

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Ana Penezić

**Humani serum-albumin: karbonilacija,
reaktivnost tiolne grupe Cys34 i vezivanje
bakar(II)-jona**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Ana Penezić

**Human serum albumin: Carbonylation,
reactivity of Cys34 thiol group and binding of
copper(II) ions**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentor:

dr Ljuba Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije za odbranu:

dr Ljuba Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu u penziji

dr Milan Nikolić,
docent Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Olgica Nedić,
naučni savetnik Instituta za primenu
nuklearne energije INEP Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze:

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ljubi Mandić, za priliku da pod njenim mentorstvom završim diplomski i master rad, i sada na kraju, doktorsku disertaciju. Hvala Vam na prenetom znanju, pomoći u radu, interesovanju za moju temu, strpljenju kada eksperimenti i pisanje naučnih radova nisu išli planiranim tokom i slobodi da uživam u naučno-istraživačkom radu u Vašoj laboratoriji. Međutim, ono zbog čega sam najzahvalnija je činjenica da sam uz Vas imala jedinstvenu priliku da radim ono što volim pored istinskog intelektualca, izuzetnog univerzitetskog profesora, i sjajne osobe. Hvala Vam na tome. Takođe, uz profesorku Mandić, moram da se zahvalim i dr Jasminki Koroliji, osobi neverovatnog znanja i fantastične energije, na svakom trenutku koji sam provela uz nju, svaki je bio dragocen.

Zahvaljujem se i mojim koleginicama iz „naše“ laboratorije 403, dr Vesni Jovanović i dr Jeleni Acimović, na svemu što sam od njih naučila, na pomoći koju su mi pružile tokom planiranja i izvođenja eksperimenata, i posebno, na lepim trenucima i prijatnoj atmosferi. Pored Vesne i Jelene, zahvalila bih se i dr Ivanu Pavićeviću, baš na svemu (a on zna koliko je to) – Ivanji, hvala!

Dr Milanu Nikoliću, zahvaljujem na savetima, interesovanju i pomoći da ova disertacija dobije svoj finalni oblik. Takođe, hvala na lepom druženju, još od mojih studentskih dana.

Dr Olgici Nedić, dugujem veliku zahvalnost, za pruženu šansu da ajncer zamenim pipetom i da radim ono što volim uz njenu (roditeljsku) podršku. Veliko hvala za sve savete i svu pomoć tokom izrade ove disertacije. Hvala i za sve ostalo što nije deo ove disertacije, a toga je mnogo, mnogo više.

Od 2014. godine radim u INEP-u sa sjajnim ljudima, hvala svima. Osećaj da dolaskom na posao zapravo dolaziš među drage ljude (a ne samo kolege) je neprocenljiv.

Dragana, Zoko, Gorane, Miloše i Nikola, sa vama delim pipete ali i sve ono ostalo što čini moj život lepim i bogatim (da, čak i kada se ne slažemo). Hvala što ste uz mene svaki dan.

Neizmernu zahvalnost, koju ne mogu opisati rečima, dugujem mojoj porodici, mojim Penezićima i mojim Protićima za sve što su mi pružili, ali na prvom mestu mojim roditeljima Zoranu i Željki, za svu ljubav i podršku koja me bezuslovno prati celog života. Bez vas ja danas ne bih bila čovek kakav jesam. Mama i tata, VVD! Konačno, hvala mojoj Nići zato što postoji i mom Saši jer uz njega je sve moguće.

Na kraju, iako nisi tu, znam da jesi – Zo hvala ti!

Autor

Humani serum-albumin: karbonilacija, reaktivnost tiolne grupe Cys34 i vezivanje bakar(II)-jona

Apstrakt: Humani serum-albumin (HSA) je najzastupljeniji protein krvne plazme (40-60% ukupnih proteina). Dominantni je antioksidant u cirkulaciji zahvaljujući slobodnoj tiolnoj grupi aminokiselinskog ostatka Cys34, kao i sposobnosti da sa visokim afinitetom veže redoks-aktivne jone. Na reaktivnost tiolne grupe Cys34 utiču brojni faktori, od kojih su promena konformacije HSA molekula usled karbonilacije i vezivanje masnih kiselina (MK), kao i vezivanje bakar(II)-jona za molekul HSA od posebnog značaja za ovu disertaciju. Relevantnost navedenih faktora u dijabetesu tipa II (DM II), kao patološkom stanju za koje je karakterističan karbonilini i oksidativni stres, povećana koncentracija MK i jona bakra u cirkulaciji, su takođe predmet ove disertacije. Konkretni ciljevi bili su da se ispita:

- 1) uticaj reakcije karbonilacije HSA molekula, *in vitro* i *in vivo*, na afinitet vezivanja bakar(II)-jona, odnosno da se utvrdi afinitet modifikovanog HSA za vezivanje ovih jona;
- 2) da li i u kom stepenu karbonilacija dovodi do otpuštanja jona bakra iz prethodno nagrađenih bakar(II)-HSA-kompleksa (*in vitro*);
- 3) efekat istovremenog vezivanja MK (zasićenih ili nezasićenih) i jona bakra(II) za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (određivanjem konstante brzine reakcije), bez prisustva i u prisustvu reagensa za karbonilaciju i
- 4) promena u afinitetu HSA prema jonima bakra *in vivo*, kod pacijenata sa dijagnozom DM II, kao i da li potencijalno otpuštanje jona bakra iz kompleksa sa HSA (uzrokovano karbonilacijom) kod ovih pacijenata utiče na stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, odnosno na promenu u aktivnosti enzima odbrane od oksidativnog stresa.

Afinitet HSA prema jonima bakra(II) smanjuje se nakon *in vitro* karbonilacije metilglioksalom (MG). Karbonilacija HSA-Cu(II)-kompleksa uzrokuje smanjenje sadržaja Cys34 tiolne grupe, konformacione promene HSA molekula, kao i otpuštanje vezanih bakar(II)-jona. Odnos između procenta smanjenja sadržaja slobodne tiolne grupe Cys34 i procenta smanjenja sadržaja HSA-vezanih bakar(II)-jona (R) iznosi $2,12 \pm 0,28$. Isti odnos ($1,96 \pm 0,36$) dobijen je i prilikom oksidacije Cys34 tiolne grupe, pri kojoj nije došlo do promene konformacije HSA molekula. Stoga

se može zaključiti da afinitet (kapacitet) HSA za vezivanje jona bakra(II), kao i otpuštanje ovih jona iz HSA-Cu(II)-kompleksa, zavisi od redoks-statusa Cys34 tiolne grupe.

Ispitivanjem međudejstva molekula HSA, MK i bakar(II)-jona, i njegovog uticaja na reaktivnost (konstantu brzine reakcije) Cys34 tiolne grupe nađeno je da vezivanje:

- MK (stearinska-Ste, oleinska-Ole, miristinska-Myr i MK iz ribljeg ulja-RU) za HSA povećava reaktivnost tiolne grupe za 20 do 80 % u odnosu na odmašćeni HSA. Povećanje zavisi od tipa i broja molekula MK vezanih za HSA ($r = 0.970$, $p < 0.001$);
- bakar(II)-jona za odmašćeni HSA i stearyl-HSA-kompleks ne dovodi do značajne promene u reaktivnosti Cys34 tiolne grupe;
- jona bakra za komplekse HSA sa Myr, Ole i MK izolovanim iz preparata RU dovodi do značajnog povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe od 86 do 114% u odnosu na odmašćeni HSA, pri čemu je doprinos vezivanja bakar(II)-jona konstantan i iznosi oko 33%.

Uticaj reakcije karbonilacije na vezivanje (otpuštanje) jona bakra(II) od strane kompleksa HSA sa MK (Ste, Ole, Myr i MK iz RU) ispitan je *in vitro*. Karbonilacija MK-HSA-Cu(II)-kompleksa dovodi do smanjenja sadržaja slobodne Cys34 tiolne grupe koje je praćeno otpuštanjem vezanih Cu(II)-jona. I u ovom slučaju odnos R, iznosi oko 2. Kako vezivanje MK i bakar(II)-jona za HSA dovodi do izraženih promena u reaktivnosti Cys34 tiolne grupe (od 86 do 114%) i budući da afinitet HSA za vezivanje jona bakra zavisi od sadržaja Cys34-SH grupe, moglo bi se očekivati da će reakcija karbonilacije MK-HSA-Cu(II)-kompleksa dovesti do drastičnog smanjenja sadržaja tiolne grupe i shodno tome do otpuštanja bakar(II)-jona. Međutim, smanjenje sadržaja Cys34-SH grupa u karbonilovanim MK-HSA-Cu(II)-kompleksima iznosi samo 5 do 18% (u zavisnosti od tipa i broja vezanih MK) u odnosu na odmašćeni HSA-Cu(II) kompleks, a sadržaj otpuštenih jona bakra od 2,4 do 8,1%. Utvrđeno je da reakcija karbonilacije (zbog konformacionih promena HSA i promena dostupnosti Cys34 tiolne grupe) ima dominantniji uticaj na promenu sadržaja HSA-SH grupa, i time na vezivanje-otpuštanje jona bakra, u odnosu na vezane MK. Važno je naglasiti da iako je smanjenje sadržaja tiolne grupe (dobijeno pri karbonilaciji svih MK-HSA-Cu(II)-kompleksa) malo, ono ima za direktnu posledicu otpuštanje redoks-aktivnih bakar(II)-jona, što je od velikog značaja za kompleksne biološke sisteme u kojima je neophodno regulisati katalitičku aktivnost metalnih jona.

Kakav je afinitet HSA za vezivanje jona bakra *in vivo*, u realnom sistemu u kome je koncentracija MK, redoks-aktivnih bakar(II)-jona i reaktivnih karbonilnih jedinjenja povećana, ispitano je kod pacijenata sa dijagnozom DM II (n=29). Nađeno je statistički značajno smanjenje sadržaja ukupnih serumskih tiola (za 27,5 %; $p < 0,01$) i sadržaja HSA tiolne grupe (za 28,5 %; $p < 0,01$) kod pacijenata, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba (n=20). Sadržaj bakar(II)-jona vezanih za HSA manji je za 24,1 %, dok je sadržaj ukupnog serumskog bakra povećan za oko 20 %, pri čemu su razlike u poređenju sa kontrolnom grupom statistički značajne ($p < 0,01$ odnosno $p < 0,05$). Upoređivanjem R odnosa između dijabetičnih pacijenata i zdravih osoba dobijaju se vrednosti od 0,50 do 2,54. Između sadržaja HSA tiolne grupe i sadržaja jona bakra(II) vezanih za HSA nađena je jaka pozitivna korelacija ($R=0,833$, $p < 0,001$). Imajući u vidu da je kod dijabetičara:

- prisutan visok stepen glikacije u cirkulaciji ($HbA_{1c} = 10,25 \pm 1,05$ %);
- povećana koncentracija serumskih karbonila u odnosu na kontrolnu grupu ($1,14 \pm 0,17$ nmol/L vs. $0,75 \pm 0,06$ nmol/L);
- utvrđena značajna promena konformacije HSA molekula, i
- utvrđeno postojanje krajnjih proizvoda neenzimske glikozilacije (AGEs),

a u kontekstu prethodnih *in vitro* eksperimenata, može se zaključiti da modifikacija HSA molekula u dijabetesu (*in vivo*) dovodi do smanjenja sadržaja HSA tiolne grupe i smanjenja afiniteta/kapaciteta za vezivanje bakar(II)-jona. Određivanjem aktivnosti enzima antioksidativne odbrane (SOD, CAT i GPx) u hemolizatima dijabetičara utvrđeno je izraženo prisustvo opšteg oksidativnog stresa, koji korelira sa karbonilnim stresom, i koji takođe može da doprinosi promeni sadržaja i redoks-statusa tiolne grupe, odnosno da utiče na vezivanje jona bakra.

Ispitivanjem reaktivnosti Cys34 tiolne grupe HSA izolovanog iz seruma pacijenata sa dijabetesom ustanovljeno je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje reaktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu ($12,0 \pm 0,9 \times 10^{-3} s^{-1}$ vs. $6,9 \pm 0,4 \times 10^{-3} s^{-1}$), što je verovatno posledica modifikacije HSA u karbonilnom stresu koja dalje uzrokuje veću izloženost tiolne grupe Cys34 okolini sredini (veću reaktivnost i smanjenje sadržaja).

Naučni doprinos ove disertacije ogleda se u produbljivanju saznanja o uticaju karbonilacije HSA na vezivanje bakar(II)-jona, njegovo otpuštanje iz kompleksa sa HSA, kao i uticaja redoks-

stanja Cys34 tiolne grupe HSA na afinitet za vezivanje ovih jona. Dobijeni rezultati, takođe, omogućavaju sagledavanje pojedinačnih i zbirnih uticaja vezivanja različitih MK za HSA, i reakcije karbonilacije HSA molekula na vezivanje bakar(II)-jona, promenu konformacije HSA molekula i na potencijal tiolne grupe kao hvatača reaktivnih karbonilinih vrsta. Na osnovu ovih rezultata mogao bi se predvideti kapacitet HSA kao antioksidanta, ali i kao potencijalnog prooksidanta koji uzrokuje pokretanje slobodno-radikalskih procesa u cirkulaciji, generišući oksidativni stres. Afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona u stanjima gde je povećan sadržaj MK i karbonilini stres, kao što je DM II, do sada nije ispitan. Sagledavanje sumarnih efekata karbonilacije HSA i vezivanja MK na njegovu sposobnost da vezuje/otpušta jone bakra u cirkulaciju daje ovoj disertaciji pored fundamentalnog i biomedicinskog značaj, budući da bi ova saznanja mogla doprineti u lečenju ili prevenciji nastanka sekundarnih komplikacija kod pacijenata sa dijagnozom DM II.

Ključne reči: albumin, bakar, tiolna grupa, karbonilacija, masne kiseline, dijabetes, karbonilni i oksidativni stres

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Patobiohemija

UDK broj: 577

Human serum albumin: Carbonylation, reactivity of Cys34 thiol group and binding of copper(II) ions

Abstract: Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in human plasma (40-60 % of total protein content). HSA is the main plasma antioxidant due to its Cys34 free thiol group, as well as, its ability to bind redox active ions with high affinity. The reactivity of Cys34 thiol group is influenced by many factors, from which, the change in HSA conformation caused by carbonylation, binding of fatty acids (FA) and binding of copper(II) ions are the most important for this doctoral dissertation. The relevance of these factors to diabetes type II (DMT II), as a pathological state that is characterized by oxidative and carbonyl stress, increased concentration of FAs and copper(II) ions in the circulation, was also the subject of this doctoral dissertation. Therefore, the aims of this dissertation were to examine:

1. the influence of HSA carbonylation *in vitro* and *in vivo* on its affinity to bind copper(II) ions, i.e. to determine the copper(II) binding affinity of modified HSA;
2. if, and in what extent the carbonylation leads to release of copper(II) ions from already formed copper(II)-HSA-complexes (*in vitro*);
3. the effect of concurrent binding of FAs (saturated and unsaturated) and copper(II) ions to HSA on the reactivity of Cys34 thiol group (determination of kinetics constant of Cys34 thiol group reaction with DNTB);
4. the change in the HSA-copper(II) binding affinity *in vivo*, in patients with DMT II, as well as, if the potential release of copper(II) ions from copper-HSA complexes (caused by carbonylation) in these patients leads to generation of reactive oxygen species, i.e. change in the activity of antioxidative enzymes.

The affinity of HSA for copper(II) ions is decreased upon *in vitro* carbonylation with methylglyoxal (MG). Carbonylation of HSA-Cu(II) complexes caused a decrease in the content of Cys34 thiol group, conformational changes in HSA molecule and release of HSA-bound copper(II) ions. The ratio between the percentage of decrease in the Cys34 thiol group content and percentage of decrease in the HSA-bound copper(II) content (R) is $2,12 \pm 0,28$. The same R ($1,96 \pm 0,36$) was obtained upon aerobic oxidation of Cys34 thiol group, whereas no conformational changes in HSA occurred. It can be concluded that the copper(II) binding affinity (capacity) of HSA, and the release of these ions from HSA-Cu(II) complexes, depends on the redox status of Cys34 thiol group.

Examination of the interplay between HSA molecule, FAs and copper(II) ions, and its effect on the reactivity of Cys34 thiol group (i.e. its kinetic constant for the reaction with DTNB) showed that binding of:

- FAs (stearic-Ste, oleic-Ole, myristic-Myr and FAs from fish oil-FO) to HSA leads to the increase of Cys34 thiol group reactivity from 20 to 80 % compared to defatted HSA. This increase depends on type and number of HSA-bound FAs ($r = 0.970$, $p < 0.001$);
- copper(II) ions to defatted HSA and Ste-HSA complex causes almost no effect on the Cys34 thiol group reactivity;
- copper(II) ions to HSA complexes with Myr, Ole and FAs from FO leads to significant increase in the Cys34 thiol group reactivity (86-114 %), with constant contribution of copper(II) ions of 33 %.

The effect of carbonylation on the binding/release of copper(II) ions to/from HSA-FA complexes (HSA complexed with Ste, Ole, Myr and FAs from FO) was examined *in vitro*. The carbonylation of FA-HSA-Cu(II) complexes leads to a decrease in the content of Cys34 thiol group followed by the release of bound copper(II) ions. The R ratio was around 2 in these experiments, as well. Having in mind that binding of FAs and copper(II) ions to HSA caused drastic changes in the Cys34 thiol group reactivity (86-114 %) and that the HSA copper binding affinity depends on the redox status of this thiol group, it could be expected that the carbonylation of FA-HSA-Cu(II) complex would cause a drastic decrease in the Cys34 thiol group content and consequently to releasement of HSA-bound copper(II) ions. However, the decrease in the Cys34 thiol group content upon carbonylation of FA-HSA-copper(II) complexes was 5 – 18 % (depending on the type and the number of bound FAs) compared to defatted HSA-copper(II) complex, and the content of released copper(II) ions was 2,4 – 8,1 %. It was determined that carbonylation reaction (by causing conformational changes in HSA molecule and changes in the Cys34 thiol group accessibility) had dominant effect on the Cys34 thiol group content, as well as on the binding/release of copper(II) ions, compared to HSA-bound FAs. It is worth noting that although a decrease in the thiol group content (upon carbonylation of all FA-HSA-Cu(II) complexes) is small, it causes the release of redox active copper(II) ions, having important consequences in complex biological systems where regulation of metal ion catalytic activity is necessary.

