su uzimani u odre enim vremenskim intervalima (odmah posle mešanja reaktanata, posle 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 i 10 sati inkubiranja), u uzorcima je odre en sadržaj slobodne tiol-grupe Elmanovom metodom. Uzorci su dalje dijalizovani naspram razblaženog pufera pH 7.4 u toku 4 sata (sa promenom pufera na pola sata). U uzorcima je spektrofotometrijski odre en sadržaj slobodnih amino-grupa (metodom sa p-benzohinonom, A imovi et al, 2011), slobodnih guanidino-grupa (metodom sa timol-natrijum-hipobromitom, A imovi et al, 2012), a koncentracija albumina odre ena je sa bromkrezol-zelenim (Doumas et al, 1971). Snimljeni su UV-VIS spektri reakcionih smeša. Uzorci su analizirani nativnom (9 % gel) i SDS PAG elektroforezom prema protokolu za model aparature za vertikalnu elektroforezu Hoeffler SE 260 (Hoeffler Sci, 1991). Gelovi su bojeni Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB).

3.10. Ispitivanje reakcije tiol-grupe u jedinjenjima male molekulske mase sa metilglioksalom

Alikvoti inkubacionih smeša tiola male molekulske mase sa metilglioksalom uzimani su u odre enim vremenskim intervalima (odmah posle mešanja, posle 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 i 6 sati inkubiranja), u uzorcima je odre en sadržaj slobodne tiol-grupe Elmanovom metodom. U uzorcima je, tako e, odre en sadržaj slobodnih amino-grupa, spektrofotometrijski, metodom sa ninhidrinom.

3.10.1 ^1H NMR spektroskopska karakterizacija proizvoda reakcije tiol-grupa i metilglioksala

Reakcija tiola male molekulske mase sa metilglioksalom pra ena je ^1H -NMR spektroskopijom. Spektri su snimani na Bruker AVANCE III 500 spektrometru (500.26 MHz za ^1H) na 37°C , uz koriš enje BBO multinuklearne probe i 5 mm kiveta. Kao rastvara koriš en je 0.1 M fosfatni pufer pH 7.4 sa 10 % D_2O . Kao standard za hemijsko pomeranje koriš en je natrijum-3-(trimetilsilil)-propansulfonat. Spektri su snimani odmah nakon mešanja reaktanata (u toku 10 min), u naredna 2 h na svakih 30

min, a zatim na sat vremena u toku narednih 5 sati uz primenu zgpr, standardne metode oduzimanja pika vode (AVANCE program rada - verzija 1D pulsna sekvenca sa fl prezasi enjem).

3.10.2 Izra unavanje dostupnosti ostatka HSA-Cys 34 ostatka rastvara u

Dostupnost ostatka Cys 34 rastvara u (accessible surface area, ASA, Gerstein, 1992 i <http://gibk26.bio.kyutech.ac.jp/jouhou/shandar/netasa/asaview/>), izra unata je u Mark Gerstein-ovom programu (Calc-surface). Podešeno je da veli ina probe bude 1.4 Å. Svi atomi u PDB fajlu (uklju uju i i one iz vode) su bili uklju eni u prora un.

3.10.3 Izra unavanje hidrofobnosti aminokiselinskih ostataka u okolini HSA-Cys 34

Pomo u internet alata STING (Sequence To and withIN Graphics, Neshich et al, 2005, <http://www.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/STING-L>) ispitana je hidrofobnost mikrookoline HSA-Cys 34, odnosno promena hidrofobnosti ostataka polarnih amino kiselina koje se nalaze u okviru 7Å udaljenosti od Cys 34.

3.11. Ispitivanje efikasnosti tiola male molekulske mase kao "hvata a" metilglioksala u spre avanju glikacije HSA

Alikvoti inkubacionih smeša 0.5 mM HSA i 42 mM metilglioksa, sa (21 mM) ili bez prisustva hvata a dikarbonilnih jedinjenja, uzimani su u odre enim vremenskim intervalima (odmah posle mešanja reaktanata, posle 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 8 sati inkubiranja na 37°C). Pre mešanja, svi rastvori su bili profiltrirani radi sterilizacije (membranski filter 0.45 µ). Pre odre ivanja iz uzoraka su uklonjeni mali molekuli i višak metilglioksala ultrafiltracijom, uzastopnim ponavljanjem (3 puta) postupka razblaživanja 0.02 M fosfatnim puferom pH 7.4 i zatim koncentrovanja u filtracionoj jedinici Amicon Ultra (propusnoj za molekule <10 kDa). U uzorcima je odre ivan sadržaj slobodnih amino-grupa spektrofotometrijskom metodom sa p-benzohinonom, guanidino-grupa metodom sa timol-natrijum-hipobromitom, tiol-grupa Elmanovom

metodom, a koncentracija albumina određena je biuretskom metodom. Promene proteina proučene su snimanjem fluorescentnih spektara i nativnom (9 % gel) i SDS – PAG elektroforezom (10 % gel) (prema protokolu za model aparature za elektroforezu Hoeffler SE 260).

3.11.1 Spektrofluorimetrijska analiza modifikacija HSA molekula

Spektrofluorimetar je kalibrisan u odnosu na bidestilovanu vodu. Fluorescentni spektri proteina su snimani u odnosu na destilovanu vodu kao slepu probu. Svi uzorci proteina su bili jednake koncentracije. Pre analize uzorci HSA su „ispirani“ ultrafiltracijom na filtracionim jedinicama (Amicon ultra od 0.5 mL sa membranom propusnom za molekule < 10 kDa), sukcesivnim razblaživanjem destilovanom vodom 5 puta i ponovnim koncentrovanjem, ukupno 4 puta (faktor razblaženja 5⁴). Da bi se izbegle greške u podešavanju koncentracije proteina usled velikog razblaživanja, podešavanje koncentracije je rađeno u dva koraka: isprani uzorci HSA su prvo razblaženi do približne koncentracije 1 mg/mL na osnovu određivanja koncentracije proteina Biuretskom metodom, zatim je u razblaženim uzorcima ponovo određena koncentracija proteina Lorijevom metodom, posle čega je razblaživanjem podešeno da finalna koncentracija bude 0.5 μM. (Za snimanje emisionog spektra HSA Trp214 fluorescencije $\text{exc}/\text{em}=290/(290-450)$, za snimanje emisionih fluorescentnih spektara koji potiču od AGEs $\text{exc}/\text{em}=330/(340-500)$ i $\text{exc}/\text{em}=360/370-550$)

3.11.2 Snimanje CD spektara modifikovanih HSA molekula

Pre analize uzorci HSA su „ispirani“ ultrafiltracijom na filtracionim jedinicama (Amicon ultra od 0.5 mL sa membranom propusnom za molekule < 10 kDa), sukcesivnim razblaživanjem destilovanom vodom 5 puta i ponovnim koncentrovanjem, ukupno 4 puta. Ođređena je koncentracija proteina biuretskom metodom i potom podešena da bude 1 mg/mL. Snimljeni spektri su analizirani u Spectra Manager programu (http://www.jasco.co.uk/spectra_manager.asp).

3.12. Kvantitativno pra enje promena u sadržaju bo nih ostataka amino-, guanidino- i tiol-grupa bo nih ostataka HSA izolovanog iz seruma dijabeti ara

Za ispitivanje su uzeti serumi od 21 pacijenta obolelog od dijabetesa tipa 2, koji su bili hospitalizovani zbog slabe metaboli ke kontrole. Glikozilovan hemoglobin, HbA_{1C}, je odre ivan imunoturbidimetrijski (Hamwi et al, 1995, analizator Architect ci8200, Abbott, North Chicago, USA). Kontrolnu grupu je inilo 12 zdravih osoba odgovaraju e dobi. HSA je izolovan iz seruma dijabeti ara i seruma zdravih osoba afinitetnom hromatografijom na koloni Cibacron Blue F3G-A Sepharose CL-6B, dimenzija 4.3x0.8 cm (Hage, 1999). Kolona je ekvilibrisana sa 0.02 M natrijum-fosfatnim-puferom pH 7.2. Po 300 µL seruma nanošeno je na kolonu. Kolona je ispirana sa 14 mL 0.02 M natrijum-fosfatnog-pufera pH 7.2, a vezan albumin je eluiran sa 1.5 M NaCl u istom puferu. Frakcije koje sadrže albumin (10) mL su skoncentrovane ultrafiltracijom do oko 1 mL. U izolovanom albuminu spektrofotometrijski je odre en sadržaj: amino-grupa sa p-benzohinomom, guanidino-grupa sa timol-natrijum-hipobromitom i tiol-grupa Elmanovom metodom, a koncentracija proteina je odre ena biuretskom metodom.

4. Rezultati i diskusija

Kako je navedeno u Uvodu, metilglioksal je veoma reaktivan α -oksoaldehid koji reaguje sa nukleofilnim grupama bo nih ostataka Lys, Arg i N-terminalnom amino-grupom, što dovodi do modifikacije proteina.

Prvi cilj ove doktorske teze je bio sagledavanje doprinosa reakcije tiol-grupe sa dikarbonilnim jedinjenjima (metilglioksalom) ukupnoj modifikaciji proteina, kao i ispitivanje konkurentnosti ove reakcije u odnosu na reakcije amino- i guanidino- grupa, i ispitivanje njenog doprinosa umrežavanju proteina.

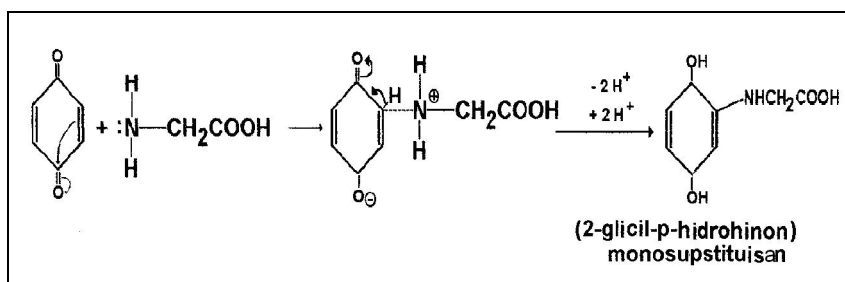
Da bi se mogao pratiti tok pomenutih reakcija, i pratiti njihov uticaj na ošte enja i biološka svojstva proteina, bilo je neophodno razviti metode pogodne za pra enje reakcija amino- i guanidino- grupa na površini molekula proteina.

4.1. Spektrofotometrijska metoda za pra enje promena sadržaja amino-grupa na površini molekula proteina u toku reakcije karbonilovanja in vitro i in vivo

Pra enje promena u sadržaju amino-grupa na površini pojedina nih strukturno okarakterisanih, izolovanih proteina, kao što je HSA, omogu ava da se prati kinetika i kompetitivnost reakcija amino-grupa u odnosu na druge bo ne ostatke proteina u toku reakcije sa dikarbonilnim jedinjenjima in vitro, ali i sagledavanje stepena modifikacije proteina in vivo (u uslovima karbonilnog stresa,) i kako ove promene uti u na funkciju proteina.

Do sada razvijene spektrofotometrijske metode za odre ivanje amino-grupa sa ninhidrinom i sa 2,4,6-trinitobenzen-sulfonskom kiselinom (TNBS, Fields, 1972) kao reagensima, nisu pogodne za napred navedene svrhe. Razlozi za to su višestruki: uslovi izvo enja reakcije (visoka temperatura kod ninhidrinske metode); merenje apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm (TNBS metoda, Okuyama i Satake, 1960) na kojoj apsorbuju proizvodi reakcije karbonilovanja i amino- i guanidino-grupa proteina (Poglavlje 4.3.1.) i interferencije tiol-grupe (TNBS metoda, Mera et al, 2010). p-benzohinon (Slika 31.) kao reagens primenjen je za spektrofotometrijsko odre ivanje

koncentracije proteina (Zaia i Barreto, 1993) merenjem apsorbance na 350, i za odre ivanje koncentracije CMC i Cys (Zaia et al, 1999) na talasnoj dužini od 500 nm i 430 nm, redom.



Slika 31. Predložen mehanizam reakcije p-benzohinona i Gly (Lichtig et al, 2001).

Da bi se sa sigurnoš u, jednostavno i pouzdano pratile promene u sadržaju amino-grupa bo nih ostataka na površini molekula proteina u toku karbonilovanja in vivo i in vitro, razvijena je spektrofotometrijska metoda za odre ivanje koncentracije slobodnih amino-grupa sa p-benzohinonom kao reagensom.

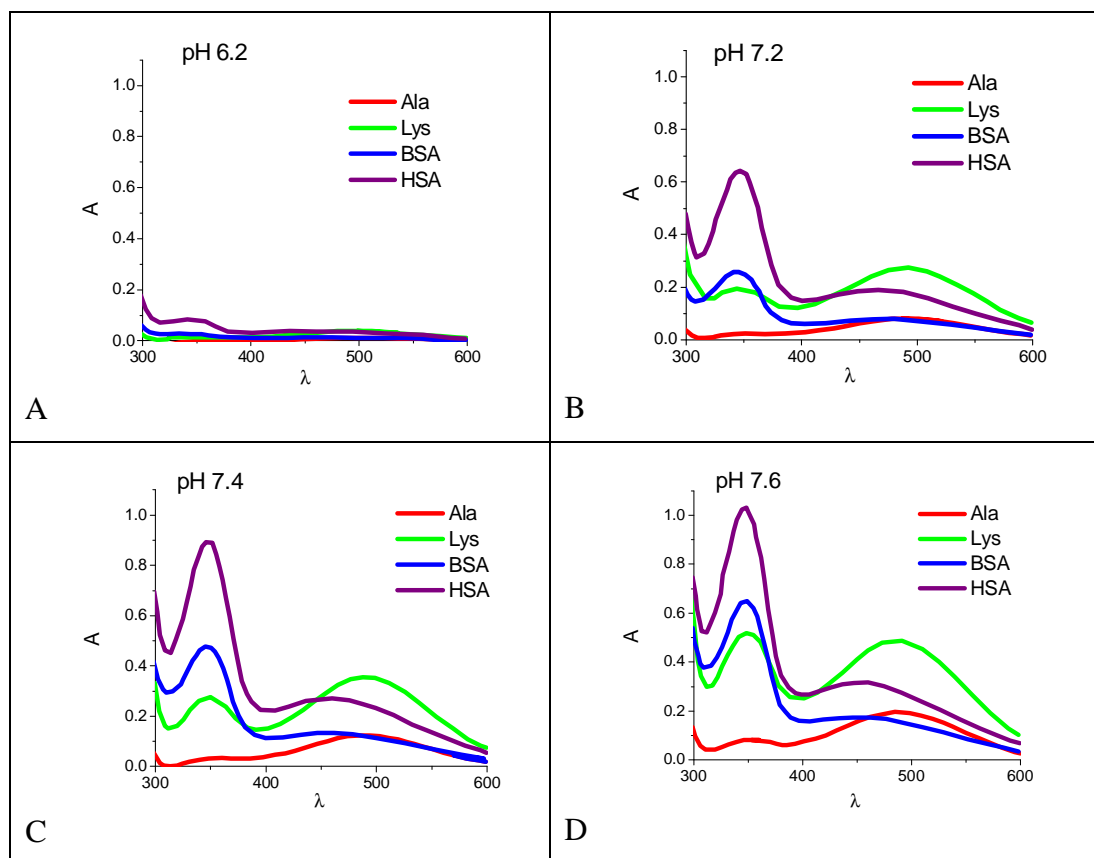
Ispitivanje uslova za odre ivanje sadržaja amino grupa p-benzohinonom

Za ispitivanje optimalnih uslova reakcije amino-grupe aminokiselina i proteina sa p-benzohinonom izabrani su Ala (–amino grupa), Lys (–amino grupa i -amino grupa), BSA i HSA (59 bo nih ostataka Lys po molekulu proteina, Westwood i Thornalley, 1995). Apsorpcioni spektri proizvoda reakcije p-benzohinona sa amino-grupama aminokiselina i amino-grupama bo nih osataka Lys na površini molekula proteina pri razli itim pH (od 6,2 do 7,6) dati su na Slici 32.

U slabo-kiseloj sredini (pH 6.2) gotovo da ne dolazi do reakcije izme u p-benzohinona i amino-grupe. U slabo-baznoj sredini grade se proizvodi sa maksimumom apsorcije na 480 nm (Lys i Ala), odnosno 460 nm (HSA i BSA) i na 350 nm (Lys, Ala, HSA i BSA). Iako je pik sa maksimumom apsorcije na 350 nm oštiji, on nije izabran za pra enje promene sadržaja amino-grupa pri karbonilovanju proteina. Razlog za to je što pri karbonilovanju reaguju i guanidino-grupe ostataka Arg (kojih na površini HSA i BSA ima 24, Westwood i Thornalley, 1995) uz stvaranje proizvoda koji apsorbuje na 350 nm (A imovi et al, 2009), što bi doprinosilo apsorbanci proizvoda amino-grupe i p-benzohinona. Zato je za dalji rad izabrana talasna dužina na 480 nm. Ova talasna

dužina izabrana je i za određivanje amino-grupa HSA i BSA da bi se smanjila interferencija koja potječe od proteinske tiol-grupe (prikazano kasnije).

Sa porastom pH povećava se intenzitet apsorpcionih maksimuma (Slika 32.). Tako, povećanje pH od 7.2 do 7.4 dovodi do povećanja apsorbanca proizvoda HSA i BSA na 480 nm za oko 50%, a daljnje povećanje pH od 0.2 jedinice za 15%. Stoga je kao optimalno pH za izvođenje reakcije između amino-grupa i p-benzohinona izabrana vrednost 7.4.

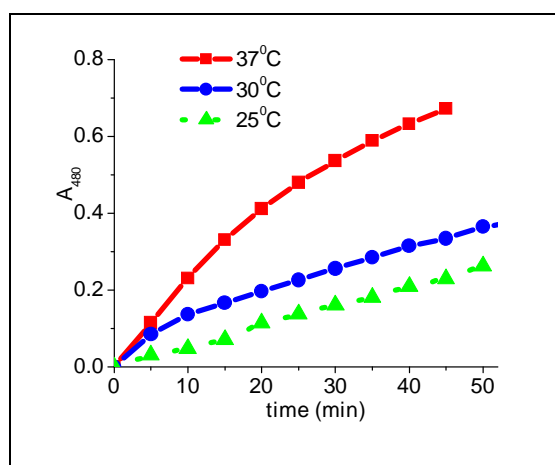


Slika 32. Apsorpcioni spektri proizvoda reakcije aminokiselina (Ala i Lys) i proteina (BSA i HSA) posle 15 min inkubiranja sa 2.67 mM PBQ na 37°C u 0.1 M fosfatnom puferu pri različitim pH vrednostima pufera: 6.2 (A), 7.2 (B), 7.4 (C) i 7.6 (D). Sadržaj amino-grupa u probi je bio 0.67 mM (za Ala, HSA i BSA) i 1.34 mM (Lys).

Na Slici 32B.-D., mogu se uočiti razlike u intenzitetu apsorpcije (na 480 nm) proizvoda reakcije p-benzohinona i jedinjenja koja sadrže amino-grupu. Proizvod HSA apsorbuje jače od proizvoda BSA i Ala. S druge strane, intenzitet apsorpcije proizvoda Lys (odnosno proizvoda jedne – i jedne –amino grupe) sa p-benzohinonom, ako se

uzme u obzir dvostruko ve i sadžaj amino-grupa, viši je od inteziteta o ekivanog za Ala (jedna –amino grupa). Ovo ukazuje da treba voditi ra una pri izboru supstance za snimanje baždarne krive, na osnovu koje se prati promena sadržaja amino-grupa u razli itim sistemima.

Uticaj temperature (25°, 30° i 37°C) i vremena inkubiranja (5-50 min) na reakciju amino-grupa sa p-benzohinonom prikazan je na Slici 33. Inkubiranje reakcione smeše na 37 °C daje 2-3 puta ve e vrednosti apsorbance od inkubiranja na sobnoj temperaturi za isti vremski period. Imaju i u vidu primenu metode u klini koj praksi, za optimalne uslove inkubiranja izabrana je temperatura od 37°C i vreme od 15 min.



Slika 33. Uticaj temperature i vremena inkubiranja na reakciju amino-grupa HSA sa p-benzohinonom. Reakciona smeša sadrži 33 μ M HSA (2 mM amino grupa) i 2.67 mM PBQ u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4.

Izabrani optimalni uslovi (pH 7.4, koncentracija pufera 0.1 M, koncentracija p-benzohinona u probi 2.67 mM, temperatura inkubiranja 37 °C i vreme 15 min) primenjeni su za ispitivanje zavisnosti apsorbance na 480 nm od koncentracije analita, odnosno sadržaja amino-grupa, u rastvorima amino-kiselina i proteina (Ala, Lys, HSA i BSA). Snimljene su standardne krive u opsegu koncentracija amino-grupa od 0.2 do 2.0 mM, u probi, što je odgovaralo koncentraciji amino-grupa u realnim uzorcima od 3 do 30 mM. Za sve etiri supstance utvr ene su linearne zavisnosti u navedenom opsegu koncentracija amino-grupa (Tabela 7). Sve vrednosti apsorbanci, dobijene za ispitivane koncentracije amino-grupa nalaze se u opsegu maksimalne ta nosti za spektrofotometrijsku metodu ($A = 0.1-1$). Me utim, vrednosti nagiba prava dobijenih za Lys i HSA su ve e od dobijenih za Ala i BSA. Razlike su još izraženije kada se reakcija

izvodi na pH 7.2. Nagib prave dobijene sa BSA je gotovo jednak nagibu prave Ala i značajno manji od nagiba prave HSA. Budući da je broj ostataka Lys na površini BSA i HSA jednak (Westwood and Thornalley 1995), razlika u apsorpciji proizvoda reakcije ovih molekula sa p-benzohinonom ukazuje da mikrookolina Lys ostataka utiče na njihovu reaktivnost.

Tabela 7. Jednolinearne standardnih prave za određivanje amino-grupa merenjem apsorbanca proizvoda reakcija p-benzohinona sa Ala, Lys, BSA ili HSA redom, u fosfatnom puferu na pH 7.2 i 7.4.

Standard	pH	Y = aC + b *	R
Ala	7.2	Y = 0.00614 C + 0.0087	0.9990
	7.4	Y = 0,0144 C + 0.00062	0.9988
Lys	7.2	Y = 0.01241 C + 0.0124	0.9986
	7.4	Y = 0.01726 C - 0.04038	0.9986
BSA	7.2	Y = 0,00887 C + 0.0055	0.9979
	7.4	Y = 0,01386 C + 0,0244	0.9992
HSA	7.2	Y = 0.01272 C + 0.0260	0.9930
	7.4	Y = 0.02182 C + 0.02611	0.9988

* Y – apsorbanca na 480 nm; C - koncentracija u mM

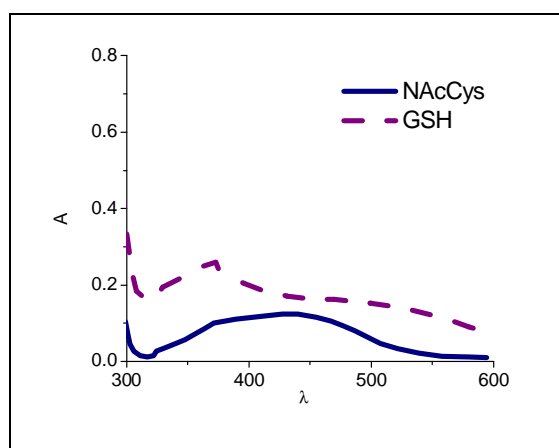
Dobijeni rezultati pokazuju da je pH 7.4 optimalno pH za određivanje amino-grupa. Promena sadržaja amino-grupa, do kojih dolazi pri karbonilovanju HSA u in vitro i in vivo uslovima, osetljivije je kada se koriste kalibracione prave snimljene sa HSA ili Lys kao standardima. Za promenu amino-grupa BSA molekula može se koristiti kalibraciona prava snimljena sa Ala.

Validacija metode

Tiol-grupa takođe reaguje sa p-benzohinonom (Zaia, et al 1999). Ukoliko se sadržaj tiola određuje sa ovim reagensom reakciju treba izvoditi u kiselj sredini u kojoj amino-grupa neznatno reaguje. Doprinos tiol-grupe pri određivanju amino-grupa, u reakcionoj smešici je pH 7.4, ispitan je u reakciji p-benzohinona sa N-acetilcisteinom (NACys) i GSH.

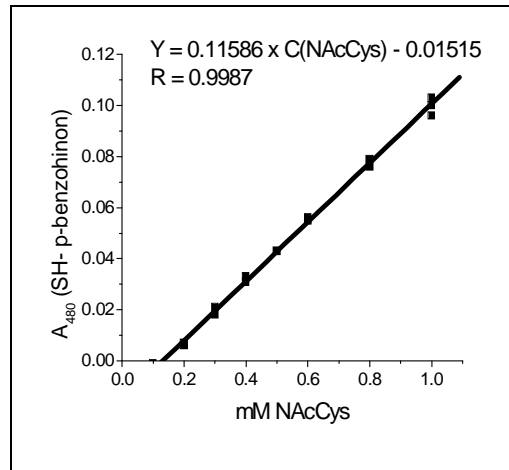
Apsorpcioni spektar proizvoda reakcije NACys i p-benzohinona ima široku traku sa maksimumom apsorpcije na 430 nm, koja potiče od tiol-p-benzohinon

proizvoda (Slika 34.). Spektar proizvoda reakcije GSH i p-benzohinona pokazuje da je reagovala i amino- i tiol-grupa GSH. Može se zaključiti da tiol-grupa može da smeta određivanju sadržaja amino-grupe pri merenju apsorbance bojenog proizvoda na 480 nm. Sa druge strane, sadržaj tiol-grupe na površini proteinskih molekula je znatno manji u odnosu na sadržaj amino-grupa. Odnos tiol- i amino-grupa na površini HSA molekula iznosi 1:59, te se može pretpostaviti da tiol-grupa ne utiče značajno na određivanje sadržaja amino-grupa. Doprinos apsorbance tiol-p-benzohinonskog proizvoda apsorpciji amino-p-benzohinonskog proizvoda na 480 nm ispitan je sa NAcCys u opsegu koncentracija od 0.1 do 1mM (koncentracija HSA-SH u realnim uslovima iznosi 0.3 mM do 0.5 mM). NAcCys ima jednu -SH grupu i nema slobodne amino-grupe. S obzirom na to da je N-acetilovani derivat proteinske aminokiseline Cys, njegova slobodna tiol-grupa je dobar model, za tiol-grupu albumina.



Slika 34. ApSORPCIONI SPEKTAR proizvoda reakcije NAcCys i GSH (0.067 mM) snimljen posle inkubiranja sa 2.67 mM PBQ u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 37°C u toku 15 min.

Dobijene vrednosti A_{480} za NAcCys-SH-p-benzohinon proizvod (Slika 34.) su više od vrednosti amino-p-benzohinon proizvoda za jednaku koncentraciju -SH i amino-grupa. Stoga, iako je sadržaj -SH grupa na površini molekula proteina znatno niži od sadržaja amino-grupa, doprinos A_{480} koji potiče od SH-p-benzohinon-proizvoda treba uzeti u obzir.



Slika 35. Zavisnost apsorbance A_{480} (SH- p-benzohinon) od koncentracije NAcCys. Prikazani rezultati su srednje vrednosti odreivanja u triplikatu.

Doprinos A_{480} (SH- p-benzohinon) procenjen je odreivanjem sadržaja amino-grupa u smešama koje sadrže Lys i NAcCys, (u kojima je odnos amino- : -SH bio 50 : 1, odnosno 100 : 1). Dobijeni rezultati dati su u Tabeli 9.

Kada je sadržaj amino-grupe 50 puta veći od sadržaja tiol-grupe, dobijena srednja vrednost za recovery iznosi 109.02 ± 2.78 %, a pri 100 puta većem sadržaju 103.42 ± 2.71 %. Kada se izmerene vrednosti A_{480} koriguju oduzimanjem A_{480} (koja potiče od SH-p-benzohinona) i kada se primeni standardna prava za Lys za odreivanje sadržaja amino-grupa, dobija se srednja vrednost recovery od 101.14 ± 1.31 % (Tabela 8.).

Budući da se ova metoda primenjuje za praćenje promene sadržaja amino-grupa na površini molekula proteina (HSA) pri karbonilovanju (u in vitro i in vivo uslovima), dobijeni rezultati pokazuju da se snimanjem baždarnih krivih sa HSA kao standardom eliminiše potreba za korekcijom sadržaja amino-grupa za sadržaj tiol-grupa. Dakle, za praćenje promena sadržaja amino-grupa proteina seruma pogodan je HSA kao standard.

Tabela 8. Uticaj tiol-grupe na odre ivanje sadržaja amino-grupe. Prikazani rezultati su srednje vrednosti ($X \pm SD$) odre ivanja koncentracije amino-, odnosno –SH grupa u triplikatu.

Uzorak	C (amino) (mM)	Dodato C(SH) (mM)	Odre ena C(amino) (mM)	Recovery (%)	Odre ena ^a C(SH) (mM)	Korigovana ^b C(amino) (mM)	Recovery (%)
1	10	0.2	10.58 ± 0.23	105.80	0.209 ± 0.002	10.05 ± 0.24	100.50
2	14	0.3	15.48 ± 0.20	110.57	0.298 ± 0.008	14.35 ± 0.40	102.50
3	25	0.5	27.67 ± 0.23	110.68	0.515 ± 0.010	25.13 ± 0.30	100.52
4	10	0.1	10.06 ± 0.17	100.60	0.109 ± 0.001	10.20 ± 0.18	102.00
5	30	0.3	31.80 ± 0.17	106.00	0.300 ± 0.007	30.67 ± 0.22	102.23
6	40	0.4	41.46 ± 0.75	103.65	0.389 ± 0.010	39.65 ± 0.82	99.12

^a Sadržaj -SH grupe u reakcionoj smeši je odre en Elmanovom metodom

^b Na osnovu jedna ine prave zavisnosti apsorbance $A_{480}(\text{SH- p-benzohinon})$ od koncentracije NAcCys ($Y = 0.11586 \times C(\text{NAcCys}) - 0.01515$, $R = 0.9987$, Slika 35.), a plaze i od C(SH), izra unata je $A_{480}(\text{SH- p-benzohinon})$. Korigovana C(amino) je izra unata na osnovu korigovane $A_{480}(\text{amino})$ koja je dobijena oduzimanjem: $A_{480}(\text{izmerena}) - A_{480}(\text{SH- p-benzohinon})$.