The HSA copper(II) binding affinity *in vivo*, was examined in DMT II patients (n = 29; sera of these patients showed an increased concentration of FAs, redox active copper(II) ions and reactive carbonyl species), and compared to healthy controls (n = 20). A statistically significant decrease in the content of total serum thiols (27,5 %, $p < 0,01$) and in the content of HSA thiol group (28,5 %, $p < 0,01$) was found, compared to healthy control group. The content HSA-bound copper(II) ions in these patients was lower for 24,1 % and the content of total serum copper was increased for about 20 %, compared to healthy control group. Both differences were statistically significant ($p < 0,01$ and $p < 0,05$ resp.). Comparison of R ratios between DMT II patients and healthy controls showed values ranging from 0,50 to 2,54. Also, a strong positive correlation was found between the content of HSA thiol groups and the content of HSA-bound copper(II) ions ($R = 0,833$, $p < 0,001$). Having in mind that in DMT II:

- there is a high level of glycation in the circulation ($HbA_{1c} = 10,25 \pm 1,05$ %);
- there is an increase in the concentration of serum carbonyls compared to the healthy control group ($1,14 \pm 0,17$ nmol/L vs. $0,75 \pm 0,06$ nmol/L);
- a significant conformational change in HSA was found, as well as
- the existence of advanced glycation end products (AGEs)

and related to mentioned *in vitro* experiments, it can be concluded that the modification of HSA molecule in DMT II (*in vivo*) leads to a decrease in both HSA thiol group content and HSA copper(II) binding affinity/capacity. Determination of antioxidative enzyme activity (SOD, CAT and GPx) in the erythrocyte hemolysates of DMT II patients showed marked presence of general oxidative stress, which correlates to carbonyl stress. This could also contribute to changes in the content and redox status of thiol group, and affect binding of copper(II) ions, as well.

Examination of the reactivity of Cys34 thiol group of HSA isolated from the sera of patients with DMT II revealed statistically significant ($p < 0,05$) increase compared to healthy control group ($12,0 \pm 0,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. $6,9 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), probably as a consequence of HSA modification due to carbonyl stress, leading to higher exposure of Cys34 thiol group to its surroundings (higher reactivity and content decrease).

Scientific contribution of this doctoral dissertation reflects in gathering in-depth knowledge about the effect of HSA carbonylation on its copper(II) binding affinity and the release of these ions from HSA-copper(II) complexes, as well as, the effect of the redox status of Cys34 thiol group

on the HSA copper(II) binding affinity. Results presented in this doctoral dissertation enable insights into the effects caused by binding of different FAs and carbonylation of HSA (both single and summed) on its copper(II) binding affinity, its conformation and on the potential of Cys34 thiol group as a reactive carbonyl species scavenger. Based on these results, antioxidative capacity of HSA could be anticipated, as well as its prooxidative potential which could launch free radical processes in the circulation, thus generating oxidative stress. The HSA copper(II) binding affinity in pathological states characterized by increased levels FAs and carbonyl stress, such as DMT II, has not been investigated so far. Anticipation of summary effects of HSA carbonylation and binding of FAs to HSA on its ability to bind and release copper(II) ions in the circulation provides this doctoral dissertation, besides fundamental, with biomedical significance, therefore contributing to treatment and prevention of secondary complications in patients with DMT II.

Keywords: albumin, copper, thiol group, carbonylation, fatty acids, diabetes, carbonyl and oxidative stress

Scientific field: Biochemistry

Scientific discipline: Patobiochemistry

UDK number: 577

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Metabolizam humanog serum-albumina i njegova fiziološka uloga	5
2.2. Struktura humanog serum-albumina	10
2.2.1. Primarna i sekundarna struktura humanog serum-albumina	10
2.2.2. Tercijarna struktura humanog serum-albumina i vezivna mesta za različite ligande	12
2.2.2.1. N-terminalni region HSA - mesto vezivanja bakar(II) – jona	14
2.2.2.2. Mesta za vezivanje masnih kiselina	15
2.3. Cys34 tiolna grupa humanog serum-albumina – svojstva i reaktivnost.....	20
2.4. Bakar(II)-joni u organizmu čoveka	22
2.4.1. Aktivnost jona bakra	23
2.5. Reakcija karbonilacije/glikacije humanog serum-albumina	26
2.5.1. Reaktivni dikarbonili – nastajanje i eliminacija.....	28
2.6. Karbonilni stres u dijabetesu tipa II – promene na molekulu HSA	30
3. MATERIJALI I METODE	32
3.1. Hemikalije i reagensi.....	32
3.2. Aparati i oprema.....	33
3.3. Uzorci seruma	34
3.4. Metode.....	34
3.4.1. Priprema komercijalnog HSA za in vitro eksperimente	34
3.4.2. Redukcija komercijalnog HSA.....	34
3.4.3. Izolovanje HSA iz seruma	35
3.4.4. Kompleksiranje HSA sa bakar(II)-jonima	36
3.4.5. Odmašćivanje HSA	36
3.4.6. Priprema kompleksa masna-kiselina-HSA i kompleksa masna kiselina-HSA-Cu(II)-joni	37
3.4.7. Karbonilacija HSA uzoraka in vitro	38
3.4.8. Određivanje koncentracije HSA	38
3.4.9. Određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu i slobodnih HSA-tiolnih grupa...39	
3.4.10. Određivanje konstante brzine reakcije Cys34-SH grupe sa DTNB reagensom	40

3.4.11. Određivanje sadržaja bakar(II)-jona vezanih za HSA i ukupne koncentracije bakra u serumu	41
3.4.12. Određivanje sadržaja guanidino-grupa na HSA molekulu	42
3.4.13. Određivanje sadržaja karbonilnih grupa u serumu	42
3.4.14. Identifikacija i određivanje sadržaja masnih kiselina vezanih za HSA gasnom hromatografijom.....	43
3.4.15. Izolovanje masnih kiselina iz komercijalnog preparata ribljeg ulja.....	44
3.4.16. Spektroskopske metode	45
3.4.16.1. Spektrofluorimetrijska analiza	45
3.4.16.2. Cirkularni dihroizam (CD).....	45
3.4.17. Elektroforetske metode	46
3.4.17.1. Nativna i SDS redukujuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	46
3.4.17.2. Izoelektrofokusingiranje	48
3.4.18. Imunoblot analiza sa autoradiografskom detekcijom	49
3.4.19. Određivanje aktivnosti enzima oksidativnog stresa	50
3.4.19.1. Određivanje aktivnosti katalaze	51
3.4.19.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze	52
3.4.19.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze.....	52
3.5. Obrada rezultata	52
4. REZULTATI I DISKUSIJA	54
4.1. Humani serum albumin – karbonilacija i afinitet za vezivanje bakar(II)-jona	54
4.1.1. Konformacione promena molekula HSA pri karbonilaciji i vezivanju jona bakra.....	57
4.2. Da li reakcija karbonilacije Cys34-tiolne grupe ima uticaja na otpuštanje bakar(II)-jona iz HSA-Cu(II)-kompleksa?	60
4.2.1. Da li je karbonilacija ostatka Cys34 sa MG uzrok otpuštanja jona bakra(II) iz HSA-Cu-kompleksa?	65
4.3. Međudejstva HSA, masnih kiselina i bakar(II)-jona: uticaj na reaktivnost Cys34 tiolne grupe.....	68
4.3.1. Vezivanjem bakar(II)-jona za kompleks HSA-masna kiselina menja se reaktivnost Cys34-SH grupe.....	69
4.3.2. Promena konformacije HSA i izloženosti ostatka Cys34 u kompleksima MK-HSA-Cu(II)	73
4.3.2.1. Zašto vezivanje masnih kiselina i jona bakra za HSA dovodi do velikog povećanja reaktivnosti tiolne grupe Cys34?	73

4.3.2.2. Kolika je izloženost ostatka Cys34 rastvaraču, odnosno dostupnost za reakciju?	75
4.4. Uticaj reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II)-kompleksa na vezivanje Cu(II)-jona	80
4.5. Relevantnost <i>in vitro</i> istraživanja za <i>in vivo</i> uslove: pacijenti sa dijagnozom <i>Diabetes mellitus</i> tip II	89
4.5.1. Promene u sadržaju HSA-SH grupe i bakar(II)-jona vezanih za HSA	90
4.5.2. Uzroci smanjenja sadržaja Cys 34 tiolnih grupa i otpuštanja jona bakra sa HSA u dijabetesu	94
4.5.2.1. Modifikacija HSA molekula u dijabetesu – karbonilacija i nastajanje AGEs	94
4.5.2.2. Oksidativni stres kod pacijenata sa dijagnozom <i>Diabetes mellitus</i> tip II	99
4.5.3. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA kod pacijenta obolelih od dijabetesa tipa II	103
5. ZAKLJUČCI	106
6. LITERATURA	111

Lista skraćenica

AFM	Afamin
AGEs	Krajnji proizvodi neenzimske glikozilacije; <i>eng.</i> advanced glycation end products
Ara	Arahidonska kiselina
ARG	α -fetoprotein povezani gen
ATP7A	Cu(I)ATP-aza
CAT	Katalaza
CMC	Karboksimetilcistein
CML	Karboksimetilizin
CTR1	Membranski importer bakra 1 (<i>eng.</i> Copper transporter)
DHA	Dokozaheksaenska kiselina
DM II	Diabetes mellitus tip II
EPA	Eikozapentaenska kiselina
GLO1	Glioksalaza 1
GLO2	Glioksalaza 2
GPX	Glutation-peroksidaza
GSH	Glutation (redukovani)
HbA1c	Glikovani hemoglobin
HSA	Humani serum-albumin
MBS	Vezivno mesto za metalne jone na HSA (<i>eng.</i> multimetal binding site)
MG	Metilglioksal
MK	Masna kiselina
Myr	Miristinska kiselina
NTS	N-terminalno visokoafinitetno mesto za bakar(II)-jone
Ole	Oleinska kiselina
RER	Rapavi endoplazmatski retikulum
ROS	Reaktivne kiseonične vrste (<i>eng.</i> reactive oxygen species)
RU	Riblje ulje
SOD	Superoksid-dizmutaza

Ste	Stearinska kiselina
STEAP	Membranska metaloreduktaza (<i>eng.</i> six-transmembrane epithelial antigen of prostate)
VitDBP	Vitamin D-vezujući protein
ZAS	Zasićeni amonijum-sulfat

1.UVOD

Humani serum - albumin (HSA) je najzastupljeniji protein krvne plazme, u koncentraciji od 0,6 mmol/L čini 40-60% ukupnih proteina. Odgovoran je za veći broj fizioloških funkcija kao što su regulacija onkotskog pritiska, transport jona metala, masnih kiselina, hormona, žučnih pigmenata i lekova (**Peteres, 1996**).

Molekul HSA u svojoj strukturi sadrži 35 ostataka cisteina (Cys), od kojih 34 grade 17 disulfidnih mostova (**Clerici i Colombo, 2014**). Tiolna grupa bočnog ostatka Cys34 je slobodna i može se nalaziti u redukovanom i oksidovanom obliku. Kod zdravih osoba 70-80% tiolne grupe Cys34 je u redukovanom obliku, te je HSA zapravo glavni antioksidant u cirkulaciji čineći 80% (0,5 mmol/L) ukupnog sadržaja slobodnih redukovanih tiola (**Ogasawara i Mukai, 2007; Clerici i Colombo, 2014**).

Osim tiolne grupe Cys34, antioksidativna uloga HSA zavisi i od njegovog svojstva da veže i iz cirkulacije ukloni slobodne bakar(II)-jone (**Taverna, 2013**). Slobodni/nevezani bakar(II)-joni dovode do oksidacije najzastupljenijih reduktanata krvne plazme (askorbat i različiti tioli), i, posledično, u redoks-ciklusu, do nastanka slobodnih radikala koji su uzročnici oksidativnog stresa (**Letelier i sar., 2010**). Katalizujući slobodno-radikalске reakcije i izazivajući oksidativni stres, joni bakra uzrokuju oštećenja ćelija i tkiva (**Gaetke,**

2003; Gaetke, 2014). Oksidativni i/ili karbonilni stres imaju važnu ulogu u patogenezi različitih bolesti kao i u procesu starenja. U patološkim stanjima poput *Diabetes mellitus-a* (DM) pokazano je povećanje koncentracije jona bakra u cirkulaciji (**Lowe i sar., 2017**). Zato je vezivanje slobodnih jona bakra veoma važno. Iako je ceruloplazmin glavni vezujući protein za jone bakra u krvnoj plazmi, HSA se, zbog velike koncentracije, smatra drugim glavnim rezervoarom ovog jona. Oko 15 % ukupnog sadržaja bakra u cirkulaciji vezuje se za HSA (**Bal i sar., 2013**). HSA poseduje dva vezivna mesta za jone bakra. Jedno je locirano na N-terminusu (NTS), a drugo je pozicionirano na interfejsu između domena I i II (MBS-*eng.* multi-metal binding site). NTS mesto vezivanja, koje čini tripeptid Ala-Lys-His, visokog je afiniteta (od 1 pmol, **Rozga, 2007**).

Antioksidativna svojstva HSA (nukleofilna antioksidativna uloga Cys34 i vezivanje jona bakra) se značajno menjaju u uslovima kada je HSA izložen ne-enzimskoj posttranslacionoj glikozilaciji (**Gryzunov i sar., 2003**), odnosno reakcijama glikacije/karbonilacije ugljenim hidratima i/ili reaktivnim dikarbonilima (glioksal, metilglioksal i deoksiglukazon). α -oksoaldehidi se stvaraju u značajnoj meri u patološkim stanjima kao što su dijabetes, Alzheimer-ova bolest, anemija, uremija, ateroskleroza, bolesti bubrega, srca i jetre, u inflamaciji i starenju. Kovalentna modifikacija (karbonilacija) proteina do koje dolazi u navedenim patološkim stanjima, predmet je brojnih studija, posebno ako se imaju u vidu posledice karbonilacije biomolekula (umrežavanje proteina, apoptoza, izazivanje inflamacije preko receptora za AGE, mikro- i makrovaskularne komplikacije). Pri karbonilaciji HSA molekula, modifikuju se bočni ostaci lizina, arginina i Cys34 na molekulu HSA, što za posledicu ima nastajanje krajnjih proizvoda glikacije (*eng.* Advanced Glycation Endproducts, AGEs). Ove reakcije dovode do promena u tercijarnoj strukturi HSA i posledično do promene njegove aktivnosti i funkcije (**Thornalley i sar., 1999, Anguizola i sar., 2013**).

U normalnim fiziološkim uslovima, molekul HSA vezuje od 0,1 do 2,0 molekula masnih kiselina (MK), dok se molarni odnos HSA/MK povećava i do 1:6 tokom gladovanja i ekstremnog vežbanja, kao i u stanjima poput dijabetesa, bolesti jetre i kardiovaskularnih bolesti (**Brodersen i sar., 1990; Roden i sar., 2000; Staehr i sar., 2003; de Almeida i sar.,**

2002; Paschos i Paletas 2009,; Jouven i sar., 2001; Oliver i Opie, 1994). Dokazano je da vezivanje MK za molekul HSA dovodi do konformacionih promena HSA molekula, koje za posledicu imaju pomenu dostupnosti/izloženosti tiolne grupe Cys34 okolnoj sredini (**Torres i sar., 2012; Pavićević i sar., 2014**), odnosno promenu njene reaktivnosti (konstante brzine reakcije) prema karbonilnim jedinjenjima.

Dijabetes, patološko stanje u kome je povišen sadržaj glukoze i reaktivnih karbonilnih vrsta u cirkulaciji, karakteriše značajna glikacija proteina plazme, smanjen sadržaj Cys34 tiolne grupe, kao i povišen sadržaj bakar(II)-jona i masnih kiselina. Rezultati istraživanja vezanih za sposobnost karbonilovanog HSA (*in vitro* i u dijabetesu) da veže jone bakra, bili su oprečni (**Guerin-Dubourg i sar., 2012; Gryzunov i sar., 2003**), a ukazano je i na potencijalnu vezu između redoks-stanja HSA i kapaciteta za vezivanje jona bakra. Drugim rečima, redoks-stanje tiolne grupe Cys34 može da utiče na hemijsku okolinu aminokiselinskih ostataka u NTS vezivnom mestu. Kakav je afinitet HSA za vezivanje jona bakra u stanjima kada je povećana karbonilacija, ali i sadržaj masnih kiselina, do sada nije ispitano.

Imajući sve ovo u vidu, predmet istraživanja ove doktorske disertacije je da se utvrdi potencijal reakcije karbonilacije (*in vitro* i *in vivo*) molekula HSA, i posebno tiolne grupe Cys34, na afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona, odnosno otpuštanje ovih jona iz kompleksa sa HSA; da se sagledaju efekti različitih masnih kiselina vezanih za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe karbonilovanog i nemodifikovanog HSA, a time i na vezivanje/otpuštanje jona bakra, kao i posledice ovih efekata na strukturu i funkciju HSA. Na osnovu predmeta istraživanja, definisani su i konkretni ciljevi ove disertacije:

- 1) Ispitivanje uticaja reakcije karbonilacije HSA molekula *in vitro* i *in vivo* na afinitet za vezivanje bakar(II)-jona, odnosno sagledavanje afiniteta modifikovanog HSA za vezivanje jona bakra (II);
- 2) Ispitivanje da li i u kom stepenu reakcija karbonilacije HSA molekula *in vitro* dovodi do otpuštanja jona bakra iz prethodno nagrađenih bakar(II)-HSA kompleksa, što bi pri fiziološkim uslovima moglo dovesti do stvaranja slobodnih

radikala i oksidativnog stresa u dijabetesu (i drugim patološkim stanjima koje karakteriše karbonilni stres);

- 3) Ispitivanje uticaja vezivanja zasićenih i nezasićenih masnih kiselina za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (određivanjem konstante brzine reakcije) i na afinitet za vezivanje jona bakra, bez prisustva i u prisustvu reagensa za karbonilaciju;
- 4) Sagledavanje promena u afinitetu HSA prema jonima bakra (*in vivo*) kod pacijenata sa dijagnozom *diabetes mellitus* tip II, kao i da li potencijalno otpuštanje jona bakra iz kompleksa sa HSA (uzrokovano karbonilacijom) kod ovih pacijenata utiče na nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, odnosno na promenu u sadržaju enzima odbrane od oksidativnog stresa.

2. PREGLED LITERATURE

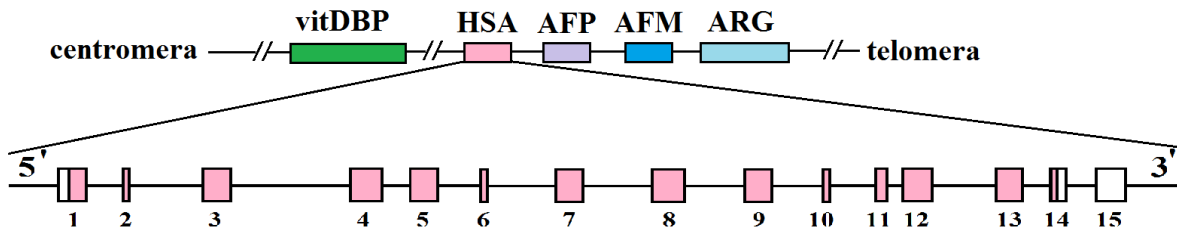
2.1. Metabolizam humanog serum-albumina i njegova fiziološka uloga

Humani serum-albumin (HSA) je monomerni, multidomenski protein koji nema kovalentno vezane ugljeno-hidratne i lipidne komponente, kao ni prostetične grupe. Sastoji se od 585 aminokiselinskih ostataka i ima molekulsku masu od oko 66,5 kDa.

HSA genetski pripada albuminskoj superfamiliji, koja uključuje i α -fetoprotein, vitamin D-vezujući protein (Gc-globulin), afamin (α -albumin). Geni za HSA, α -fetoprotein (AFP) i afamin (AFM) su tandemski raspoređeni, tako da imaju istu transkripcionu orijentaciju (**Kragh-Hansen, 2013**), dok je gen za vitamin D-vezujući protein udaljen i ima suprotnu transkripcionu orijentaciju (**Naidu i sar., 2010**). Svi ovi proteini imaju transportnu ulogu, a HSA se, usled svoje visoke zastupljenosti, smatra najvažnijim (**Kragh-Hansen, 2013**). Zastupljenost vitamin D-vezujućeg proteina (vitDBP) i AFM je mala i iznosi 5 $\mu\text{mol/L}$ odnosno 0,8 $\mu\text{mol/L}$ (redom), dok je AFP praktično odsutan u cirkulaciji odraslih, zdravih osoba. Naidu i sar. (2010) identifikovali su i petog člana ove genske superfamilije, α -fetoprotein-povezani gen (ARG), koji je usled velikog broja mutacija neaktivan pseudogen. Ovi geni prisutni su u jednoj kopiji, a četiri aktivna se eksprimiraju kodominantno tj. sa oba alela. Nalaze se na hromozomu 4, na njegovom dužem kraku u blizini centromere, na poziciji 4q11-13 (**Naidu i sar., 2010; Song i sar., 1999**). Gen za HSA (NCBI: NG_009291.1) ima 16961 nukleotida i podeljen je na četrnaest introna i petnaest egzona (**Minghetti i sar., 1986**) (**Slika 1.**)

Do danas je poznato 67 genetskih mutacija u humanom genu za HSA koje stvaraju različite varijante cirkulišućih proalbumina i albumina (aloalbumina) (**Kragh-Hansen, 2013**). Većina ovih mutacija nema velikog uticaja na razvoj nekog oboljenja, međutim, neke od njih mogu pogoditi delove molekula odgovorne za transportnu ulogu HSA, a mogu uticati i na konformaciju HSA i njegovu stabilnost (**Kragh-Hansen, 2013**).

Hromozom 4 pozicija 4q11-13



Slika 1. Pozicija albuminske superfamilije na hromozomu 4. vitDBP - vitamin D vezujući protein, HSA - humani serum-albumin, AFP - α -fetoprotein, AFM - afamin, ARG - α -fetoprotein-povezani gen. Gen za HSA: egzoni su predstavljeni obojenim pravougaonicima, a intronske sekvence crnom linijom. Slika je napravljena na osnovu unosa u PDB sa oznakom 5z0b. Pravougaonici sa belim poljima i beli pravougaonik kojim je označen egzon 15 predstavljaju kodirajuće sekvence koje ne podležu procesu translacije.

Sinteza HSA odvija se u hepatocitima. Sintetiše se translacijom iRNK molekula koji nosi informaciju za pre-pro-albumin (prekursor HSA) od 609 aminokiselina. Pre-peptid, koji čini 18 aminokiselinskih ostataka na N-terminusu, predstavlja signalnu sekvencu, koja se vezuje za SRP (*eng.* signal recognition particle) protein. SRP protein (sa vezanom signalnom sekvencom) se potom vezuje za receptor na membrani ravnog endoplazmatskog retikuluma (RER) (**Rapoport, 1992**). Kada rastući nascentni lanac dostigne određenu dužinu (50 - 75 aminokiselina), SRP molekul se odvaja, a za membranu RER-a vezuju se ribozomi, što dovodi do translokacije polipeptida u lumen RER-a. Signalna peptidaza (serin-proteaza), prisutna u lumenu, katalizuje hidrolizu signalne sekvence, čime nastaje pro-albumin koji na N-terminusu ima sekvencu od 6 aminokiselina (**Nothwehr i sar., 1990; Lee i Wu, 2015**). Uvijanje u nativnu konformaciju uz formiranje disulfidnih mostova počinje pre samog kraja sinteze HSA (**Ellis i van der Vies, 1991**). Iz RER-a, nakon završene translacije, pro-albumin se sekretornim vezikulama transportuje u Goldžijev aparat, gde se uklanja sekvencu od 6 aminokiselina na N-terminusu. Ovako nastaje zreo HSA od 585 aminokiselina i sa prosečnom molekulskom masom od 66,5 kDa, koji se pakuje u sekretorne vezikule i tako napušta ćeliju.

Ukupna količina HSA u ljudskom telu iznosi oko 280 g, što je oko 3% ukupnog proteinskog sadržaja (**Levitt i Levitt, 2016**). Zastupljenost HSA u intravaskularnom prostoru/cirkulaciji je oko 40%, a ostalih 60% distribuirano je u intersticijumu raznih organa, uglavnom mišića, ali i adipoznog i vezivnog tkiva, i kože (**Levitt, 2003**). Brzina sinteze je približno 150 mg/kg telesne mase dnevno za odraslu osobu od 70 kg. Svakoga dana sintetiše se oko 8,5% albumina plazme i 4% ukupnog albumina u organizmu, što odgovara izmeni ukupnog albumina za 25 dana (**Levitt i Levitt, 2016**). Važno je naglasiti da brzina sinteze zavisi i od dostupnosti aminokiselina, tj. njihove trenutne zastupljenosti u organizmu, što se posebno odnosi na triptofan (**van der Vusse, 2009**).

Poluživot HSA u plazmi (17,3 dana) je relativno dugačak zahvaljujući činjenici da se putem limfnog sistema protein redistribuira i do 28 puta između cirkulacije i ekstravaskularnog prostora (**Peters, 1996**). HSA napušta cirkulaciju putem fenestriranih kapilara, sinusoidnih kapilara, a u tkivima gde postoji kontinualna kapilarna mreža, putem aktivnog transcitotskog transporta, koji može uključiti i receptore, (**Merlot i sar., 2014**). Albumin-vezujući proteini i receptori za HSA identifikovani su u različitim tkivima i ćelijskim linijama, uključujući bubrežno tkivo, endotel, fibroblaste, kao i površinu tumorskih ćelija (**Merlot i sar., 2014**) (**Tabela 1**). Određeni receptori i albumin-vezujući proteini interaguju isključivo sa modifikovanim HSA molekulom, dok drugi vezuju njegovu nativnu/nepromenjenu formu. Značaj ovog podatka ogleda se u činjenici da npr. FcRn receptor omogućava nemodifikovanom HSA recirkulaciju kroz organizam. Vezujući se za HSA u kiselim uslovima, kakvi vladaju u lizozomu, FcRn receptor praktično štiti protein od degradacije (**Bern i sar., 2015**). Ukoliko je molekul HSA na neki način modifikovan, ili mu je promenjena nativna konformacija, ne dolazi do vezivanja za FcRn receptor, te se takav HSA degradira u lizozomu. Pored FcRn receptora, receptori gp60 (albondin) i SPARC takođe imaju ulogu u recirkulaciji HSA (**Schnitzer i Oh, 1993**). Nasuprot ovim receptorima, receptori gp18 i gp30, zaduženi su za uklanjanje starih, denaturisanih ili modifikovanih molekula HSA (**Schnitzer i Bravo, 1993**).

Tabela 1. Tkivna i ćelijska lokalizacija albumin-vezujućih proteina i receptora za HSA (adaptirano prema **Merlot i sar., 2014**)

Receptor	Tkivo/tip ćelije	Ligand
Albondin/gp60	Kontinualni endotel	Nativni HSA
gp18	Endotel, makrofagi, fibroblasti i površina kancerskih MDA-MB-453 ćelija prisutnih u karcinomu dojke	Modifikovani-HSA
gp30	Endotel, makrofagi, fibroblasti i površina kancerskih MDA-MB-453 ćelija prisutnih u karcinomu dojke	Modifikovani-HSA
SPARC	Endotelne ćelije, krvni sudovi glatke muskulature, skeletna muskulatura, fibroblasti, testisi, jajnici, ćelije pankreasa i različite tumorske ćelije	Nativni HSA
hnRNPs	Humane ćelijske linije tumora: CEM T-ćelija leukemije, MCF-7 ćelije karcinoma dojke i MV3 ćelije melanoma	Nativni HSA
Kalretikulin	Humane ćelijske linije tumora: CEM T-ćelija leukemije, MCF-7 ćelije karcinoma dojke i MV3 ćelije melanoma	Nativni HSA
FcRn	Endotelne ćelije, antigen-prezentujuće ćelije, intestinalno tkivo, bubrezi, plućno tkivo i krvno-moždana barijera (endotelne ćelije centralnog nervnog sistema i horoidnog pleksusa)	Nativni HSA
Kubilin	Ćelije proksimalnih tubula bubrega, intestinalne ćelije, placenta	Nativni HSA (moguće i modifikovani)
Megalin	Ćelije proksimalnih tubula bubrega, intestinalne ćelije, placenta, horoidni pleksus, tireociti, cilijarni epitel, pluća, paratiroidna, endometrijum, jajovod, srednje uho i epitelne ćelije epididimisa	Nativni HSA (moguće i modifikovani)

U ravnotežnom stanju, sinteza HSA je balansirana njegovom ekskrecijom putem bubrega (urinom), putem gastrointestinalnog trakta i kataboličkim razlaganjem. Renalnom i

gastrointestinalnom ekskrecijom gubi se redom oko 6%, odnosno 10% ukupnog HSA. Ostalih 84% kataboliše se uglavnom u koži i mišićima, primarno u fibroblastima (**Levitt i Levitt, 2016; Peters, 1996**), mada se mora naglasiti nedostatak informacija vezan za mesta katabolizma HSA (**Levitt i Levitt, 2016**). Put degradacije HSA vodi preko ulaska u endocitotske vezikule, koje se spajaju sa lizozomom, formirajući sekundarni lizozom. U ovom ćelijskom odeljku odvija se brza enzimska degradacija na kiselom pH (5-5,5), uz utrošak energije koja je obezbeđena hidrolizom pirofosfata (**Beeken i Imredy, 1962; Peters 1996**). Krajnji proizvodi degradacije HSA su slobodne aminokiseline, koje ulaze u ukupan aminokiselinski rezervoar organizma (**Peters, 1996**).

HSA je najzastupljeniji protein humane plazme (40-60% ukupnih proteina), sa prosečnom koncentracijom od 42 g/L (0,6 mmol/L) (**Peters, 1996**). Imajući u vidu pomenuti sadržaj ovog molekula u organizmu, kao i njegovu distribuciju, jasno je da je njegova fiziološka i farmakološka uloga višestruka:

- Održavanje onkotskog pritiska (HSA doprinosi sa 80%) i među-tkivna distribucija tečnosti (**Peters, 1996; Evans, 2002;**).
- Održavanje pH krvi (**Peters, 1996**).
- Transportna uloga; HSA je transporter brojnih egzogenih i endogenih jedinjenja, među kojima su masne kiseline, lekovi, L-Triptofan (Trp), brojni joni metala (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , ...), žučne kiseline, bilirubin, hem, hormoni (**Curry i sar., 1998, 2009; Bal i sar., 2013; Peters, 1996; Sun i Wong, 1985; Takikawa i sar., 1987; Ascenzi i sar., 2015**).
- Antioksidativna uloga: svojom slobodnom tiolnom grupom Cys34, a usled visoke koncentracije, HSA predstavlja dominantni izvor slobodnih tiola i primarnu antioksidativnu zaštitu organizma. Pored Cys34, vezivanje dvovalentnih jona prelaznih metala (koji katalizuju slobodno-radikalске reakcije Fenton-ovog tipa), i njihovo uklanjanje iz cirkulacije, predstavlja dodatnu antioksidativnu zaštitu (**Oettel i Stauber, 2007; Gryzunov i sar., 2003**);

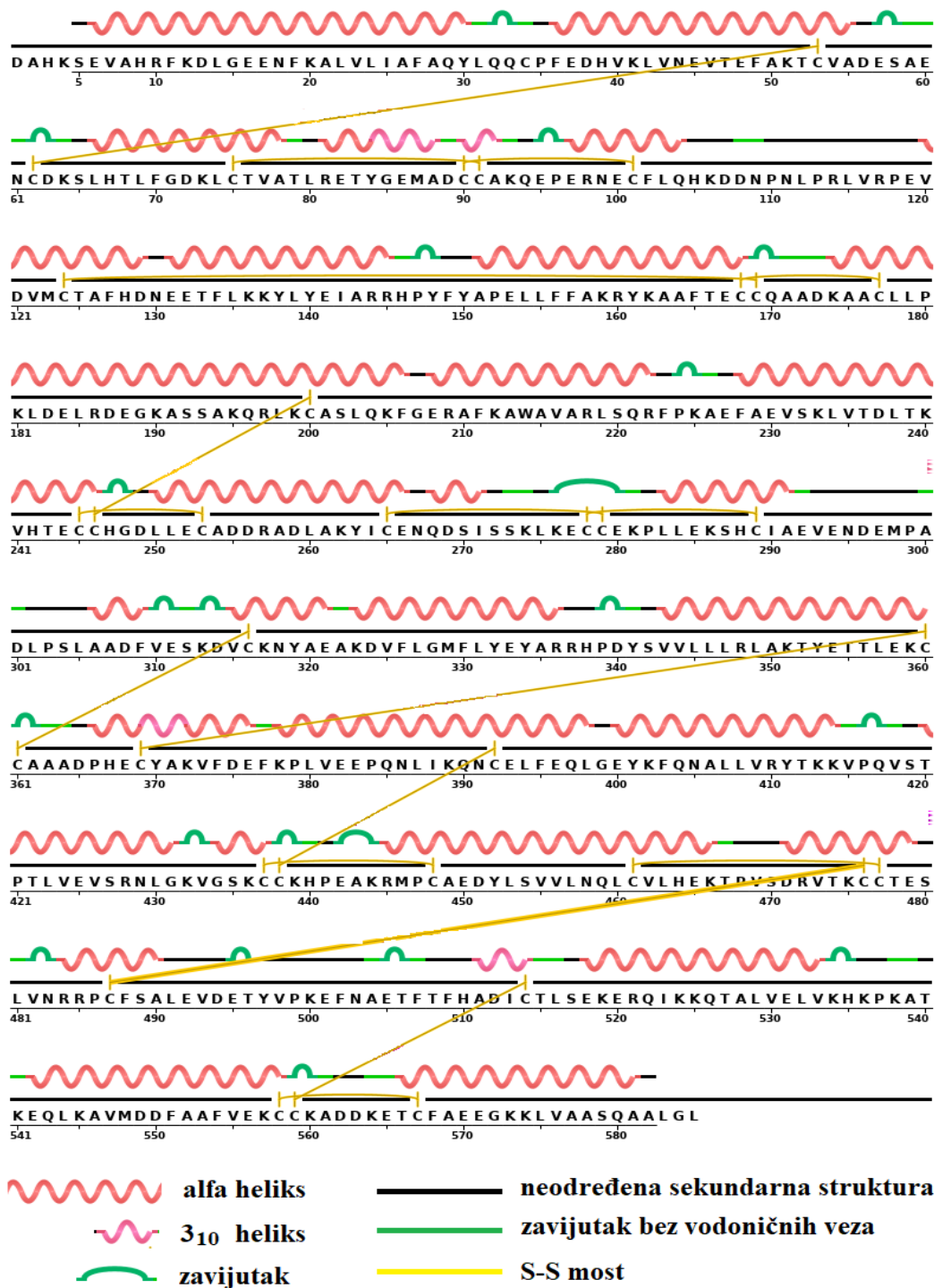
- Terapija različitih stanja: primena u hipovolemiji, stanjima šoka, tretmanu opekotina na velikoj površini kože, hipoalbuminemiji itd (**Liberati i sar., 2006, Fanali i sar., 2012**).
- Kao biomarker razvoja i terapije određenih patoloških stanja: kancer, reumatoidni artitis, ishemija, post-menopauzalna gojaznost, oboljenja u kojima je potrebna kontrola glikemije (**Gupta i Lis, 2010; Koga i sar., 2009; Sbarouni i sar., 2010; Fanali i sar., 2012**).

2.2. Struktura humanog serum-albumina

2.2.1. Primarna i sekundarna struktura humanog serum-albumina

Zreli molekul albumina ima 585 aminokiselina u primarnoj strukturi. Među ovim aminokiselinama nalazi se 35 Cys ostataka, od kojih 34 formira 17 disulfidnih mostova, dok je tiolna grupa prvog ostatka Cys u sekvenci, Cys34, slobodna. Karakteristično za HSA je i prisustvo jednog Trp na poziciji 214, kao i odsustvo Asn-X-Ser/Thr sekvence, neophodne za N-glikozilaciju u posttranslacionoj obradi proteina (**Peters, 1996; Sugio i sar., 1995; Bhattacharya i sar., 2000**) (Slika 2). U primarnoj strukturi HSA, dominiraju kisele aminokiseline, a uočljiva je veća zastupljenost Cys, Leu, Glu i Lys u odnosu na druge aminokiseline (**Peters, 1996**).

U sekundarnoj strukturi nativnog HSA, dominantni su α -heliksi koji čine 67% ukupne strukture, a karakteristično je potpuno odsustvo β -pločica (**Slika 2**).