Preciznost metode ispitivana je odre ivanjem sadržaja amino-grupa u komercijalnom HSA u 5 proba, za svaku od dve razli ite koncentracije rastvora HSA (0.25 i 0.5 mM). Dobijene srednje vrednosti za sadržaj amino-grupa (15.27 ± 0.19 mM i 30.22 ± 0.56 mM), odnosno relativne standardne devijacije (RSD, 1.24 % i 1.85 %, redom) pokazuju da je metoda precizna. Preciznost odre ivanja ispitana je i sa rastvorom komercijalnog BSA, jednakih koncentracija. Dobijene vrednosti za sadržaj amino-grupa iznose 15.40 ± 0.29 mM i 29.95 ± 0.45 mM (dobijene su RSD 1.88 % i 1.50 %).

Ta nost metode proverena je metodom standardnog dodatka. U rastvore BSA (0.125 mM i 0.5 mM) dodavan je rastvor alanina, da koncentracija dodatih amino-grupa bude od 3 do 30 mM (Tabela 9). Dobijene srednje vrednosti za recovery iznosile su 100.65 ± 1.21 %.

Tabela 9. Provera ta nosti odre ivanja amino-grupa sa p-benzohinonom u uzorcima BSA (0.125 i 0.5 mM) metodom standardnog dodatka. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri odre ivanja.

Uzorak	C(amino BSA) (mM) *	Dodata C(amino-Ala) (mM)	Odre ena C (amino) (mM)	Recovery (%)
1	7.38	3	10.65 ± 0.22	102.61
		10	17.38 ± 0.29	100.03
		20	27.72 ± 0.58	101.27
		30	37.75 ± 0.51	101.01
2	30.58	3	33.42 ± 0.51	99.52
		10	40.38 ± 0.36	99.48

*Sadržaj amino-grupa u 0.125 mM i 0.5 mM BSA iznosi 7.38 mM, odnosno 30.58 mM.

Može se zaklju iti da je razvijena spektrofotometrijska metoda za odre ivanje sadržaja amino-grupa na površini molekula proteina, sa p-benzohinonom kao reagensom, jednostavna, brza, precizna i ta na. Metoda je primenjena za odre ivanje amino-grupa u in vitro eksperimentima modifikacije HSA karbonilnim jedinjenjima, kao i za pra enje promena HSA in vivo kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa.

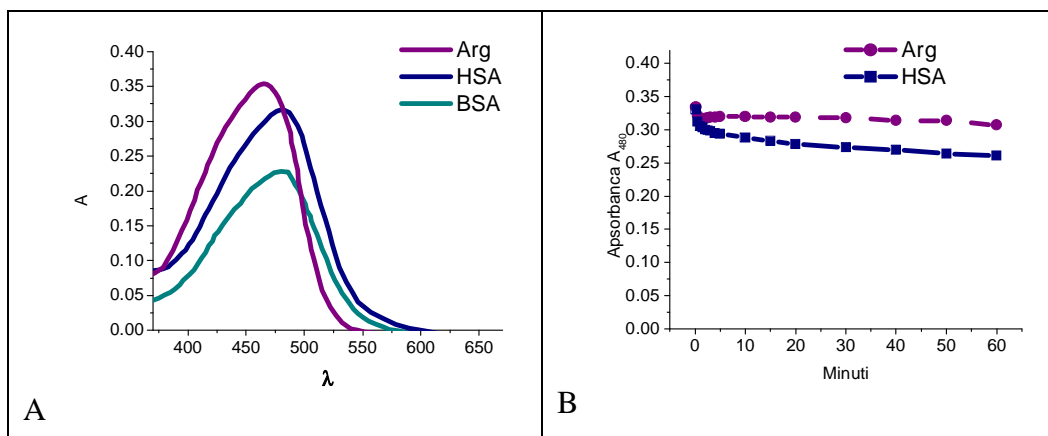
4.2. Spektrofotometrijska metoda za pra enje promena sadržaja guanidino-grupa u toku karbonilovanja proteina

Polaze i od potrebe da se razvije jednostavna metoda za pra enje promena sadržaja guanidino-grupa proteina u toku karbonilovanja proteina -oksoaldehidima, ispitivana je mogu nost primene reakcije Arg sa reagensom koji sadži timol-natrijum-hipobromit, u vodenoj sredini (Sastry i Tummuru, 1984).

Optimizacija uslova za određivanje guanidino-grupa sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit

Apsorpcioni spektri proizvoda reakcije guanidino-grupa Arg i proteina sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit, prikazani su na Slici 36. U baznoj sredini odmah nakon mešanja reaktanata, nastaju proizvodi sa maksimumom apsorpcije na 470 nm (Arg) i 480 nm (HSA i BSA). Proizvod Arg guanidine-grupe je stabilan u toku 60 min. Apsorbanca proizvoda guanidino-grupe HSA se smanjila za 16 % u toku istog vremenskog perioda. Stoga je neophodno meriti apsorbanca odmah po dodatku reagenasa timola i natrijum-hipobromita.

Sa Slike 36. se može uočiti da postoje primetne razlike u apsorpciji bojenih proizvoda guanidino-ostataka proteina. Proizvod reagensa i HSA apsorbuje jače od proizvoda sa BSA. Prema tome, u cilju praćenja promena nivoa proteinskih guanidino-grupa neophodno je da se standardna prava snima sa odgovarajućim konkretnim proteinom kao standardom.



Slika 36. A. Apsorpcioni spektri proizvoda reakcije guanidino grupe 10 mM Arg i 0.5 mM HSA sa reagensom (timol i natrijum-hipobromit) B. stabilnost nastalih bojenih proizvoda sa vremenom.

Zavisnost apsorbanca bojenog proizvoda na 470 nm i 480 nm od koncentracije analita ispitivana je za guanidino-grupe arginina i proteina (HSA i BSA). Za sve tri supstance dobijena je linearna zavisnost u opsegu koncentracija guanidino grupa u od 4,8 do 190 μ M (u probi), što odgovara koncentraciji u realnim uzorcima od 1 do 40 mM (Tabela10.). Vrednosti nagiba pravih dobijenih za Arg i HSA (kada je apsorbanca bila merena na 480 nm) su skoro jednake. Stoga se za praćenje promena sadržaja HSA

guanidino-grupa tokom karbonilovanja može koristiti standardna prava snimljena sa Arg kao standardom, merenjem apsorbance na 480 nm. S obzirom na to da je broj Arg ostataka na površini BSA i HSA jednak (Westwood i Thornalley, 1995), razlike u apsorbanci proizvoda reakcije ovih molekula ukazuju da mikrookolina ostataka Arg utiče na reaktivnost guanidino-grupa. Za praćenje karbonilovanja BSA je stoga, potrebno koristiti standardnu pravu snimljenu sa BSA kao standardom.

Tabela 10. Jednolinearne standardnih prava za određivanje koncentracije guanidino-grupa sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit, dobijenih sa Arg, HSA i BSA kao standardima.

Standard	(nm)	Y = aC + b *	R
Arginin	470	Y = 0.03360 C - 0.0055	0.9997
	480	Y = 0.03077 C - 0.0019	0.9997
HSA	470	Y = 0.02914 C + 0.01167	0.9991
	480	Y = 0.03068 C + 0.00113	0.9994
BSA	470	Y = 0.02339 C + 0.00608	0.9993

* Y – apsorbanca; C koncentracija u mM

Validacija metode

Broj ostataka Lys na HSA je veći od broja ostataka Arg (59 prema 24), stoga je ispitan uticaj amino-grupe Lys na određivanje guanidino-grupa (sa timolom i natrijum hipobromitom). Sadržaj guanidino-grupa određen je u rastvorima Lys i Arg u kojima je odnos guanidino : amino iznosio 1:1, 1:2 i 1:10 (odnos na površini molekula HSA). Utvrđeno je da čak i kada je prisutna u 10 puta većoj koncentraciji, amino-grupa Lys ne utiče na određivanje sadržaja guanidino-grupa ovom metodom.

Preciznost metode određivanja sadržaja guanidino-grupa u HSA i BSA ispitana je u 5 proba za svaku od dve različite koncentracije rastvora proteina (0.15 i 0.6 mM). Dobijene vrednosti za sadržaj guanidino-grupa u rastvorima HSA bile su 3.68 ± 0.04 mM i 14.34 ± 0.17 mM (dobijene RSD su bile 1.1% i 1.2%), a u rastvorima BSA 3.64 ± 0.03 mM i 14.16 ± 0.28 mM (RSD - 0.9% i 2%).

Tačnost metode proverena je metodom standardnog dodatka. U rastvore BSA koncentracija 3.6 i 14.4 mM dodavan je rastvor Arg (koncentracija dodatih guanidino-

grupa bila je od 0.72 do 7.2 mM, Tabela 11.). Dobijena srednja vrednost ta nosti iznosi $99.84 \pm 0.84 \%$.

Tabela 11. Provera ta nosti odre ivanja guanidino grupa u uzorcima BSA (0.15 i 0.6 mM) metodom standardnog dodatka.

BSA uzorak	C(guanidino BSA) (mM)*	Dodata C (guan.-Arg) (mM)	Odre eno C (guan.) (mM)	Ta nost (%)
1	3.6	0	3.60 ± 0.02	100.06
		0.72	4.26 ± 0.05	98.56
		1.80	5.40 ± 0.11	99.96
		3.60	7.12 ± 0.06	98.92
		7.20	10.83 ± 0.25	100.25
2	14.4	0	3.60 ± 0.02	100.06
		0.72	15.06 ± 0.12	99.60
		1.80	16.03 ± 0.30	98.94
		3.60	18.15 ± 0.25	100.85
		7.20	21.63 ± 0.15	100.14

*Sadržaj guanidino grupa u 0.15 mM i 0.6 mM BSA bio je 3.6 mM i 14.4 mM.

Dobijeni rezultati pokazuju da je metoda za odre ivanje guanidino-grupa proteina precizna (RSD 0.9-2%) i ta na (recovery $99.84 \pm 0.84 \%$) i stoga pogodna za pra enje promena sadržaja guanidino-grupa tokom karbonilovanja proteina in vitro. Pored toga metoda je bila jednostavna što ukazuje na njen potencijalni zna aj za primenu u klini koj praksi za pra enje karbonilovanja proteina in vivo. Rezultati ovih ispitivanja su dati u poglavlju 4.6.

4.3. Ispitivanje doprinosa reakcije tiol-grupe modifikaciji proteina dikarbonilnim jedinjenjima

Da bi se sagledale modifikacije proteina do kojih dolazi u karbonilnom stresu i doprinos tiol-grupe ovim promenama, ispitivana je reakcija HSA sa metilgliksalom, in

in vitro u uslovima približnim fiziološkim. HSA je izabran kao model-sistem, jer je poznata njegova kristalna struktura, poznat je broj bo nih ostataka lizina (59), arginina (24) i cisteina (1) koji se nalaze na površini ovog molekula, i koji stoga mogu da u estvuju u reakciji sa metilglioksalom. Polaze i od injenice da je pri fiziološkim uslovima tiol-grupa reaktivnija od guanidino- i amino-grupa, i da je mnogo manje zastupljena i dostupna (samo jedna tiol grupa, ija je relativna dostupnost (RASA) manja od 5 %, poglavlje 4.4.5.), bilo je od interesa ispitati zna aj reakcije tiol-grupe HSA u modifikaciji proteina. Pored toga, budu i da je HSA najzastupljeniji protein plazme, Cys 34 grupa na površini molekula mogu e je da ima dodatne uloge u odbrani organizma od oksidativnog stresa. Njeno karbonilovanje samim tim, smanjuje antioksidativni kapacitet HSA molekula.

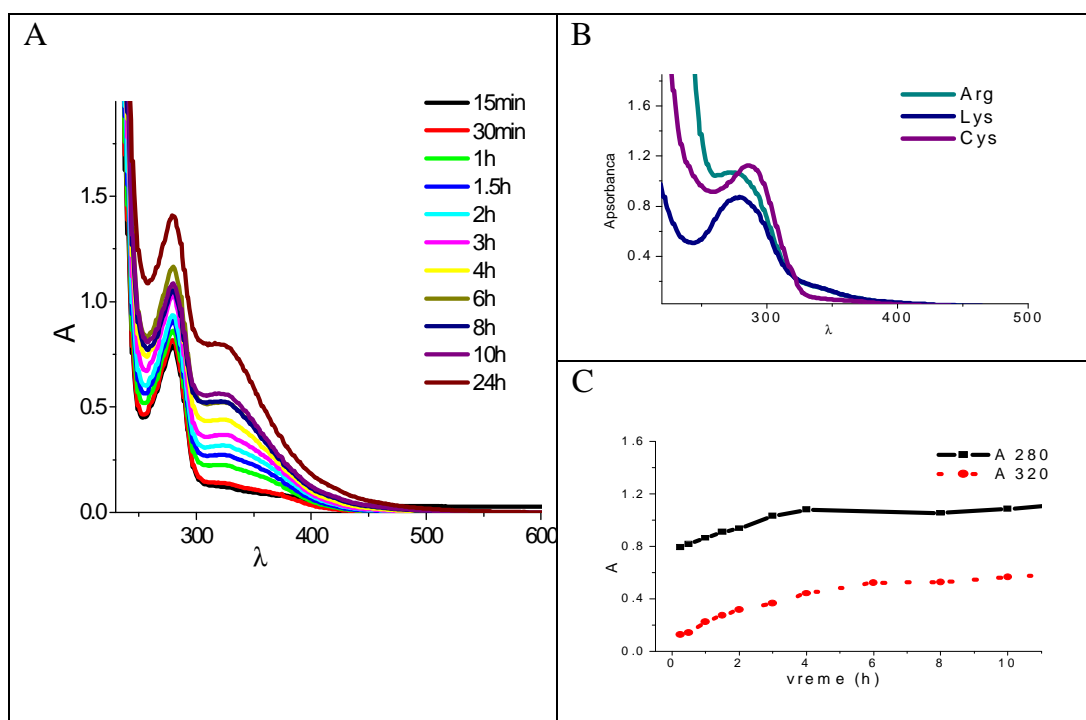
Preliminarna ispitivanja modifikacije BSA sa malim viškom (19 %) metilglioksala u odnosu na ukupan sadržaj reaktivnih grupa (84, Westwood i Thornalley, 1995) pokazala su da dolazi do zna ajnog smanjenja sadržaja tiol-grupa (A imovi et al, 2009.). Ovi rezultati su omogu ili dizajniranje eksperimenata (u pogledu koncentracija i vremena trajanja inkubacije) za ispitivanje modifikacije HSA metilglioksalom. U cilju da se ispita zavisnost modifikacija aminokiselinskih ostataka od koncentracije metilglioksala, inkubiranje HSA je ra eno sa koncentracijama metilglioksala ve im i manjim od ukupnog sadržaja reaktivnih grupa.

4.3.1. Modifikacija HSA metilglioksalom, kada je on prisutan u višku u odnosu na broj reaktivnih grupa na površini proteina

U cilju ispitivanja reaktivnosti bo nih ostataka Lys, Arg i Cys na površini molekula HSA, prvo je pra ena reakcija HSA (0.5mM) sa 100 mM metilglioksalom, inkubiranjem reakcione smeše na 37 °C, u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, u toku 24 h. Koncentracija HSA (33.3 mg/mL) je odgovarala fiziološkoj, a koncentracija metilglioksala (100 mM) je bila ve a od ukupnog broja grupa bo nih aminokiselinskih ostataka na površini molekula HSA, koje mogu da reaguju (84, Westwood i Thornalley, 1995).

Tok reakcije HSA sa metilglioksalom pra en je snimanjem apsorpcionog UV-VIS spektra (u alikvotima inkubacione smeše, posle uklanjanja malih molekula dijalizom, Slika 37.A.). Može se uo iti da se u tokom reakcije pove ava intezitet

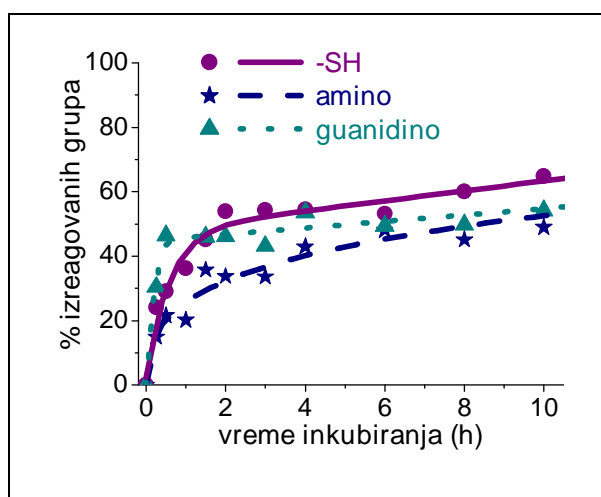
apsorpcionog maksimuma na 280 nm i pojavljuje pik na 320 nm, koji tako e raste s vremenom. Ako se izvrši pore enje HSA spektara sa apsorpcionim spektrima proizvoda dobijenih u reakciji pojedina nih aminokiselina - Arg, Lys i Cys (Slika 37.B.) i metilglioksala, može se zaklju iti da je pove anje A_{280} posledica nastanka proizvoda reakcije metilglioksala i amino-, guanidino- i tiol-grupe bo nih ostataka aminokiselina HSA. Pik na 320 nm odgovara apsorpcionom maksimumu proizvoda reakcije metilglioksala sa argininom i lizinom (Slika 37.B.). Promene inteziteta oba maksimuma sa vremenom prikazane su na Slici 37C. Promene su najbrže u prvih 4 sata reakcije, a zatim dolazi do pojave platoa u periodu od 4 do 6 sati pika na A_{280} , dok je promena inteziteta A_{320} i dalje prisutna, ali znatno sporija (Slika 37.C.).



Slika 37. A. Apsorpcioni spektri reakcionih smeša HSA (0.5 mM) i metilglioksala (100 mM) dobijeni tokom inkubiranja na 37°C u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4. u vremenskom periodu od 15 min do 24 h; B. Apsorpcioni spektri reakcionih smeša aminokiselina Arg, Lys i Cys (2 mM) i metilglioksala (10 mM) posle inkubacije od 6 h; C. promena A_{280} i A_{320} u toku inkubiranja HSA sa metilglioksalom.

Kinetika reakcije metilglioksala i amino-, guanidino- i -SH grupa pra ena je odre ivanjem njihovog sadržaja na površini HSA, u alikvotima inkubacione smeše s vremenom. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 38. Može se videti da je:

- w reakcija guanidino-grupe najbrža. Posle samo 30 min inkubiranja sa metilglioksalom, izreagovalo je 48 % dostupnih guanidino grupa. Procenat se nije menjao i posle 10 h inkubiranja ($48.6 \pm 3.9 \%$)
- w reakcija amino-grupe je najsporija, u prvih 30 min izreagovalo je samo 20 % slobodnih amino grupa, a posle 4 h ovaj procenat je udvostru en. U vremenu inkubiranja od 4 do 10 h došlo je do postepenog porasta % izreagovanih amino-grupa do 49 %
- w u prvih 30 min izreagovalo 30 % -SH grupa, posle 2 h 55 % a posle 10 h inkubiranja 65 % -SH grupa.
- w Na kraju inkubacionog perioda (24 h) izreagovalo oko 70 % amino- i guanidino-grupa i 85 % -SH grupa.

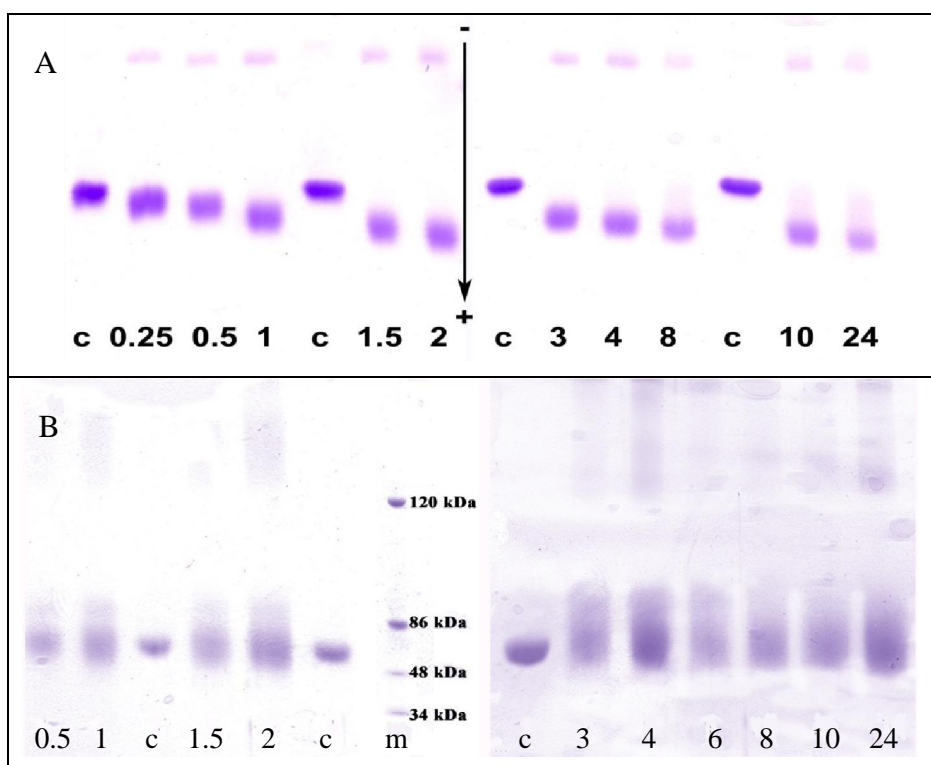


Slika 38. Kvantifikacija tiol-, amino- i guanidino-grupa (procenat izreagovanih u odnosu na po etni sadržaj) za vreme inkubacije HSA (0.5mM) i metilglioksala (100 mM) u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 10 sati. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti tri odre ivanja.

Modifikacije HSA u toku inkubiranja sa metilglioksalom pod navedenim uslovima prae su nativnom i SDS PAGE elektroforezom (Slika 39.) Promene u naelektrisanju HSA pri nativnoj elektroforezi (Slika 39.A.) uo avaju se ve posle 15 minuta inkubacije. U toku 24- asovnog inkubiranja, pozitivno naelektrisanje HSA molekula se stalno smanjuje (odnosno pove ava relativna pokretljivost HSA pri nativnoj elektroforezi, REP, Tabela 12.). Ove promene su u skladu sa promenom ukupne koli ine (mol) izreagovanih guanidino- i amino- grupa po molu HSA (Tabela 13). Najve e promene u pokretljivosti HSA dobijene su u toku prva 2 sata reakcije sa

metilglioksalom, kada je amino-grupa izreagovala u značajnom, a guanidino-grupa u maksimalnom procentualnom iznosu.

Na SDS PAGE elektroforegramu (Slika 39.B.) uočava se širenje trake od 66 kDa (koja odgovara monomeru HSA), sa „repom“ prema većim molekulskim masama (do 90 kDa), već posle 30 minuta inkubacije. Dimerske trake (molekulske mase oko 130 kDa) i trake oligomera se uočavaju posle 2 sata inkubacije, što ukazuje da dolazi do umrežavanja molekula HSA. Sa povećanjem vremena inkubiranja širenje trake HSA monomera je sve intenzivnije, dobija se praktično jedna široka kontinualna traka 48-90 kDa, što upućuje na to da pored umrežavanja monomera HSA dolazi do fragmentacije HSA i umrežavanja fragmenata.



Slika 39. Elektroforegrami dobijeni nativnom (A) i SDS PAGE elektroforezom (B) alikvota HSA (0.5 mM) inkubiranog sa metilglioksalom (100 mM) u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 37 °C u toku 24 h. Linija c prikazuje HSA bez prisustva metilglioksala, oznake ostalih linija odgovaraju vremenskom periodu inkubiranja HSA sa metilglioksalom (u satima). Linija m su standardi (34, 48, 86 i 120 kDa).

Tabela 12. Promena sadržaja izreagovanih bo njih ostataka aminokiselina (mol/mol HSA) pri inkubiranju HSA (0.5 mM) sa 100 mM metilgliksalom u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 na 37°C, u toku 24h.

Vreme inkubiranja (h)	Sadržaj izreagovanih grupa (mol/mol HSA)					REP	A ₃₂₀
	Tiol	Amino	Guanidino	Ukupno	% ^a		
0.5	0.22 ± 0.01	11.80 ± 0.52	11.52 ± 0.35	23.54	28.1	1.47 ± 0.03	0.140
2	0.41 ± 0.01	18.90 ± 0.38	10.15 ± 0.17	29.46	35.17	2.39 ± 0.03	0.317
4	0.42 ± 0.01	24.06 ± 0.61	11.80 ± 0.52	36.27	43.31	2.50 ± 0.02	0.441
8	0.46 ± 0.01	25.28 ± 0.52	10.96 ± 0.43	36.7	43.81	2.61 ± 0.01	0.527
10	0.50 ± 0.01	28.91 ± 0.46	11.93 ± 0.40	41.34	49.35	3.04 ± 0.01	0.565
24	0.65 ± 0.01	40.71 ± 0.48	16.80 ± 0.33	58.16	69.43	3.33 ± 0.03	0.798

^a ukupan zbir izreagovalih grupa, izražen kao procenat od ukupnog broja dostupnih grupa, REP - relativna elektroforetska pokretljivost, određena prema kontroli HSA

Uzimajući u obzir prikazane rezultate odnosno da:

W procenat izreagovanih guanidino-grupa dostiže maksimalnu vrednost posle 30 minuta inkubiranja HSA sa metilgliksalom i da se daljim inkubiranjem ne menja;

W se oligomeri jasno uočavaju pri SDS-PAGE elektroforezi posle 2 h inkubiranja, odnosno kada procenat izreagovanih –SH i amino-grupa HSA raste (Tabela 12.);

W umrežavanje proteina raste sa vremenom (a smanjuje se sadržaj slobodnih amino- i tiol-grupa);

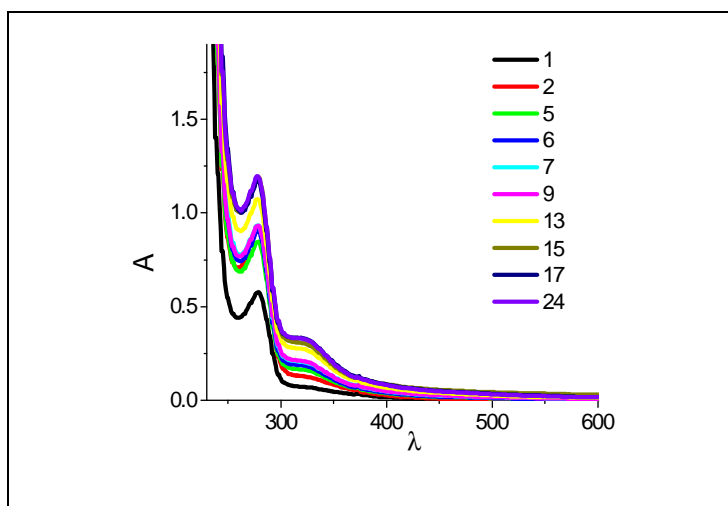
može se zaključiti da bojni ostaci cisteina i lizina na molekulu HSA imaju značajniju ulogu u umrežavanju molekula, nego bojni ostaci arginina. Bojni ostaci Lys HSA učestvuju u umrežavanju preko MG-SH (hemitioacetala) ili preko MG-NH₂, proizvoda nastalih u posle reakcije, što je u skladu sa predloženim mehanizmom (Zeng i Davies, 2006).

Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa predloženim mehanizmom reakcije guanidino-grupe (Lo et al, 1994) prema kojem proizvodi nastali u posle reakcije učestvuju u intramolekulskoj reakciji guanidino-grupe bojnog ostatka Arg, pri čemu nastaje imidazolonski derivat, čime je dalje umrežavanje sprečeno.

4.3.2. Modifikacija HSA sa metilglioksalom kada je on prisutan u manjku u odnosu na broj reaktivnih grupa na površini proteina

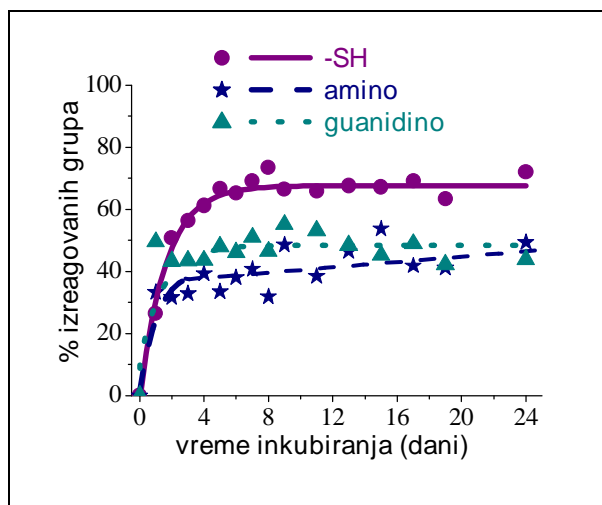
Rezultati dobijeni pri ispitivanju modifikacije HSA u prisustvu malo veće koncentracije metilglioksala omogući su saznanja o reaktivnosti boji ostataka aminokiselina Lys, Arg i Cys i njihovom doprinosu modifikaciji i umrežavanju proteina. Pošto su koncentracije metilglioksala pri fiziološkim uslovima znatno manje (u normalnom serumu se stvara oko 120 μM , Phillips i Thornalley, 1993, a kod tipa 1 dijabetičara raste do 5 - 6 puta više, Thornalley, 1996), bilo je od interesa ispitati doprinos $-\text{SH}$ grupe uo enzimskih promjena, pri kojima metilglioksala znatno manje od sume reaktivnih grupa, i pratiti te promjene u dužem vremenskom periodu. Zato je HSA (0.5 mM) inkubiran sa metilglioksalom (10 mM), čija je koncentracija bila 4 puta manja od ukupnog sadržaja grupa (koje mogu da reaguju), u toku 24 dana. Izabrani vremenski period približan je vremenu poluživota HSA u cirkulaciji (oko dvadesetak dana).