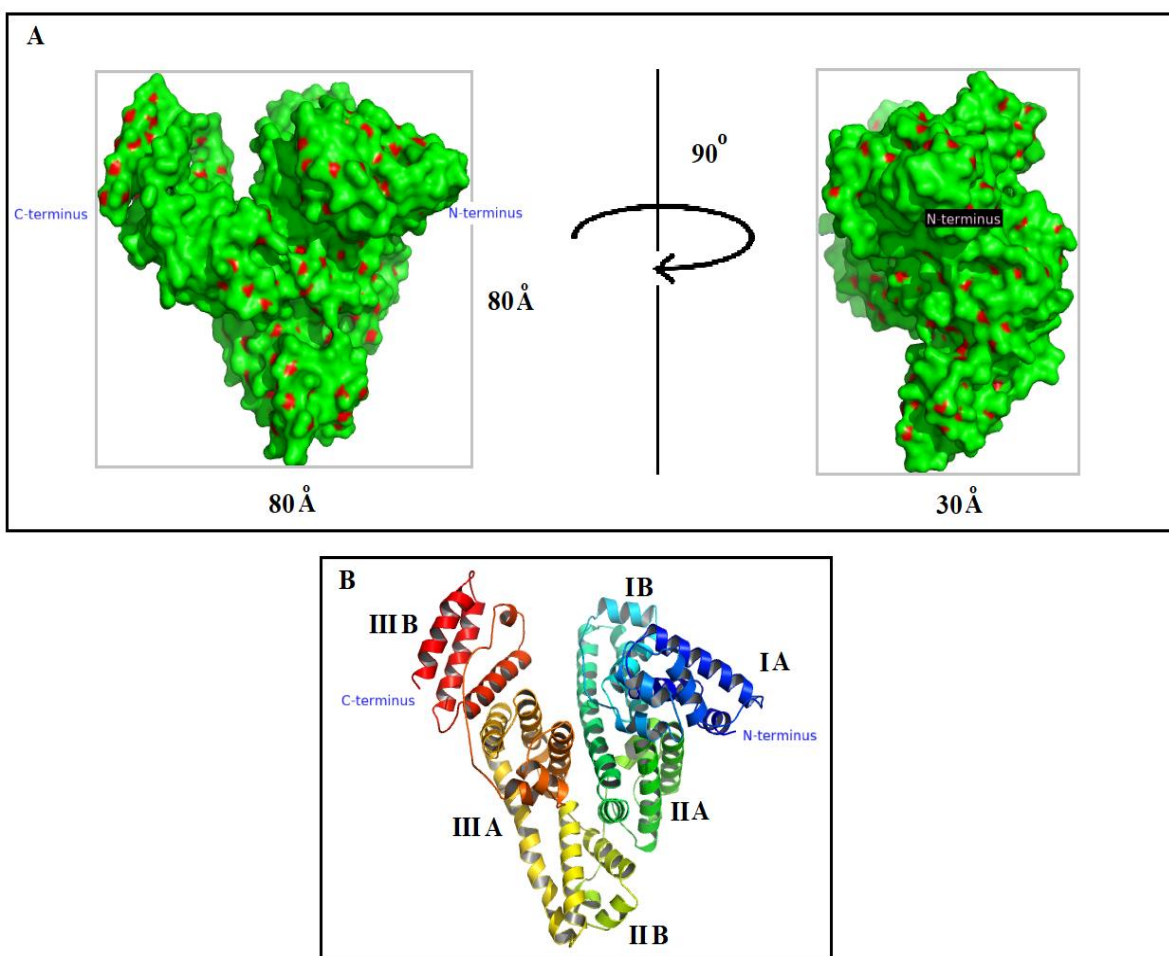


*Nomenklatura prema DSSP - Define Secondary Structure of Proteins

Slika 2. Primarna i sekundarna struktura HSA; Prikaz je preuzet iz PDB baze, za unos 5z0b.

2.2.2. Tercijarna struktura humanog serum-albumina i vezivna mesta za različite ligande

U nativnoj konformaciji, molekul HSA ima dimenzije 80x80x30 Å i oblik koji podseća na srce (Slika 3A) (Sugio i sar., 1999). Heliksi i ostale sekundarne strukture (zavijutci i petlje) formiraju tri homologa domena, I (ostaci 1-195), II (ostaci 196-383) i III (ostaci 384-585), koji se nedvosmisleno uočavaju (Slika 3B) (Sugio i sar., 1999). Domeni su dalje organizovani u subdomene, A i B. U subdomenu A nalazi se 6, a u subdomenu B, 4 heliksa, koji su međusobno povezani fleksibilnim petljama i zavijutcima (Sugio i sar., 1999; Minghetti i sar., 1986).



Slika 3. Tercijarna struktura HSA. A) Prikaz površine nativnog HSA molekula i njegovih dimenzija; B) Domenska i subdomenska organizacija HSA: domeni su označeni rimskim brojevima I, II i III, a subdomeni slovima A i B. Slika je napravljena upotrebom programa PyMol za PDB unos 5z0b.

Sva tri domena HSA molekula imaju sličnu trodimenzionalnu strukturu, ali je njihov međusobni raspored asimetričan. Domeni I i II postavljeni su skoro pod uglom od 90 stepeni, jedan u odnosu na drugi, i interaguju posredstvom vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija. Domen III „izviruje“ iz subdomena IIB pod uglom od 45 stepeni, i sa domenima I i II sklapa oblik slova Y. Domen III interaguje uglavnom sa subdomenom IIB, dok svega nekoliko interakcija ostvaruje sa domenom I (**Sugio i sar., 1999**). Ovakva organizacija domena daje molekulu HSA njegov karakterističan srcoliki oblik, a takođe i omogućava izuzetnu fleksibilnost prilikom vezivanja različitih liganada (**Carter i Ho., 1994**).

Prema prirodi liganda, mesta za vezivanje na HSA molekulu (**Tabela 2**) mogu se podeliti na:

- Mesta za vezivanje metalnih jona (**Bal i sar., 1998; Bal i sar. 2013**);
- Mesta za vezivanje masnih kiselina (**Bhattacharya i sar., 2000; Curry i sar. 1999**);
- Mesta za vezivanje različitih lekova (Sudlow I i Sudlow II) (**Sudlow i sar., 1975**);
- Mesto za vezivanje bilirubina (**Zunszain i sar., 2008**);
- Mesto za vezivanje hema (**Kamal i Behere, 2005**).

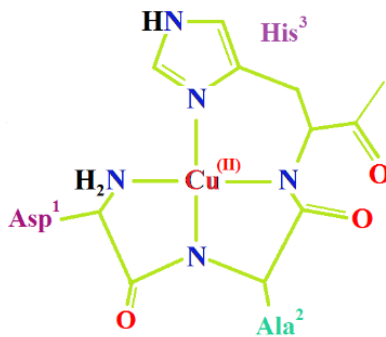
Tabela 2. Vezivna mesta za različite ligande na molekulu HSA

Vezivno mesto	Tip liganda	Lokalizacija vezivnog mesta
NTS (N-terminal binding site)	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}	Tetrapeptid na N-terminusu (Asp-Ala-His-Lys; DAHK)
MBS (<i>eng.</i> Multimetal binding site)	Zn^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+}	Dodirna površina domena I i II
Cys34	Hg^{2+} , Au^+	Subdomen IA
FA1	Masne kiseline	Subdomen IB
FA2	Masne kiseline	Dodirna površina subdomena IA-IIA

FA3	Masne kiseline	Subdomen IIIA
FA4	Masne kiseline	Subdomen IIIA
FA5	Masne kiseline	Subdomen IIIB
FA6	Masne kiseline	Dodirna površina subdomena IIA i IIB
FA7	Masne kiseline	Subdomen IIA
Sudlow I	Organska heterociklična jedinjenja u anjonskoj formi (varfarin, fenilbutazon)	Subdomen IIA
Sudlow II	Aromatična jedinjenja (ibuprofen, diazepam, halotan, propofol)	Subdomen IIIA
Hidrofobni džep L-oblika	Bilirubin	Subdomen IB
Hidrofobna šupljina D-oblika	Hem	Subdomen IB

2.2.2.1. N-terminalni region HSA - mesto vezivanja bakar(II) – jona

N-terminalni region HSA (NTS) je visoko-afinitetno mesto za vezivanje jona bakra. Molekul HSA vezuje ove jone posredstvom N-terminalnog tetrapeptida Asp-Ala-His-Lys (DAHK) i to sa afinitetom od 1 pM na pH 7,4 (**Rozga i sar., 2007**). Glavna odlika ovog mesta je da u koordinaciji jona metala učestvuju deprotonovani atomi azota, azot iz peptidnih veza alanina (Ala) i histidina (His), i alanina i aspartata (Asn), zajedno sa atomom azota iz terminalne α -amino-grupe i azotom iz imidazolovog prstena His (**Bal i sar., 2013**) (**Slika 4**). Za ovakvo tetrakordinativno mesto vezuju se joni metala koji grade kvadratno-planarne komplekse, kao što su joni Cu^{2+} ili Ni^{2+} (**Kozlowski i sar., 1999**). NTS vezivno mesto na molekulu HSA nije do sada kristalografski okarakterisano i pretpostavlja se da ostaje visoko neuređene strukture, tj. da zauzima različite konformacije i u čvrstom stanju u uslovima kristalizacije (**Bal i sar., 2013**).



Slika 4. Mesto visokog afiniteta za vezivanje jona Cu^{2+} na N-terminusu molekula HSA.

Iako HSA ima dva specifična mesta za vezivanje jona bakra, NTS i MBS (*eng.* Multimetal binding site), u fiziološkim uslovima, samo je NTS mesto zauzeto ovim jonima zahvaljujući visokom afinitetu, kao i činjenici da je koncentracija HSA u velikom višku u odnosu na jone Cu^{2+} (**Bal i sar., 2013**). U cirkulaciji zdravih osoba, samo 1-2% ukupnih molekula albumina ima vezane jone bakra (**Sokolowska i sar., 2002, Bal i sar., 2013**).

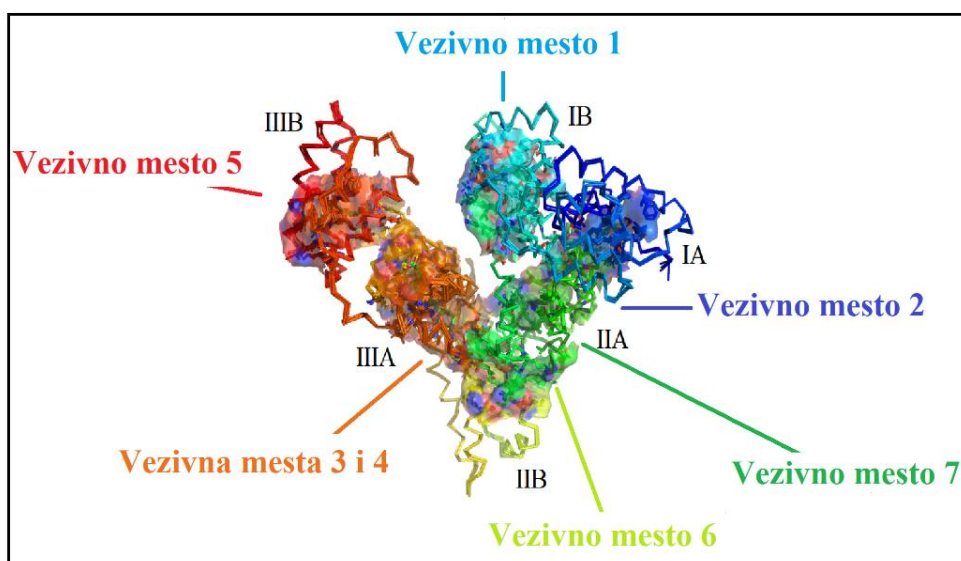
^1H NMR studijom utvrđeno je da NTS vezivno mesto, preciznije His3, interaguje sa tiolnom grupom Cys34 (**Christodoulou i sar., 1995**). Ovom studijom otvoreno je pitanje promene afiniteta NTS mesta za jone bakra (II) u zavisnosti od redoks stanja tiolne grupe Cys34, a time i antioksidativne uloge HSA (**Gryzunov i sar., 2003**).

2.2.2.2. Mesta za vezivanje masnih kiselina

Koncentracija masnih kiselina u cirkulaciji kod zdravih osoba iznosi 250-500 $\mu\text{mol/L}$ (**Rogiers, 1981**), dok se u patološkim stanjima (kancer, dijabetes, metabolički sindrom, gojaznost) i pri ekstremnim fizičkim naporima može povećati (**Steinfeld i sar., 1961**). Pri normalnim fiziološkim uslovima, kod zdrave populacije, masne kiseline se vezuju za HSA u odnosu od 0,1 do 0,2 mola po molu HSA (**Brodersen i sar., 1990; Simard i sar., 2006**). Međutim, u uslovima kao što su gladovanje i ekstremna fizička aktivnost (**Spector, 1986; Brodersen i sar., 1990**), kao i u patološkim stanjima poput dijabetesa, metaboličkog

sindroma, bolesti jetre i kardiovaskularnih bolesti, ovaj odnos može ići i do 6:1 u korist masnih kiselina (Peters, 1996; Cistola, 1991).

Detaljnim ispitivanjem kristalografskih struktura kompleksa HSA i različitih masnih kiselina utvrđeno je postojanje sedam različitih mesta za vezivanje ovih liganada (Petipas i sar., 2001), kao i tri dodatna mesta koja omogućavaju vezivanje određenih masnih kiselina srednjeg lanca (Bhattacharya i sar., 2000). Mesta su raspoređena u sva tri domena HSA (Slika 5), a neka se poklapaju sa mestima za vezivanje lekova, Sudlow I i II. Na ovim mestima vezuju se zasićene, mono- i poli-nezasićene masne kiseline, kratkog, srednjeg i dugog lanca. Opisani su i kristalografski okarakterisani kompleksi sa miristinskom (Myr; C14), stearinskom (Ste; C18), oleinskom (Ole; C18:1; *cis*-9) i arahidonskom kiselinom (Ara; C20:4; *cis*-5,8,11,14) (Petipas i sar., 2001; Bhattacharya i sar., 2000).



Slika 5. Veživna mesta za masne kiseline na molekulu HSA. Prikazane su površine svakog veživnog mesta za miristinsku (Myr), stearinsku (Ste), oleinsku (Ole) i arahidonsku (Ara) kiselinu. Slika je napravljena upotrebom programa PyMol za PDB unose 1bj5, 1e7i, 1gni i 1gnj.

Mesta označena brojevima od 1 do 5 su mesta sa najvećim afinitetom. Ona u svom sastavu sadrže konzervirane aminokiselinske ostatke (Curry i sar., 1998; Bhattacharya i sar., 2000).

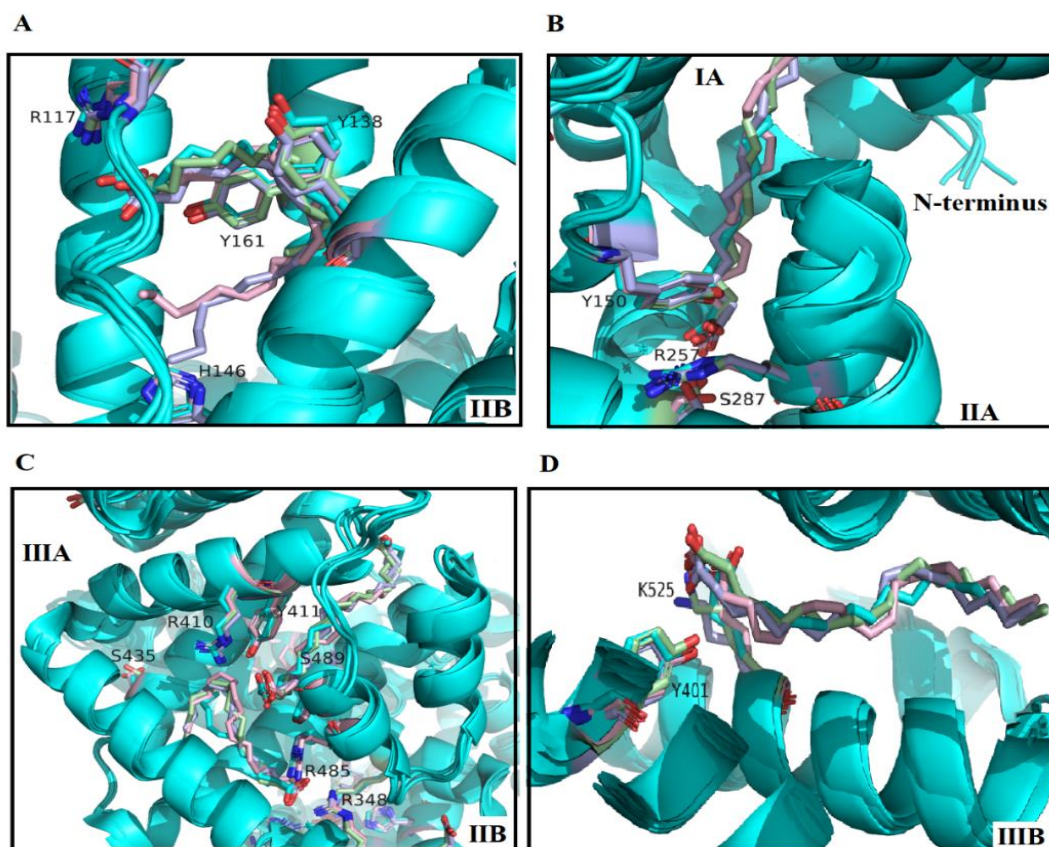
Mesto **1** (**Slika 6 A**) nalazi se u šupljini, koja ima oblik slova D, pozicioniranoj u centru strukture koju čine četiri heliksa subdomena IB (**Bhattacharaya i sar., 2000**). Ovo mesto je relativno otvoreno, a time i dostupno rastvaraču. Sve masne kiseline vezuju se za ovo mesto u istoj orijentaciji, odnosno svojom karboksilnom grupom (polarnom „glavom“) ostvaruju vodonične veze sa ostatkom Arg117 i sa molekulom vode koji je koordinisan hidroksilnom grupom Tyr161. Napolarni „rep“ zasićenih masnih kiselina dugog lanca uvijek se u unutrašnjosti šupljine, tako da je njegov kraj u neposrednoj blizini His146, koji se nalazi na dnu mesta 1 (**Bhattacharaya i sar., 2000**). Mesto 1 je primarno mesto za vezivanje zasićenih masnih kiselina srednjeg lanca (C10:0 – C14:0), dok se zasićene masne kiseline dugog lanca ne uklapaju na ovo mesto sa podjednako efikasnošću (**Bhattacharaya i sar., 2000**). Vezivanje masnih kiselina dugog lanca za ovo mesto je verovatno ograničeno rastvorljivošću same masne kiseline. (Poli)nezasićene masne kiseline dugog lanca (C18:1 i C20:4) vezuju se za mesto 1 uz promenljiv položaj karboksilne grupe i dobro ukplapanje nepolarnog „repa“ (**Petipas i sar., 2001**).

Mesto **2** locirano je između subdomena IA i IIA, i najzatvorenije je od svih vezivnih mesta za masne kiseline, budući da je i karboksilna grupa liganda zaštićena od prisustva rastvarača (**Slika 6 B**). Vezivanjem masnih kiselina za ovo mesto dolazi do konformacionih promena na molekulu HSA, a u njihovom odsustvu ovo mesto se deli na dva polu-mesta (**Curry i sar., 1998, 1999**). Tokom vezivanja masnih kiselina, formira se produženi džep rotacijom domena I u odnosu na domen II. Ova konformaciona promena stabilizovana je vezivanjem liganda (**Bhattacharaya i sar., 2000**). Karboksilna grupa masne kiseline interaguje posredstvom vodonične veze sa ostacima Tyr150, Arg257 i Ser287, dok se nepolarni „rep“ linearno prostire duž uske hidrofobne šupljine, nastale spajanjem IA i IIA subdomena. Za ovo mesto vezuju se masne kiseline srednjeg i dugog lanca. U slučaju vezivanja (poli)nezasićenih masnih kiselina, dolazi do stvaranja zonskih proširenja šupljine, prečnika 1,2 Å (**Petipas i sar., 2001**), mada i same masne kiseline (Ole i Ara) podležu konformacionoj promeni, odnosno vezuju se u „izduženom“ obliku.

U mestima **3** i **4** (**Slika 6 C**), lociranim u subdomenima IIB i IIIA, masne kiseline vezuju se pod skoro pravim uglovima pri čemu dolazi do međusobnog kontakta „repovima“. U mestu 3 polarna „glava“ masne kiseline interaguje vodoničnim vezama sa ostacima Ser342

i Arg348 iz subdomena IIB, i Arg485 iz subdomena IIIA (Bhattacharaya i sar., 2000). Mesto 3 je kratko, široko i potpuno zatvoreno. Polinezasićene masne kiseline na ovom mestu vezuju se u svojoj normalnoj „U“ konformaciji (Petipas i sar., 2001). Mesto 4 je duže i usko, a konformacije vezanih masnih kiselina su slične zbog sužavanja hidrofobnog tunela u kome se uklapa metilenski „rep“. Polarne „glave“ interaguju vodoničnim vezama sa Arg410, Tyr411 i Ser489, koji se nalaze na spoljašnjoj površini subdomena IIIA (Bhattacharaya i sar., 2000).

Mesto 5 čini hidrofobni kanal koji se prostire u subdomenu IIB (Slika 6 D). „Polarna“ glava interaguje sa ostatkom Lys525, a ova interakcija je u većini slučajeva potpomognuta i dodatnom interakcijom sa Tyr401 (Bhattacharaya i sar., 2000). Polinezasićene masne kiseline se na ovom mestu vezuju u samo jednoj konformaciji, koja je izdužena zbog uske građe samog tunela (Petipas i sar., 2001).



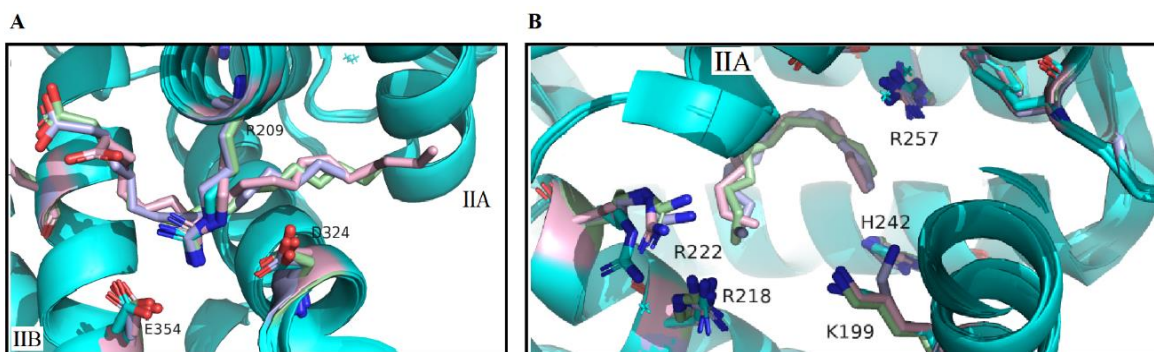
Slika 6. Visokoafinitetna vezivna mesta za masne kiseline na molekulu HSA. Na slikama su prikazani subdomeni u molekulu HSA u kojima su locirana vezivna mesta, aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju i vezane masne kiseline. A-mesto 1, B-mesto 2, C-mesta 3

i 4, D-mesto 5. Različitim bojama označene su različite masne kiseline, kao i ostaci koji učestvuju u njihovom vezivanju na svakom od pet mesta: tirkiz – Myr, zelena – Ste, svetloplava – Ole i ljubičasta – Ara. Slika je napravljena upotrebom PyMol-a za PDB unose: 1bj5, 1e7i, 1gni i 1gnj.

Mesta **6 i 7** su mesta niskog afiniteta za vezivanje masnih kiselina (**Slika 7**).

Mesto **6** nalazi se na površini HSA molekula, u vidu plitkog kanala na interfejsu između subdomena IIA i IIB (**Slika 7 E**). Ostaci koji učestvuju u vezivanju masnih kiselina (dugog i kratkog lanca) su Arg209, Lys351 i Ser480. Oni interaguju sa karboksilnom grupom masne kiseline, dok se metilenski „repovi“ ukotvljuju u kanal zahvaljujući jonskim vezama koje gradi ostatak Arg209 sa Asp324 i Glu354 (**Bhattacharaya i sar., 2000**). I u ovom mestu se polinezasićene masne kiseline nalaze u izduženoj konformaciji (**Petipas i sar., 2001**).

Mesto **7** locirano je u hidrofobnom džepu u subdomenu IIA (**Slika 7 F**). Veoma je slično vezivnim mestima 3 i 4, ali je znatno manje. Do sada nisu jasno definisane aminokiseline koji interaguju sa karboksilnim grupama masnih kiselina, ali se pretpostavlja da bi to mogli biti ostaci Lys199, Arg218, Arg222, His242 i Arg257 (**Bhattacharaya i sar., 2000**). Polinezasićene masne kiseline se na ovom mestu mogu uklopiti u savijenoj konformaciji (**Petipas i sar., 2001**).



Slika 7. Vezivna mesta niskog afiniteta za masne kiseline na molekulu HSA. Na slikama su prikazani subdomeni u molekulu HSA u kojima su locirana vezivna mesta, aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju i vezane masne kiseline. A-mesto 6 i B-mesto 7. Različitim bojama označene su različite masne kiseline kao i ostaci koji učestvuju u njihovom vezivanju na svakom mestu: tirkiz – Myr, zelena – Ste, svetloplava – Ole i ljubičasta – Ara. Slika je napravljena upotrebom PyMol-a za PDB unose: 1bj5, 1e7i, 1gni i 1gnj.

Vezivna mesta za masne kiseline na molekulu HSA međusobno se preklapaju, a utvrđeno je da se ona preklapaju i sa mestima vezivanja drugih liganada (**Simard i sar.,**

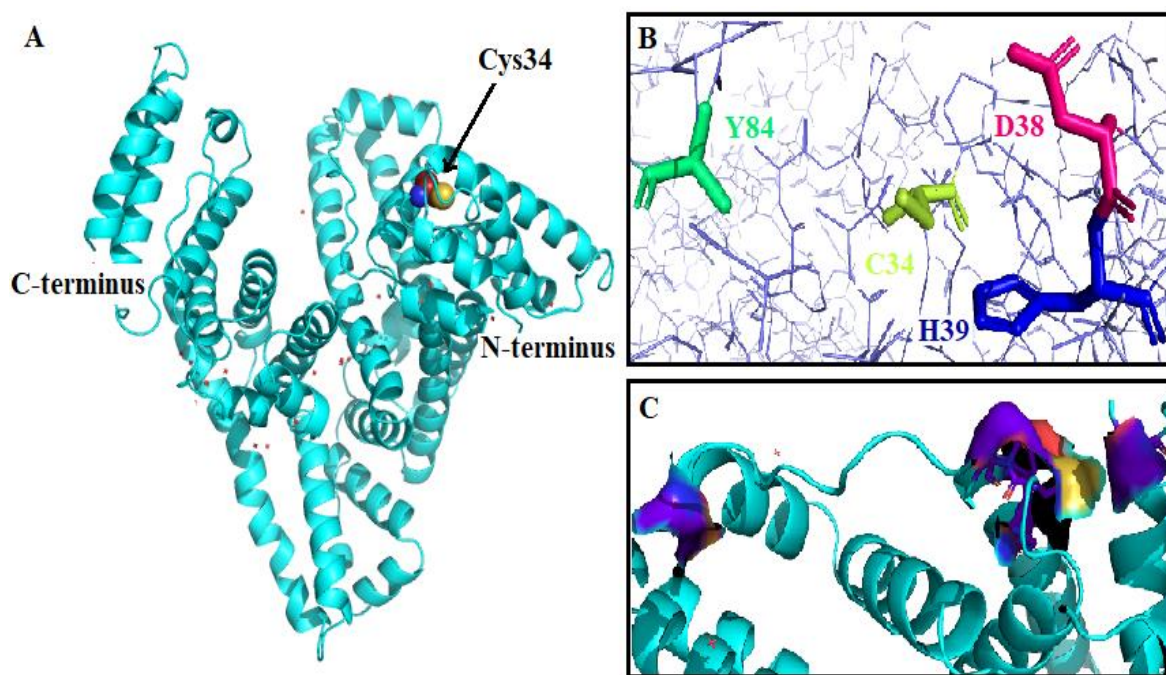
2006). Zbog toga vezivanje masnih kiselina za HSA dovodi do promene afiniteta za vezivanja drugih liganada. Vezivanje masnih kiselina dovodi i do značajnih promena konformacije HSA molekula, koje za posledicu mogu imati promenu funkcionalnih svojstava ovih molekula (**Gryzunov i sar., 2003**).

2.3. Cys34 tiolna grupa humanog serum-albumina – svojstva i reaktivnost

U primarnoj strukturi HSA postoji 35 Cys ostataka, od kojih su 34 uključena u formiranje 17 disulfidnih mostova, a samo jedan, Cys34 je slobodan. Ovaj ostatak cisteina, sa svojom slobodnom tiolnom grupom, je dominantan izvor slobodnih tiola u humanoj plazmi (**Oettel i Stauber, 2007**). Kod zdravih osoba 70-80% Cys34 tiolnih grupa je u redukovanom, a 2-5% u oksidovanom obliku i to kao sulfinska i sulfonska kiselina (**Turell i sar., 2009; Alvarez i sar., 2010; Torres i sar., 2012**). Između 20 i 30% ukupnih Cys34-SH grupa gradi mešovite disulfide sa tiolima malih molekulskih masa (Cys, homocistein, glutation - GSH) koji su prisutni u cirkulaciji (**Stewart i sar., 2005**), dok je 5-10% uključeno u stvaranje HSA-HSA homodimera preko disulfidnog mosta (**Peters, 1996**).

Ako se uzme u obzir zastupljenost HSA u odnosu na ostale proteine plazme, jasno je da je slobodna tiolna grupa ostatka Cys34 zapravo glavni antioksidant. Promene u reaktivnosti i dostupnosti ove grupe, prema tome, imaju veliki uticaj na ukupan antioksidativni kapacitet HSA molekula. Slobodna tiolna grupa ostatka Cys34 je jak nukleofil (**Li i sar., 2010**), i zato predstavlja atraktivnu metu za reakciju sa elektrofilima kakvi su reaktivni dikarbonili. Cys34 je prepoznat kao sakupljač malih elektrofila na osnovu detekcije adukata HSA-Cys34 sa aldehidima, oksiranim, brojnim malim molekulima i azotnim iperitima (koji se koriste u citotoksičnoj hemoterapiji) (**Rubino i sar., 2009**). Sve ovo pokazuje da u slučajevima kada je organizam izložen karbonilnom ili oksidativnom stresu, ova grupa je prva linija odbrane. Njenom brzom reakcijom sa stresorom, organizam može značajno smanjiti antioksidativni kapacitet, pri čemu njeno nadoknađivanje zavisi od brzine *de novo* sinteze samog HSA molekula.

Strukturno, Cys34 nalazi se u domenu IA, na površini HSA molekula. Iako je površinski, ovaj aminokiselinski ostatak, on leži na dnu plitkog džepa, dubine oko 9.5 Å (Slika 8). Okružen je sa ostacima Pro35 i Val117, kao i polarnim i aminokiselinskim ostacima koji lako jonizuju: Asp38, Tyr84 i His39, a koji imaju veliki uticaj na svojstva tiolne grupe (Sugio i sar., 1999; Stewart i sar., 2005). Vrednosti pKa za Cys34 bile su predmet istraživanja i kontroverzi, te su u literaturi prisutni podaci u rasponu od 5 do 8,8 (Bonanata i sar., 2017). Bonanata i saradnici su utvrdili da pKa vrednost Cys34 tiolne grupe odmašćenog HSA molekula na fiziološkom pH (7,4) iznosi 8,1.



Slika 8. Položaj i okruženje Cys34-tiolne grupe. **A** – položaj Cys34-tiolne grupe u trodimenzionalnoj strukturi HSA molekula; **B** – aminokiseline koje okružuju Cys34; **C** – molekulska površina aminokiselina koje okružuju Cys34 i interagiruju sa njim. Slika je napravljena upotrebom PyMol-a za PDB unos 5z0b.

Reaktivnost tiolne grupe Cys34 zavisi od njenog okruženja, tj. lokalne konformacije, kao i od interakcija sa okolnim aminokiselinama. Izloženost atoma sumpora Cys34

rastvaraču je ograničena ukoliko je u obliku tiola, a raste kada je u formi tiolata (**Bonanata i sar., 2017**). Tiolat je stabilizovan vodoničnim vezama sa Tyr84 i preko molekula vode sa Asp38 i Gln33. ¹HNMR studije Christodoulou i sar. (**Christodoulou i sar., 1994; Christodoulou i sar., 1995**) pokazale su i mogući „flip-flop“ mehanizam kojim dolazi do tranzicije sakrivene -SH grupe Cys34 u izloženu, a u zavisnosti od vezivanja liganda za HSA. Reaktivnost/dostupnost Cys34-SH grupe se značajno menja kada se masne kiseline kao ligandi vezuju za HSA (**Torres i sar., 2012; Pavićević i sar., 2014**). Tako, vezivanje stearinske kiseline povećava reaktivnosti ove grupe u odnosu na odmašćeni HSA molekul za šest puta (**Torres i sar., 2012**).

Imajući u vidu izuzetnu fleksibilnost molekula HSA, vezivanje različitih liganda izaziva promenu konformacije proteina, što za posledicu može da ima promenu izloženosti/dostupnosti -SH grupe Cys34 (**Torres i sar., 2012**), a time i njene reaktivnosti. (**Pavićević i sar., 2014**).

2.4. Bakar(II)-joni u organizmu čoveka

Bakar je prelazni metal, sa atomskom masom 63,5 Da. U organizmu čoveka nalazi se u oksidacionim stanjima +1 i +2. Esencijalni je mikroelement, prisutan u tragovima u različitim ćelijama i tkivima. Najveća koncentracija bakra u organizmu čoveka nađena je u jetri i mozgu (**Gaetke i sar., 2014; Turnland, 1998**). Prosečan dnevni unos bakra ishranom iznosi 1-3 mg (**Bost i sar., 2016**).

Homeostaza bakra u organizmu regulisana je na nivou intestinalne apsorpcije i hepatičke ekskrecije, a između ove dve tačke bakar prolazi kroz nekoliko barijera i odeljaka uz pomoć amfifilnih proteina bez kojih ne bi mogao proći kroz lipofilnu ćelijsku membranu (**Ohrvik i sar., 2015**). Nakon apsorpcije u duodenumu (**Lowe i sar., 2017**), joni bakra(II) dospevaju u cirkulaciju kroz enterocite. Prilikom ulaska u enterocite, oni se redukuju u Cu(I)-jone, dejstvom membranskog proteina STEAP (*eng.* Six-Transmembrane Epithelial Antigen

of Prostate), koji je metaloreduktaza (**Ohgami i sar., 2006**). Potom Cu(I)-jone preuzima membranski importer CTR1 (*eng.* Copper transporter 1) i unosi ih u ćeliju.

Napuštanje enterocita posredovano je ekskretornom putanjom koja uključuje vezivanje za ATP7A, jednu od dve humane Cu(I)-ATP-aze (**Ohgami i sar., 2006, Lowe i sar., 2017**). ATP7A je odgovoran za snabdevanje jonima bakra tokom sinteze enzima za čiju aktivnost je ovaj jon neophodan. Bakar je potencijalno toksičan za žive organizme (**Rubino i sar., 2012**), te se u organizmu čoveka ne nalazi u slobodnom stanju. Celokupna količina bakra vezana je za prostetične grupe enzima, transportne proteine, proteine pratioce (*eng.* chaperones) i u His-Cu-His kompleksu koji je u ravnoteži sa HSA, i u mnogo manjoj meri sa α 2-makroglobulinom (**Rosenzweig, 2001; Prohaska, 2008; Boal i sar., 2009; Lau i sar., 1971; Linder i sar., 1991**).

Većina jona bakra odlazi u jetru gde se vezuje za ceruloplazmin, protein koji predstavlja glavni depo bakra u cirkulaciji (70-90 % bakra vezano je za ceruloplazmin) (**Lowe i sar., 2017**). Osim u ceruloplazminu, u cirkulaciji se joni bakra nalaze u vidu labilnog/izmenljivog rezervoara kao vezani za HSA molekul ili u vidu His-Cu-His kompleksa (**Linder, 1991**).

Bakar se iz organizma izlučuje putem žuči, bilijarnim kanalćima, u formi kompleksa koji onemogućava njegovu reapsorpciju (**Gollan i sar., 1973**). Ekskrecija se odvija putem endozomalno-lizosomalne putanje (**Ohgami i sar., 2006**).

2.4.1. Aktivnost jona bakra

Kao dobar donor i akceptor elektrona bakar u organizmu čoveka učestvuje u mnogobrojnim redoks-reakcijama. Zahvaljujući redoks-aktivnostima, ima važnu ulogu kao kofaktor različitih enzima koji učestvuju u brojnim vitalnim procesima (**Gaetke i sar., 2014**) kao što su:

- umrežavanje kolagena i elastina tokom formiranja vezivnog tkiva;

- eritropoeza;
- formiranje i održavanje mijelinskog omotača;
- sinteza melanina;
- ćelijska respiracija;
- uklanjanje slobodnih radikala;
- sinteza kateholamina.