Reakcija HSA sa metilglioksalom praćena je snimanjem UV-VIS spektara reakcionih smjesa (mali molekuli su bili prethodno udaljeni dijalizom) tokom vremena (Slika 40.). U ovom slučaju se dva pika, na 280 i na 320 nm, intenzitet raste s vremenom.



Slika 40. Apsorpcioni spektri reakcionih smjesa HSA (0.5 mM) i metilglioksala (10 mM) dobijeni tokom inkubiranja, na 37°C u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, u vremenskom periodu od 1 do 24 dana.

Kinetika reakcije praena je odreivanjem sadržaja slobodnih amino-, guanidino- i tiol-grupa u alikvotima reakcione smeše. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 41. i u Tabeli 13.



Slika 41. Kvantifikacija tiol-, amino- i guanidino-grupa (procenat izreagovanih u odnosu na poetni sadržaj) za vreme inkubacije HSA (0.5 mM) i metilgliksala (10 mM) u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 24 dana. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost tri odreivanja sa RSD < 3%.

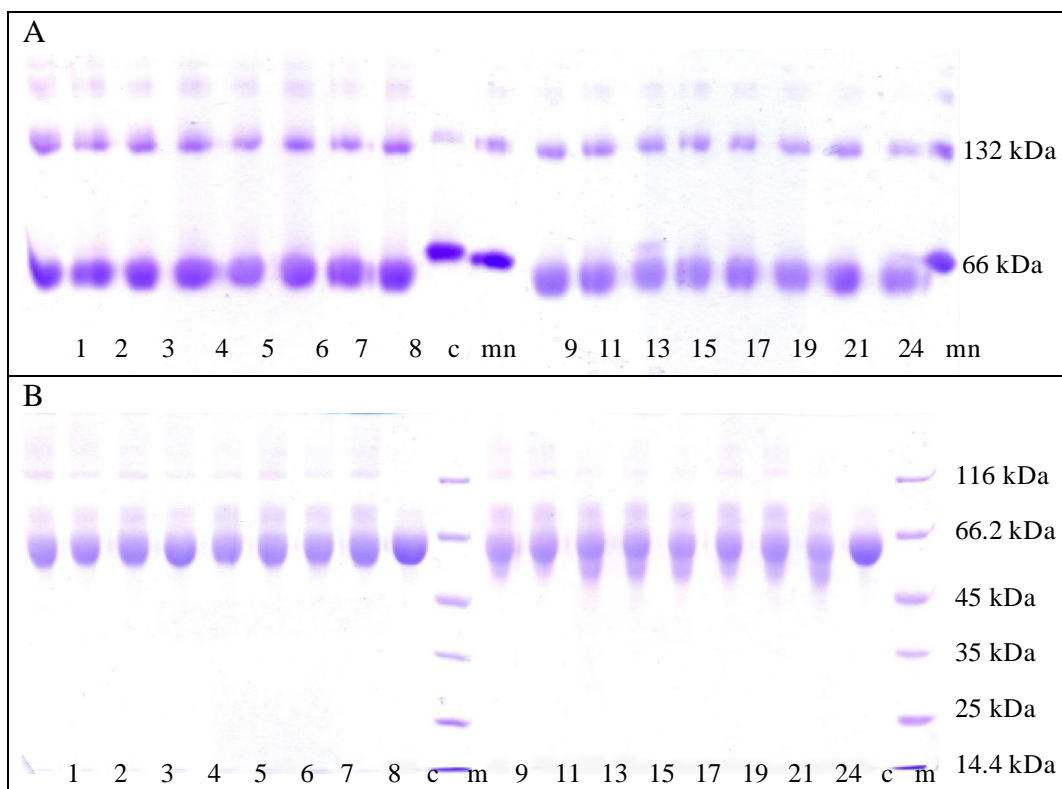
Tabela 13. Promena sadržaja izreagovanih bojih ostataka aminokiselina (mol/mol HSA) pri inkubiranju HSA (0.5 mM) sa 10 mM metilgliksalom u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 na 37°C, u toku 24 dana.

Vreme inkubiranja (dani)	Sadržaj izreagovanih grupa (mol/mol HSA)				% ^a
	Tiol	Amino	Guanidino	Ukupno	
1	0.198 ± 0.009	20.75 ± 0.70	11.97 ± 0.08	32.92	39.2
2	0.386 ± 0.007	18.35 ± 0.50	10.39 ± 0.15	29.13	34.67
3	0.430 ± 0.006	20.39 ± 0.83	10.40 ± 0.23	31.22	37.17
4	0.494 ± 0.003	20.32 ± 0.65	11.51 ± 0.39	32.32	38.48
5	0.503 ± 0.004	23.69 ± 0.96	11.51 ± 0.20	35.69	42.5
7	0.518 ± 0.008	24.08 ± 1.11	12.22 ± 0.32	36.82	43.8
9	0.509 ± 0.015	28.70 ± 0.42	13.20 ± 0.08	42.40	50.6
13	0.513 ± 0.006	26.50 ± 0.11	11.62 ± 0.25	38.63	46.0
17	0.526 ± 0.010	25.10 ± 0.33	11.74 ± 0.17	37.37	44.5
24	0.550 ± 0.008	29.13 ± 0.36	10.51 ± 0.20	40.19	48.0

^a ukupan zbir izreagovanih grupa, izražen kao procenat od ukupnog broja dostupnih grupa

Posle samo jednog dana inkubiranja, postignuta je ravnoteža za reakcije guanidino- i amino-grupa HSA sa metilglioksalom, pri čemu je izreagovalo oko 50 % guanidino-grupa ($47.2 \pm 3.8\%$) i oko 35 % amino grupa. Posle prvog dana inkubiranja izreagovalo je 26 % -SH grupa, 51 % posle 2 dana, a ravnoteža je dostignuta posle 5 dana inkubiranja, kada je izreagovalo 65 % -SH grupa.

Pokretljivost HSA pri nativnoj elektroforezi se značajno promenila posle prvog dana inkubacije i dalje se praktično nije menjala (za prvih osam dana inkubiranja REP iznosi 1.87 ± 0.05 , Slika 42.A.)

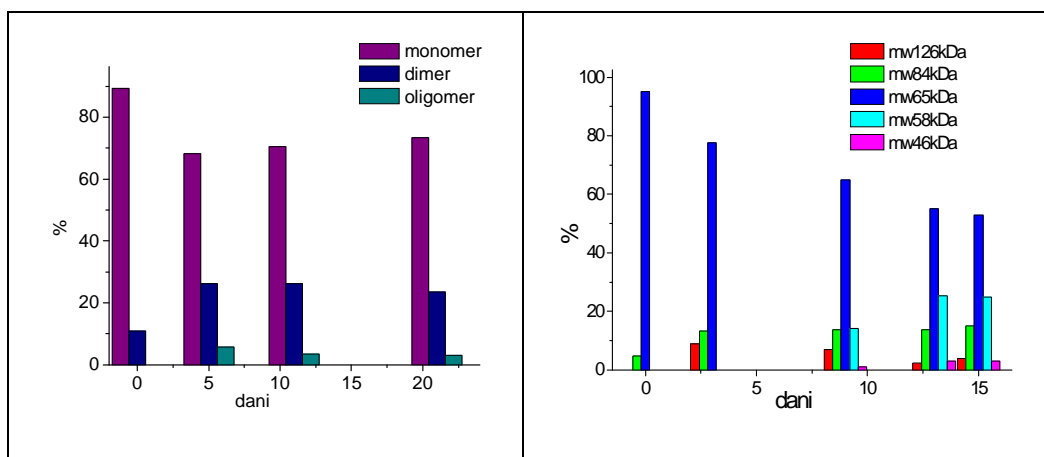


Slika 42. Elektroforegrami dobijeni nativnom elektroforezom (9% gel) (A) i SDS PAGE (10% gel) (B) alikvota HSA (0.5 mM) inkubiranog sa metilglioksalom (10 mM) u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.2) na 37 °C u toku 24 dana. Linija c prikazuje HSA bez prisustva metilglioksala, oznake ostalih linija odgovaraju vremenskom periodu inkubiranja HSA sa metilglioksalom (u danima). Linija mn je standard BSA za nativnu elektroforezu, a linija m su standardi molekulskih masa za SDS PAGE.

Pored dominantne trake HSA od 66 kDa, na nativnom elektroforegramu se uočavaju još dve trake. Pokretljivost jedne trake (M_r oko 132 kDa) odgovara pokretljivosti dimera

standarda BSA, te verovatno poti e od dimera HSA. Druga traka se nalazi u oblasti ve ih molekulskih masa, poti e verovatno od oligomera HSA. Analiza elektroforegrama u programu Image J pokazala je da do promene zastupljenosti HSA monomera, dimera i oligomera dolazi posle samo jednog dana inkubiranja sa metilglioksalom. Kontrolni uzorak je pored monomera imao oko 11% dimera, a u HSA inkubiranom sa metilglioksalom, zastupljenost monomera bila je $69.08 \pm 1.9 \%$, dimera 25.99 ± 1.03 i oligomera oko 5 % (Slika 43.A). Trake HSA inkubiranog sa metilglioksalom su znatno šire u odnosu na kontrolni uzorak.

Na SDS elektroforegramu (Slika 42.B.) vidi se širenje traka (uo ava se „rep“) prema ve im molekulskim masama u prvim danima inkubiranja. Analiza elektroforegrama u programu Image J pokazala je da je udeo monomera posle prvog dana inkubacije sa metilglioksalom opao sa 95 % (u kontrolnom uzorku) na 78 % (Slika 43.B.), posle osmog do desetog dana na oko 65 %, a posle jedanaestog dana na 55 %.



Slika 43. Zastupljenost monomera, dimera i oligomera u alikvotima inkubacione smeše HSA (0.5 mM) i 10mM MG, dobijena analizom elektroforegrama, u programu Image J: A. nativna elektroforeza; B. SDS PAGE.

Kontrolni uzorak nije imao dimersku traku ve samo rep do oko 80 kDa, koji je inio oko 5 %. Dimerska traka (126 kDa) se javlja posle prvog dana inkubacije sa metilglioksalom i ini oko 10%, kolika je i zastupljenost „repa“ na 85 kDa. Treba posebno ista i da se posle 9. dana inkubacije sa metilglioksalom, pojavljuje traka manje molekulske mase od 58 kDa sa zastupljenoš u od oko 15 %, njena zastupljenost raste do oko 20 % posle 15. dana reakcije HSA sa metilglioksalom. Posle jedanaestog dana

javlja se još jedan fragment molekulske mase od oko 46 kDa, čija je zastupljenost oko 3 %. Dakle, posle 9 dana inkubiranja, pored širenja trake HSA monomera ka veće molekularne mase, dolazi i do pojave traka manjih molekularnih masa, što ukazuje da pored umrežavanja molekula proteina, dolazi i do fragmentacije molekula HSA i povezivanja fragmenata.

Broj tiol-grupa na površini molekula HSA jeste zanemarljiv u poređenju sa ukupnim brojem amino- i guanidino-grupa, ali su one vrlo brzo i u značajnoj meri reagovali sa metilgliksalom i kada je količina metilgliksala bila nedovoljna (4 puta manja u odnosu na grupe koje reaguju). Na osnovu dobijenih rezultata može se proceniti koliki je doprinos tiol-grupe u umrežavanju HSA pri ovim uslovima.

Ako se uzme u obzir da je:

u posle 5 dana inkubiranja HSA (0.5 mM) sa 10 mM metilgliksalom, kada je uspostavljena ravnoteža reakcije metilgliksala i sve tri reaktivne grupe, izreagovalo oko 40 % amino-grupa (odnosno oko 11.8 mM) i oko 50 % guanidino-grupa (oko 6 mM, Tabela 14) može se zaključiti da je najmanje 8 mM amino-grupa učestvovalo u umrežavanju HSA molekula.

U 65 % SH grupa izreagovalo, odnosno u reakciji sa metilgliksalom nagradilo hemitioacetal (oko 0.50 mM), može se zaključiti da oko 4 % umrežavanja HSA molekula može biti posledica reakcije hemitioacetala sa amino grupom. Procenat nije zanemarljiv s obzirom na izuzetno malu zastupljenost SH grupa na površini HSA u odnosu na amino- i guanidino- grupe.

Modifikacija HSA glikacijom i stvaranje AGEs dovodi do razvoja sekundarnih komplikacija kod obolelih od dijabetesa. U poslednje vreme istraživanja su se fokusirala na antioksidativna svojstva HSA (Aimov et al 2009) i na ulogu Cys 34 tiol-grupe. Faure (2008) je predložio da modifikacija HSA dikarbonilnim jedinjenjima može dovesti do promene strukture i svojstava HSA, kao i do smanjenja njegovog antioksidativnog kapaciteta.

Rezultati kvantifikacije reaktivnih grupa i povećana promena elektroforetske pokretljivosti HSA, posebno pri niskim dozama metilgliksala i pri dugoročnoj izloženosti (dobijeni u ovoj tezi) pokazuju da tiol-grupe, pored amino-grupa imaju značajnu ulogu u modifikaciji i umrežavanju proteina u prisustvu metilgliksala. Značajno smanjenje sadržaja tiol-grupe za 26 % posle jednog sata inkubacije, odnosno za 72 % posle 24h, u prisustvu metilgliksala, može imati za posledicu smanjenje antioksidativnog kapaciteta albumina.

Na kraju treba ista i da su modifikacije HSA ispitivane u sistemu u kome je koncentracija metilglioksala (10mM i 100mM) bila daleko viša od fizioloških. Naime, u literaturi se navodi da je fiziološka koncentracija metilglioksala 100 nm (Chaplen, 1998), odnosno da slobodnog metilglioksala u plazmi ima <math><5\mu\text{M}</math> (Thornalley, 1996), i da ga je >90 % vezano za proteine (Lo et al, 1994). Me utim, primena visokih koncentracija metilglioksala u in vitro ispitivanjima je uobičajena, jer one omogućavaju da se sa sigurnošću u prate promene proteina spektrofotometrijskim metodama i elektroforetski. Da bi se sagledao uticaj različite koncentracije metilglioksala (100 i 10 mM) na reakciju aminokiselinskih bojnih ostataka HSA, rezultati dobijeni sa 2.5 puta većom koncentracijom metilglioksala u odnosu na sadržaj reaktivnih bojnih ostataka, kao i sa 4 puta manjom koncentracijom, uporedo su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Uticaj koncentracije metilglioksala i vremena inkubiranja na udeo (%) izreagovanih tiol-, amino- i guanidino-grupa HSA. Koncentracija HSA iznosi 0.5 mM.

	Koncentracija metilglioksala (mM)							
	100				10			
	Vreme inkubiranja							
Grupa	30 min	2 h	10 h	1 dan	1 dan	2 dana	5 dana	
Tiol (%)	30	55	65	85	26	51	65	
Amino (%)	20	32	49	69	35	35	40	
Guanidino (%)	48	48	54	70	50	50	50	

Pri povećanju koncentracije metilglioksala smanjuje se vreme potrebno za uspostavljanje ravnoteže za reakciju metilglioksala i sve tri reaktivne grupe (2 sata kada je koncentracija metilglioksala bila 100 mM, prema 3-5 dana kada je koncentracija metilglioksala bila 10 mM), odnosno povećava se brzina reakcija. Me utim, veća koncentracija metilglioksala nije uticala na procenat u kojem su izreagovale ove grupe kada je reakcija dostigla ravnotežu. Ova činjenica sa jedne strane, daje dodatni argument da je model primenjen za ispitivanje reakcije HSA sa metilgliksalom in vitro, bez obzira na mnogo veće koncentracije metilgliksala od fizioloških (normalnih) i patoloških, dobar model i polazište za ispitivanje promena na HSA in vivo, u uslovima karbonilnog stresa. Sa druge strane, ona omogućava ekstrapolaciju dobijenih rezultata na fiziološke koncentracije metilglioksala.

4.4. Uticaj mikrookoline tiol-grupe jedinjenja male molekulske mase i u serum albuminu, na reakciju sa metilglioksalom

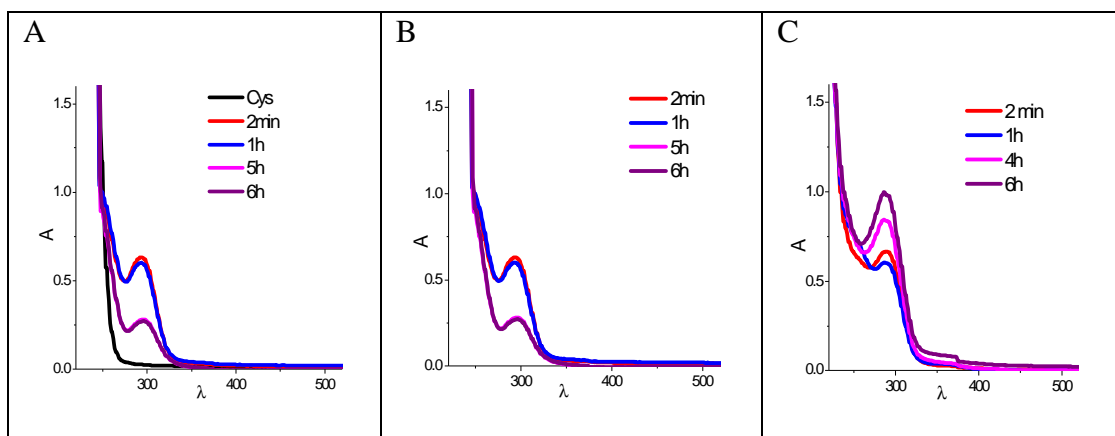
Uprkos maloj zastupljenosti –SH grupe na površini HSA molekula, ona reaguje i pri višku i pri nedovoljnoj količini metilglioksala u visokom procentu (65%) i u estvuje u umrežavanju proteinskih molekula. Ovo može biti posledica uticaja mikrookoline Cys 34 tiol-grupe na reakciju sa metilglioksalom. U cilju razumevanja ovog uticaja, ispitivana je reakcija metilglioksala i aminokiselina (Cys, NAcCys i karboksimetilcistein), peptida (GSH) i proteina (HSA). Tok reakcije praćen je snimanjem ¹H NMR spektara i spektrofotometrijskim određivanjem slobodnih amino- i tiol-grupa u alikvotima reakcionih smeša ovih molekula i metilglioksala (u različitim odnosima 1:1, 1:2 i 1:5). Dobijeni rezultati bi pored razumevanja doprinosa tiol-grupe u stvaranju AGEs, trebalo da omogućе i sagledavanje značaja malih tiola kao potencijalnih “hvatača” metilglioksala.

4.4.1. Karakterizacija reakcije cisteina i metilglioksala

Reakcija Cys i metilglioksala (reaktanti su inkubirani u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 na 37°C) praćena je UV-VIS spektrofotometrijski i spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije slobodnih tiol- i amino-grupa. Koncentracija amino-grupa u alikvotima inkubacione smeše određivana je ninhidrinskom metodom, a koncentracija tiol-grupa Elmanovom metodom.

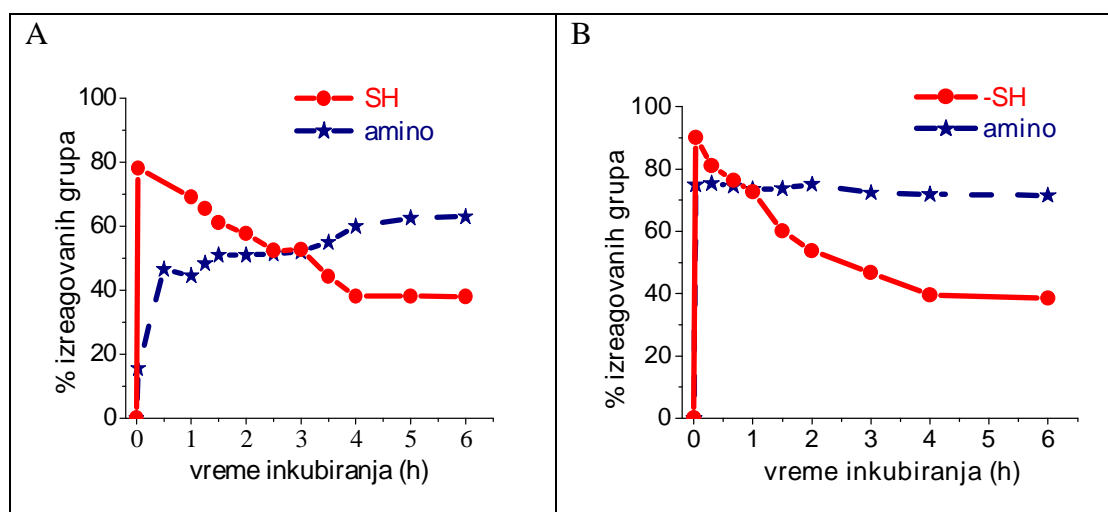
Na apsorpcionim spektrima inkubacione smeše javlja se maksimum na 288 nm koji potiče od nastalog proizvoda reakcije cisteina i metilglioksala (Slika 44.). Kada je odnos reaktanata Cys : MG u smeši 1:1 i 1:2, uočava se nagli porast intenziteta apsorpcionog maksimuma već posle par minuta od početka reakcije, a zatim u naredna 4 sata intenzitet opada i ne menja se posle 5 do 6 sati reakcije (Slika 44.).

Kada je odnos reaktanata Cys:MG u smeši 1:5, uočava se nagli skok apsorbanca na 288 nm, odmah posle mešanja reaktanata, koja se neznatno smanjuje u narednih sat vremena, a zatim se pri daljem inkubiranju povećava.



Slika 44. ApSORPCIONI UV-VIS spektri reakcionih smeša Cys i MG u odnosu 1:1 (A), 1:2 (B) i 1:5 (C) dobijeni za vreme inkubacije u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 6 h.

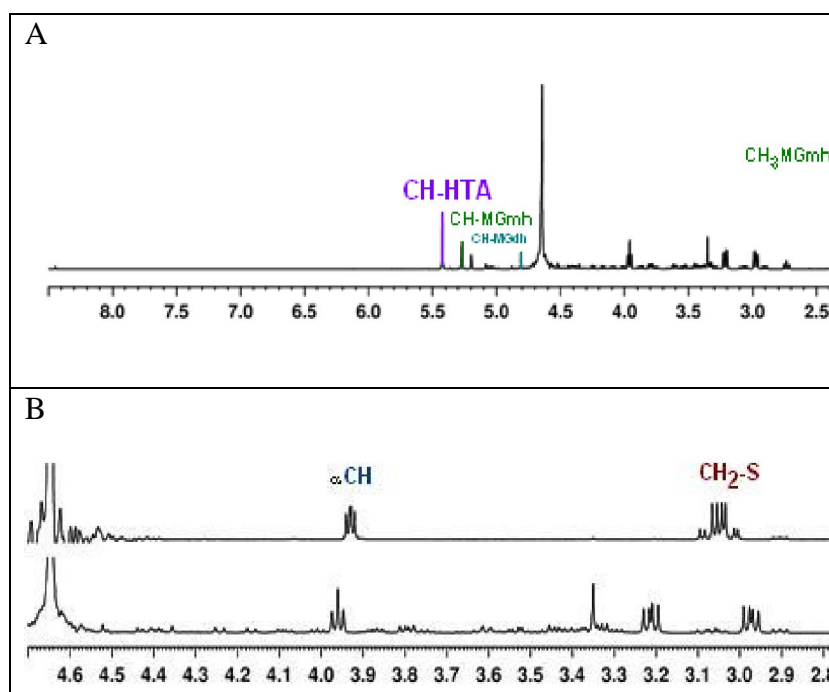
Promene u sadržaju (%) izreagovanih tiol- i amino-grupa Cys, u inkubacionim smešama za odnose reaktanata 1:1 i 1:5 prikazani su na Slici 45. Krive toka reakcije tiol-grupe i metilglioksala imaju bifaznu prirodu za oba odnosa reaktanata. U prvim minutima reakcije izreaguje 78 % odnosno 90 % tiol-grupa redom. U narednim satima krive se gotovo preklapaju, sadržaj izreagovanih tiol-grupa se smanjuje do oko 40 % (posle 4 h reakcije) i ne menja se u nastavku inkubacije.



Slika 45. Promena sadržaja (%) izreagovanih tiol- i amino- grupa u reakcionoj smeši Cys i MG, za odnose reaktanata 1:1 (A) i 1:5 (B), za vreme inkubacije u 0.1M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 37°C u toku 6 h. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost tri odreivanja sa RSD manjom od 3%.

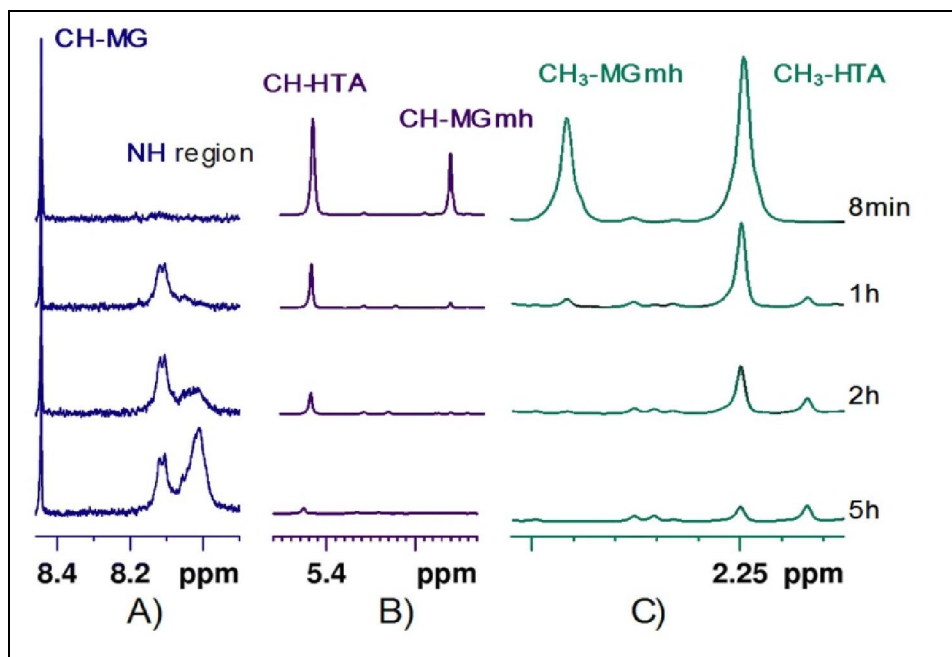
Kada su Cys i metilglioksal u ekvimolarnom odnosu, skoro celokupan metilglioksal je izreagovao na po etku inkubiranja (pri emu je izreagovalo oko 78 % tiol-grupa i oko 16 % amino-grupa). Posle 4 sata inkubiranja, uspostavlja se ravnoteža u kojoj je procenat izreagovanih tiol-grupa iznosio 40 %, a procenat izreagovanih amino-grupa 60 % (Slika 45.A.). Kada je koncentracija metilglioksala bila 2.5 puta ve a u odnosu na ukupnu koncentraciju amino- i tiol-grupa Cys koje reaguju, u prvim minutima reakcije izreagovalo je oko 85% tiol-grupa i oko 75% amino-grupa, a zatim se procenat izreagovanih tiol-grupa u narednih 4 sata smanjio na oko 40%.

Ove promene su zapažene i pri snimanju ^1H NMR spektra reakcione smeše Cys i metilglioksala u fosfatnom puferu (pH 7.4, na 37°C). Reakciona smeša je sadržala reaktante u ekvimolarnom odnosu (po 40mM). Sa spektra snimljenog 8 minuta od trenutka mešanja reaktanata, zapaža se da je skoro celokupan Cys izreagovao. Pojavljuju se signali koji odgovaraju nastalom proizvodu, hemitioacetalu (HTA), na ^1H 5.42 (s, CH) i 2.25 (s, CH_3) (Slika. 46.A.)



Slika 46. A. ^1H NMR spektar reakcione smeše Cys i metilglioksala (u odnosu 1:1) snimljen 8 min nakon mešanja. B. Delovi ^1H NMR spektra istog Cys (gore) i njegove reakcione smeše sa metilglioksalom (1:1, dole), na pH 7.4, na 37°C

Sa vremenom, intezitet oba signala se smanjuje (Slika 47B. i C.). Sa druge strane, posle jednog sata inkubiranja, pojavljuje se široki signal koji odgovara NH aduktu (na δ 8.1, Slika 47A.). Ovaj signal se nije menjao u nastavku inkubacije, ali se pojavio novi signal na δ 8.2, iji intezitet je rastao s vremenom (Slika 47.A).