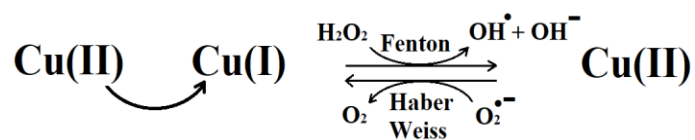
Sa druge strane, ukoliko dođe do disbalansa u homeostazi jona bakra u organizmu, dolazi do ispoljavanja toksičnih efekata ovog metala. Toksični efekat iskazuje se pre svega u jetri, jer je ovaj organ njegovo glavno mesto skladištenja, i manifestuje se razvojem ciroze. Pored toga, dolazi do hemolize, oštećenja renalnih tubula, moždanog tkiva i drugih organa. Simptomi mogu uznapredovati i do komatoznog stanja, hepatične nekroze, vaskularnog kolapsa i smrti (**Winge i sar., 1990, Gaetke i sar., 2003**).

Opisana su i dva oboljenja, kod kojih dolazi do preteranog taloženja bakra u organizmu: Meneks-ov sindrom i Wilson-ova bolest. Meneks-ov sindrom posledica je mutacija na genu koji kodira ATP7A protein važan za kontrolu koncentracije bakra u organizmu. Dolazi do deficita enzima koji imaju bakar kao kofaktor, a zaduženi su za razvoj mozga (**Mercer, 1998**). Kod Wilson-ove bolesti je, usled smanjenog kapaciteta bilijarne ekskrecije, povećan sadržaj bakra u jetri i moždanom tkivu (**Brewer, 1996**).

Ova dva oboljenja su direktna posledica narušene homeostaze bakra, međutim postoje i druga patološka stanja u kojima dolazi do ispoljavanja negativnih efekata ovog metala. Jedno od njih je i *Diabetes mellitus* tip II (DMII). Iako DMII pogađa veliku populaciju, nisu poznati svi aspekti ovog oboljenja uzrokovano kompleksnom povezanošću genetskih i epigenetskih faktora, kao i uticaja okoline (**Lowe i sar., 2017**). Uloga bakra u ovom patološkom stanju može se razmatrati na osnovu saznanja da su u serumu i urinu pacijenata koncentracije bakra povećane u odnosu na zdravu populaciju (**Ito i sar., 2001; Cooper i sar., 2005**). Povišena koncentracija serumskog bakra pozitivno korelira sa koncentracijom glikovanog hemoglobina (HbA_{1c}), ukazujući na ulogu ovog metala u nastanku tkivnih oštećenja, posebno kardiovaskularnog sistema, tj. nastanku sekundarnih

komplikacija (Ito i sar., 2001; Naka i sar., 2013; Cooper i sar., 2005). Pozitivna korelacija nađena je i između povećane koncentracije bakra u serumu pacijenata i povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* Reactive Oxygen Species, ROS). Sa druge strane, nađena je negativna korelacija između koncentracije bakra i ceruloplazmina, i ukupnih tiola (Sarkar i sar., 2010).

Dobijene korelacije ukazuju da bakar verovatno ispoljava negativni efekat u razvoju dijabetesa tipa II i sekundarnih komplikacija učestvujući u reakcijama u kojima nastaju slobodni radikali, tj. uzrokujući oksidativni stres putem Fentonove i Haber-Weiss-ove reakcije:

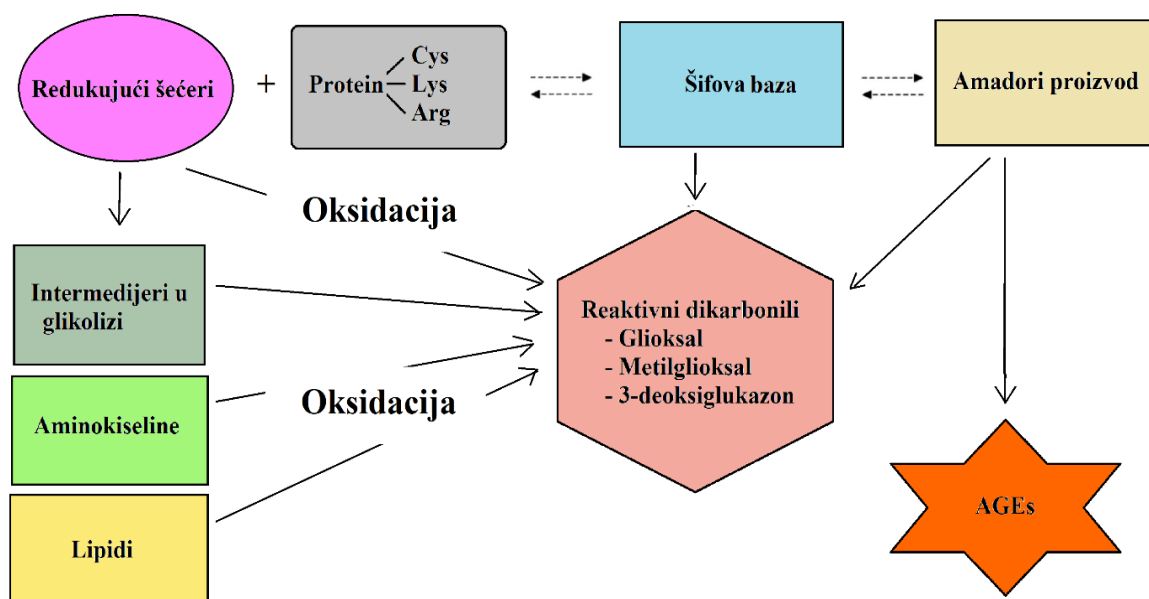


Slobodni joni bakra(II) takođe oksiduju najzastupljenije reduktante (askorbat i tirole) i time dodatno doprinose oksidativnom stresu. U studijama na miševima sa DMII, pokazano je da terapija helatorom jona bakra dovodi do smanjenja sadržaja ovog metala u serumu, kao i do smanjenja proizvodnje ROS (Tanaka i sar., 2009). Iako brojne studije podržavaju ideju da promena koncentracije bakra može biti relevantan faktor koji utiče na razvoj i komplikacije kod jedinki sa DMII, usled izazivanja i pogoršavanja oksidativnog stresa, i dalje su neophodna istraživanja koja bi dala jasne odgovore po pitanju uloge bakra u ovom patološkom stanju.

Sve navedeno ukazuje da je vezivanje jona bakra za proteine od izuzetne važnosti. HSA, sa svojim NTS vezivnim mestom (Poglavlje 2.2.2.1.) doprinosi uklanjanju viška jona bakra u cirkulaciji i sprečavanju oksidativnog stresa. Kako se u reakcijama glikacije/karbonilacije, ili pri vezivanju različitih liganada (posebno masnih kiselina) za HSA, menja njegova konformacija, od interesa je ispitivanje uticaja ovih promena na afinitet vezivanja bakar(II)-jona, odnosno na njihovo otpuštanje.

2.5. Reakcija karbonilacije/glikacije humanog serum-albumina

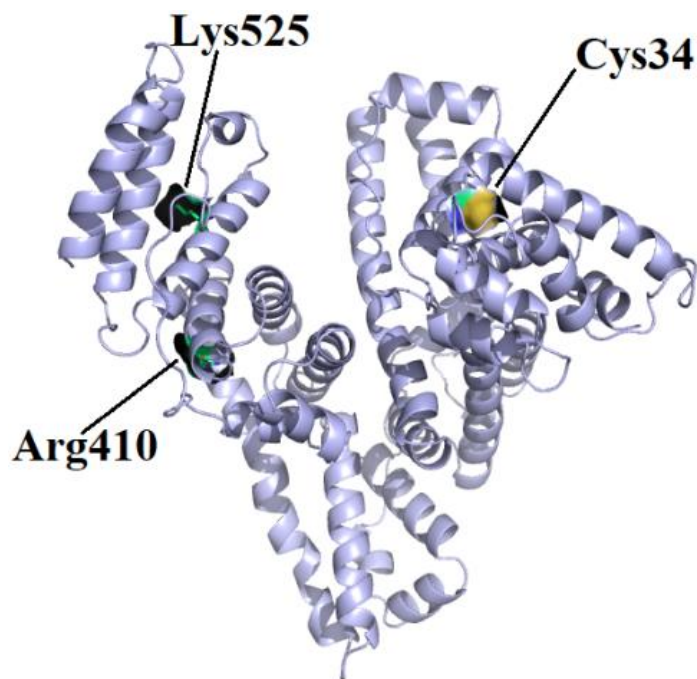
Glikacija se definiše kao spontana, neenzimska Maillard-ova reakcija između ugljenih hidrata/karbonila sa amino-, guanidino- i tiolnom grupom na površini molekula proteina (**Thornalley i sar., 1999; Neelofar i sar., 2017**). Ugljeni hidrati (glukoza, fruktoza, galaktoza) mogu ne-enzimski modifikovati proteine (sa dugim poluživotom) u stanjima kada njihova koncentracija u dužem vremenskom periodu prevazilazi fiziološke granice (dijabetes, galaktozemija i fruktozemija) (**Rondeau i sar., 2011**). Reakcijom aldehidne grupe ugljenih hidrata ili reaktivnih dikarbonila, i amino-grupe proteina nastaje Šifova baza koja Amadori premeštanjem prelazi u stabilan (reverzibilan) ketoamin (**Brownlee i sar., 1984**). Ova jedinjenja nazivaju se ranim proizvodima glikacije. Ketoamin potom prolazi seriju sporih reakcija (oksidacija, polimerizacija i ciklizacija), u kojima se dobijaju krajnji proizvodi neenzimske glikozilacije AGEs. AGEs proizvodi su reaktivni i daljom reakcijom sa amino- i tiolnim grupama dovode do umrežavanja proteina. (**Šema 1**)



Šema 1. Šema nastajanja krajnjih proizvoda glikacije, AGEs.

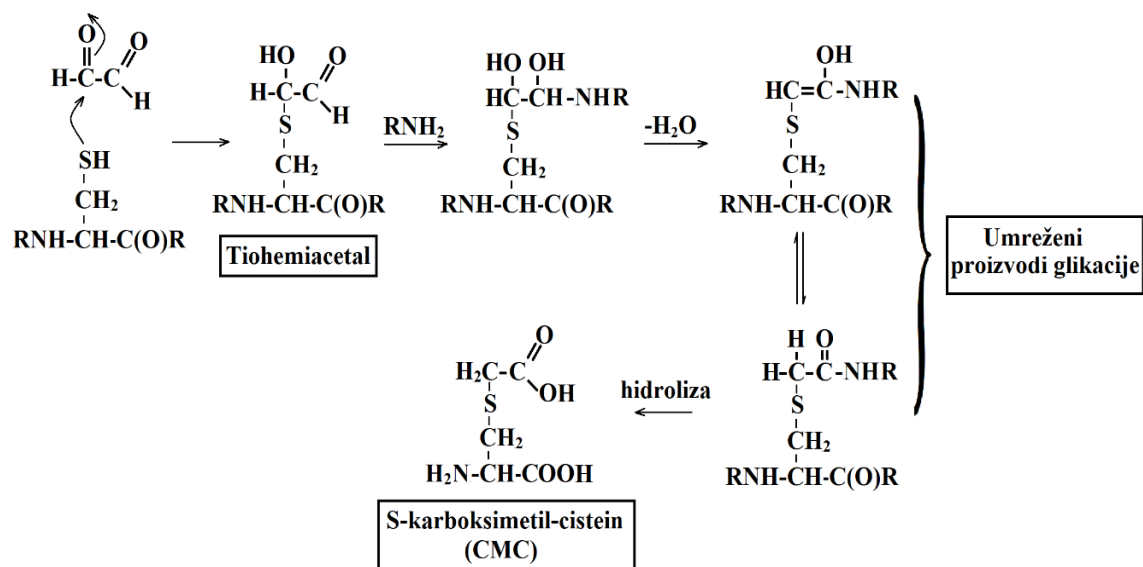
Sadržaj AGEs raste u tkivima pod oksidativnim stresom (**Guerin-Dubourg i sar., 2012; Thornalley, 2008**). Na površini molekula HSA nalazi se 59 ostataka Lys, 24 ostatka

Arg i jedan slobodni ostatak Cys34, tj. 84 potencijalne mete za karbonilaciju. Od 59 Lys ostataka, u *in vivo* uslovima, tokom karbonilnog stresa modifikuje se njih 13, a dominantno ostatak Lys525 (Rondeau i sar., 2011) (Slika 9). Od 24 ostatka Arg, njih šest je modifikovano tokom karbonilnog stresa *in vivo*, pri čemu je Arg410 dominantna meta (Rondeau i sar., 2011).



Slika 9. Položaj aminokiselinskih ostataka u 3D strukturi HSA koji najčešće podležu reakciji glikacije. Slika je napravljena pomoću programa PyMol za PDB unos: 5z0b

Tiolna grupa Cys34, kao svoje nukleofil brzo reaguje sa reaktivnim dikarbonilima pri čemu nastaje tiohemiacetal (Aćimović i sar., 2010), koji dalje u reakciji sa drugim nukleofilnim grupama na površini molekula proteina dovodi do njihovog umrežavanja (Šema 2):



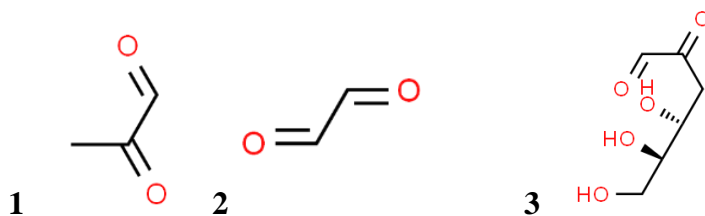
Šema 2. Put nastajanja S-karboksimetil-cisteina kao krajnjeg proizvoda glikacije.

Reakcijom karbonilacije/glikacije, menja se naelektrisanje i struktura HSA molekula, a time i do promena u njegovoj funkciji. Ove promene podrazumevaju:

1. smanjenje antioksidativnog kapaciteta HSA (zbog smanjenja sadržaja slobodne Cys34-SH grupe i promene afiniteta za vezivanje metalnih jona);
2. promenu afiniteta za vezivanje različitih liganda (uticaj na transportnu ulogu HSA);
3. pojavu novih mesta za vezivanje određenih liganda i
4. nastajanje AGEs-a, koji mogu imati imunogenu ulogu (**Rondeau i sar., 2011, Neelofar i sar., 2017**).

2.5.1. Reaktivni dikarbonili – nastajanje i eliminacija

α -oksoaldehidi se u organizmu stvaraju kroz nekoliko puteva, koji su povezani sa putanjom nastajanja AGEs. Reaktivniji su od glukoze i do 20000 puta (**Maessen i sar., 2015**), te su stoga reakcije karbonilacije proteina α -oksoaldehydima izuzetno brze. Biološki najrelevantniji reaktivni dikarbonili su metilglioksal (MG) (1), glioksal (2) i 3-deoksiglukazon (3):



Gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton-fosfat, intermedijeri u procesu glikolize, su glavni prekursori u sintezi metilglioksala (**Brings i sar., 2017; Phillips i sar., 1993**). Prekursori mogu biti glukozno-nezavisni i poticati iz metabolizma masnih kiselina, aminokiselina, kao i od askorbinske kiseline (**Brings i sar., 2017; Smuda i sar., 2013**).

Glioksal nastaje fragmentacijom glukoze i glukozo-aminskih adukata (koji uključuju fruktozil-lizin) u reakciji koja je katalizovana jonima metala (**Wells-Knecht i sar., 1995**), kao i peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina (**Mlakar i sar., 1996**).

Prekursori u nastajanju 3-deoksiglukazona su glukozni adukti N-terminalne amino-grupe proteina ili amino-grupe Lys ostataka (Amadori proizvodi glikacije) (**Zyzak i sar., 1995**), kao i fruktozofosfat (**Szwergold i sar., 1990**).

Eliminacija reaktivnih dikarbonila odvija se putem glioksalaznog sistema, dejstvom aldolazo-reduktaze, aldehyd-dehidrogenaze i fruktozamin-3-kinaze, kao i posredstvom proteolitičkog sistema (**Brings i sar., 2017**).

Glioksalazni sistem metaboliše 99% nastalog metilglioksala (**Sousa Silva i sar., 2013; Brings i sar., 2017**). Čine ga dva enzima, glioksalaza 1 (GLO1) i glioksalaza 2 (GLO2), koja zahtevaju prisustvo katalitičke količine GSH. U prvom koraku, u prisustvu GLO1, redukovani glutation reaguje sa dikarbonilom i nastaje hemitioacetal. Sledeću reakciju katalizuje GLO2, pri čemu se stvara D-laktat i regeneriše redukovani GSH. Glioksal se takođe metaboliše ovim sistemom, ali ne i 3-deoksiglukazon. Promene u aktivnosti ovog sistema mogu doprineti razvoju dijabetičnih komplikacija (**Brings i sar., 2017**).

Aldolazo-reduktaza, uz pomoć NADPH, katalizuje redukciju metilglioksala do hidroksi-acetona i laktal-aldehida ili propan-diola (**Vander Jagt i sar., 2001**), a u odsustvu

GSH isključivo do hidroksi-acetona. Ovaj enzim pretvara i glioksal do glikol-aldehida (**Vander Jagt i sar., 2003**), a 3-deoksiglukazon do 3-deoksifruktoze (**Kato i sar., 1989**). Aldehid-dehidrogenaza oksiduje metilglioksal do piruvata (**Brings i sar., 2017**). Zbog velike aktivnosti glioksalaznog sistema ova reakcija ima manji značaj. Fruktozamin-3-kinaza katalizuje fosforilaciju fruktozil-lizina, jednog od glavnih prekursora u nastanku AGEs. Fosforilacijom se fruktozil-lizinski adukt destabilizuje i razlaže, čime se postiže reverzibilnost procesa glikacije (**Szwergold i sar., 2001**).

Proteolitički sistem degradacijom uklanja modifikovane proteine, a time i dikarbonilna jedinjenja iz organizma. Iako su AGEs otporniji na digestiju u proteazomalno-lizozomalnom sistemu do njihove akumulacije neće doći sve dok ovaj sistem zadržava svoj kapacitet razlaganja (**Brings i sar., 2017**).

2.6. Karbonilni stres u dijabetesu tipa II – promene na molekulu HSA

Diabetes mellitus predstavlja grupu metaboličkih poremećaja kojima je zajednička pojava hiperglikemije (**Prakash, 2017**). Hiperglikemija u dijabetesu tipa II posledica je genetskih i metaboličkih poremećaja u dejstvu i/ili sekreciji insulina (**Kahn i sar., 2014**), a često je povezana sa stalnim i ireverzibilnim, strukturnim i funkcionalnim promenama na ćelijskom nivou i u organizmu, uz nastajanje sekundarnih komplikacija, poput mikroangiopatije (nefropatija, retinopatija i polineuropatija) i makroangiopatije (**Fowler, 2008; Prakash, 2017**).

Posledica hiperglikemije kod pacijenata sa dijagnozom DM II je pojava karbonilnog i oksidativnog stresa (**Lyons, 1997**). Koncentracije 3-deoksiglukazona i metilglioksala povećane su u cirkulaciji ovih pacijenata (**Beisswenger i sar., 2001; Lyons, 2002**). Takođe, kod ovih pacijenata često je prisutna hiperlipidemija i, kao posledica iste, povišena koncentracija reaktivnih intermedijera lipidne peroksidacije koji doprinose porastu oksidativnog i karbonilnog stresa (**Tsai i sar., 1994**).

Imajući u vidu da se kod pacijenata obolelih od DM II stvaraju reaktivne vrste koje modifikuju proteine, uočene strukturne i funkcionalne promene na molekulu HSA su označene kao izuzetno važne u brojnim *in vivo* studijama. Ove studije su pokazale učešće glikovanog HSA u razvoju i napredovanju sekundarnih komplikacija u dijabetesu tipa II (Neelofar i sar., 2017).

Kao što je napred istaknuto (**Poglavlje 2.3**), jedna od uloga HSA je antioksidativna zaštita, zahvaljujući slobodnoj tiolnoj grupi ostatka Cys34, koji uklanja 70% slobodnih radikala u plazmi (Mera i sar., 2010). Karbonilni stres u dijabetesu tipa II dovodi do modifikacije ove grupe, čime se smanjuje antioksidativni kapacitet HSA. Takođe, pokazano je da se redukovani i oksidovani HSA (kada se posmatra redoks stanje Cys34) razlikuju kada je u pitanju vezivanje određenih liganada, što potvrđuje da oksidativni status ovog molekula utiče na njegovu funkciju (Kawakami i sar., 2006, Rondeau i sar., 2008, Rondeau i sar., 2011).

Studije su pokazale da na molekulu HSA postoji 29 mesta koja su podložna glikaciji *in vivo* (Neuzil i sar., 1994). Zahvaljujući svojim nukleofilnim svojstvima, pored Cys34, glikaciji su podložni i ostaci Lys i Arg (Ahmed, 2005). Glikacijom ovih aminokiselinskih ostataka u DM II dolazi do promene konformacije HSA molekula, odnosno smanjenja afiniteta glikovanog HSA prema ligandima kao što su masne kiseline dugog lanca, bilirubin i neki lekovi (Shaklai i sar., 1984).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hemikalije i reagensi

Za potrebe izrade ove disertacije korišćene su *p.a.* hemikalije renomiranih svetskih proizvođača: Merck (Darmstadt, Germany), Fisher-Scientist (Waltham, USA) i Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Hemikalije i reagensi ostalih proizvođača:

- 20% rastvor HSA namenjen za kliničku upotrebu (Baxter, Vienna, Austria). Rastvor u proseku sadrži 0,4 mmol SH/mmol HSA;
- Markeri za SDS elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA);
- Reagens za određivanje koncentracije HSA sa 3',3'',5',5''-tetrabrom-m-krezolsulfonftaleinom (bromkrezol zeleno, BKZ) (Human, Wiesbaden, Germany);
- Zečija anti-HSA poliklonska antitela (Calbiochem, San Diego, USA);
- Zečija anti-DNP poliklonska antitela (Sigma Aldrich, St Louis, USA);
- Poliklonska anti-zečji IgG antitela konjugovana sa HRP (AbD Serotec, Cidlington, UK), kao sekundarna antitela;
- HRP-avidin konjugat (Vector, Burlingham, USA);
- ECL reagens (Thermo-Fischer Scientific, Waltham, USA);
- Rentgen film MXB (Kodak, Rochester, USA);
- Komercijalni test RANSOD (RANDOX, Crumlin, Ireland);
- Komercijalni test RANSEL (RANDOX, Crumlin, Ireland);
- Nitrocelulozna membrana Amersham™ Protran® (Sigma Aldrich, St Louis, USA);
- Standardni premiks masnih kiselina PUFA-2 (Supelco, Bellefonte, USA);
- Riblje ulje Alkakaps Omega 3 (Alkaloid, Skoplje, Makedonija)

3.2. Aparati i oprema

Korišćeno je sledeće:

- Spektrofotometri: Beckman DU-50 (Fullerton, SAD) i Shimadzu UV 1800 (Kyoto, Japan);
- Spektrofluorimetar Fluoromax-4 Jobin Yvon, (Horiba Scientific, Japan);
- Gasni hromatograf Shimadzu GC 2014 (Kyoto, Japan);
- CD spektrometar J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan);
- Centrifuge: Tehtnica LC 320 (Železniki, Slovenia), Eppendorf MiniSpin i Eppendorf MiniSpin Plus (Hamburg Germany);
- Centrikoni za ultrafiltraciju (Ultracel-30k i Amicon Ultra-15 Millipore, Burlington USA);
- Vodeno kupatilo (NeoMedica, Niš, Serbia);
- Automatske mikropipete Brand (Wertheim, Germany) i Eppendorf (Hamburg, Germany);
- Analitička vaga B6 Mettler Toledo (Columbus, USA)
- Tehnička vaga, Chyo (Japan)
- Elektroforetska jedinica Hoefer® SE 260 (San Francisco, USA);
- Sistem za elektroforezu i blot, Mini-PROTEAN® Tetra, Bio-Rad (Hercules, USA);
- Sistem za polu-suvi blot, Trans-Blot SD, Bio Rad (Hercules, USA);
- Sistem za izoelektrofokusanje, 111 Mini IEF Cell, Bio-Rad (Hercules, USA);
- pH metar/konduktometar, WTW inoLab 720 (Weilheim, Germany) i pH metar, Radiometar PHM 26 (Brønshøj, Denmark);
- Vorteksi, Velp (Usmate, Italy) i Tehtnica EF 102 (Železniki, Slovenia);
- Magnetne mešalice Labortechnik (Wasserburg, Germany) i ARE, Velp (Usmate, Italy);

3.3. Uzorci seruma

Uzorci krvi pacijenata (n=29) od DM II, sa lošom glikemijskom kontrolom ($HbA_{1c} \geq 8,0$) i zdravih volontera (n=20) odgovarajućih godina i pola, sakupljeni su nakon prekonoćnog gladovanja, venepunkcijom iz antekubitalne vene. Svi ispitanici su upoznati sa istraživanjem i dali su svoj pristanak za učestvovanje u studiji. Za potrebe ovih istraživanja dobijena je etička dozvola Instituta za primenu nuklearne energije, INEP. Puna krv ostavljena je da koaguliše na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je centrifugiranjem (4000 x g, 10 min) dobijen serum koji se izdvojio iznad krvnog ugruška. Ovako dobijeni serum korišćen je za izolovanje HSA i biohemijske analize.

3.4. Metode

3.4.1. Priprema komercijalnog HSA za *in vitro* eksperimente

Komercijalni HSA bio je 20% rastvor koncentracije 200 mg/mL. Pored HSA, ovaj preparat sadrži i prezervative i stabilizatore neophodne za duže čuvanje: natrijum-hlorid, natrijum kaprilat i natrijum-N-acetiltriptofanat, ukupna koncentracija natrijumovih jona iznosi 100-130 mmol/L. Ovaj preparat ispran je fosfatnim puferom (PB; 0,1 mol/L, pH 7,4) centrifugiranjem u centrikonima za ultrafiltraciju sa membranom od 30 kDa. Nakon ispiranja, određena je koncentracija HSA Biuretskim reagensom i reagensom sa BKZ (**Poglavlje 3.4.8.**). Koncentracija HSA za dalje eksperimenta podešena je na 0,5 mmol/L sa PB.

3.4.2. Redukcija komercijalnog HSA

Kao što je već napomenuto, korišćeni komercijalni (oksidovani) preparat HSA sadrži 0,3 – 0,4 mol SH grupa/mol HSA. Za potrebe *in vitro* eksperimenata bilo je potrebno redukovati HSA, tako da se dobije više od 0,8 mol SH grupa/mol HSA. Za redukciju komercijalnog HSA korišćen je ditiotreitol (DTT). Primenom molarnog odnosa DTT:HSA od 1:1, i višim (**Lee i Hirose, 1992**), dobija se sadržaj HSA-SH grupa koji prevazilazi 100%,

što se objašnjava delimičnim razvijanjem strukture HSA usled raskidanja disulfidnih veza unutar samog molekula. Kako bi se izbegla delimična denaturacija, razvijena je metoda gde se za redukciju upotrebljava molarni odnos 1:1 za DTT: oksidovana forma HSA-SH. Prema tome, ukoliko je npr. u HSA-SH preparatu izmerena koncentracija -SH grupa od 0,4 mol SH/mol HSA, za redukciju će se koristiti 0,6 mol/L DTT.

Postupak: Pre redukcije određuje se sadržaj HSA-SH grupa (**Poglavlje 3.4.9.**) kao i ukupna koncentracija HSA (**Poglavlje 3.4.8.**). Oduzimanjem koncentracije HSA-SH grupa od koncentracije HSA dobija se koncentracija oksidovane forme. U rastvor HSA doda se rastvor DTT-a (u 0.1 mol/L PB, pH 7,4) tako da molarni odnos oksidovanih HSA-SH grupa prema DTT bude 1:1. Smeša se inkubira 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon završene inkubacije, da bi se uklonio eventualni viška DTT, HSA se ispira u centrikonu (30 kDa, V=15 mL) šest puta sa PB. Ispranom HSA potom se odredi koncentracija i sadržaj SH grupa. Ovako redukovani HSA čuva se u frižideru maksimalno dva dana u dobro zatvorenom sudu, bez nadslojenog vazduha.

3.4.3. Izolovanje HSA iz seruma

Izolovanje HSA iz seruma, prema metodi **Jovanović i sar. (2013) (Poglavlje 3.3.)**, zasniva se na dvostepenom taloženju proteina upotrebom zasićenog rastvora amonijum-sulfata (AS).

Reagensi:

- Zasićeni rastvor amonijum-sulfata (ZAS, pH 7,4),
- Fosfatni pufer (PB), 0,1 mol/L, pH 7,4; ovaj PB je korišćen u svim eksperimentima, osim ako nije drugačije naznačeno.

Postupak:

- 1) U 1 mL uzorka seruma dodaje se rastvor ZAS, kap po kap, uz stalno blago mešanje na vorteksu do postizanja zasićenja od 54% AS. Istaloženi proteini predstavljaju globulinsku frakciju i uklanjaju se centrifugiranjem na 7500 rpm tokom 10 min. Talog se odbacuje, a iz supernatanta se u drugom koraku izoluje HSA;

- 2) Supernatant se tretira sa ZAS, na isti način kao i u koraku 1, do postizanja 70% zasićenja AS. Taloži se HSA. Nakon centrifugiranja smeše na 7500 rpm tokom 10 min, dobijeni supernatant se odbacuje, a precipitat je visoko prečišćeni HSA.

Ovako dobijeni HSA potom se rastvara do željene koncentracije u PB i ispira se od AS u centrikonima (30 kDa) istim puferom. Čistoća preparata proverava se nativnom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (PAGE, **Poglavlje 3.4.17.1.**).

3.4.4. Kompleksiranje HSA sa bakar(II)-jonima

Komercijalni HSA ne sadrži vezane bakar(II)-jone. Kako bi se sintetisali HSA-Cu(II)-kompleksi sa različitim sadržajem bakra, komercijalni HSA inkubiran je prema metodi **Gryzunov-a (2003)** sa rastvorom bakar(II)-sulfata pentahidrata. Dobijeni su kompleksi u kojima je sadržaj bakar(II)-jona bio: 0,05, 0,1 i 0,2 mol Cu(II): mol HSA.

Reagensi:

- 5 mmol/L rastvor $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 10 mmol/L PB, pH 7,4

Postupak: Alikvot 5 mmol/L rastvora $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ dodaje se uzorcima HSA (0,5 mmol/L) tako da se dobiju kompleksi u kojima je sadržaj vezanih Cu(II)-jona 0,05, 0,1 i 0,2 mol/mol HSA. Smeše se ostave 40 minuta na +4 °C, u mraku. Nakon završene inkubacije, smeše se ispiraju PB (10 mmol/L, pH 7,4) od nevezanih bakar(II)-jona koristeći centrikone (30 kDa). Nakon ispiranja, određuje se koncentracija HSA, kao i sadržaj vezanih Cu (II)-jona (**Poglavlja 3.4.8. i 3.4.11.**).

3.4.5. Odmašćivanje HSA

Kako bi u *in vitro* uslovima ispitali uticaj pojedinačnih masnih kiselina i masnih kiselina iz ribljeg ulja, na afinitet HSA za vezivanje Cu(II)-jona, masne kiseline vezane na komercijalnom HSA trebalo je prethodno ukloniti. Odmašćivanje komercijalnog HSA urađeno je metodom po **Chen-u (1967)**.

Postupak: Komercijalni rastvor HSA (do 5mL, upotrebom većih zapremina rizikuje se veliki gubitak), razblaži se destilovanom vodom dva puta. Uz konstantno mešanje na magnetnoj

mešalici dodaje se aktivni ugalj (0.1 g na 1 mL nerazblaženog HSA). Nakon homogenizacije smeše, podesi se pH rastvora na 3,0 upotrebom 3 mol/L HCl. Rastvor se potom stavi na led i uz konstantno mešanje (na magnetnoj mešalici) inkubira 1 h. Nakon završene inkubacije, alikvoti rastvora se prenesu u epruvete za centrifugiranje i centrifugiraju na 10000 rpm tokom 10 min. Supernatant se odvoji i prebaci u nove epruvete i ponovo centrifugira. Postupak se ponavlja sve dok se ne ukloni sav aktivni ugalj. Rastvori se spoje i pH se podesi na 7,0 pomoću 1 mol/L NaOH. Odmašćeni HSA se zatim ispere nekoliko puta PB (u centrikonima (30 kDa) i potom se odredi njegova koncentracija (**Poglavlje 3.4.8.**).

3.4.6. Priprema kompleksa masna-kiselina-HSA i kompleksa masna kiselina-HSA-Cu(II)-joni

U cilju kompleksiranja HSA sa masnim kiselinama (MK) na kontrolisan način, odmašćeni komercijalni HSA, koji je sadržao 0,2 mol SH grupa/mol HSA, redukovao je i zamašćen željenom MK u jednom koraku. Pripremljeni su kompleksi sa stearinskom (Ste), miristinskom (Myr) i oleinskom (Ole) kiselinom, kao i masnim kiselinama iz ribljeg ulja (RU). Pre redukcije i kontrolisanog zamašćivanja, određen je sadržaj HSA-SH grupa Ellman-ovim reagensom (**Poglavlje 3.4.9.**).

Postupak: Rastvoru HSA u PB dodati 0,1 mol/L DDT (u PB) u količini ekvimolskoj sa sadržajem oksidovane forme HSA-SH. Odmah dodati i 0,8 mmol/L etanolni rastvor MK tako da odnos MK:HSA bude 4:1 (mol/mol). Finalna koncentracija etanola u smeši je manja od 1 %, tako da ne dolazi do denaturacije HSA. Smeša se inkubira na 37 °C 1 h i na 12000 rpm 5 min. Uzorci se isperu od viška DTT-a i MK sa PB pet puta, a zatim se skoncentruju u centrikonima (30 kDa) do koncentracije od 1 mmol/L. Sadržaj vezanih MK u dobijenim kompleksima Ste-HSA, Myr-HSA, Ole-HSA i RU-HSA se potom određuje GC/MS metodom (**Poglavlje 3.4.14.**).

Kompleksi MK-HSA-Cu(II) sintetišu se inkubacijom kompleksa MK-HSA sa 10mM rastvorom bakar(II)-sulfata pentahidrata u PB. Alikvoti 10 mmol/L rastvora $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ dodaju se MK-HSA kompleksima, tako da finalni odnos bude 0,1 mol Cu(II)/ mol MK-HSA

kompleksa. Smeše se inkubiraju na +4 °C 40 minuta u mraku. U cilju uklanjanja nevezanih Cu(II)-jona, kompleksi su zatim ispirani sa PB u centrikonima (30 kDa, V=15 mL) pet puta. Nakon ispiranja, sadržaj bakra vezanog za svaki MK-HSA kompleks određen je spektrofotometrijski sa batokuproinskim reagensom (**Poglavlje 3.4.11.**).

3.4.7. Karbonilacija HSA uzoraka in vitro

U uzorcima nativnog (komercijalnog) HSA sa i bez vezanog bakra, odmašćenog HSA sa i bez vezanog bakra, kao i kompleksa MK-HSA sa i bez vezanog bakra, dodatkom PB podesi se koncentracija HSA na 0,5 mmol/L. U uzorke se zatim dodaje 40 % rastvor metilglioksala (u PB) tako da u finalnoj smeši njegova koncentracija bude 10 mmol/L. Smeše se inkubiraju na 37 °C od trenutka dodavanja rastvora metilglioksala. Za potrebe praćenja uticaja metilglioksala na reaktivnost i sadržaj HSA-SH grupe, kao i na sadržaj vezanih bakar(II)-jona, uzimaju se alikvoti u vremenskim intervalima od pola sata, sat i na kraju inkubacije. Krajnje vreme inkubacije bilo je 24 h. Alikvoti iz inkubacione smeše ispirani su u centrikonima (30 kDa) sa PB radi uklanjanja neizreagovanog metilglioksala. Nakon ispiranja, u uzorcima je određen sadržaj HSA-SH grupa, sadržaj vezanog bakra, kao i koncentracija proteina (**Poglavlja 3.4.9., 3.4.11. i 3.4.8.**).

3.4.8. Određivanje koncentracije HSA

Koncentracija HSA određena je spektrofotometrijski Biuretskim metodom (**Slater, 1986.**) i komercijalnim reagensom, koji sadrži BKZ kao za određivanje koncentracije HSA.

Određivanje koncentracije HSA Biuretskom metodom

Reagensi:

Reagens se pravi rastvaranjem redom, sledećih supstanci:

- 4,5 g kalijum-natrijum-tartarata,
- 4 g natrijum-hidroksida,
- 1,5 g bakar(II)-sulfata pentahidrata,
- 2,5 g kalijum-jodida.

Supstance se rastvore u destilovanoj vodi u normalnom sudu od 500 mL.