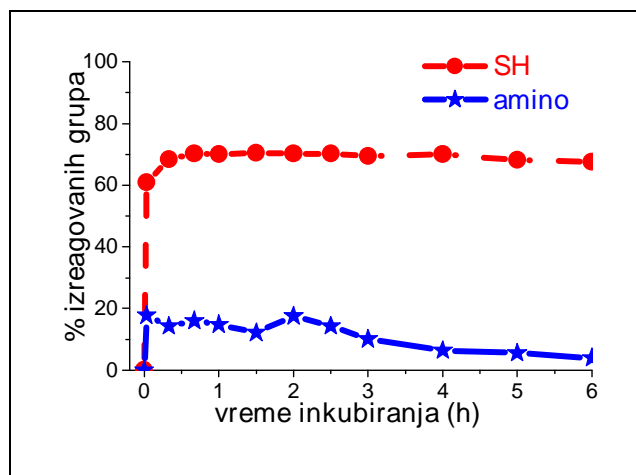


Slika 47. Specifične promene u ^1H NMR spektrima reakcione smeše Cys i MG (1:1) u periodu 5 h: A. CH metilgliksala (δ 8.44) i NH region, B. CH-HTA (δ 5.42) i CH od MGmh (δ 5.27), C. CH_3 od MGmh (δ 2.29) i CH_3 od HTA (δ 2.25), (MG-metilgliksal, MGmh – metilgliksal monohidrat; MGdh – metilgliksal dihidrat).

Pikovi na δ 5.27 (s, CH) i 2.29 (s, CH_3) potiču od neizreagovanog metilgliksalmonohidrata (MGmh); a oni na δ 4.81 (CH) i 1.36 (CH_3) potiču od metilgliksaldihidrata (MGdh) (Nemet et al, 2004; Rae et al, 1994). U toku inkubiranja, intezitet ovih signala se smanjuje i posle 2 sata u reakcionoj smeši nema slobodnog metilgliksala. Drugi pokazatelj da se reakcija između metilgliksala i Cys dešava sa tiol-grupom je promena $\text{CH}_2\text{-S}$ signala (δ 3.05) u spektru reakcione smeše u poređenju sa spektrom istog Cys (Slika 47.B.).

Da bi se ispitalo koliko pH, koji odgovara fiziološkim uslovima (7.4) utiče na jednu bifaznu reakciju tiol-grupe Cys i metilgliksala, proučena je promena sadržaja tiol- i amino-grupe kada se reakcija sa metilgliksalom izvodi u nepuferisanom vodenom rastvoru koji je pH 3.44. U prvim minutima reakcije izreaguje oko 62 % tiol-grupe, ravnoteža se postiže već posle 15 min, sadržaj tiol-grupe se u toku daljih 5 sati

inkubiranja ne menja. Oko 12.5 % amino-grupa izreaguje u istom vremenskom periodu (Slika 48.).



Slika 48. Promena sadržaja (%) izreagovanih tiol- i amino-grupa u reakcionoj smeši Cys i MG (1:1), kada se reakcija odvija u vodenom (nepuferisanom) rastvoru, pH 3.44, na 37°C u toku 6 h.

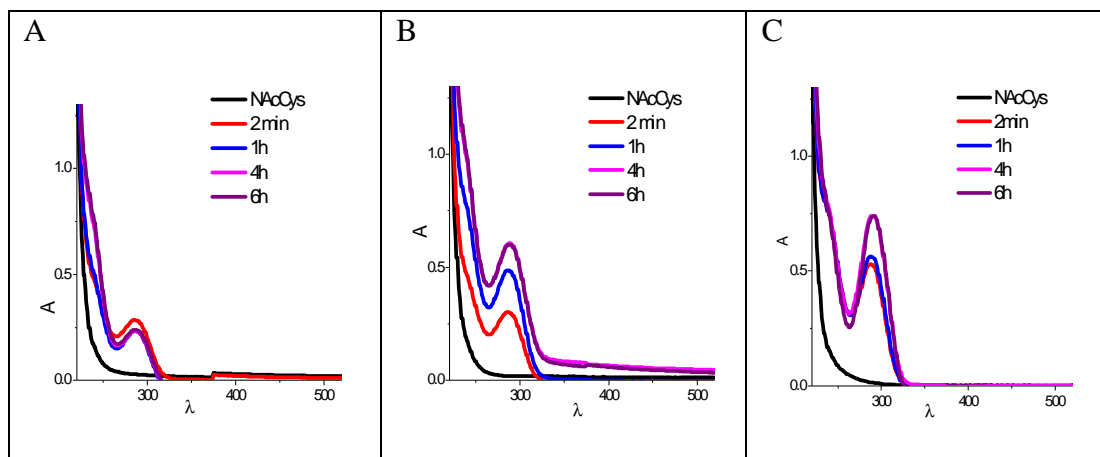
4.4.2. Karakterizacija reakcije tiol-grupe N-acetil-cisteina i metilglioksala

N-acetil-cistein (NACys) je derivat aminokiseline L-Cys. Prekursor je u biosintezi GSH. Zbog prisustva slobodne tiol-grupe on je antioksidant. Koristi se kao dijetetski suplement, kao lek u tretmanu hepatotoksi nosti izazvane lekovima (paracetamolom, Yarema et al, 2009), kao mukolitik (Fluimucil) i kao lek u patološkim stanjima u kojima je prisutan oksidativni stres ili kada je nivo GSH smanjen (Al-Tonbary et al, 2009).

Reakcija NACys i metilglioksala (reaktanti u odnosima 1:1, 1:2 i 1:5, inkubirani su u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4 na 37°C) pra ena je snimanjem UV-VIS apsorpcionih spektara (Slika 49.) i spektrofotometrijskim odre ivanjem koncentracije slobodnih tiol grupa (Slika 50.).

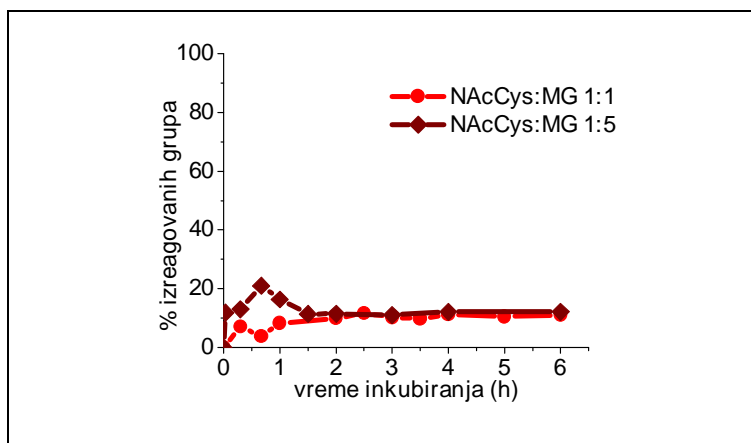
Na osnovu apsorpcionih spektara (Slika 49.) reakcionih smeša, može se zaklju iti da proizvod reakcije NACys i metilglioksala ima maksimum apsorpcije na

280 nm, karakteristični za tiol-grupu. Sa povećanjem koncentracije metilglioksala intenzitet maksimuma raste.



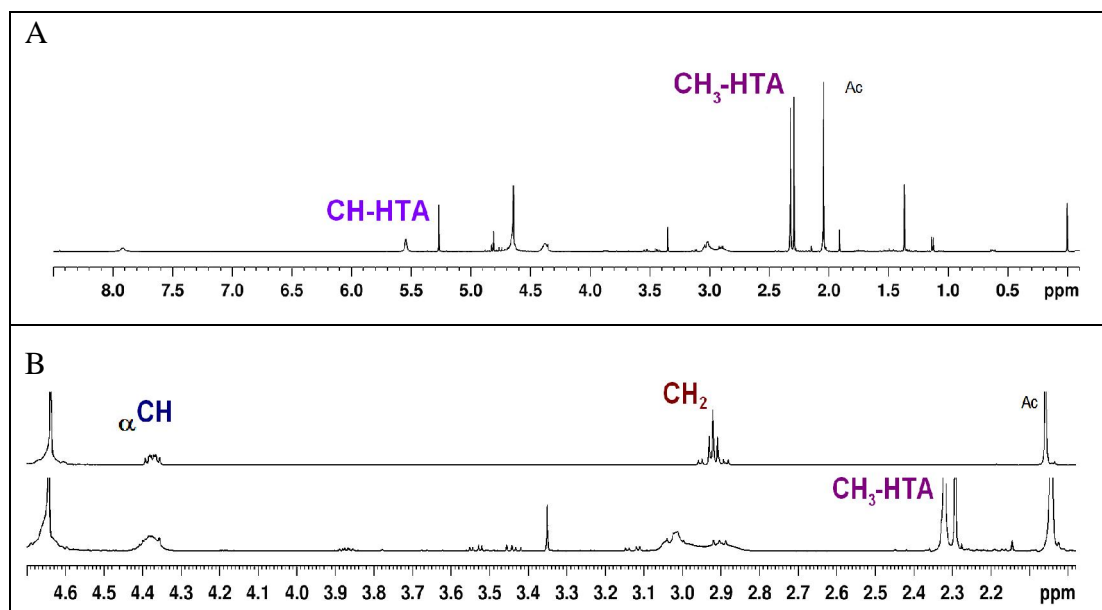
Slika 49. Apsorpcioni UV-VIS spektri NAcCys inkubiranog sa MG u odnosu 1:1(A), 1:2 (B) i 1:5 (C) u fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C.

Procentni udeo izreagovanih tiol-grupa u reakciji NAcCys sa metilglioksalom bio je znatno manji nego u reakciji Cys i metilglioksala, u toku celog perioda inkubiranja. Na početku inkubacije, samo 7% (za odnos reaktanata 1:1) odnosno 12% (za odnos reaktanata 1:5) tiol-grupe izreaguje. U periodu od 2 do 6 h izreaguje $10,8 \pm 0,9\%$ (1:1), odnosno $12,4 \pm 1,9\%$ (1:5) tiol-grupa. Povećanje temperature inkubiranja na 50 °C, ne dovodi do promene sadržaja izreagovanih tiol-grupa NAcCys. Reakcija je takođe praćena snimanjem ^1H NMR spektara (Slika 51.).



Slika 50. Promena sadržaja (%) izreagovanih tiol-grupa u reakcionoj smeši NAcCys i MG, za odnose

reaktanata 1:1 i 1:5



Slika 51. A. ^1H NMR spektar reakcione smeše NAcCys i metilglioksala (u odnosu 1:1) snimljen 9 min nakon mešanja reaktanata. B. Delovi ^1H NMR spektara istog NAcCys (gore) i njegove reakcione smeše sa metilglioksalom (1:1) (dole), na pH 7.4, 37°C.

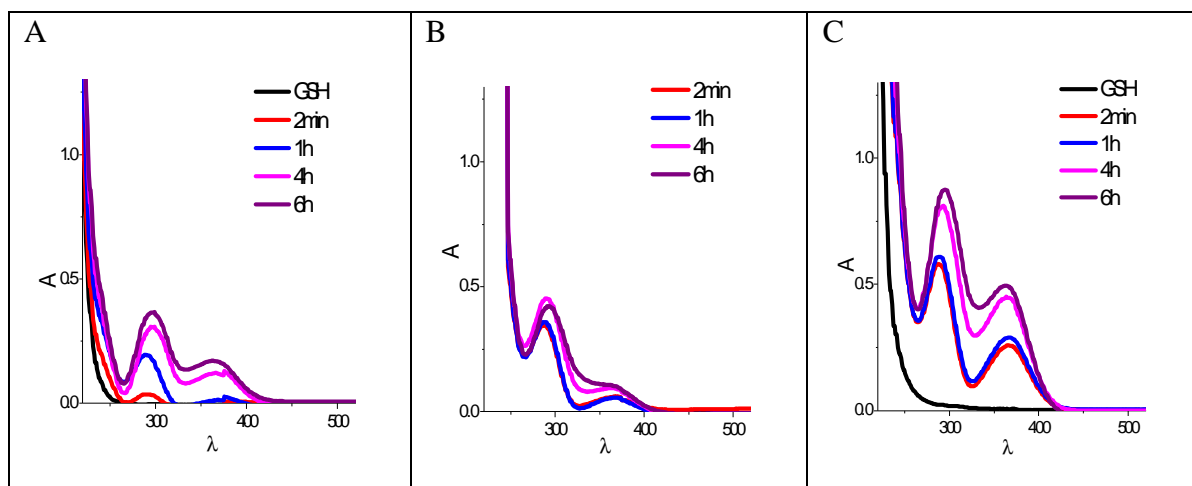
Na ^1H NMR spektru reakcione smeše, snimljenom posle 9 minuta od mešanja reaktanata, pojavljuju se signali koji odgovaraju nastalom proizvodu, hemitioacetalu (HTA), na δ_{H} 5.54 (s, CH) i 2.32 (s, CH_3). Potvrda da se reakcija između metilglioksala i NAcCys zaista dešava sa tiol-grupom je promena $\text{CH}_2\text{-S}$ signala (δ_{H} 2.93) u ^1H NMR spektru reakcione smeše u poređenju sa spektrom istog NAcCys (Slika 51.B.)

4.4.3. Reakcija tiol-grupe glutationa i metilglioksala

Glutation, tripeptid sa slobodnom tiol-grupom, je koenzim enzima glutation-peroksidaze i glutation reduktaze, koji učestvuju u odbrani organizma od reaktivnih kiseoniknih vrsta i enzima glutation-transferaze koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika. U ovom istraživanju glutation je izabran, jer pod fiziološkim uslovima spontano (neenzimski) reaguje sa metilglioksalom pri čemu nastaje glutation-

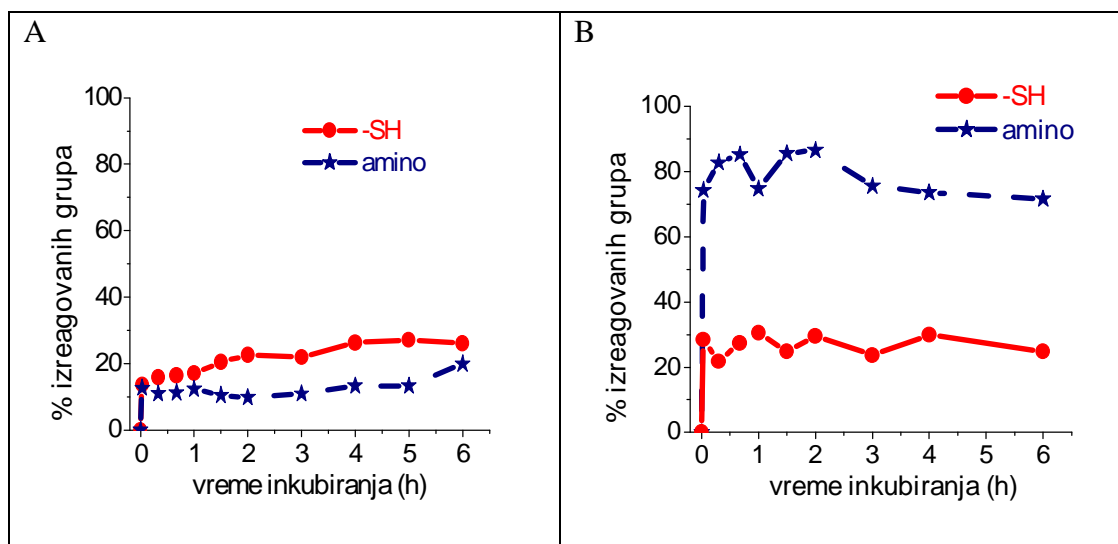
hemitioacetal koji je supstrat za glioksalazu I. Može se smatrati prirodnim hvatačem dikarbonilnih jedinjenja, in vivo.

Ispitivana je reakcija GSH (2 mM) sa metilglioksalom u odnosima 1:1, 1:2 i 1:5 u fosfatnom puferu pH 7.4. Reakciona smeša je inkubirana na 37°C u toku 6 sati. Na apsorpcionim spektrima reakcionih smeša javljaju se dva maksimuma, prvi veći intenziteta na 288 nm, i drugi manjeg intenziteta na 360nm (Slika 52.). Prvi maksimum potiče od proizvoda reakcije tiol- i amino-grupe GSH sa metilglioksalom, dok drugi maksimum potiče od proizvoda nastalog u reakciji amino-grupe GSH i metilglioksala.



Slika 52. Apsorpcioni UV-VIS spektri reakcionih smeša GSH i MG, dobijeni za odnose reaktanata 1:1 (A), 1:2 (B) i 1:5 (C), pri inkubaciji u fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C, u toku 6 h.

Vremenski tok reakcije glutationa i metilglioksala proučavan je određivanjem sadržaja slobodne tiol- i amino-grupe u reakcionoj smeši. Promene sadržaja (%) izreagovanih tiol- i amino-grupa u reakcionim smešama, u toku 6 sati, prikazane su na Slici 53. Dobijene krive toka reakcije se razlikuju od kriva dobijenih za reakciju Cys sa metilglioksalom. Pri odnosu reaktanata 1:1, u prvim minutima reakcije izreaguje oko 14 % tiol-grupa, tokom naredna 2 sata inkubiranja ovaj procenat dalje raste, da bi u naredna 4 sata ostao skoro nepromenjen (24.8 ± 2.4 %). Kada je odnos reaktanata 1:5 (metilglioksal je bio u višku), u prvim minutima reakcije izreaguje 28 % tiol-grupa, i daljim inkubiranjem se taj udeo ne menja (27.2 ± 3.4 %). Procenat izreagovanih amino-grupa GSH (pri ekvimolarnom odnosu reaktanata), je za oko 5 puta manji u odnosu na amino-grupe Cys, pod istim uslovima reakcije. Kada je metilglioksal bio u višku (odnos GSH:MG=1:5) procenat izreagovanih amino-grupa GSH je skoro isti kao i u slučaju Cys, pri istim uslovima.

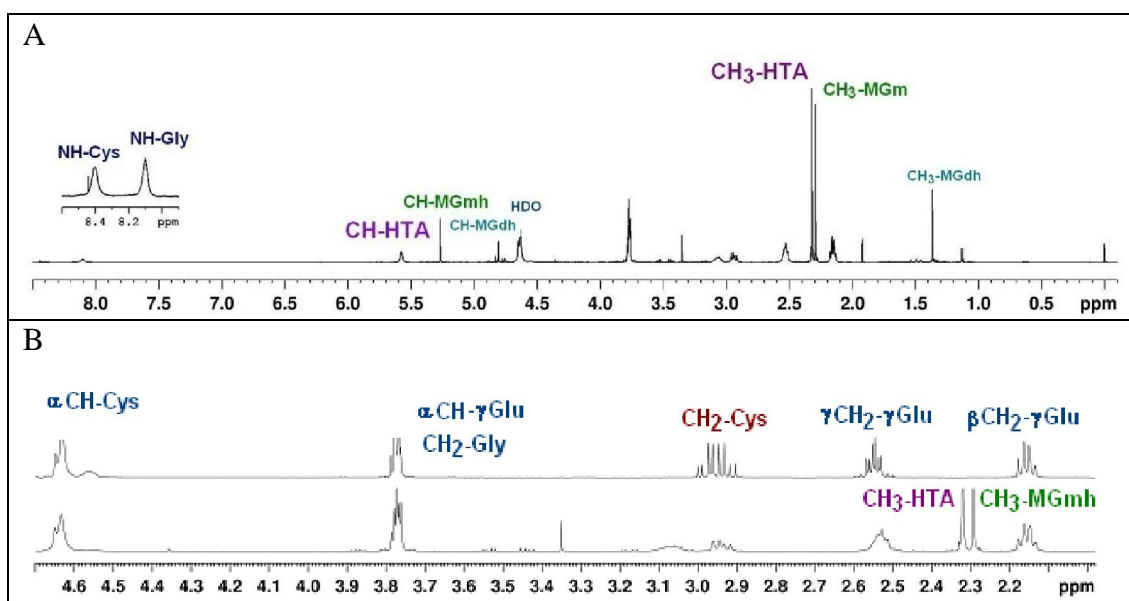


Slika 53. Promena sadržaja (%) izreagovane tiol- i amino- grupe u reakcionoj smeši GSH i MG za odnos reaktanata 1:1 (A) i 1:5 (B), za vreme inkubacije u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 37°C, u toku 6 h.

Na ^1H NMR spektru (Slika 54.) reakcione smeše GSH i metilglioksala (1:1), snimljenom posle 13 minuta od po etka reakcije, uo avaju se karakteristi ni signali hemitioacetala, ^1H 5.58 (s, CH) i ^1H 2.32 (s, CH₃). Spektri se nisu menjali u toku daljeg inkubiranja, što je u skladu sa rezultatima odre ivanja sadržaja izreagovanih amino- i tiol-grupa GSH. Prisustvo signala koji poti u od slobodnog metilglioksala (monohidrata i dihidrata), kada je koli ina metilglioksala bila u manjku u odnosu na ukupan broj grupa koje reaguju (odnos reaktanata 1:1) ukazuje na to da nije sav metilglioksal izreagovao, što je tako e u skladu sa rezultatima dobijenim odre ivanjem sadržaja slobodne amino- i tiol-grupe GSH u toku reakcije. Dodatni pokazatelj da se reakcija GSH i metilglioksla odvija sa tiol-grupom je promena CH₂-S signala u ^1H NMR spektru reakcione smeše u odnosu na spektar istog GSH (Slika 54.B.). CH signal nastalog hemitioacetala glutationa (Slika 54.A.) se deli u dva singleta, što ukazuje na smeše diastereomernih hemitioacetala (Rae et al, 1994).

Rezultati odre ivanja sadržaja tiol-grupa u reakcionim smešama tiol-jedinjenja male molekulske mase sa metilglioksalom, su pokazali da je procenat izreagovanih tiol-

grupa svakog pojedina nog tiola, kada se uspostavi ravnoteža reakcije, gotovo jednak za sve ispitivane odnose (bez statistički značajne razlike, $p < 0.001$, Tabela 15.). Iako su koncentracije metilglioksala korišćene u ovom ispitivanju, bile mnogo više od fizioloških vrednosti, ovi nalazi omogućavaju ekstrapolaciju rezultata na uslove bliske fiziološkim.



Slika 54. A. ^1H NMR spektar reakcione smeše GSH i metilglioksala (u odnosu 1:1), snimljen 13 min nakon mešanja reaktanata. U produžetku je prikazan NH region. B. Delovi ^1H NMR spektara istog GSH (gore) i njegove reakcione smeše sa metilglioksalom (1:1) (dole), na pH 7.4, 37°C.

Tabela 15. Srednje vrednosti procentnog sadržaja izreagovanih –SH grupa malih tiola posle 4-6 sati (kada je postignuto stanje ravnoteže reakcija) inkubiranja sa metilglioksalom u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) na 37 °C. Koncentracija tiol-jedinjenja u reakcionim smešama iznosila je 2 mM.

Odnos mali tiol/ metilglioksal	Sadržaj izreagovanih -SH grupa (%)		
	Cys	NACys	GSH
1 : 1	38.1 ± 0.9	10.8 ± 0.9	26.5 ± 0.6
1 : 2	38.2 ± 0.7	11.2 ± 0.7	26.6 ± 2.6
1 : 5	39.0 ± 0.8	12.2 ± 0.9	27.4 ± 2.5

Kada se uporede reaktivnosti tiol-grupe ispitivanih jedinjenja prema metilglioksalu, može se zaključiti da reaktivnost opada u nizu Cys>GSH>NACys, za sve ispitivane odnose koncentracija reaktanata, i vremenske intervale. Tako je, na primer, da karboksimetil-cistein ne reaguje sa metilglioksalom.

Sve ovo pokazuje da mikrookolina tiol-grupe utiče na njenu reaktivnost i na prinos proizvoda reakcije.

4.4.4. Hemijske reakcije koje se dešavaju u reakcionoj smeši Cys i metilglioksala

U ¹HNMR spektrima reakcionih smeša svih ispitivanih malih tiola sa metilglioksalom pojavljuju se dva jasno definisana signala – jedan koji potiče od CH nastalog hemitioacetala (δ_{H} oko 5.5), a drugi od acetil CH₃ iz hemitioacetala (δ_{H} 2.3). U spektrima nije bilo signala koji potiču od karboksietil-cisteina.

Prisustvo -amino grupe u neposrednoj blizini tiol-grupe, čini tiol-grupu Cys najreaktivnijom. Tiol-grupa reaguje već na početku reakcije u visokom procentu (90 % i 78%) i kada je metilglioksal prisutan u višku, odnosno manjku, uz stvaranja hemitioacetala (HTA) kao proizvoda (Slika 45.). Kriva toka reakcije tiol-grupe Cys je bifazna - procenat izreagovanih tiol-grupa se, posle naglog porasta u početku reakcije, u narednim satima smanjuje, do 40% (u ravnoteži, Slika 45.).

Uzrok smanjenju udela izreagovalnih tiol-grupa Cys u toku reakcije sa metilglioksalom (kada je on bio u manjku), mogao bi biti porast sadržaja izreagovanih amino-grupa. Naime, amino-grupa u reakciji sa metilglioksalom može da nagradi Cys-NH₂-MG adukt (Slika 56.B.), ili može da reaguje sa nastalim hemitioacetalom (stvaraju i umreženi Cys-SH-MG-NH₂-Cys adukt, Zeng i Davies, 2006). U ¹HNMR spektru (posle 1 sata reakcije) javlja se dublet koji odgovara -NHR grupi, koja može nastati u slučaju bilo kog od ova dva puta reakcije amino-grupe Cys. Kada bi se reakcija amino-grupe nepromenjenog molekula Cys odigravala sa hemitioacetalom, procenat izreagovanih tiol-grupa bi ostao nepromenjen u daljem toku reakcije, što prema našim rezultatima nije slučaj. Ako se međusobno uporede reakcione krive tiol- i amino-grupe Cys, moglo bi se zaključiti da trošenje preostalog slobodnog metilglioksala za reakciju sa amino-grupom, koja jeste sporija, ali daje stabilniji proizvod, dovodi do toga da se usled nedostatka metilglioksala razgrađuju nastali hemitioacetal, u povratnoj

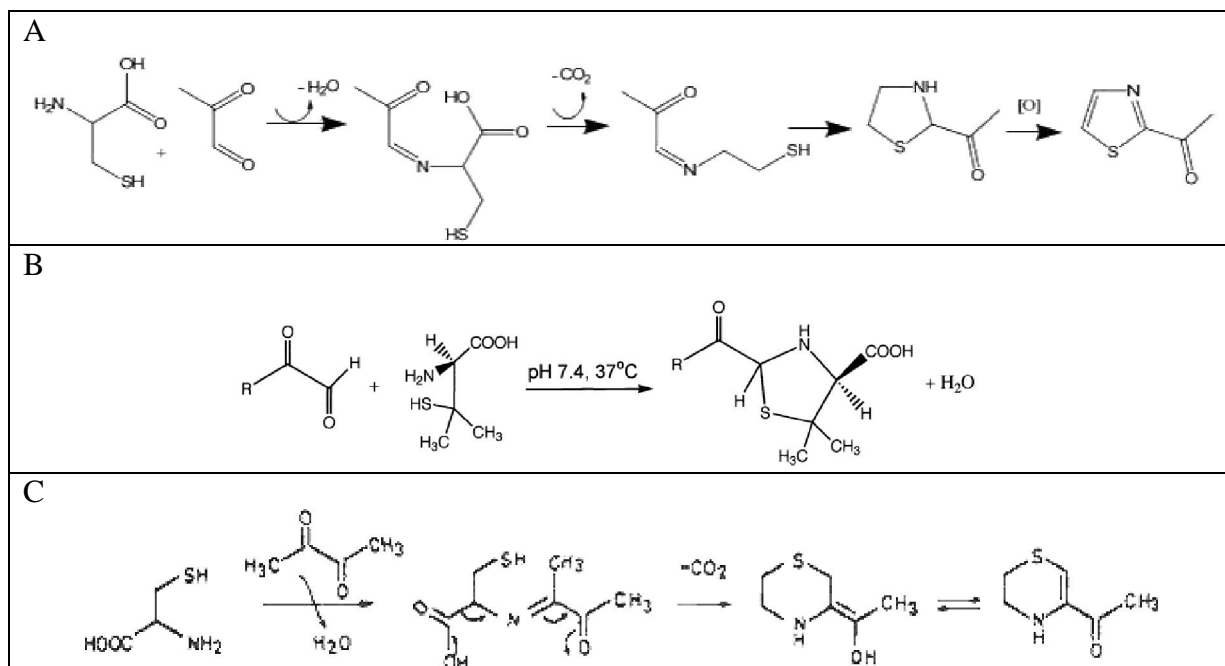
reakciji. Moglo bi se pretpostaviti da se ovo dešava do uspostavljanja ravnoteže, kada je odnos izreagovanih tiol-grupa prema izreagovanim amino-grupama 2:3. Me utim, ovo nije slučaj, pošto u prisustvu viška metilglioksala (2.5 puta više u odnosu na ukupan broj slobodnih tiol- i amino- grupa Cys) reakcija tiol-grupe prati isti tok reakcione krive kao i kad je metilglioksal u manjku.

Reakcione krive pokazuju tako e, da je ukupan zbir procenata izreagovanih amino- i tiol-grupa Cys u toku 2.5 sati reakcije ve i od dostupne koli ine metilglioksala, koji je bio dodat u reakcionu smešu (zbir je za 20 % ve i posle 30 min reakcije, a za 5 % posle 2.5 h). S druge strane, ¹HNMR spektar snimljen posle 1.5-2 sata od po etka reakcije ne pokazuje signal koji je karakteristi an za metilglioksal (na δ_{H} 5.27 – s, CH i na δ_{H} 2.29 – s, CH₃) što ukazuje na to da, posle 2 sata reakcije više nema slobodnog metilglioksala u reakcionoj smeši.

Ima primera u literaturi koji ukazuju na mogućnost stvaranja cikličnih intermedijera u reakciji tiola i dialdehida. Predloženo je da u reakciji kondenzacije Cys i D-penicilamina (3,3-dimetil-D-cisteina) sa metilglioksalom nastaju Šifove baze od kojih dalje, posle premeštanja i oksidacije mogu nastati heterociklični molekuli: 2- acetiltiazol (Slika 55A., Griffith i Hammond, 1989; Marchand et al, 2002), 2- acetiltiazolidin (Slika 55.B., Wondrak et al, 2002) i dihidrotiazinski derivati (Slika 55.C, Hofmann i Schieberle, 1995).

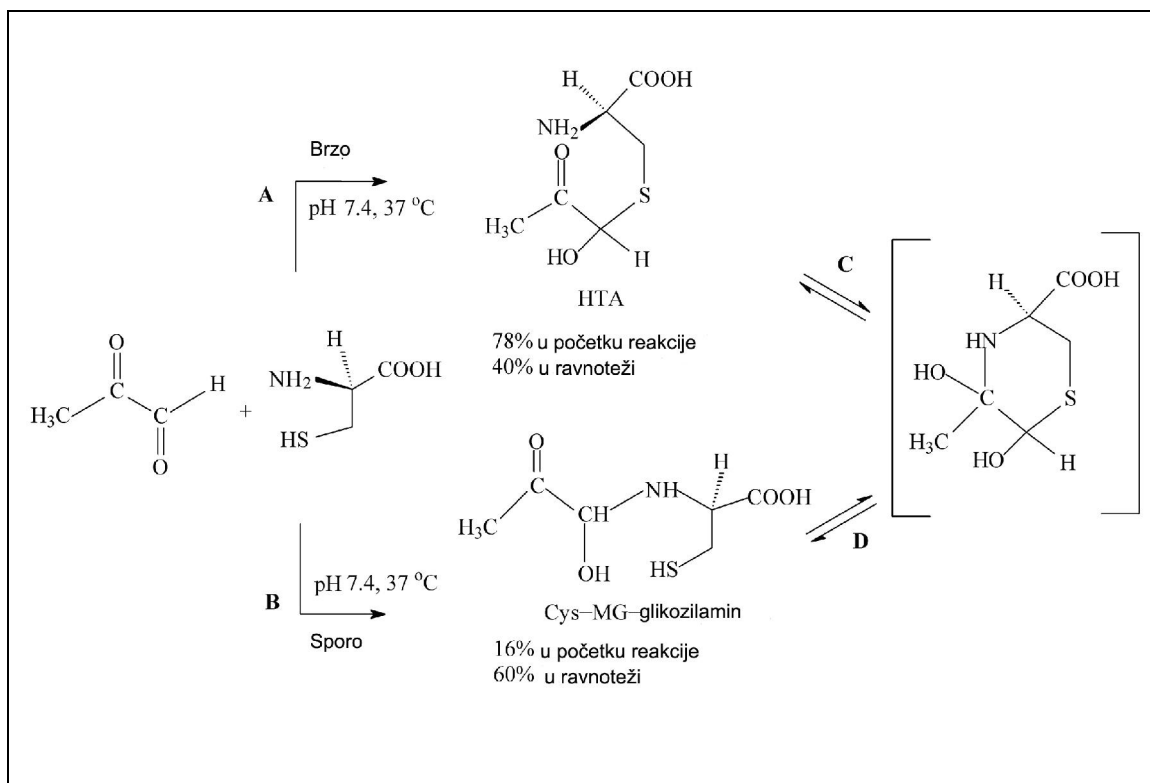
Na osnovu dobijenih rezultata i imaju i u vidu navedene literaturne podatke, predložen je mehanizam reakcije Cys i metilglioksala (Slika 56.). Slobodna -amino grupa molekula cisteina, ija je tiol-grupa u reakciji sa metilglioksalom ve nagradila hemitioacetal (78%) (Slika 56.A.), može da reaguje sa slobodnom acetil-karbonilnom grupom nastalog hemitioacetala (Slika 56.C.) pri emu nastaje tiazolidinski intermedijer.

Upravo promene u sadržaju tiol- i amino-grupa u toku reakcije Cys sa metilglioksalom, ukazuju da nastaje Cys-SH-MG-NH₂ intermedijer (prelazno stanje u kojem dolazi do formiranja tiazolidinskog prstena), koji dalje prelazi u stabilniji Cys-NH₂-MG adukt (Slika 56.D.). Posledica ovih reakcija je utvr eno smanjenje sadržaja hemitioacetala (Cys-SH-MG adukta). Kada se postigne ravnoteža (posle 4 sata inkubiranja) reakciona smeša sadrži oko 60 % Cys-NH₂-MG (Cys-MG-glikozilamina) i oko 40 % Cys-SH-MG adukta (hemitioacetala).



Slika 55. Primeri tiazolskih heterocikli njih molekula koji mogu nastati u reakciji Cys (ili penicilamina) sa metilglioksalom: A. (Griffith i Hammond, 1989), predložili mehanizam nastanka 2-acetiltiazola u reakciji Cys sa metilglioksalom; B. (Wondrak et al, 2002)- reakcija D-penicilamina sa metilglioksalom (R=CH₃) u fiziološkim uslovima, brzo nastajanje 2-acetiltiazolidina (dijastereomernog derivata); C. (Hofmann i Schieberle, 1995), reakcija Cys sa 2,3-butandionom i stvaranje tiazinskog derivata (5-acetil-2,3-dihidro-1,4-tiazina).

Postojanje upravo Cys-SH-MG-NH₂ intermedijera može objasniti i tok reakcija amino- i tiol-grupa, dobijenih kada je u reakciji sa Cys metilglioksal bio u višku. Na po etku inkubiranja, procenat izreagovane amino-grupe bio je zna ajno ve i u odnosu na situaciju kada je metilglioksal bio u manjku (75 % prema 16 %). Ve a stabilnost Cys-NH₂-MG adukta u odnosu na hemitioacetal, dovela je samo do blage promene sadržaja izreagovanih amino-grupa na kraju perioda inkubiranja (oko 68 %), a sadržaj hemitioacetala se smanjio na 40%. Na kraju perioda inkubiranja, odnos proizvoda u smeši sa viškom metilglioksala bio je 3.4:2, gotovo jednak odnosu proizvoda u smeši kada je metilglioksal bio u manjku (3:2).



Slika 56. Hemijske reakcije koje se dešavaju u reakcionoj smeši Cys-metilglioksal 1:1 (A imovi et al, 2010).

Na osnovu izloženog može se zaključiti da prisustvo α -amino grupe i tiol-grupe na susednim C atomima, čini tiol-grupu Cys veoma reaktivnom. Prema predloženom mehanizmu reakcije Cys i metilglioksala, slobodna α -amino grupa molekula Cys (koja je tiol-grupa u reakciji sa metilglioksalom već nagradila hemityoacetala), reaguje sa slobodnom acetil-karbonilnom grupom nastalog hemityoacetala, stvara se tiazolidinski intermedijer, koji dalje prelazi u stabilniji proizvod Cys-MG-glikozilamin. U ravnoteži je prisutno oko 40 % hemityoacetala i oko 60 % Cys-MG-glikozilamina. Molekuli koji imaju α -amino- β -merkpto-etansku grupu kao farmakoforu, dakle konfiguraciju koja omogućava formiranje intermedijera sa peto lanim ili šesto lanim prstenom u reakciji sa metilglioksalom, mogu biti dobri hvatači metilglioksala.

4.4.5. Uticaj mikrookoline na reaktivnost tiol-grupe HSA i tiol-grupe jedinjenja malih molekulskih masa

U poglavlju 4.4 zaključeno je da je kriva toka reakcije tiol-grupe Cys sa metilglioksalom bifazna zbog prisustva β -amino grupe. Prisustvo β -amino grupe određuje i koliko se hemitioacetala nagraditi u ravnoteži. Ovo je potvrđeno eksperimentom u kojem je praćena reakcija tiol- i amino-grupe Cys sa metilglioksalom (1:1) u vodenom rastvoru. Amino grupa Cys je više protonovana, jer je pH reakcione smeše 3.44. Sadržaj izreagovanih tiol-grupa na početku inkubiranja je bio manji (62 %) u poređenju sa sadržajem na pH 7.4. Daljim inkubiranjem se nije menjao, jer građeni intermedijera sa amino-grupom nije bilo moguće.

Kada je NAcCys inkubiran sa metilglioksalom na pH 7.4, procenat izreagovanih tiol-grupa bio je 3-4 puta manji u odnosu na reakciju Cys. Povećanje temperature reakcione smeše na 50 °C nije uticalo da procenat izreagovane tiol-grupe bude veći. Dakle, odsustvo slobodne β -amino grupe (a ne sterne setnje zbog njenog acetilovanja) je glavni uzrok smanjenja reaktivnosti tiol-grupe NAcCys u odnosu na Cys. S druge strane, u slučaju karboksimetil-cisteina, zaštićena tiol-grupa sprečava reakciju amino-grupe sa metilglioksalom. Sadržaj slobodne amino-grupe u karboksimetil-cisteinu se ne menja sa vremenom, a na ^1H NMR spektru nema signala koji potiču od proizvoda reakcije amino-grupe. Ovim je potvrđen zaključak o uticaju slobodne amino-grupe (odnosno mikrookoline $-\text{SH}$ grupe) na brzinu reakcije $-\text{SH}$ grupe i metilglioksala, na stvaranje prelaznog stanja i nastanak hemitioacetala.

Tiol-grupa glutationa je u reakciji sa metilglioksalom bila manje reaktivna od cisteinske, ali reaktivnija od tiol-grupe NAcCys. To je očekivano, jer ako se pogleda mikrookolina tiol-grupe glutationa, β -amino-grupa nije slobodna, već je zaštićena peptidnom vezom. Ravnoteža u reakciji je postignuta odmah na početku inkubiranja, i udeo izreagovanih tiol-grupa, kao i amino-grupa, ostao je pri daljem inkubiranju nepromenjen. Ovaj rezultat je potvrđen i snimanjem ^1H NMR spektara. Ako se uporedi reakcija terminalne amino-grupe GSH sa reakcijom amino-grupe Cys, vidi se da je prva u 5 puta manjem procentu izreagovala sa metilglioksalom pri istim uslovima.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Wondraka (Wondrak et al, 2002), koji je pokazao da NAcCys, Cys i GSH dovode do smanjivanja fluorescencije AGEs, i rezultata Sharma (Sharma i Santhoshkumar, 2009) koji je ispitivao efikasnost tiolnih

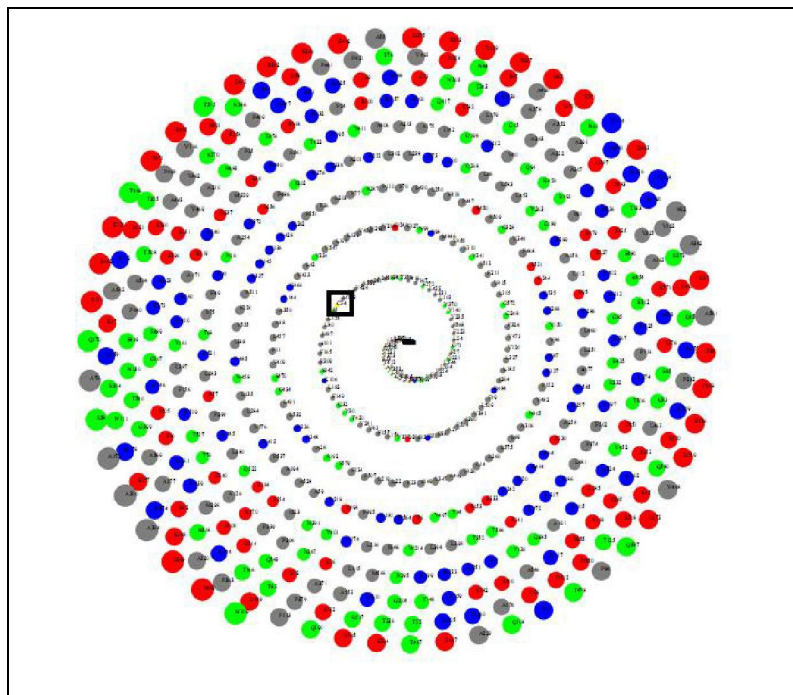
jedinjenja male molekulske mase kao inhibitora glikacije proteina do koje dolazi u reakciji sa metilglioksalom. Najpotentniji inhibitor je bio Cys, a zatim GSH, pa NAcCys. Njihova efikasnost kao inhibitora, bila je veća od efikasnosti metformina, za koji je već bilo utvrđeno da je potentan inhibitor glikacije (Beisswenger et al, 1999; Rahbar i Figarola, 2003). Tioli male molekulske mase su bili bolji inhibitori glikacije proteina i od poznatih inhibitora nastanka AGEs –karnozina i piridoksamina (Rahbar i Figarola, 2003; Ruggiero-Lopez et al, 1999).

Zbog velike reaktivnosti tiol-grupe Cys, može se zaključiti da molekuli koji imaju β -amino- γ -merkapto-etan kao farmakoforu, dakle konfiguraciju koja omogućava formiranje intermedijera sa peto lanim ili šesto lanim prstenom u reakciji sa metilglioksalom, mogu biti dobri hvatači i metilglioksala. Dipeptid Cys-Gly, koji ima slobodnu tiol-grupu, slobodnu β -amino-grupu i NH-amidnu grupu (Sharma i Santhoshkumar, 2009) i D-penicilamin, koji ima slobodne $-SH$ i β -amino-grupu, su pokazali visoki inhibitory potencijal u reakcijama glikacije proteina (Sharma i Santhoshkumar, 2009; Wondrak et al, 2002).

Upotreba tiola male molekulske mase kao hvatača metilglioksala sprečava ili preteranu potrošnju GSH, koji kao kofaktor enzima učestvuje u odbrani organizma od oksidativnog stresa (kao kofaktor glutation-peroksidaze) i od ksenobiotika aktiviranih u procesu biotransformacije (kao kofaktor glutation transferaze). Smanjenje nivoa GSH je primeno u eritrocitima dijabetičara (Pasaoglu et al, 2004).

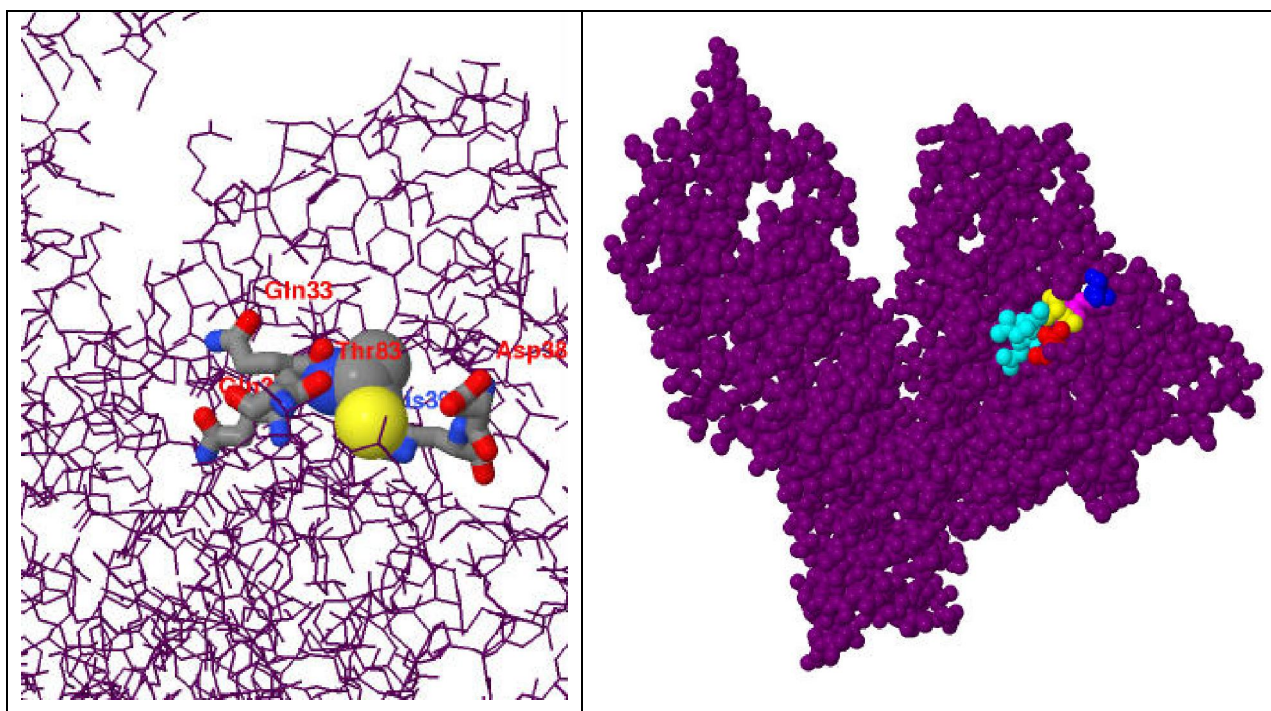
Na osnovu prezentovanih rezultata može se proceniti u kojoj meri, u reakciji sa metilglioksalom, može doći do modifikacije proteina koji na svojoj površini imaju slobodnu tiol-grupu. Inkubiranje HSA sa metilglioksalom, bilo sa nedovoljnom količinom ili u višku, dovelo je do toga da oko 60% tiol-grupe bude modifikovano. Ovaj procenat je viši od procenta modifikacije tiol-grupe Cys pri istim reakcionim uslovima.

Dostupnost ostatka Cys 34 rastvara u (solvent accessible surface area - ASA) izražavana korišćenjem programa Marka Gersteina Calc-surface (Gerstein, 1992) iznosi 12,6 % odnosno 11.26 % (prema internet alatu ASAView, za strukturu pdb 1ao6, Petersen et al, 2009). Da je dostupnost $-SH$ grupe Cys 34 jako mala vidi se i iz izračunavanja relativne dostupnosti rastvara u (RASA), određene u odnosu na ostale boje ostatke HSA (RASA za strukturu pdb 1e7h, Slika 57.), a koja iznosi samo 4.2 %. Izračunata dostupnost 12.6 % je pet puta manja od procenta u kom je tiol-grupa HSA reagovala.



Slika 57. Shematski prikaz relativne dostupnosti bo njih ostataka u molekulu HSA -za strukturu pdb 1e7h, (Ahmad et al, 2004) (plavo-pozitivno naelektrisani ostaci; crveno-negativno naelektrisani ostaci, zeleno-polarni nenaelektrisani ostaci, žuto-Cys i sivo-nepolarni ostaci.

Mikrookolina Cys, dakle, dovodi do povećanja reaktivnosti i sadržaja nagra enog hemitioacetala. Polarni aminokiselinski ostaci na udaljenosti do 7 Å od –SH grupe su Gln 32, Gln33, Pro 35, Asp 38, Thr 83 i His 39, a nepolarni Leu 31, Leu 42, Leu 74, Val 77, Ala 78, i Tyr 84. Pomoću interneta alata STING (Sequence To and withIN Graphics) izračunate su vrednosti za hidrofobnost polarnih aminokiselinskih ostataka oko Cys 34. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 16. Ako se uporede izračunate vrednosti za hidrofobnost polarnih aminokiselina koje su 7Å udaljene od Cys 34 (Slika 58), sa njihovim vrednostima kada su one izolovane, vidi se da je unutar HSA došlo do porasta njihove hidrofobnosti. Povećana hidrofobnost mikrookoline može dovesti do povećanja nukleofilnosti i reaktivnosti ostataka Cys 34, odnosno povećanja sposobnosti da reaguje i “uhvati” molekul metilglioksala.



Slika 58. Polarni ostaci na rastojanju $< 7 \text{ \AA}$, u hidrofobnom džepu, od Cys 34: A. cpk sistem bojenja plavo N , crveno O , žuto S i sivo C atomi, B. ostaci Gln 32 i Gln 33 tirkiz, Asp 38 plavo, His 39 roze, Thr 83 crveno, slike za pdb 1e7h su generisane u programu Jmol.

Tabela 16. Hidrofobnost mikrookoline $-\text{SH}$ grupe HSA; hidrofobnost polarnih aminokiselinskih ostataka u okviru 7 \AA udaljenosti od Cys 34

	hidrofobnost bo njih aminokiselinskih ostataka	
	izolovanih	u proteinu*
Gln32	-5.54	-0.23
Gln33	-5.54	-1.16
Asp38	-8.72	-1.42
His39	-4.66	-0.01
Thr83	-2.57	-0.91

*Referenca Radzicka et al, 1988

Pored direktnog efekta na reaktivnost tiola Cys 34, povećana hidrofobnost mikrookoline može doprineti manjoj hidratisanosti metilglioksala i time njegovoj većoj reaktivnosti. Naime, u vodenom rastvoru metilglioksal se nalazi u obliku monohidrata (56-62%), dihidrata (38-44%) i u obliku dikarbonila (9%). Hidrofobna okolina Cys 34 može dovesti do pomeranja ove ravnoteže, metilglioksal se može naći i u stanju monokarbonila ili dikarbonila u većem procentu unutar hidrofobnog džepa oko Cys 34, nego u okolnom rastvoru.

4.5. Ispitivanje efikasnosti malih tiola kao „hvatača“ metilglioksala u sprečavanju glikacije HSA sa metilglioksalom

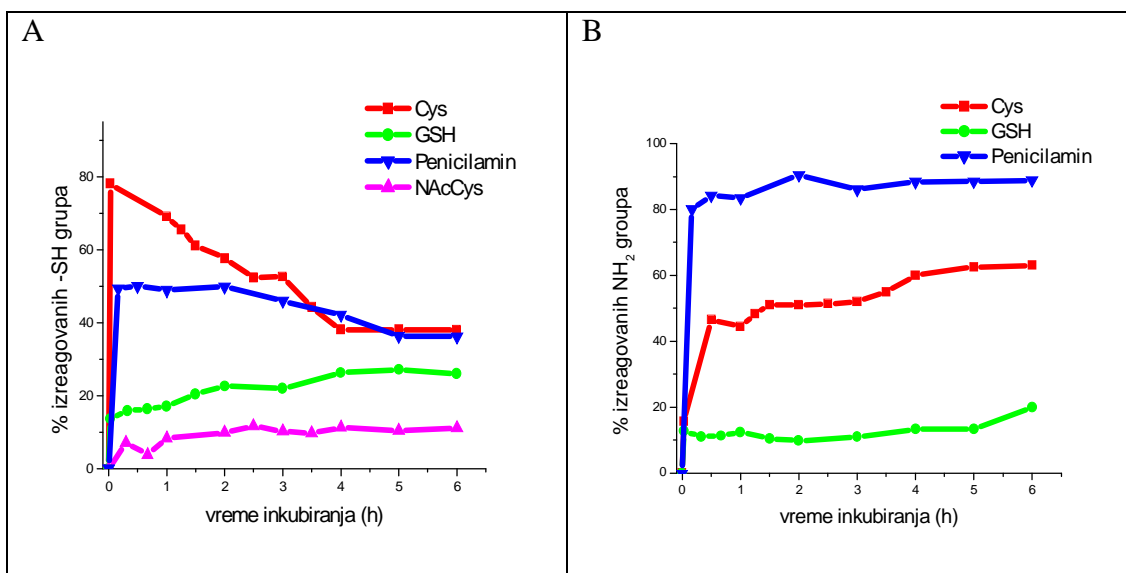
U cilju sprečavanja neenzimskog glikozilovanja biomolekula neophodno je pronaći (dizajnirati i sintetisati) pogodne molekule - hvatače metilglioksala (i drugih dialdehida). Ispitivanje mehanizma reakcije tiol-grupe i metilglioksala pokazalo je da bi tioli malih molekulskih masa, posebno oni koji sadrže α -amino- β -merkapto-etansku grupu kao farmakoforu, mogli biti uspešni hvatači i metilglioksala.

Stoga je ispitivana efikasnost tiola male molekulske mase (Cys, penicilamina, GSH i NAcCys) kao inhibitora reakcije HSA sa metilglioksalom. Pored tiola, u eksperimentima inhibicije upotrebljen je i metformin, lek koji se koristi u terapiji metaboličkog sindroma i dijabetesa (Faure et al, 2008), koji kao biguanidinski reagens može biti dobar hvatač dikarbonilnih jedinjenja (Ruggiero-Lopez et al, 1999). HSA (0.5mM) je inkubiran (na 37°C, u toku 8 sati) sa ekvimolarnom koncentracijom metilglioksala (42 mM) u odnosu na ukupan broj grupa HSA koje mogu da reaguju, sa i bez prisustva hvatača metilglioksala (u dvostruko manjoj koncentraciji u odnosu na metilglioksal). Modifikacije HSA molekula praćene su tokom vremena, u alikvotima reakcionih smeša, spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja neizreagovanih amino- i guanidino-grupa, spektrofluorimetrijski i nativnom i SDS PAGE.

4.5.1. Ispitivanje kinetike reakcija penicilamina i metformina sa metilglioksalom

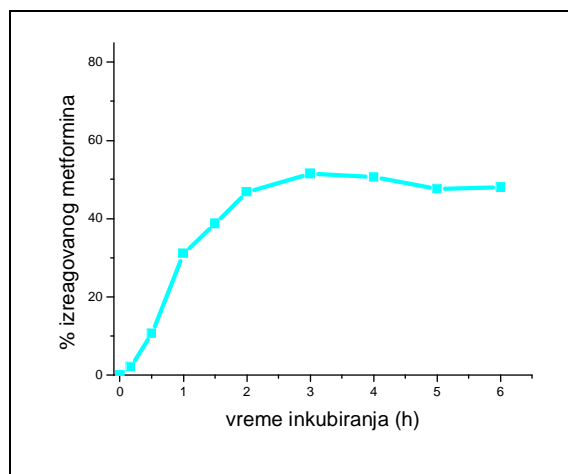
Prvo je ispitivana kinetika reakcije metilglioksala (10 mM) i penicilamina (2mM), kao tiola male molekulske mase u ijem molekulu se nalazi -amino- -merkapto-etanska grupa (3,3-dimetil-D-cistein, $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-SH}$). Dobijene krive vremenskog toka reakcije tiol- i amino-grupe penicilmina upore ene su sa istim reakcijama za ve ispitivane Cys, NAcCys i GSH (Poglavlje 4.4.1., Slika 59.)

Kriva dobijena za reakciju tiol-grupe penicilamina (kada je odnos reaktanata bio 1:1) ima oblik sli an krivoj reakcije tiol-grupe Cys. U prvim minutima reakcije tiol-grupa Cys je izreagovala u ve em procentu (78 %), u odnosu na penicilamin (50 %). Daljim inkubiranjem procenat izreagovane tiol-grupe penicilamina se smanjuje, tako da posle 5-6 sati inkubiranja, kada je uspostavljena ravnoteža, iznosi 40 %, jednako sadržaju izreagovanih i tiol-grupa Cys. Odmah po mešanju reaktanata amino-grupa penicilamina je izreagovala preko 80 %, dakle znatno više u odnosu na amino-grupu Cys (16%). Daljim inkubiranjem se udeo izreagovane amino-grupe nije zna ajno menjao i na kraju inkubiranja iznosio je oko 89 %. Može se zaklju iti da je penicilamin sli no, kao i Cys, dobar hvata metilglioksala.



Slika 59. Promena sadržaja (%) izreagovanih -SH (A) i amino- (B) grupa dobijenih pri inkubaciji tiola male molekulske mase i metilglioksala (1:1) u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 6 h.

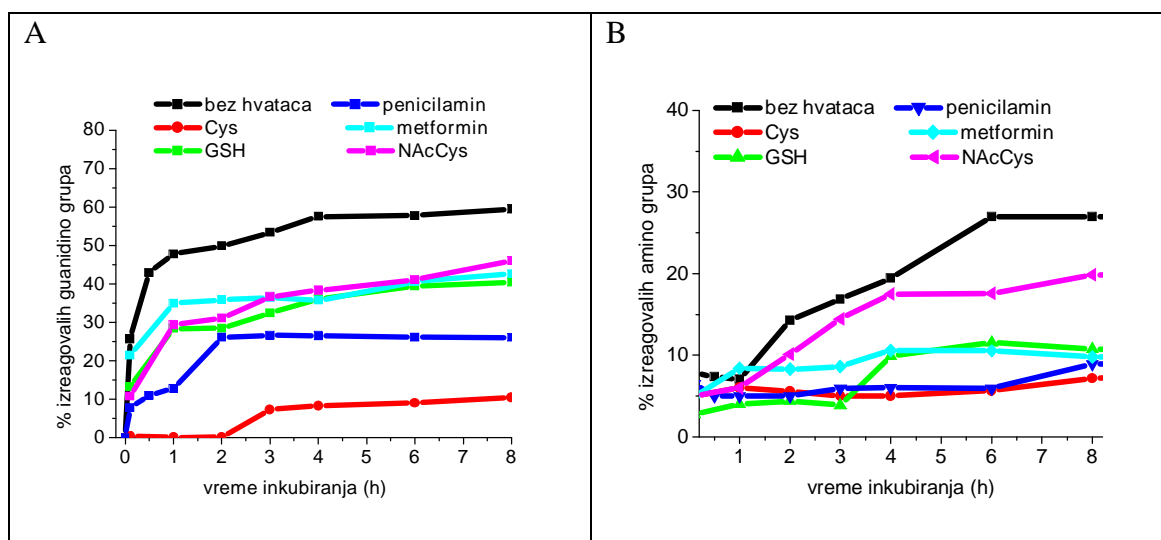
Vremenski tok reakcije metformina (2 mM) i metilglioksala (2mM) pra en je odre ivanjem koncentracije guanidino grupa u reakcionoj smeši sa vremenom (Slika 60.). Za ovo odre ivanje primenjena je kalibraciona prava sa metforminom kao standardom ($Y=0.06889+0.05965X$). Ravnoteža reakcije se uspostavi posle 2 h inkubiranja, kada je izreagovalo oko 50 % metformina.



Slika 60. Promena sadržaja (%) izreagovanih guanidino grupa metformina u reakciji sa metilglioksalom (1:1), pri inkubiranju u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 6 h.

4.5.2. Ispitivanje efikasnosti tiola malih molekulskih masa i metformina u spre avanju modifikacije HSA sa metilglioksalom

Efikasnost malih tiola (Cys, NAcCys, GSH i penicilamina) i metformina u spre avanju modifikacije HSA utvr ena je odre ivanjem sadržaja slobodnih amino- i guanidino grupa na površini HSA molekula pri inkubaciji sa metilglioksalom u prisustvu i bez prisustva inhibitora (Slika 61.)



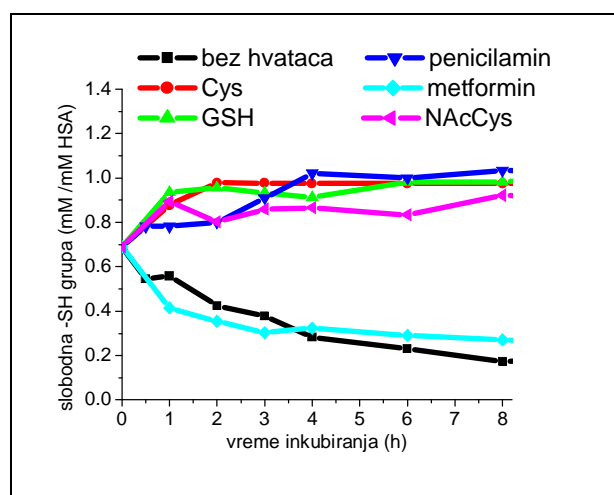
Slika 61. Promena sadržaja (%) izreagovanih guanidino- (A) i amino- (B) grupa na površini molekula HSA (0,5 mM) pri inkubaciji sa metilglioksalom (42 mM) u prisustvu (21 mM) i bez prisustva hvata a, u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 8 h.

Bez prisustva hvata a reakcija guanidine-grupa sa metilglioksalom je bila vrlo brza (Slika 61A.), posle 30 min izreagovalo je više od 40 % guanidino-grupa, a posle 4 sata sadržaj izreagovanih guanidino-grupa bio je oko 58 % i dalje se nije menjao. U prisustvu metformina u prvih sat vremena izreagovalo je oko 35% guanidino-grupa, a posle 6 sati inkubiranja izreagovalo je oko 40%. Najefikasniji u spre avanju reakcije guanidino-grupa HSA sa metilglioksalom bio je Cys. U prva 2 sata, reakcija guanidino-grupe je bila skoro potpuno spre ena, a posle 3-6 h inkubiranja izreagovalo je samo oko 10 % guanidino grupa. U prisustvu penicilamina, u prvim minutima izreagovalo je oko 10 % guanidino-grupa, a posle 2 h 26 % i taj udeo se daljim inkubiranjem nije menjao. U prisustvu NAcCys i GSH u prva 2 h inkubiranja, guanidino grupe su izreagovale u nešto manjoj meri nego u prisustvu metformina, ali u periodu od 4-6 h inkubiranja,

efikasnost NAcCys, GSH i metformina u spre avanju reakcije guanidino grupa HSA sa metilglioksalom je bila približno jednaka. Dakle, može se zaključiti da efikasnost ispitivanih molekula u spre avanju reakcije guanidino-grupe opada redom: Cys > penicilamin > metformin = NAcCys = GSH.

Reakcija HSA amino-grupa, bez prisustva hvata a, je sporija od reakcije guanidino-grupa (Slika 61B.). Posle 4 sata inkubacije izreagovalo je oko 20 % amino-grupa, odnosno 27 % posle 6 sati. U prisustvu metformina u prvih sat vremena izreagovalo je oko 8 %, a posle 4-6 sati oko 10 % amino-grupa. U pogledu spre avanja reakcije HSA amino-grupa sa metilglioksalom, najefikasniji su bili Cys i penicilamin, u njihovom prisustvu izreagovalo je manje od 9 % amino-grupa. Efikasnost GSH u spre avanju reakcije amino-grupa je slična dobijenoj sa Cys i penicilaminom u prvih 2 h inkubiranja, a u nastavku inkubiranja dobijenoj sa metforminom. NAcCys se pokazao najmanje efikasnim –posle 4-6 sati inkubiranja izreagovalo je oko 20 % amino-grupa HSA.

Prisustvo malih tiola kao hvata a dovelo je do gotovo potpunog inhibiranja reakcije HSA-SH grupe sa metilglioksalom. U prisustvu metformina kao hvata a, reakcija tiol-grupe se odvija u približno istoj meri kao i bez prisustva hvata a (Slika 62.). Od malih tiola najslabiji inhibitor reakcije tiol-grupe bio je NAcCys.

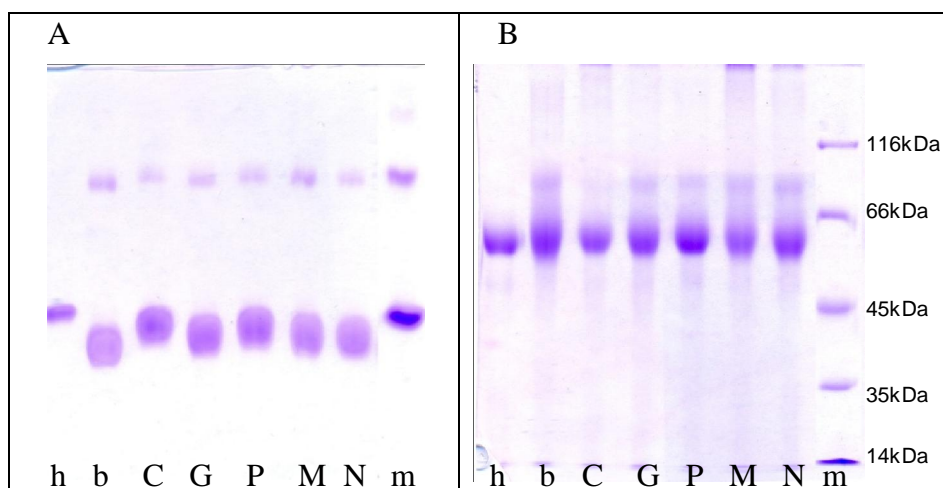


Slika 62. Promena sadržaja izreagovanih tiol- grupa HSA (0,5 mM) pri inkubaciji sa metilglioksalom (42 mM) u prisustvu (21 mM) i bez prisustva hvata a, u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C u toku 8 h

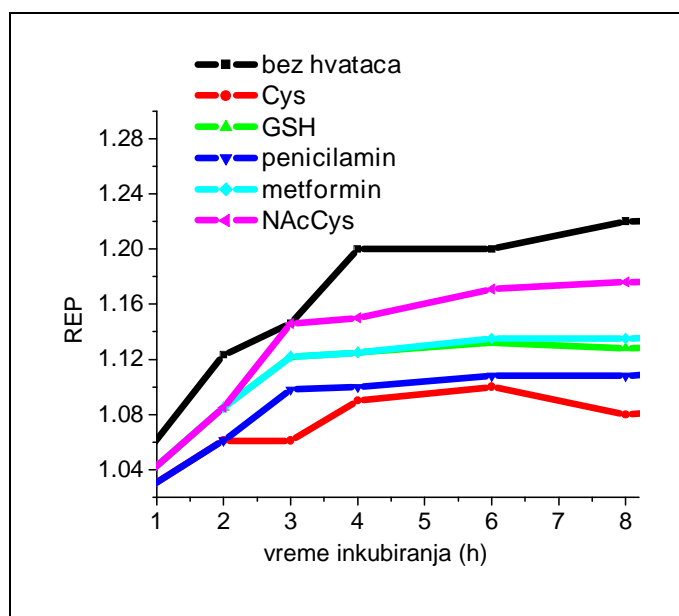
Elektroforetsko pra enje promena HSA u reakciji sa metilglioksalom u prisustvu i bez prisustva hvata a metilglioksala

Modifikacija HSA metilglioksalom sa i bez prisustva hvata a ovog dikarbonila, pra ena je i elektroforetski (SDS PAGE i nativnom elektroforezom). Uzimani su alikvoti reakcione smeše u toku 8 sati inkubiranja i posle 24 h. Promene HSA molekula su se desile ve posle 2 -3 sata inkubiranja (Slika 63.). Mogu se uo iti razlike u pokretljivosti HSA pri nativnoj elektroforezi kada je inkubiran sa metilglioksalom i u prisustvu i bez prisustva inhibitora. Tako e se pojavila nova traka ija relativna elektroforetska pokretljivost (REP) odgovara dimeru BSA. U kojoj meri je prisustvo hvata a metilglioksala uticalo na promenu REP vrednosti monomera HSA prikazano je na Slici 64. Promene REP vrednosti monomera pri nativnoj elektroforezi su u skladu sa dobijenom promenom sadržaja izreagovanih guanidino- i amino-grupa u prisustvu inhibitora. Najmanje promene utvr ene su u prisustvu Cys i penicilamina, u prisustvu GSH i metformina došlo je do iste promene REP, a u prisustvu NAcCys do najve e.

Na SDS elektroforegramu HSA inkubiranog sa metilglioksalom uo ava se širenje albuminske trake ka ve im molekulskim masama, javlja se dimerska traka i oligomerska. Analizom elektroforegrama nativne i SDS elektroforeze u programu Image J odre ena je približna zastupljenost HSA monomera i dimera u inkubacionim smešama (Tabela 17.). Smanjenje udela monomera i pojava dimera u uzorcima HSA inkubiranog sa metilglioksalom bez prisustva hvata a, pokazuje da dolazi do umrežavanja proteina (kao što je ve istaknuto u poglavlju 4.3.). Zavisno od efikasnosti upotrebljenog hvata a metilglioksala, smanjuje se umrežavanje proteina u reakciji sa metilglioksalom. Može se zaklju iti da su od ispitivanih hvata a metilglioksala, Cys i penicilamin bili najefikasniji u spre avanju umrežavanja HSA u reakciji sa metilglioksalom. Najmanje efikasni bili su metformin i NAcCys.



Slika 63. Elektroforegrami dobijeni nativnom (A) i SDS-PAG elektroforezom HSA (0.5 mM) inkubiranog u toku 2 h sa metilglioksalom (41 mM) (u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.4, na 37°C) u prisustvu (21 mM) i bez prisustva inhibitora Cys, GSH, penicilamina, metformina i NAcCys; oznake traka: h-HSA kontrola, b-bez inhibitora, C-Cys, G-GSH, P-penicilamin, M-metformin, N-NAcCys, m: BSA (nativna), markeri (SDS).



Slika 64. Promena relative elektroforetske pokretljivosti (REP) HSA tokom inkubiranja sa metilglioksalom u prisustvu i bez prisustva inhibitora reakcije.

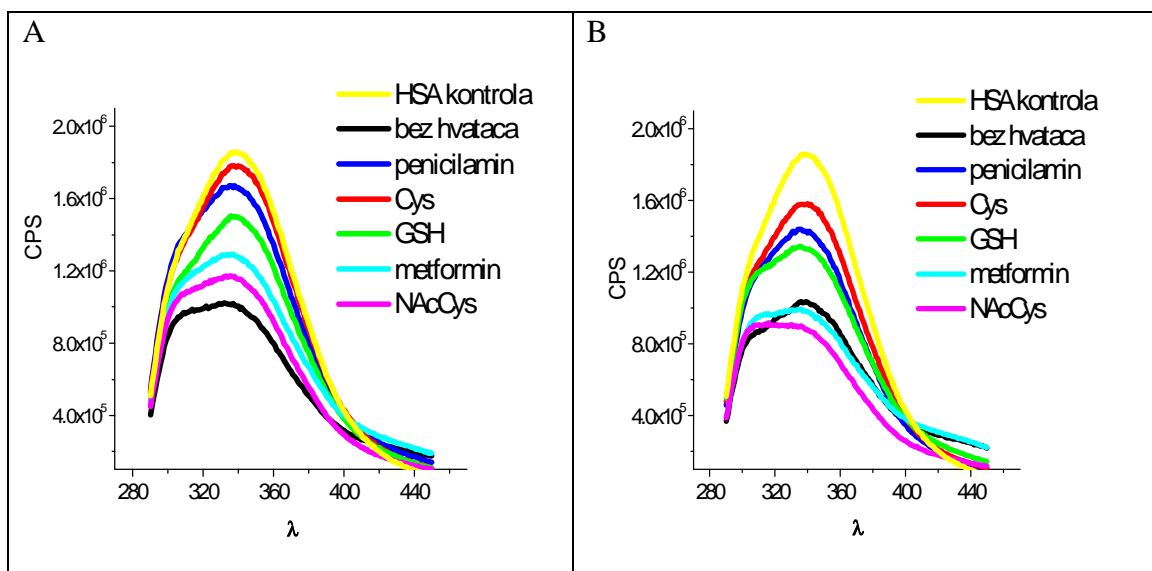
Tabela 17. Zastupljenost HSA monomera i dimera u reakcionim smešama HSA (0,5 mM) i metilglioksala (42 mM) posle 2 sata inkubacije bez i u prisustvu inhibitora (21 mM) dobijena na osnovu analize elektroforegrama u programu Image J.

HSA + MG	Nativna PAGE		SDS PAGE		
	monomer(%)	dimer(%)	monomer(%)	dimer(%)	oligomer(%)
Bez hvata a	84	15	74.87	16.2	8.5
Cys	89	10	89.30	9.69	
GSH	84	13	83.96	14.56	
Penicilamin	89	10	87.58	11.15	
Metformin	80	20	79.97	15.7	4.17
NAcCys	85	13	79.2	17.72	3.76

Spektrofluorimetrijsko ispitivanje promena konformacije HSA u reakciji sa metilglioksalom, u prisustvu i bez prisustva hvata a metilglioksala

Snimljeni su fluorescentni emisioni spektri uzoraka HSA inkubiranog sa metilglioksalom sa i bez prisustva hvata a metilglioksala, pri ekscitaciji na $\lambda_{exc}290$. Na ovoj talasnoj dužini prati se unutrašnja fluorescencija HSA koja potiče od ostataka Trp 214. Dobijeni spektri uzoraka HSA inkubiranog sa metilglioksalom, bez i u prisustvu hvata a, prikazani su na Slici 65. Svi uzorci su imali jednaku koncentraciju HSA (0.5 μ M).

U reakciji sa metilglioksalom dolazi do gašenja unutrašnje fluorescencije HSA, intenzitet fluorescencije na emisionom maksimumu $\lambda_{em}338$ se smanjuje za približno 45 % (posle 2 i 6 sati inkubiranja dobijeno je približno jednako smanjenje). Procenat smanjenja intenziteta fluorescencije u prisustvu hvata a metilglioksala prikazan je u Tabeli 18.



Slika 65. Fluorescentni emisijski spektri (eksc=290nm) HSA inkubiranog sa metilglioksalom u toku 2 h (A) i 6 h (B), bez i u prisustvu hvata a.

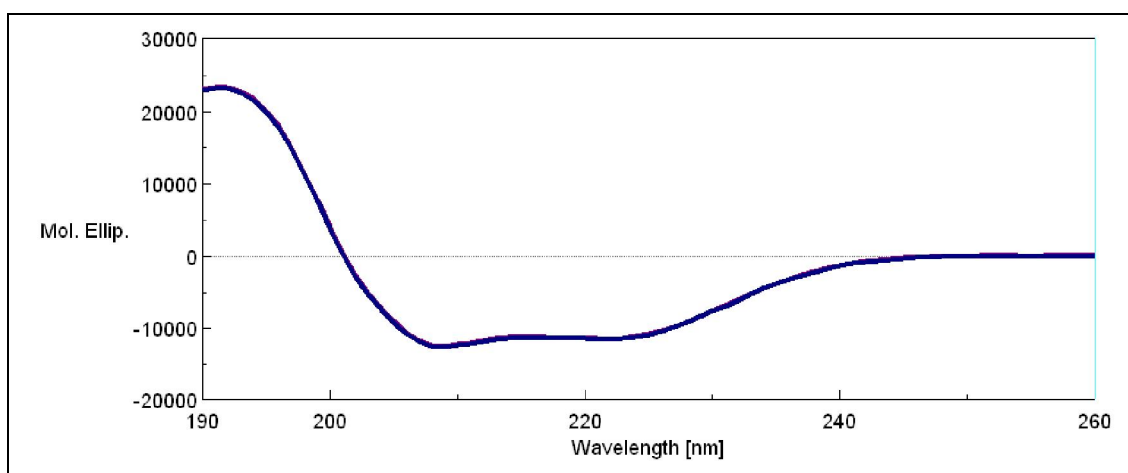
Tabela 18. Procenat smanjenja inteziteta fluorescence na em 338 nm, do koga dolazi pri inkubaciji HSA sa metilglioksalom u toku 2, odnosno 6 sati, u prisustvu i bez prisustva hvata a metilglioksala.

HSA + MG	Smanjenje inteziteta maksimuma em 338 (%)		Pomeranje maksimuma em 338
	2 h	6 h	
HSA kontrola	0	0	338
bez hvata a	45.67	44.49	332
penicilamin	10.99	22.97	335
Cys	4.31	15.27	340
GSH	19.21	28.36	336
metformin	30.81	47.16	336
NAcCys	37.20	52.46	335

U prisustvu Cys, i u nešto manjoj meri penicilamina, došlo je do najmanjeg smanjenja inteziteta fluorescencije. Metformin i NAcCys delimi no spre avaju gašenje fluorescencije u toku 2 sata inkubacije, ali posle 6 sati efekat je izostao. GSH pokazuje središnju vrednost efikasnosti u spre avanju gašenja fluorescencije.

Uzroci gašenja triptofanske fluorescencije HSA u reakciji sa metilgliksalom mogu biti višestruki. Mogu biti posledica promena u tercijarnoj i sekundarnoj strukturi proteina, što bi dovelo do promena u dostupnosti Trp rastvara u. Gašenje fluorescencije može biti posledica promena u mikrookolini Trp 214. Mendez i saradnici (2005) su ispitivanjem fluorescencije i CD spektara pri denaturaciji glikovanog HSA (40 mg/mL nagra enog glikacijom sa 150 mM Glc u toku 160 h) predložili da je smanjenje triptofanske fluorescencije glikovanog HSA posledica modifikacije Lys ostataka glukozom u okolini Trp 214 (Lys 199, a verovatno i Lys 212 i Lys 195), te da ova modifikacija dodatno stabilizuje sekundarnu strukturu i lokalnu strukturu oko Trp. Zapazili su da se glikovani HSA teže denaturišu. Gašenje triptofanske fluorescencije može biti i posledica pojave novih struktura u HSA – AGEs, koje fluoresciraju posle ekscitacije na ve im talasnim dužinama od triptofanske, pa su stoga kven eri triptofanske fluorescencije.

Na osnovu snimljenog CD spektara HSA inkubiranog 6 h sa i bez hvata a metilgliksala (i kontrole) može se zaklju iti da pri reakciji sa metilgliksalom nije došlo do promena u sekundarnoj strukturi HSA (Slika 66), i da gašenje triptofanske fluorescencije em 338 nm može biti posledica promene u tercijarnoj strukturi.

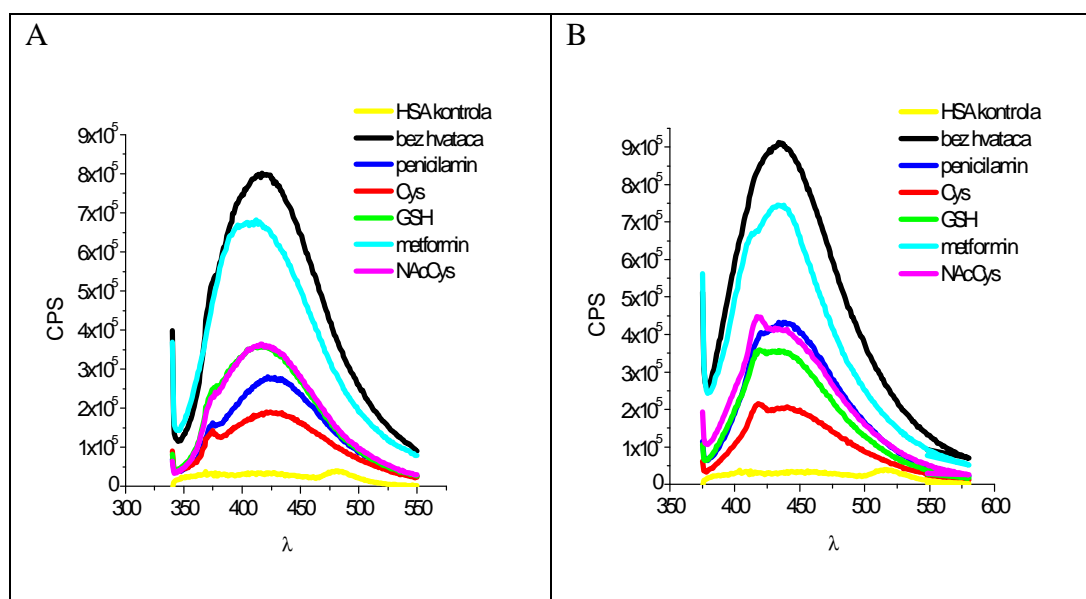


Slika 66. CD spektri (190-260 nm) HSA (kontrola, plavo) i HSA inkubiranog sa metilgliksalom, u toku 6 h (ljubi asto)

Pentozidin – derivat nastao umreženjem ostataka Lys i Arg i arg-pirimidin su fluorescentni krajnji proizvodi glikacije proteina za koje je karakteristi no eksc/ em = 328/378 (Dyer et al, 1991, Ahmed et al, 2002). Za HSA modifikovan sa glukozom

navodi se pojava fluorescencije sa $\lambda_{\text{eksc}}/\lambda_{\text{em}} = 335/406$ (Westwood i Thornalley, 1995) koja potječe od pentozidina i Arg-pirimidina (Ahmed et al, 2002). Praćenje fluorescencije $\lambda_{\text{eksc}}/\lambda_{\text{em}}=360/430$ (Monnier i Cerami, 1981), odnosno $365/440$ (Sharma et al, 2002) ili $370/430$ (Zoellner et al, 2001) je predloženo kao mera stepena glikacije proteina.

Snimanje fluorescentnih emisionih spektara, karakterisanih za AGEs (ekscitacija na 330 i 360 nm, Slika 67.) pokazalo je da se u prisustvu Cys i penicilamina u najmanjoj meri stvaraju fluorescentni AGEs (Tabela 19.)



Slika 67. Fluorescentni emisioni spektri na $\lambda_{\text{eksc}}=330\text{nm}$ (A) i $\lambda_{\text{eksc}}=360\text{nm}$ (B) HSA inkubiranog sa metilglioksalom 6h u prisustvu hvatača.

Tabela 19. Povećanje relativnih intenziteta fluorescencije HSA, koji je inkubiran sa metilgliksalom u toku 6 h u prisustvu hvatača i metilgliksala.

HSA + MG	Relativno povećanje intenziteta fluorescencije	
	330eksc/417em	360eksc/440em
HSA kontrola	1.00	1.00
bez hvatača	4.99	13.82
penicilamin	1.67	6.59
Cys	1.16	3.20
GSH	2.26	5.43
metformin	4.18	11.37
NAcCys	2.26	6.39

Na osnovu ispitivanja efikasnosti malih tiola kao hvatača i metilgliksala u sprečavanju glikacije HSA sa metilgliksalom zaključeno je:

- w Gašenje triptofanske fluorescencije (na talasnoj dužini 338 nm) u prisustvu metilgliksala (i nekih hvatača) može stoga, biti posledica pojave krajnjih proizvoda glikacije (AGEs) koji su kverterni triptofanske fluorescencije, odnosno njihova ekscitacija se odvija na 330 nm koja odgovara emisiji Trp 214. Da je upravo ovo slučaj pokazuje vrednost relativnog povećanja fluorescencije na 330eksc/417em i 360eksc/440em (karakteristične za fluorescentne krajnje proizvode glikacije, pentozidin i arg-pirimidin), koje je najmanje upravo u prisustvu Cys i penicilamina.
- w Na osnovu svega može se zaključiti da se u prisustvu Cys i penicilamina postiže veoma efikasno sprečavanje reakcije glikacije HSA sa metilgliksalom. Supstance koje sadrže α -amino- γ -merkapto-etansku grupu kao farmakoforu, mogu se koristiti kao efikasni hvatači i metilgliksala. Mali tioli kao hvatači i pokazuju i dodatnu prednost (u odnosu na metformin) jer omogućavaju zaštitu tiol-grupe HSA i obnovu njegovog antioksidativnog potencijala, koji je veoma bitan za njegovu funkciju in vivo.

4.6. Monitoring stepena karbonilovanja HSA in vivo preko odreivanja sadržaja amino-, guanidino- i tiol- grupa

U nekim patološkim stanjima (dijabetesu, uremiji, aterosklerozi, oksidativnom stresu, inflamaciji) i pri starenju povećava se nivo dikarbonilnih jedinjenja (kao što su gliksal, metilgliksal, 3-deoksiglukozon) i glikoaldehida (Desai et al, 2010; Lo et al, 1994; Lu et al, 2010; Odani et al, 1999), odnosno dolazi do karbonilnog stresa. Dikarbonilna jedinjenja su vrlo reaktivna i dovode do modifikacije proteina, DNK i lipida. Metilgliksal mnogo brže dovodi do promena na proteinima nego sama glukoza, pri znatno nižim koncentracijama i kraćem vremenu izloženosti (Mera et al, 2010).

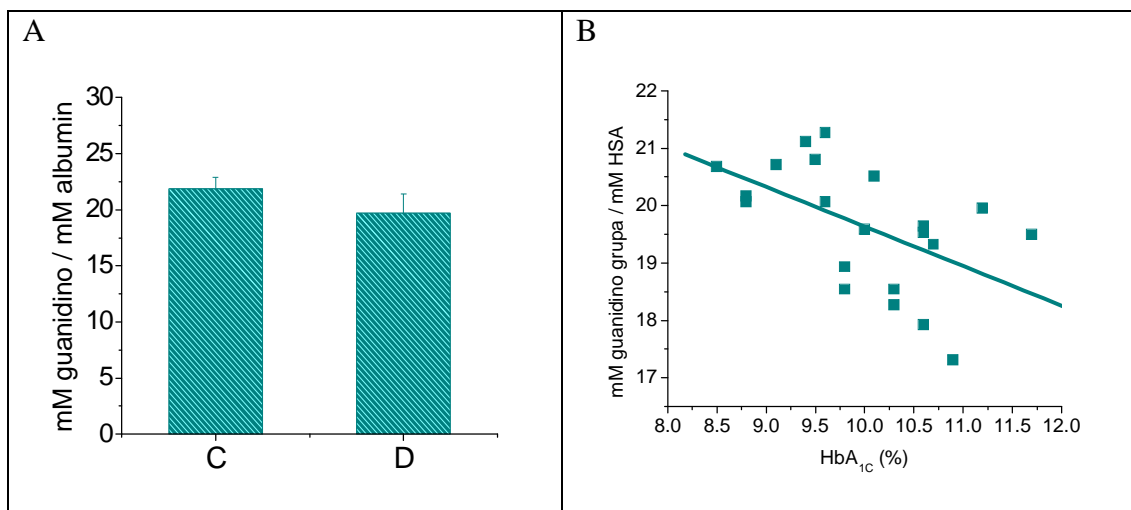
Ostaci Lys, Arg i Cys, kao što je pokazano u prethodnim poglavljima, reaguju sa dikarbonilnim jedinjenjima. Neki od nastalih proizvoda su okarakterisani. U reakciji amino i tiol grupe proteina sa metilgliksalom nastaju monoaddukti- N-karboksietil-lizin (CEL, Ahmed et al, 1997) i S-(karboksietil)-cistein (Mostafa et al, 2007), koji su markeri nastanka i razvoja sekundarnih komplikacija u dijabetesu. Nastaju, takođe, i umreženi proizvodi – metilgliksal-lizinski-dimer (MOLD, Chellan i Nagaraj, 1999). U reakciji metilgliksala i bojnog ostatka Arg nastaje N-(karboksimetil)-arginin koji se transformiše u 1,5-dihidroimidazol i zatim sporo oksiduje u 5-metilimidazol-4-on (Lo et al, 1994). Ovako nastali krajnji proizvodi glikacije se akumuliraju u proteinima tkiva sa starenjem i u hroničnim bolestima dijabetesu i aterosklerozi (Degenhardt et al, 1998).

Do sada nije razvijena metoda za detektovanje AGEs koja je opšte prihvaćena ili u širokoj primeni, niti postoji dostupan kit za odreivanje AGEs za primenu u dijagnostičke svrhe. Najčešće metode za detektovanje su HPLC, ELISA i imunohistohemijske (Singh et al, 2001). Praćenje promena u sadržaju bojnih ostataka aminokiselina na strukturno okarakterisanom, izolovanom proteinu, kao što je HSA, omogućilo bi uvid u modifikaciju proteina u uslovima karbonilnog stresa in vivo i efekat ovih promena na njegovu funkciju. Promene u nivou slobodnih amino-, guanidino- i tiol-grupa ostataka Lys, Arg i Cys na površini HSA, koji reaguju sa dikarbonilnim jedinjenjima, mogle bi biti pokazatelj izloženosti karbonilnom stresu u kliničkoj praksi. U tom cilju odreivan je sadržaj slobodnih amino-, guanidino- i tiol-grupa na površini HSA molekula izolovanog iz seruma pacijenata obolelih od dijabetesa tip 2 (n=21), koji su bili hospitalizovani zbog loše metaboličke kontrole dijabetesa. Grupa dijabetičara je imala značajno povećan nivo HbA_{1c} ($9.9 \pm 0.99\%$) u odnosu na kontrolu ($4.9 \pm 0.5\%$).

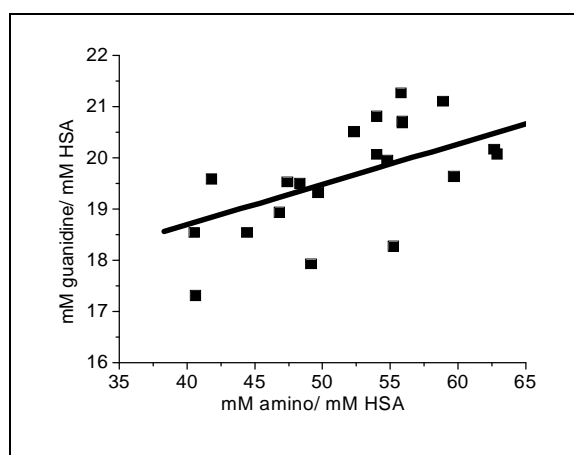
$p < 0.001$). Kontrolnu grupu je činilo 12 zdravih osoba, odgovarajućeg godišta i pola. HSA je izolovan iz seruma dijabetičara i zdravih osoba afinitetnom hromatografijom na koloni Cibacron Blue F3G-A Sepharose CL-6B.

Sadržaj slobodnih guanidino-grupa Arg ostataka (na izolovanom HSA) određen je spektrofotometrijskom metodom sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit (Amorim et al, 2012). Sadržaj HSA guanidino grupa kod dijabetičara je bio 19.72 ± 1.67 mM guanidino grupa/mM albumina, statistički značajno ($p < 0.001$) niži od vrednosti dobijene za kontrolnu grupu (21.87 ± 1.02 mM guanidino grupa/mM albumina). U ovom se delimično preklapanje opsega sadržaja guanidino grupa (Slika 68.). Pri testiranju upotrebljivosti metode jedini kriterijum za izbor uzoraka dijabetičara bio je povećana vrednost HbA_{1c}. Primena metode za praćenje karbonilovanja u dobro definisanim grupama (sa različitim sekundarnim komplikacijama i sa većim brojem uzoraka) omogućiti bolje definisanje opsega sadržaja guanidino-grupa kod dijabetičara i u kontrolnoj grupi.

Pronađena je slaba negativna korelacija ($r = -0.532$, $p < 0.05$) između ukupnog sadržaja HSA-guanidino grupa i vrednosti HbA_{1c} kod osoba obolelih od dijabetesa. Sa druge strane ispitivanje korelacije sadržaja HSA-amino i HSA-guanidino grupa kod dijabetičara je pokazalo da među njima postoji pozitivna korelacija ($r = 0.641$, $p < 0.002$) (Slika 69.)

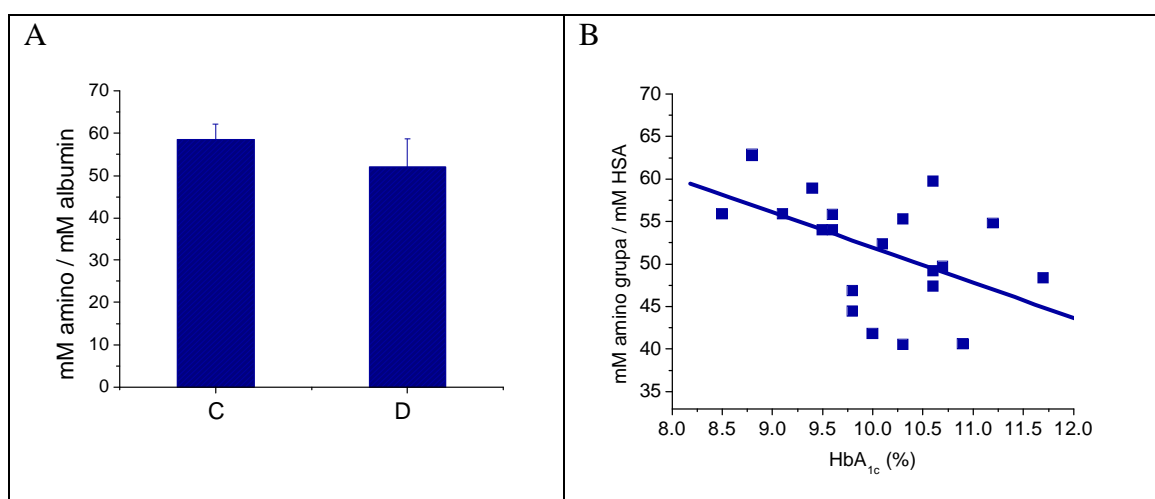


Slika 68. A. Srednja vrednost sadržaja guanidino-grupa u HSA izolovanom iz seruma osoba obolelih od dijabetesa (D, n=21) i kontrolne grupe (C, n=12) korelacija između sadržaja HSA-guanidino grupa i vrednosti HbA_{1c} kod osoba obolelih od dijabetesa: $Y = (26,53 \pm 2,52) + (-0,68 \pm 0,25)X$, $r = -0,532$, $p < 0,05$.



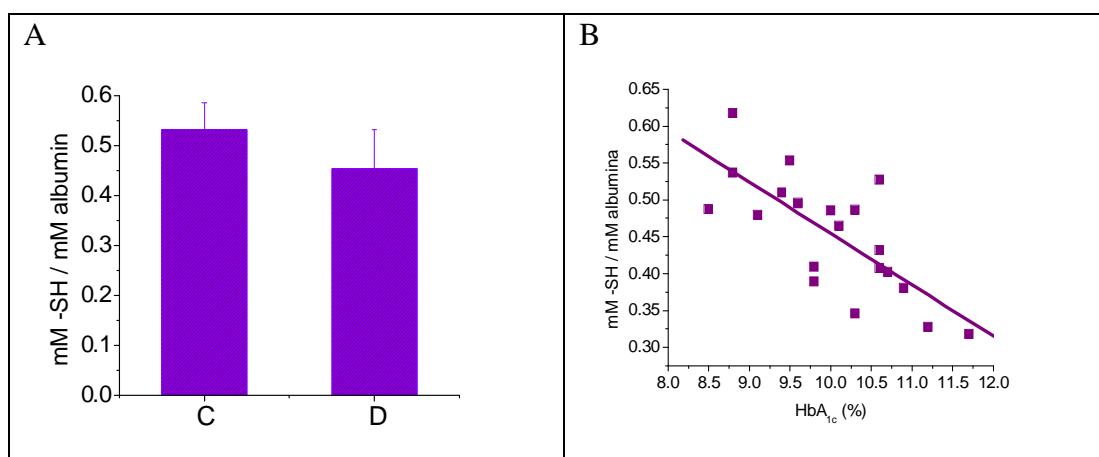
Slika 69. Korelacija sadržaja HSA amino- i HSA guanidino- grupa.

Određivanje sadržaja amino-grupa na HSA izolovanom iz seruma osoba obolelih od dijabetesa urađeno je spektrofotometrijskom metodom sa p-benzohinonom (Amiovi et al, 2011). Sadržaj HSA amino-grupa kod dijabetičara (51.96 ± 6.74 mM amino grupa/mM albumina), je značajno niži ($p < 0.005$) u odnosu na vrednost kontrolne grupe (58.49 ± 3.69 mM amino grupa/mM albumina) (Slika 70.). Između sadržaja ukupnih amino-grupa HSA i vrednosti HbA_{1c} nađena je slaba negativna korelacija ($r = -0.510$, $p < 0.02$)



Slika 70. A. Srednja vrednost sadržaja amino-grupa HSA izolovanog iz seruma osoba obolelih od dijabetesa (D, n=21) i kontrolne grupe (C, n=12) B. Korelacija ($r = -0.510$) između sadržaja HSA amino-grupa i vrednosti HbA_{1c} kod osoba obolelih od dijabetesa $Y = (93.29 \pm 16.03) + (-4.13 \pm 1.60)X$, $r = -0,510$, $p < 0,002$.

Sadržaj slobodne HSA tiol-grupe kod dijabetičara određen Elmanovom metodom sa DTNB, (0.454 ± 0.078 , $n=21$) je statistički značajno ($p<0.01$) niži u odnosu na kontrolu (0.532 ± 0.054 , $n=12$, Slika 71). Sadržaj tiol-grupe korelira sa vrednostima HbA_{1C} ($r=-0.742$, $p<0.0001$) kod osoba obolelih od dijabetesa.



Slika 71. A. Srednja vrednost sadržaja tiol-grupa HSA izolovanog iz seruma osoba obolelih od dijabetesa (D, $n=21$) i kontrolne grupe (C, $n=12$) B. Korelacija ($r=-0.742$) između sadržaja HSA-SH grupe i vrednosti HbA_{1C} kod osoba obolelih od dijabetesa $Y = (1.15 \pm 0.14) + (-0.070 \pm 0.014)X$, $r = -0,742$, $p<0,0001$.

Hiperglikemija i promenjen metabolizam glukoze u dijabetesu dovode do povećanja oslobađanja dikarboninih jedinjenja, kao što je metilgliksal (Han et al, 2009). Glukoza i aldehidi reaguju sa amino-, guanidino- i tiol-grupom proteina i dovode do stvaranja AGEs, odnosno promena strukture i aktivnosti proteina.

Albumin je najzastupljeniji protein u serumu koji ima brojne funkcije. Utvrđeno je da postoji povezanost između koncentracije albumina u plazmi ili pak modifikacija, s jedne strane i mortaliteta, s druge (Phillips et al 1989). Glikovani albumin je povezan sa promenama na kardiovaskularnom sistemu, što je pokazano na modelima sa životinjama (Cohen et al, 1996) i u dijabetesu kod ljudi (Schram et al, 2005; Schalkwijk et al, 1999). Kod pacijenata sa dijabetesom, utvrđeno je da postoji povezanost između povećanja nivoa glikovanog albumina i povećanja krvnog pritiska (markera rizika od kardiovaskularnih bolesti, Schram et al, 2005) Postoji korelacija između glikovanog albumina, i markera endotelne disfunkcije u plazmi i adhezionih molekula elije (Schalkwijk et al, 1999). Povećanje serumskog albumina može da dovede do povećanja

proliferacije i migracije vaskularnih glatkih mišića (Hattori 2002). Nivo glikovanog albumina je pokazatelj glikemije u prethodne 2-3 nedelje pre uzimanja uzorka, stoga je on dobar kandidat za kratkoročno praćenje bolesnika sa dijabetesom (Takahashi et al, 2007). Kod nekih patoloških stanja, glikovani albumin je bolji parametar glikemijske kontrole od HbA1c (kod tipa 2 dijabetesa na insulinskoj terapiji, hronične bubrežne insuficijencije (posebno na hemodijalizi), kod ciroze jetre, anemije (nedostatka gvožđića) i u patološkim stanjima vezanim za postprandijalnu hiperglikemiju, Koga et al, 2010). Za merenje glikovanog albumina razvijene su metode HPLC i enzimske (sa ketoamin oksidazom, kao specifičnom proteinazom za albumin, Kouzuma et al, 2002).

Dobijeni rezultati su pokazali da se za monitoring karbonilovanja HSA može koristiti određivanje sadržaja najzastupljenijih amino-grupa na površini HSA molekula (Amorini et al, 2011). Mada je metoda jednostavna, precizna i tačna, i interferencija koja potiče od tiol-grupe minimalna, ponekad je ipak ova korekcija neophodna, što nije slučaj kada se primenjuje metoda za određivanje guanidino-grup. Može se zaključiti da je metod za monitoring stepena karbonilovanja HSA određivanjem sadržaja guanidino grupa više pogodan za kliničku praksu.

Određivanje amino- i guanidino-grupa na izolovanom albuminu mogu biti klinički parametri nezavisni od određivanja HbA1c koji bi dali dodatne informacije o stepenu izloženosti karbonilnom stresu i uspešnosti metaboličke kontrole kod osoba obolelih od dijabetesa. Sadržaj određenih slobodnih guanidino grupa na albuminu izolovanom iz seruma dijabetičara pokazao je slabu negativnu korelaciju sa nivoom HbA1c i relativno slabu pozitivnu korelaciju sa sadržajem amino grupa albumina. Ovo upućuje na zaključak da su različiti mehanizmi modifikacije ostataka Lys i Arg proteina u uslovima karbonilnog stresa. Buduća studija na većem broju pacijenata pokazale bi korisnost određivanja amino- grupa i guanidino-grupa kao markera izloženosti karbonilnom stresu na izolovanom albuminu.

Pored guanidino grupa, zbog veoma dobre korelacije ($r=-0,742$) između sadržaja HSA tiol-grupa i HbA1c. Određivanje promena tiol-grupa u karbonilovanju je takođe, veoma pogodno za kliničku praksu.

Praćenje nivoa karbonilovanja za pojedinačno dobro strukturalno okarakterisan protein (npr. HSA) kroz određivanje sadržaja slobodnih reaktivnih amino- i guanidino-grupa na izolovanom proteinu, omogućava bolji uvid u nivo modifikacije *in vivo*, kao i procene promene njegove aktivnosti. Kako su metode za određivanje guanidino- i

amino- grupe, opisane u ovom radu, jednostavne, brze, precizne i ta ne, pogodne su za kvantifikaciju nivoa karbonilovanja proteina u razli itim bolestima i za pra enje terapije (tj. kapaciteta leka de zaštiti od delovanja reaktivnih -aldehida).

5. Zaključak

Karbonilna jedinjenja su veoma reaktivna, reaguju sa nukleofilnim grupama bo njih ostataka Lys i Arg, N-terminalnom amino-grupom i tiol-grupom ostatka Cys na površini molekula proteina i tako ih modifikuju.

Ispitivanje doprinosa tiol-grupe modifikaciji proteina dikarbonilnim jedinjenjima, kinetike i konkurentnosti ove reakcije u odnosu na reakcije amino- i guanidino-grupe, zahtevalo je razvijanje metoda pogodnih za praćenje toka ovih reakcija. Za određivanje sadržaja amino-grupa (ostatka Lys i terminalne) na površini molekula proteina u toku reakcije karbonilovanja, razvijena je spektrofotometrijska metoda zasnovana na reakciji amino-grupe sa p-benzohinonom. Metoda je precizna (RSD u opsegu 1.2-1.8 %) i tačnost (ispitano metodom standardnog dodatka, 100.65 ± 1.21 %). Za određivanje sadržaja guanidino-grupa razvijena je spektrofotometrijska metoda sa reagensom koji sadrži timol i natrijum-hipobromit. Preciznost metode (RSD) je u opsegu od 0.9 do 2%, a tačnost iznosi 99.84 ± 0.84 %. Obe metode su tehnički jednostavne, ne zahtevaju mnogo vremena i stoga su veoma pogodne za primenu i u fundamentalnim istraživanjima i u kliničkoj praksi.

U cilju sagledavanja modifikacija HSA do kojih dolazi u procesu karbonilovanja, HSA (0.5mM) je inkubiran sa različitim koncentracijama metilglioksala, sa znatno većim od fizioloških i većim od ukupnog broja reaktivnih aminokiselinskih bo njih ostataka na površini molekula HSA koje mogu da reaguju (100 mM), kao i sa nedovoljnom količinom metilglioksala (10 mM), u toku 10 sati i 24 dana. Praćenje toka reakcija tiol-, amino- i guanidino-grupa (spektrofotometrijskim određivanjem njihovog sadržaja) i praćenje promena HSA molekula (nativna i SDS-PAGE, pokretljivost, fragmentacija, umrežavanje) pokazali su da:

✓ i pored male zastupljenosti tiol-grupa na površini molekula HSA (oko 80 puta manja u odnosu na ukupan broj amino- i guanidino-grupa) ona reaguje u velikom procentu (do 65 %);

✓ tiol-grupa, pored amino-, učestvuje u umrežavanju HSA molekula (stvaranje dimera i oligomera) preko nastajanja HSA-MG (HSA-amino-MG ili HSA-SH-MG) intermedijera. U slučaju nedovoljne količine metilglioksala (u odnosu na koncentraciju grupa dostupnih za modifikaciju) u umrežavanju učestvuje sa udelom od 4%;

✓ povećanje koncentracije metilglioksala utiče na brzinu njegove reakcije sa tiol-grupom, odnosno na vreme uspostavljanja ravnoteže, na doprinos tiol-grupe modifikaciji molekula proteina, ali ne utiče na procenat izreagovanih grupa u stanju ravnoteže. Ova činjenica omogućava ekstrapolaciju dobijenih rezultata na niže, fiziološke koncentracije metilglioksala.

Ispitivanje reakcije metilglioksala i tiol-grupe aminokiselina (Cys, NAcCys i CMC), peptida (GSH) i proteina (HSA) pokazalo je da:

✓ mikrookolina tiol-grupe utiče na njenu reaktivnost i na prinos proizvoda reakcije. Reaktivnost tiol-grupe opada u nizu Cys>GSH>NAcCys, za sve ispitivane odnose koncentracija reaktanata (1:1, 1:2, 1:5). CMC ne reaguje sa metilgliksalom. Procenat izreagovanih -SH grupa svakog pojedina nog tiola, kada se uspostavi ravnoteža reakcije, gotovo je jednak za sva tri ispitivana odnosa sa metilgliksalom (1:1, 1:2, 1:5): $38.1 \pm 0.9\%$, $38.2 \pm 0.7\%$ i $39.0 \pm 0.8\%$ za Cys; $26.5 \pm 0.6\%$; $26.6 \pm 2.6\%$ i $27.4 \pm 2.5\%$ za GSH; $10.8 \pm 0.9\%$; $11.2 \pm 0.7\%$ i $12.2 \pm 0.9\%$ za NAcCys, redom. Prisustvo -amino- -merkapt-etanske grupe povećava reaktivnost tiol-grupe i omogućava da tiol-jedinjenje bude uspešan "hvata" metilgliksala.

✓ Praćenjem toka reakcije malih tiola i metilglioksala ^1H NMR spektroskopijom, kao i spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja pojedina nih grupa u reakcionim smešama, omogućilo je predlaganje reakcionih puteva. Predloženo je da slobodna -amino-grupa molekula Cys (koja je tiol-grupa u reakciji sa metilgliksalom već nagradila hemitioacetal), reaguje sa slobodnom acetil-karbonilnom grupom hemitioacetala, stvara se tiazolidinski intermedijer, koji dalje prelazi u stabilniji proizvod Cys-MG-glikozilamin. U ravnoteži je prisutno oko 40 % hemitioacetala i oko 60 % Cys-MG-glikozilamina.

✓ Inkubiranje HSA sa metilgliksalom, bilo sa nedovoljnom količinom ili u višku, dovelo je do toga da oko 60% tiol-grupe bude modifikovano. Ovaj procenat je veći od procenta u kojem je izreagovala tiol grupa Cys (40%), pri istim reakcionim uslovima. S druge strane, izražena dostupnost HSA tiol-grupe je veoma mala (12.6 %). Izražene vrednosti za hidrofobnost polarnih aminokiselina, koje se nalaze na udaljenosti od 7 Å od Cys 34, su veće u odnosu na vrednosti aminokiselinama u slobodnom stanju. Hidrofobnost mikrookoline može dovesti do povećanja nukleofilnosti i reaktivnosti ostataka Cys 34 i tako povećati njegovu sposobnost da reaguje i "uhvati" metilgliksal. Pored direktnog efekta na reaktivnost tiola Cys 34, povećana hidrofobnost mikrookoline

može doprineti manjoj hidratisanosti molekula metilglioksala i time njegovoj većoj reaktivnosti.

Da bi se spretilo neenzimsko glikozilovanje in vivo, neophodno je razviti pogodne molekule, "hvatače" metilglioksala (i drugih dialdehida). Ispitivanje efikasnosti tiola male molekulske mase (GSH i NAcCys), tiola koji sadrže α -amino- β -merkapto-etansku grupu kao farmakoforu, (Cys i penicilamina), i metformina (biguanidino jedinjenja) u spremanju reakcije HSA sa metilglioksalom pokazalo je da:

✓ reakciju HSA guanidino-grupa sa metilglioksalom najbolje sprema Cys, a potom penicilamin (sadržaj izreagovanih guanidino-grupa smanjen je za oko šest, odnosno 2 puta, redom). Efikasnost NAcCys, GSH i metformina je gotovo jednaka (sadržaj izreagovanih guanidino-grupa u njihovom prisustvu se smanjuje za 1.5 puta). Slike efikasnosti ispoljili su ispitivani molekuli i u spremanju reakcije HSA amino-grupe s metilglioksalom.

✓ Prisustvo tiola (Cys, NAcCys i penicilamina) dovelo je do gotovo potpunog spremanja reakcije HSA tiol-grupe i metilglioksala. U prisustvu metformina, reakcija HSA-SH grupe se odvijala u približno jednakom stepenu kao i bez prisustva hvatača.

✓ Cys i penicilamin su najefikasniji u spremanju umrežavanja HSA u reakciji sa metilglioksalom. Najmanje efikasni su metformin i NAcCys.

✓ Snimanje fluorescentnih spektara HSA modifikovanog metilglioksalom u prisustvu i bez prisustva hvatača metilglioksala pri ekscitaciji na 290 nm (povećanje gašenja fluorescencije Trp 214) i pri ekscitaciji 330 i 360 nm (stvaranje fluorescentnih AGEs) pokazalo je da se u prisustvu Cys i penicilamina postiže veoma efikasno spremanje reakcije glikacije HSA sa metilglioksalom. Supstance koje sadrže α -amino- β -merkapto-etansku grupu kao farmakoforu, mogu se koristiti kao efikasni hvatači i metilglioksala. Mali tioli kao hvatači pokazuju i dodatnu prednost (u odnosu na metformin) jer omogućavaju bolju zaštitu tiol-grupe HSA i očuvanje njegovog antioksidativnog potencijala koji je veoma bitan za njegovu funkciju in vivo.

AGEs nastaju u najvećem stepenu kao posledica reakcije karbonilovanja, akumuliraju se u hroničnim bolestima (posebno dijabetes) i sa starošću. Do sada nije razvijena metoda za detekciju AGEs koja je opšte prihvatljiva ili u širokoj primeni, niti postoji dostupan kit za njihovo određivanje u dijagnostičke svrhe. Primenom, u okviru ove teze razvijenih, spektrofotometrijskih metoda za određivanje sadržaja slobodnih amino- i guanidino-grupa na HSA izolovanom iz seruma pacijenata obolelih od tipa 2

dijabetesa (koji su bili hospitalizovani zbog loše metabolike kontrole sa HbA_{1c} od 9.9 ± 0.99%) i iz seruma kontrolne grupe (zdravih osoba odgovarajućeg godišta i pola, sa HbA_{1c} od 4.9 ± 0.5 %) na to je da je:

√ sadržaj HSA guanidino-grupa kod dijabetičara (19.72±1.67 mM guanidino-grupa / mM albumina) statistički značajno (p<0.001) niži u odnosu na sadržaj u kontrolnoj grupi (21.87±1.02 mM guanidino grupa/mM albumina).

√ sadržaj HSA amino-grupa kod dijabetičara (51.96±6.74 mM amino-grupa / mM albumina) statistički (p <0.005) značajno niži u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolnu grupu (58.49 ± 3.69 mM amino grupa/mM albumina). Između sadržaja ukupnih HSA amino-grupa i nivoa HbA_{1c} na to je slaba negativna korelacija (r=-0.510, p<0.05).

√ sadržaj slobodne tiol-grupe na površini HSA kod dijabetičara (0.495 ± 0.076 mM tiol- grupa / mM albumina) je niži u odnosu na kontrolu (0.530±0.051 mM tiol-grupa / mM albumina), ali razlika nije statistički značajna. Međutim, pronađena je dobra negativna korelacija (r=-0.656) između ukupnog sadržaja -SH grupa i nivoa HbA_{1c} u serumu osoba obolelih od dijabetesa.

Praćenje promena sadržaja amino- i guanidino-grupa kiselinskih ostataka na površini molekula strukturno dobro okarakterisanog izolovanog proteina (kao što je HSA) omogućava uvid u modifikacije proteina u uslovima karbonilnog stresa in vivo, kao i razmatranje efekata ovih promena na njegovu aktivnost. Promene u sadržaju ostataka Lys, Arg i Cys na površini HSA, koji reaguju sa dikarbonilnim jedinjenjima, mogu biti pokazatelj izloženosti karbonilnom stresu. Kako su metode za određivanje guanidino- i amino-grupe, primenjene u ovom radu, jednostavne, brze, precizne i tačne, pogodne su za kvantifikaciju nivoa karbonilovanja proteina u različitim bolestima i za praćenje terapije (tj. kapaciteta leka u zaštiti od delovanja reaktivnih α -oksoaldehida) u kliničkoj praksi.

6. Literatura

- A imovi , J. M., Stanimirovi , B. D., & Mandi , Lj. M. (2009). The role of thiol group in protein modification with methylglyoxal. *J. Serb. Chem. Soc*, 74, 867-883.
- A imovi , J. M., Stanimirovi , B. D., Todorovi , N., Jovanovi , V. B., Mandi , Lj. M. (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.
- A imovi J.M. Jovanovi , V.B., Veselinovi M.R., Sre kovi V.D., Mandi Lj.M. (2011) Method for monitoring of the protein amino group changes during carbonylation, *Clin. Biochem.* 44, 994-999.
- A imovi J.M., Jovanovi V.B., Sre kovi V.D., Penezi Romanjuk A.Z., Mandi L.M (2012). Monitoring of the human serum slbumin carbonylation level through determination of guanidino group content, *Analyt Biochem* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.028>
- Ahmad, S., Gromiha, M., Fawareh, H., & Sarai, A. (2004). ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*, 5, 51.
- Ahmed, M. U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1997). N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J*, 324 (Pt 2), 565-570.
- Ahmed, N., Argirov, O. K., Minhas, H. S., Cordeiro, C. A., Thornalley, P. J. (2002). Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J*, 364(Pt 1), 1-14.
- Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S. K., Beisswenger, P. J., Thornalley, P. J. (2005). Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia*, 48(8), 1590-1603.
- Al-Tonbary, Y., Al-Haggar, M., El-Ashry, R., El-Dakroory, S., Azzam, H., Fouda, A. (2009). Vitamin e and N-acetylcysteine as antioxidant adjuvant therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Adv Hematol*, 2009, 689639.
- Alt, N., Carson, J. A., Alderson, N. L., Wang, Y., Nagai, R., Henle, T., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2004). Chemical modification of muscle protein in diabetes. *Arch Biochem Biophys*, 425(2), 200-206.

- Amadori, M. (1929). The condensation product of glucose and p-anisidine. *Atti Reale Accad.Nazl.Lincei*, 9, 226-230.
- Aso, Y., Inukai, T., Tayama, K., and Takemura, Y. (2000) Serum concentrations of advanced glycation end products are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 37, 87–92.
- Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T., Gardner, D. K., Slone, D. S., Craun, M. L. (2005). Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med*, 33(7), 1638-1641.
- Baynes, J. W., Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), 1-9.
- Baynes, J. W., Thorpe, S. R. (2000). Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 28(12), 1708-1716.
- Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A. D., Lal, S., Szweggold, B. S. (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(1), 198-202.
- Beisswenger, P. J., Moore, L. L., Brinck-Johnsen, T., and Curphey, T. J. (1993) Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. *J. Clin. Invest.* 92, 212–217.
- Berg, T. J., Bangstad, H. J., Torjesen, P. A., Osterby, R., Bucala, R., and Hanssen, K. F. (1997) Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metab.* 46, 661–665.
- Biemel, K. M., Friedl, D. A., Lederer, M. O. (2002). Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound. *J Biol Chem*, 277(28), 24907-24915.
- Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., Nawroth, P. P. (1998a). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*, 37(3), 586-600.
- Bierhaus, A., Ziegler, R., Nawroth, P. P. (1998b). Molecular mechanisms of diabetic angiopathy-clues for innovative therapeutic interventions. *Horm Res*, 50 Suppl 1, 1-5.
- Bonsignore, A., Leoncini, G., Siri, A., Ricci, D. (1973). Kinetic behaviour of glyceraldehyde 3-phosphate conversion into methylglyoxal. *Ital J Biochem*, 22(4), 131-140.
- Bourdon, E., Blache, D. (2001). The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*, 3(2), 293-311.

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*, 318(20), 1315-1321.
- Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D. P. (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*, 37(25), 8965-8972.
- Bunn, H. F., Higgins, P. J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213(4504), 222-224.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Sapienza, M., Puleo, E., Calafato, S., Cornelius, C., Finocchiaro, M., Mangiameli, A., Di Mauro, M., Stella, A. M., Castellino, P. (2007). Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones*, 12(4), 299-306.
- Cerami, A., Vlassara, H., Brownlee, M. (1986). Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. *J Cell Biochem*, 30(2), 111-120.
- Chai, T. F., Hong, S. Y., He, H., Zheng, L., Hagen, T., Luo, Y., Yu, F. X. (2012). A potential mechanism of metformin-mediated regulation of glucose homeostasis: inhibition of Thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression. *Cell Signal*, 24(8), 1700-1705.
- Chaplen, F. W. (1998). Incidence and potential implications of the toxic metabolite methylglyoxal in cell culture: A review. *Cytotechnology*, 26(3), 173-183.
- Chellan, P., Nagaraj, R. H. (1999). Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch Biochem Biophys*, 368(1), 98-104.
- Cohen, M. P., Clements, R. S., Cohen, J. A., Shearman, C. W. (1996). Glycated albumin promotes a generalized vasculopathy in the db/db mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 218(1), 72-75.
- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Stone, M. D., Inda, J. J., Drouillard, D. J., Kuzmicic, J. P., Donoghue, M. A., Long, E. K., Armien, A. G., Lavandero, S., Arriaga, E., Griffin, T. J., Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and adipocyte mitochondrial function. *J Biol Chem*, 287(39), 32967-32980.
- Dai GH, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang YZ, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:14871-14876.
- Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1998). Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44(7), 1139-1145.

- Desai, K. M., Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., Untereiner, A., Wu, L. (2010). Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol*, 88(3), 273-284.
- DCCTRG, Diabetic Control and Complication Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*, 329(14), 977-986.
- Dukic-Stefanovic, S., Schinzel, R., Riederer, P., Munch, G. (2001). AGES in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? *Biogerontology*, 2(1), 19-34.
- Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H.G. (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with brom cresol green, *Clin .Chim Acta* 31, 87–96.
- Dyer, D. G., Blackledge, J. A., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1991). Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J Biol Chem*, 266(18), 11654-11660.
- Eble, A. S., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (1983). Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem*, 258(15), 9406-9412.
- Edelstein, D., Brownlee, M. (1992). Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*, 41(1), 26-29.
- Faure, P., Wiernsperger, N., Polge, C., Favier, A., Halimi, S. (2008). Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin Sci (Lond)*, 114(3), 251-256.
- Fields, R. (1972). The Rapid Determinations of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol*, 25, 464-465.
- Furuhata, A., Nakamura, M., Osawa, T., Uchida, K. (2002). Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J Biol Chem*, 277(31), 27919-27926.
- Gariballa, S. E., Sinclair, A. J. (2000). Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing*, 29(3), 207-210.
- Gerstein, M. (1992). A Resolution-Sensitive Procedure for Comparing Protein Surfaces and its Application to the Comparison of Antigen-Combining Sites. *Acta Cryst.*, A48, 271-276.
- Ginsberg, H., Plutzky, J., Sobel, B. E. (1999). A review of metabolic and cardiovascular effects of oral antidiabetic agents: beyond glucose-level lowering. *J Cardiovasc Risk*, 6(5), 337-346.

- Goh, S. Y., Cooper, M. E. (2008). Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(4), 1143-1152.
- Grandhee, S. K., Monnier, V. M. (1991). Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem*, 266(18), 11649-11653.
- Griffith, R., Hammond, E. G. (1989). Generation of swiss cheese flavor components by the reaction of amino acids with carbonyl compounds. *J Dairy Sci*, 72, 604-613.
- Grillo, M. A., Colombatto, S. (2008). Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, 35(1), 29-36.
- Guerin-Dubourg, A., Catan, A., Bourdon, E., Rondeau, P. (2012). Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab*, 38(2), 171-178.
- Hage, D. S. (1999) Affinity chromatography: a review of Clinical Applications *Clin Chem* 5, 593-615
- Han, Y., Randell, E., Vasdev, S., Gill, V., Curran, M., Newhook, L.A, Grant, M., Hagerty, D., Schneider, C. (2009) Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes, *Clin. Biochem*, 42, 562-569.
- Hamwi, A., Schweiger, C. R., Veitl Test, M. (1995) Quantitative measurement of HbA1c by an Immunoturbidimetric assay compared to a standard HPLC method. *Am J Clin Pathol*, 104, 89-95.
- Hattori, Y., Suzuki, M, Hattori, S., Kasai, K. (2002) Vascular smooth muscle cell activation by glycated Albumin (Amadori adducts), *Hypertension* 39 22-28.
- Hipkiss, A. R., Brownson, C., Bertani, M. F., Ruiz, E., Ferro, A. (2002). Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process? *Ann N Y Acad Sci*, 959, 285-294.
- Hodge, J. (1953). Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem*, 1, 928-943.
- Hodge, J. E. (1955). The Amadori rearrangement. *Adv Carbohydr Chem*, 10, 169-205.
- Hoeffer Scientific Instruments, (1991) *Electrophoresis Instruments and Accessories. Techniques and Exercises*, Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco
- Hoffmann, J., Alt, A., Lin, J., Lochnit, G., Schubert, U., Schleicher, E., Chavakis, T., Brownlee, M., Van der Woude, F. J., Preissner, K. T., Hammes, H. P. (2006). Tenilsetam prevents early diabetic retinopathy without correcting pericyte loss. *Thromb Haemost*, 95(4), 689-695.

- Hofmann, T., Schieberle, P. (1995). Evaluation of the key odorants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. 2187–2194.
- <http://www.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/STING-L/>
- <http://gibk26.bio.kyutech.ac.jp/jouhou/shandar/netasa/asaview/>
- http://www.jasco.co.uk/spectra_manager.asp
- <http://www.imars.org/online/wp-content/uploads/2010/02/PPL-Maillard-Products-for-Website-comments.pdf>
- Ishii, T., Tatsuda, E., Kumazawa, S., Nakayama, T., Uchida, K. (2003). Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 42(12), 3474-3480.
- Jiang, J., Chen, P., Chen, J., Yu, X., Xie, D., Mei, C., Xiong, F., Shi, W., Zhou, W., Liu, X., Sun, S., Zhang, P., Yang, X., Zhang, Y., Liang, X., Zhang, Z., Lin, Q., Yu, Y., Miyata, T., Tian, J., Liang, M., Luo, W., Xu, X., Hou, F. (2012). Accumulation of tissue advanced glycation end products correlated with glucose exposure dose and associated with cardiovascular morbidity in patients on peritoneal dialysis. *Atherosclerosis*, 224(1), 187-194.
- Kalapos, M. P. (2008). The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact*, 171(3), 251-271.
- Kim, K. J., Lee, B. W. (2012). The roles of glycated albumin as intermediate glycation index and pathogenic protein. *Diabetes Metab J*, 36(2), 98-107.
- Kleinova, M., Belgacem, O., Pock, K., Rizzi, A., Buchacher, A., Allmaier, G. (2005). Characterization of cysteinylated of pharmaceutical-grade human serum albumin by electrospray ionization mass spectrometry and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19(20), 2965-2973.
- Koenig RJ, P. C., Jones RL, Saudek C, Lehrman M, and Cerami A, A (1976). Correlation of glucose regulation and Hemoglobin A1c in diabetes mellitus. . *New Engl J Med*, 295, 417-420.
- Koga, M., Kasayama, S. (2010). Clinical impact of glycated albumin as another glycemetic control marker. *Endocr J*, 57(9), 751-762.
- Kouzuma, T., Usami, T., Yamakoshi, M., Takahashi, M., Imamura, S. (2002). An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological samples. *Clin Chim Acta*, 324(1-2), 61-71.
- Lapolla, A., Flamini, R., Dalla Vedova, A., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R., Traldi, P. (2003). Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*, 41(9), 1166-1173.

- Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D. (2001). AGE in micro- and macroangiopathy. *Contrib Nephrol*(131), 10-21.
- Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem*, 38(2), 103-115.
- Lichtig, J., Guarilha Jr., O., Oliveira, R. M. S., Masini, J. C., Trujillo, L. M. (2001). Spectrophotometric determination of total proteins by derivatization with p-benzoquinone in a flow system. *Analytical Letters*, 34(2), 193.
- Lo, T. W., Westwood, M. E., McLellan, A. C., Selwood, T., Thornalley, P. J. (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., Randell, E., Han, Y., Adeli, K., Krahn, J., Meng, Q. H. (2010). Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Clin Biochem*, 44(4), 307-311.
- Marchand, S., de Revel, G., Vercauteren, J., Bertrand, A. (2002). Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. *J Agric Food Chem*, 50(21), 6160-6164.
- Mendez, D. L., Jensen, R. A., McElroy, L. A., Pena, J. M., Esquerra, R. M. (2005). The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch Biochem Biophys*, 444(2), 92-99.
- Mera, K., Takeo, K., Izumi, M., Maruyama, T., Nagai, R., Otagiri, M. (2010). Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin. *J Pharm Sci*, 99(3), 1614-1625.
- Monnier, V. M. (2003). Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*, 419(1), 1-15.
- Monnier, V. M., Cerami, A. (1981). Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*, 211(4481), 491-493.
- Monnier, V. M., Sell, D. R., Genuth, S. (2005). Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci*, 1043, 567-581.
- Morgan, P. E., Dean, R. T., Davies, M. J. (2002). Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycooxidation products. *Arch Biochem Biophys*, 403(2), 259-269.
- Mostafa, A. A., Randell, E. W., Vasdev, S. C., Gill, V. D., Han, Y., Gadag, V., Raouf, A. A., El Said, H. (2007). Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol Cell Biochem*, 302(1-2), 35-42.

- Murata-Kamiya, N., Kamiya, H. (2001). Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res*, 29(16), 3433-3438.
- Nagai, R., Mera, K., Nakajou, K., Fujiwara, Y., Iwao, Y., Imai, H., Murata, T., Otagiri, M. (2007). The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochim Biophys Acta*, 1772(11-12), 1192-1198.
- Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., Turk, Z. (2006). Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol Nutr Food Res*, 50(12), 1105-1117.
- Nemet, I., Vikic-Topic, D., Varga-Defterdarovic, L. (2004). Spectroscopic studies of Methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide, *Bioorg Chem*, 32 560–570.
- Neshich, G., Mancini, A.L., Yamagishi, M.E., Kuser, P.R., Fileto, R., Pinto, I.P., Palandrani, J.F., Krauchenco, J.N., Baudet, C., Montagner, A.J., Higa, R.H., (2005) STING report: Collection of graphic and tabular sequence structure and function descriptors For an individual amino acid of PDB structures, *Nucleic Acids Res*. 1 (33) (Database Issue) D269–D274.
- Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Usami, J., Maeda, K. (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.
- Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y., Okada, H. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(2), 100-105.
- Okuyama, T., Satake, K. (1960). On the preparation and properties of 2, 4, 6-trinitrophenyl-amino acids and-peptides. *Journal Biochem*, 47, 454-466.
- Pasaoglu, H., Sancak, B., Bukan, N. (2004). Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med*, 203(3), 211-218.
- Peng, X., Ma, J., Chen, F., Wang, M. (2011). Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food Funct*, 2(6), 289-301.
- Phillips, A., Shaper, A.G., Whincup, P.H. (1989). Association between serum albumin and mortality from cardiovascular diseases, cancer and other causes, *Lancet*, 2 1434–1436.
- Petersen, B., Petersen, T. N., Andersen, P., Nielsen, M., Lundegaard, C. (2009). A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol*, 9, 51.
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol*, 91, 95-119.

- Pfenninger H., Brautechnische Analysen methoden, BandII, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommision (MEBAK), 3rd ed., Auflage, Selbstverlag der MEBAK, Freising,1993, p.60.
- Phillips, S. A., Thornalley, P. J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem*, 212(1), 101-105.
- Popova, E. A., Mironova, R. S., Odjakova, M. K. (2010). Non-enzymatic glycosylation and deglycatyng anzymes. *Biotechnol Biotechnol eq.*, 24, 1928-1934.
- Pun, P. B. L., Murphy, M. P. (2012). Pathological Significance of Mitochondrial Glycation. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 13.
- Radzicka, A., Pedersen, L., Wolfenden, R. (1988). Influences of solvent water on protein folding: free energies of solvation of cis and trans peptides are nearly identical. *Biochemistry*, 27(12), 4538-4541.
- Rae, C., O'Donoghue, S. I., Bubb, W. A., Kuchel, P. W. (1994). Stereospecificity of substrate usage by glyoxalase 1: nuclear magnetic resonance studies of kinetics and hemithioacetal substrate conformation. *Biochemistry*, 33(12), 3548-3559.
- Rahbar, S. (1968). An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta*, 22(2), 296-298.
- Rahbar, S., Figarola, J. L. (2003). Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419(1), 63-79.
- Ramasamy, R., Yan, S. F., Schmidt, A. M. (2006). Methylglyoxal comes of AGE. *Cell*, 124(2), 258-260.
- Rojas, A., Morales, M. A. (2004). Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci*, 76(7), 715-730.
- Rolo, A. P., Palmeira, C. M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212(2), 167-178.
- Ruggiero-Lopez, D., Lecomte, M., Moinet, G., Patereau, G., Lagarde, M., Wiernsperger, N. (1999). Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol*, 58(11), 1765-1773.
- Saito, K., Hamano, K., Nakagawa, M., Yugawa, K., Muraoka, J., Kuba, H., Furukawa, K., Azuma, T. (2011). Conformational analysis of human serum albumin and its non-enzymatic glycation products using monoclonal antibodies. *J Biochem*, 149(5), 569-580.
- Sastry, C. S. P., Tummuru, M. K. (1984). Spectrophotometric determination of arginine in proteins. *Food Chem.*, 257-260.

- Sato, T., Shimogaito, N., Wu, X., Kikuchi, S., Yamagishi, S., Takeuchi, M. (2006). Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 21(3), 197-208.
- Schalkwijk, C. G., Ligtvoet, N., Twaalfhoven, H., Jager, A., Blaauwgeers, H. G., Schlingemann, R. O., Tarnow, L., Parving, H. H., Stehouwer, C. D., van Hinsbergh, V. W. (1999). Amadori albumin in type 1 diabetic patients: correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries. *Diabetes*, 48(12), 2446-2453.
- Schalkwijk, C. G., Miyata, T. (2012). Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*, 42(4), 1193-1204.
- Schram, M. T., Schalkwijk, C. G., Bootsma, A. H., Fuller, J. H., Chaturvedi, N., Stehouwer, C. D. (2005). Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Hypertension*, 46(1), 232-237.
- Sell, D. R., Biemel, K. M., Reihl, O., Lederer, M. O., Strauch, C. M., Monnier, V. M. (2005). Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes. *J Biol Chem*, 280(13), 12310-12315.
- Sell, D. R., Monnier, V. M. (1989). Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem*, 264(36), 21597-21602.
- Sharma, K. K., Santhoshkumar, P. (2009). Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta*, 1790(10), 1095-1108.
- Sharma, S. D., Pandey, B. N., Mishra, K. P., Sivakami, S. (2002). Amadori product and age formation during nonenzymatic glycosylation of bovine serum albumin in vitro. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 6(4), 233-242.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.
- Slater, R. J. (1986). *Experiments in Molecular Biology*. Clifton, New Jersey: Humana Press, 1986. 269.
- Standeven, K. F., Ariens, R. A., Whitaker, P., Ashcroft, A. E., Weisel, J. W., Grant, P. J. (2002). The effect of dimethylbiguanide on thrombin activity, FXIII activation, fibrin polymerization, and fibrin clot formation. *Diabetes*, 51(1), 189-197.
- Takahashi, K. (1977). Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *J Biochem*, 81(2), 403-414.
- Takahashi, S., Uchino, H., Shimizu, T., Kanazawa, A., Tamura, Y., Sakai, K., Watada, H., Hirose, T., Kawamori, R., Tanaka, Y. (2007). Comparison of

- glycated albumin (GA) and glycated hemoglobin (HbA1c) in type 2 diabetic patients: usefulness of GA for evaluation of short-term changes in glycemic control. *Endocr J*, 54(1), 139-144
- Tanaka, Y., Uchino, H., Shimizu, T., Yoshii, H., Niwa, M., Ohmura, C., Mitsuhashi, N., Onuma, T., Kawamori, R. (1999). Effect of metformin on advanced glycation endproduct formation and peripheral nerve function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 376(1-2), 17-22.
- Tanji, N., Markowitz, GS., Fu C, Kislinger, T., Taguchi, A., Pischetsrieder, M., Stern, D., Schmidt, A.M., D'Agati, V.D. (2000) Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.*;11, 1656–1666.
- Thornalley, P. J. (1988). Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J*, 254(3), 751-755.
- Thornalley, P. J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol*, 27(4), 565-573.
- Thornalley, P. J. (2003a). Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6), 1372-1377.
- Thornalley, P. J. (2003b). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419(1), 31-40.
- Thornalley, P. J. (2005). Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*, 1043, 111-117.
- Thornalley, P. J., Langborg, A., Minhas, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, 344 Pt 1, 109-116.
- Thornalley, P. J., Rabbani, N. (2011). Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol*, 22(3), 318-325.
- Thornalley, P. J., Waris, S., Fleming, T., Santarius, T., Larkin, S. J., Winklhofer-Roob, B. M., Stratton, M. R., Rabbani, N. (2010). Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res*, 38(16), 5432-5442.
- Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2003). Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*, 25(3-4), 275-281.
- Torres, M. J., Turell, L., Botti, H., Antmann, L., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., Alvarez, B. (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., Botti, H., Carballal, S., Radi, R., Alvarez, B. (2009). Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(28), 3384-3392.
- UKPDSG, UK Prospective Diabetes Study Group (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34).. *Lancet*, 352(9131), 854-865.
- Ulrich, P., Cerami, A. (2001). Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*, 56, 1-21.
- VanderJagt, D. J., Harrison, J. M., Ratliff, D. M., Hunsaker, L. A., Vander Jagt, D. L. (2001). Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem*, 34(4), 265-270.
- Vinik, A. (2011). The question is, my dear watson, why did the dog not bark?: the joslin 50-year medalist study. *Diabetes Care*, 34(4), 1060-1063.
- Westwood, M. E., Thornalley, P. J. (1995). Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J Protein Chem*, 14(5), 359-372.
- Wondrak, G. T., Cervantes-Laurean, D., Roberts, M. J., Qasem, J. G., Kim, M., Jacobson, E. L., Jacobson, M. K. (2002). Identification of alpha-dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. *Biochem Pharmacol*, 63(3), 361-373.
- Yamagishi, S. (2011). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol*, 46(4), 217-224.
- Yamagishi, S., Amano S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M., Makita, Z. (2002) Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290, 973-978.
- Yao, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Pestell, R., Edelstein, D., Giardino, I., Suske, G., Ahmed, N., Thornalley, P. J., Sarthy, V. P., Hammes, H. P., Brownlee, M. (2006). Methylglyoxal modification of mSin3A links glycolysis to angiopoietin-2 transcription. *Cell*, 124(2), 275-286.
- Yan, H., i Harding, J.J. (2006) Carnosine inhibits modifications and decreased molecular chaperone activity of lens -crystallin induced by ribose and fructose 6-phosphate. *Mol. Vis.*, 12, 205-214.
- Yarema, M. C., Johnson, D. W., Berlin, R. J., Sivilotti, M. L., Nettel-Aguirre, A., Brant, R. F., Spyker, D. A., Bailey, B., Chalut, D., Lee, J. S., Plint, A. C., Pursell, R. A., Rutledge, T., Seviour, C. A., Stiell, I. G., Thompson, M.,

- Tyberg, J., Dart, R. C., Rumack, B. H. (2009). Comparison of the 20-hour intravenous and 72-hour oral acetylcysteine protocols for the treatment of acute acetaminophen poisoning. *Ann Emerg Med*, 54(4), 606-614.
- Zaia, D. A. M., Barreto, W. J. (1993). Spectrophotometric method for simultaneous determination of proteins and amino acids with p-benzoquinone. *Analitica Chimica Acta*, 277, 89-95.
- Zaia, D. A. M., Ribas, K. C. L., Zaia, C. T. B. V. (1999). Spectrophotometric determination of cysteine and/or carbocysteine in a mixture of amino acids, shampoo, and pharmaceutical products using p- benzoquinone. *Talanta*, 50, 1003-1010.
- Zeng, J., Davies, M. J. (2005). Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem Res Toxicol*, 18(8), 1232-1241.
- Zeng, J., Davies, M. J. (2006). Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem Res Toxicol*, 19(12), 1668-1676.
- Zheng, C. M., Ma, W. Y., Wu, C. C., Lu, K. C. (2012). Glycated albumin in diabetic patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*, 413(19-20), 1555-1561.
- Zoellner, H., Hou, J. Y., Hochgrebe, T., Poljak, A., Duncan, M. W., Golding, J., Henderson, T., Lynch, G. (2001). Fluorometric and mass spectrometric analysis of nonenzymatic glycosylated albumin. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(1), 83-89.

Biografija

Jelena M A imovi ro ena je 7.7.1976. godine u Zemunu. Prvu beogradsku gimnaziju završila je 1995. i iste godine upisala Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer biohemija (studijski program od 9 semestara). Diplomirala je 1.11.2000. sa srednjom ocenom 9.03 i ocenom 10 na diplomskom ispitu i stekla zvanje Diplomirani biohemi ar. Magistarski rad iz oblasti biohemijskih nauka, pod mentorstvom v. prof. dr Ljube Mandi , sa naslovom “Mogu nosti odre ivanja aktivnosti N-acetil- β -D-glukozaminidaze sa 2-metoksi-4-(2-nitrovinil)-fenil-N-acetil- β -D-glukozaminidom kao suspratom u baznim urinima“ odbranila je na Hemijskom Fakultetu u Beogradu, decembra 2005.

Od 2001. angažovana je na Hemijskom fakultetu kao pripravnik na istraživa kim poslovima, na Katedri za biohemiju. Od.2006. angažovana je na Hemijskom fakultetu u zvanju asistenta za užu nau nu oblast Biohemija. Reizabrana je u isto zvanje 2010.

U periodu od 2006-2010 bila je angažovana na nau no-istraživa kom projektu finansiranom od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije: “Ispitivanje strukture i funkcija biološki važnih molekula u fiziološkim i patološkim stanjima”

U periodu 2010-angažovana je na projektu FCUB-ERA 256716 (Ja anje Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u cilju uspostavljanja Centra izvrsnosti za molekularnu biologiju i istraživanje hrane u regionu Zapadnog Balkana) me unarodni projekat - Evropska unija (Brisel, Belgija)

U periodu 2011- angažovana je na projektu finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije “Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki zna ajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i zna aj” (172049)

lan je Srpskog hemijskog društva, lan je Biohemijskog drustva Srbije

Lista nau nih publikacija

Radovi u vrhunskim me unarodnim asopisima, M21:

1. Ljuba Mandi , Jelena A imovi , Vesna Jovanovi : The possibility of determining of N-acetyl- -D-glucosaminidase isoenzymes under alkaline conditions, Clin Biochem 38: 384-389 (2005) (IF 2.359 za 2005, Kategorija Medicinska laboratorijska tehnologija 4/23)
2. Jelena M.Acimovi , Bojana D. Stanimirovi , Nina Todorovi , Vesna B. Jovanovi , Ljuba M. Mandi : Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal, Chemico-Biological Interactions 188, 21-30 (2010) (IF 3,077 za 2008, Kategorija Toksikologija 18/75)
3. Jelena M. Acimovic; Vesna B. Jovanovic; Milica R. Veselinovic; Vesna Dimitrijevic Sreckovic; Ljuba M. Mandic: Method for monitoring of the protein amino group changes during carbonylation. Clin Biochem 44, 994-999 (2011) (IF 2.019 za 2009, Kategorija Medicinska laboratorijska tehnologija 8/29)
4. A imovi J.M., Jovanovi V.B., Sre kovi V.D., Penezi Romanjuk A.Z., Mandi L.M (2012). Monitoring of the human serum slbumin carbonylation level through determination of guanidino group content, Analyt Biochem doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.028>

Radovi u istaknutim me unarodnim asopisima, M22:

1. Ljuba Mandi , Radmila Maksimovi , Jelena A imovi , Dubravka Dobri : Change in the iso-enzyme profiles of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase in workers exposed to mercury; Toxicology and Industrial Health 18 (5): 207-214 (2002)

Radovi u me unarodnim asopisima, M23:

1. Jelena A imovi , Vesna Jovanovi , Ljuba Mandi : Influence of pigments and pH of urine on the determination of N-acetyl- -D-glucosaminidase activity with 2-methoxy-4-(2'-nitrovinyl)-phenyl-N-acetyl- -D-glucosaminide. Journal of Clinical Laboratory Analysis 19, 260-266 (2005) (IF 1.183 za 2003, Kategorija Medicinska laboratorijska tehnologija 15/26)
2. Jelena A imovi , Bojana Stanimirovi , Ljuba Mandi : The role of thiol group in protein modification with methylglyoxal. Journal of Serbian Chemical Society 74, 867-883 (2009) (IF 0.820 za 2009, Kategorija Hemija, multidisciplinarna 86/138)

Radovi saopštteni na skupovima medjunarodnog zna aja štampani u izvodu, M 34:

1. Lj. Mandi , V. Jovanovi , J. A imovi , V. Dimitrijevi , P. Djordjevi : "The influence of glucose content on the isoenzyme profiles of N-acetyl- -D-glucosaminidase in diabetes",

- 12 th Balcan Biochemical Biophysical days, Bucharest 2001, Book of abstracts, p 61
2. Lj. Mandi , V. Jovanovi , J. M. A imovi , V. Dimitrijevi : Isoenzymes of urinary N-acetyl- α -D-glucosaminidase-a marker of tubular or glomerular damage in diabetes? 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Euromedlab Barcelona 2003, Clin Chem and Lab Med, 41, S257, 2003.
3. J. M. A imovi , V. B. Jovanovi , Lj. Mandi : The influence of pigments and pH of urine on the determination of N-acetyl- α -D-glucosaminidase activity, 4th Aegean Analytical Chemistry days, Kusadasi 2004, p 159
4. V. B. Jovanovi , J. M. A imovi , Lj. M. Mandi : The influence of urinary pigments on the determination of N-acetyl- α -D-glucosaminidase. 16th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Glasgow 2005, Clinica Chimica Acta 355 (2005), S204-S205
5. V. B. Jovanovi , J. M. A imovi , V.S.Dimitrijevi -Sre kovi , Lj. M. Mandi : The investigation of serum N-acetyl- α -D-glucosaminidase and its isoenzymes as markers of the progression of diabetic complications in IDDM. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest 2005, FEBS journal, 272 (suppl 1) (2005), 495-496
6. B. D. Stanimirovi , J.M. A imovi , Lj.M. Mandi : In vitro investigation of the reaction of cystein-SH group and α -dicarbonyls. 5th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries on Chemical Sciences at the European crossroads, Ohrid 2006, Book of abstracts Vol. I, p 147
7. J. Ivanovska, J. Jankovic, J. Acimovic, B. Stanimirovic, Lj. Mandic: Kinetics of reaction of human serum albumin with methyl-glyoxal. 32nd FEBS Congress, Be 2007, Molecular Machines, FEBS journal 274 (Suppl. 1), 241, 2007.
8. J. Jankovic, J. Ivanovska, J. Acimovic, B. Stanimirovic, Lj. Mandic: Biochemical characterization of advanced glycation end products: modifications of thiol amino-acid residues. 32nd FEBS Congress, Be 2007., Molecular Machines, FEBS journal 274 (Suppl.1), 241, 2007.
9. Jelena M. A imovi , Vesna B. Jovanovi , Milica R. Veselinovi , Radmila Maksimovi , Ljuba M. Mandi . Monitoring of the protein amino group changes during carbonylation, 7th Aegean analytical chemistry days, Lesvos 2010, Book of abstracts, p. 284
10. Jelena M. Acimovi , Bojana D. Stanimirovi , Nina Todorovi , Vesna B. Jovanovi , Ljuba M. Mandi . Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and protein on the reaction with methylglyoxal. EuroFoodChem XVI, Gdansk 2011, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 61 (Suppl.1), 130, 2011
11. Ljuba M. Mandic, Vesna B. Jovanovic; Jelena M. Acimovic; Radmila Maksimovic. Does the sialic acid content in A form of N-acetyl- α -D-glucosaminidase influence the changes of its activities in diabetic secondary complications? 43rd IUPAC World Chemistry Congress, San Juan 2011, Abstract book, p. 216
12. V.B Jovanovi , J. M. A imovi , A. Z. Penezi , Lj. M. Mandi . Determination of human serum albumin thiol group. 16th European Conference on Analytical Chemistry, Beograd 2011, BC15
13. J.M. A imovi , V.B. Jovanovi , I.D. Pavi evi , Lj.M.Mandi . The spectrophotometric method for monitoring of protein guanidine group changes during

carbonylation. 16th European Conference on Analytical Chemistry, Beograd 2011, BC16

14. I.D. Pavicevic, V.J. Jovanovic, J.M. Acimovic, L.J.M. Mandic. Impact of fatty acids binding to human serum albumin on the reaction of free thiol group of albumin. 2nd FCUB-ERA workshop, Beograd 2011, P13.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu, M64:

1. J. A. imovi , B. Boj evski, V. Jovanovi , L.J. Mandi : Uticaj pH na odre ivanje aktivnosti N-acetil- -D-glukozaminidaze; XIII Kongres medicinske biohemije i laboratorijske medicine sa me unarodnim u eš em i XIX Biohemijski dani; Jugoslov. Med. Biohem. 21(2), 166 (2002)
2. J. A. imovi , B. Boj evski, V. Jovanovi , Lj. Mandi : Stabilnost izoenzima N-acetil- -D-glukozaminidaze u baznim urinima; XLI Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd 2003, Izvodi radova, str. 154
3. B.D. Stanimirovi , J.M.A imovi , J.Ž. Jankovi , J.V. Ivanovska, Lj.M. Mandi : Biohemijska karakterizacija krajnjih proizvoda glikozilovanja proteina: modifikacije bo nih ostataka amino kiselina i njihove spektroskopske osobine, 45. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad 2007, Izvodi radova, str. 96
4. J. M. A imovi , V. B. Jovanovi , A. Z. Penezic, I. D. Pavi evi , Lj. M. Mandi .Tioli malih molekulskih masa kao hvata i metilglioksala, 50. Jubilarno savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd 2012, Izvodi radova

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

Јасена Квишевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

*Модификација -5H групе ароматичних и-диоксидних и
рецидивних; идентификација производа модификације сулфидних и
других у аминимативу структура*

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јасена Квишевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Живковић

Број уписа _____

Студијски програм Доктор дисертационих курса

Наслов рада Верификација и друге апликације дигиталних јединица: истраживачки

Ментор проф. др. Вука Мандић

Потписани Јелена Живковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____

Јелена Живковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Модификација - Ф рунс црпаксма и дисертацијски једичења:
модификација производа, модификација одређивања и примене у иницијал
Трпаксе.
која је моје ауторско дело.

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

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

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