Postupak: Analiza: 20 μ L uzorka i 1000 μ L Biuretskog reagensa

Slepa proba: 20 μ L PB i 1000 μ L Biuretskog reagensa

Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija uzorka na 546 nm prema slepoj probi. Koncentracija HSA se izračuna korišćenjem standardne prave ($y=0,00517x+0,00294$; koeficijent korelacije $r=0,999$), koja je konstruisana upotrebom serije rastvora komercijalnog HSA u rasponu koncentracija od 1 do 100 mg/mL. Sva određivanja urađena su u triplikatu.

Određivanje koncentracije HSA sa BKZ

Postupak: Analiza: 10 μ L uzorka i 1000 μ L reagensa

Slepa proba: 10 μ L PB i 1000 μ L reagensa

Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija uzorka na 578 nm prema slepoj probi. Koncentracija HSA izračuna se korišćenjem standardne prave, koja je konstruisana upotrebom serije rastvora komercijalnog HSA u rasponu koncentracija od 1 do 100 mg/mL: $y=0,0155x + 0,028$, koeficijent korelacije $r = 0,993$. Sva određivanja urađena su u triplikatu.

3.4.9. Određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu i slobodnih HSA-tiolnih grupa

Sadržaj ukupnih tiola u serumu i slobodnih HSA-SH grupa određen je spektrofotometrijski, modifikovanom Ellmanovom metodom (**Bulaj i sar., 1998**).

Reagensi:

- 1 mol/L Tris, pH 8,0
- 2 mmol/L 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB): 7,92 mg DTNB, 68 mg natrijum-acetata i destilovana H₂O do 10 mL

Postupak: Pomeša se 100 μ L uzorka, 100 μ L 1M Tris pufera (pH 8,0) i 100 μ L DTNB reagensa, i zatim dodati destilovanu vodu do 1000 μ L. Smeša se inkubira 30 min na sobnoj

temperaturi i potom se izmeri apsorbancija na 412 nm prema slepoj probi reagensa. Vrednost apsorbancije za reakcionu smešu je korigovana za apsorbanciju uzorka (slepa proba uzorka; bez DTNB) i apsorbanciju reagensa. Koncentracija tiola izračunava se na osnovu standardne prave ($y=0,00136x-0,00935$; $r=0,9999$) pripremljene sa rastvorima Cys za raspon koncentracija od 0,001 do 1 mmol/L. Koncentracija tiola u serumu izražava se u mmol/L, a sadržaj HSA-SH grupa u mol-SH/mol HSA. Sva merenja urađena su u triplikatu.

3.4.10. Određivanje konstante brzine reakcije Cys34-SH grupe sa DTNB reagensom

Kinetika reakcije Cys34-SH grupe sa DTNB reagensom praćena je određivanjem konstante brzine reakcije, koja je pseudo-prvog reda. Konstanta je određena spektrofotometrijski, na isti način kao što je određen i sadržaj tiolnih grupa Ellman-ovim reagensom (3.4.9.). Razlika je što se u određenim vremenskim intervalima prati promena apsorbancije na 412 nm tokom 30 min inkubacije reakcione smeše.

Postupak: Uzorku HSA (100 μ L) doda se 100 μ L Tris pufera i 700 μ L destilovane vode. Smeša se inkubira na 37 °C tokom 5 min i potom prenese u kivetu za merenje na spektrofotometru. Doda se 100 μ L 2 mM rastvora DTNB i brzo se smeša izmeša uvlačenjem u nastavak pipete i izbacivanjem sadržaja iz nastavka. Na svakih 10 s prati se apsorbancija na 412 nm tokom prvih 5 min, a potom na 30 s do isteka 30-og minuta. Merenje se obavlja u termostatiranoj kiveti u termobloku instrumenta. Sadržaj neizreagovanih tiolnih grupa, u svakom vremenskom intervalu, izračuna se oduzimanjem konačne vrednosti nakon 30 min reakcije od svake prethodne vrednosti. Izračunate vrednosti koriguju se za slepu probu reagensa i slepu probu uzorka HSA. Profil kinetike reakcije pseudo-prvog reda linearizuje se logaritmovanjem vrednosti za koncentraciju tiolne grupe i prikazivanjem dobijenih podataka u funkciji vremena. Konstruiše se semilogaritamski dijagram prema jednačini: $\ln C_{SH} = \ln C_{SH0} - kt$. Nagib ovako dobijene prave predstavlja negativnu vrednost konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe HSA sa DTNB reagensom.

3.4.11. Određivanje sadržaja bakar(II)-jona vezanih za HSA i ukupne koncentracije bakra u serumu

Koncentracija bakar(II)-jona u serumu i sadržaj (udeo) ovih jona vezanih za HSA određeni su spektrofotometrijski, sa batokuproinskim reagensom (BCS). BCS je reagens specifičan za određivanje bakar(I)-jona, sa kojim oni grade žuto-narandžasti kompleks (**Zak, 1958**). Zato je za određivanje sadržaja bakar(II)-jona neophodno prethodno redukovati Cu(II)-jone. Redukcija se obavlja sa 800 μ M rastvorom natrijum-askorbata.

Reagensi:

- Dinatrijumova so batokuproin-disulfonata (BCS): 400 μ mol/L rastvor BCS (0,02 g BCS rastvoriti u 50 mL destilovane vode);
- Reagens za redukciju Cu(II) \rightarrow Cu(I): natrijum-askorbat (800 μ mol/L) i natrijum-acetat (odmeriti po 0,5 g svake supstance i rastvoriti u 25 mL destilovane vode);
- Reagens za taloženje proteina: 0,63 mol/L trihlorsirćetna kiselina (TCA) + 0,5 mol/L HCl (10,22 g TCA i 4,2 mL koncentrovane HCl rastvoriti u destilovanoj vodi do 100 mL).

Postupak: Pomeša se 300 μ L uzorka HSA i 300 μ L reagensa za redukciju, izmeša na vorteksu i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Doda se 300 μ L BCS reagensa i smeša inkubira 15 min na sobnoj temperaturi. Izmeri se apsorbancija na 480 nm. Dobijene vrednosti se koriguju za vrednosti apsorbancije slepe probe uzorka (ne sadrži BCS) i apsorbancije reagensa.

Koncentracija Cu(II)-jona vezanih za HSA (mol Cu(II)/mol HSA) izračunava se pomoću standardne prave ($y=0,00869+0,00395x$, $r=0,999$), snimljene sa rastvorom bakar(II)-sulfata pentahidrata u rasponu koncentracija 5-200 μ mol/L. Radne rastvore praviti razblaživanjem osnovnog rastvora sa 10 mmol/L PB, pH 7,4.

Za određivanje ukupne koncentracije bakar(II)-jona u serumu, neophodno je prvo serum tretirati reagensom za taloženje proteina, kako bi se oslobodili svi vezani Cu(II)-joni. Pomešati 500 μ L seruma sa 500 μ L reagensa za taloženje proteina. Smešu inkubirati 20

minuta na sobnoj temperaturi, a zatim izcentrifugirati na 3000 rpm/minuti. Dobijeni supernatant tretirati na isti način kao i HSA uzorke. Sva određivanja urađena su u triplikatu.

3.4.12. Određivanje sadržaja guanidino-grupa na HSA molekulu

Sadržaj slobodnih guanidino-grupa na molekulu HSA određuje se spektrofotometrijski (Sastry i Tummuru, 1984; Aćimović i sar., 2012).

Reagensi:

- 0,01% rastvor timola u 0.5 mol/L NaOH (0,01 g timola i 2 g NaOH rastvoriti u 100 mL destilovane vode);
- Rastvor natrijum-hipobromita, 2% brom u 5% rastvoru natrijum-hidroksida (w/v) (0,68 mL broma rastvoriti u 100 mL 5% rastvora narijum-hidroksida)

Postupak: U 2 mL smeše reagensa 1 i 2 (po 1 mL svakog) se dodaje 10 μ L uzorka HSA i izmeri aposrbancija na 480 nm, odmah po mešanju. Apsorbancija uzorka se koriguje za apsorbciju reagensa i slepu probu uzorka (ne sadrži timol). Sadržaj guanidino-grupa se izračunava na osnovu standardne prave ($y=-0,01407+0,30933x$; $r=0,999$), konstruisane sa Arg kao standardom (u opsegu koncentracija 0,125 - 1,250 mmol/L). Određivanje je urađeno u triplikatu.

3.4.13. Određivanje sadržaja karbonilnih grupa u serumu

U cilju sagledavanja stepena karbonilnog stresa sadržaj karbonilnih gupa u humanom serumu određuje se spektrofotometrijski (Rogowska-Wrzesinska i sar., 2014).

Reagensi:

- Reagens za taloženje proteina: 10% TCA u destilovanoj vodi
- 2 mol/L HCl
- 10 mmol/L 2,4-dinitrofenil-hidrazin (DNPH) u 2 mol/L HCl (0,0396 g DNPH u 20 mL 2 mol/L HCl)
- 80 mmol/L fosfatni pufer, pH 8,0 (PB)
- Pufer za rastvaranje (2 g SDS, 0,05 g EDTA rastvoriti u 100 mL PB)

Postupak: Serum se razblažuje destilovanom vodom do ukupne koncentracije proteina od 10 mg/mL. Odmeri se po 250 μ L razblaženog seruma i u svaki alikvot doda se po 125 μ L 10% TCA. Smeše se potom centrifugiraju na 1500 rpm tokom 5 min. Supernatanti se odbacuju. Precipitat jednog alikvota se derivatizuje sa 250 μ L 10 mmol/L DNPH, a drugi tretira samo sa 2 mol/L HCl (slepa proba uzorka). Suspenzije se potom izmešaju na vorteksu, tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Doda se 500 μ L 10% TCA i ponovo izcentrifugira na 1500x rpm tokom 5 min. Supernatanti se odbacuju a precipitati ispiraju dva puta sa po 1 mL smeše etanol:etil-acetat 1:1 (V/V). Talog se rastvara u 1,5 mL 2% SDS-a (u PB) inkubiranjem na 37 °C tokom 20 min, uz povremeno mešanje na vorteksu. Nakon rastvaranja taloga izmeri se apsorbanciju na 375 nm prema slepoj probi uzorka. Za izračunavanje sadržaja karbonilnih grupa koristi se ekstinkcioni koeficijent za DNPH (22000 L/mol cm). Koncentracija karbonila u serumu se izražava u nmol/mg proteina.

3.4.14. Identifikacija i određivanje sadržaja masnih kiselina vezanih za HSA gasnom hromatografijom

Za određivanje sadržaja masnih kiselina, vezanih za HSA, gasnom hromatografijom potrebno je prethodno odvojiti MK od molekula HSA. Za ekstrakciju nepolarnih masnih kiselina je primenjen Folch-ov rastvor (**Folch, 1957**).

Reagensi:

- Folch-ov rastvor za ekstrakciju MK: hloroform:metanol = 2:1 (v/v)
- n-heksan
- 2 mol/L rastvor natrijum-hidroksida u metanolu
- 0.2 mol/L sumporna kiselina u metanolu

Postupak: Uzorku HSA (100 μ L) se dodaje Folch-ov rastvor i snažno meša na vorteksu 1 min. Dobijena emulzija se centrifugira na 5000 rpm 10 min da se odvoje dve faze. Odvoji se donja hlorofomska faza i upari do suva u struji azota. Suvom ostatku se doda 2 mL n-heksana i izmeša na vorteksu, a potom se doda 0,2 mL 2 mol/L NaOH u metanolu. Epruvete se zatvore teflonskim zatvaračem i ostave u termostatu na 85 °C tokom 1 h. Tada se dodaje 0,2 mL rastvora 1 mol/L sumporne kiseline u metanolu i termostatiraju epruvete na 85 °C 2 h. Nakon

hlađenja, smeša se centrifugira na 3000 rpm 10 min, odvojiti heksanski sloj i upari do suva u struji azota.

Dobijeni metil-estri MK se analiziraju na gasnom hromatografu (Shimadzu GC 2014, Kyoto, Japan) sa plamenojonizacionim detektorom. Upotrebljena je kapilarna kolona Restek-2330 (stacionarna faza je polietilenglikol), dužine 60 m, prečnika 0,2 mm i softver za obradu podataka Lab Solutions.

Uzorak metil-estara MK rastvori se u 10 μ L n-heksana neposredno pre analize. Injektuje se od 0,5 do 1 μ L rastvora u kolonu. Protok nosećeg gasa (helijum) se podešava na 11 mL/minuti, protok vazduha na 500 mL/minuti, a protok vodonika na 50 mL/minuti. Optimizacija uslova analize MK postignuta je upotrebom standardnog premiksa masnih kiselina PUFA-2 (Supelco). Identifikacija MK u uzorku izvodi se upoređivanjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenima dobijenim za standarde. Kvantifikacija MK u uzorku HSA postignuta je upoređivanjem integrala površina ispod maksimuma sa integralom površine internog standarda MK C13:0 poznate koncentracije.

3.4.15. Izolovanje masnih kiselina iz komercijalnog preparata ribljeg ulja

U cilju ispitivanja uticaja MK iz komercijalnih preparata ribljeg ulja na funkcionalna svojstva HSA upotrebljeno je riblje ulje Alkakaps Omega 3 (Alkaloid, Skoplje, Makedonija). Preparat je dostupan na tržištu u vidu želatinoznih, gastrozistentnih kapsula. Prema specifikaciji proizvođača, u kapsulama se nalazi prečišćeno riblje ulje bakalara sa etil-estrima MK, od kojih 165 mg eikozapentaenske kiseline (EPA), 110 mg dokozaheksaenske kiseline (DHA) i 5 mg vitamina E (u obliku tokoferil-acetata). Za ekstrakciju EPA i DHA iz ribljeg ulja primenjeni su postupci saponifikacije, uklanjanja nesaponifikovanih sastojaka i desaponifikacije.

Reagensi:

- 0,3 mol/L kalijum-hidroksid u 90% etanolu;
- 4 mol/L HCl;
- dietil-etar;

- n-heksan.

Postupak: Izmeri se masa šlifovanog balona od 250 mL radi kasnijeg obračuna prinosa MK. U balon se prenese sadržaj kapsule i na svakih 50 mg ulja se doda 2 mL etanolnog rastvora kalijum-hidroksida. Na balon se postavi refluks-kondenzator. Smeša se zagreva do ključanja i refluktuje tokom 60 min na 80 °C. Posle je hlađenja, doda se 50-100 mL destilovane vode i energično se promućka. Smeša se prenese u levak za odvajanje. Nesaponifikovani sastojci se uklanjaju ispiranjem. Sukcesivno se dodaje po 20 mL dietil-etra, mućka i odbacuje gornji, organski sloj. Vodena faza se zakiseli rastvorom 2 mol/L HCl, tako da pH bude između 1 i 2, pri čemu se izdvajaju slobodne MK. Nezasićene MK, EPA i DHA, se ekstrahuju sa po 20 mL n-heksana, četiri puta. Spoje se heksanski ekstrakti i upare na rotacionom vakuum uparivaču uz blago zagrevanje, da ne bi došlo do termičkog razlaganja polinezasićenih EPA i DHA. Čistoća, prinos i odnos ekstrahovanih EPA i DHA određuju se su GS/MS metodom (**Poglavlje 3.4.14.**).

3.4.16. Spektroskopske metode

3.4.16.1. Spektrofluorimetrijska analiza

Za ispitivanja promena u tercijarnoj strukturi HSA pri vezivanju liganada i reakciji karbonilacije, snimaju se fluorescentni spektri HSA, koji potiču od emisije Trp214, kao i fluorescentni spektri koji odgovaraju krajnjim proizvodima glikacije. Emisioni spektar rastvora HSA (0.6 μM) je snimljen na $\lambda^{\text{exc}}/\lambda^{\text{em}} = 295/300\text{-}450$ nm. Finalni spektri su predstavljeni kao srednja vrednost za dva skeniranja u kvarcnoj kiveti dužine puta 1 cm, uz širinu otvora 5 nm i korekciju dobijenog spektra za spektar slepe probe (0,1 M PB pH 7,4). Emisioni spektri fluorescentnih krajnjih proizvoda glikacije (**Schmitt i sar., 2005**) snimljeni su za $\lambda^{\text{exc}}/\lambda^{\text{em}} = 330/340\text{-}500; 360/370\text{-}500$ nm.

3.4.16.2. Cirkularni dihroizam (CD)

Eventualne promene u sekundarnoj strukturi HSA prilikom vezivanja Cu(II)-jona praćene su CD spektrometrijom. Za snimanje spektara pripremljeni su rastvori odmašćenog HSA (1 mg/mL) u 0,01 mol/L PB pH 7,4. Daleki-UV CD spektri (od 185 do 250 nm) su

snimljeni pri sledećim uslovima: dužina optičkog puta 0,01 cm, temperatura 25 °C, očitavanja u 0,1 nm intervalima (50 nm/min), sa osetljivošću ±200 mdeg. Finalni spektri su dobijeni kada je spektar uzorka (koji predstavlja srednju vrednost od dve akumulacije) korigovan za spektar pufera. Za obradu snimljenih spektara i dobijanje podataka o sekundarnoj strukturi uzoraka HSA korišćen je Spectra Manager softver.

3.4.17. Elektroforetske metode

3.4.17.1. Nativna i SDS redukujuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Osnovni rastvori za elektroforezu na poliakrilamidnom gelu (PAGE) su:

- 1) Monomerni rastvor za razdvajajući gel (40% akrilamid, 5% bisakrilamid): 38 g akrilamida, 2 g bisakrilamida i destilovana voda do 100 mL;
- 2) Monomerni rastvor za koncentrujući gel (6,25 % akrilamid, 20 % bisakrilamid): 5 g akrilamida, 1,25 g bisakrilamida i destilovana voda do 100 mL;
- 3) Pufer za razdvajajući gel (947 mmol/L Tris, pH 8,48): 11,47 g Tris, 28,9 mL 1 mol/L HCl i destilovana voda do 100 mL, podesiti pH na 8,48.
- 4) Pufer za koncentrujući gel (158 mmol/L Tris, pH 6,90): 1,92 g Tris, 25,6 mL 0,33 mol/L H₃PO₄ i destilovana voda do 100 mL, podesiti pH na 6,90. Oznaka u tabeli je Tris pH 6,90;
- 5) Rastvor inicijatora polimerizacije 10 % (w/v) amonijum-persulfat (APS): 1 g APS i destilovana voda do 10 mL.
- 6) 10% SDS u destilovanoj vodi;
- 7) Rastvor za nadslojavanje (n-butanol zasićen vodom): n-butanol 10 mL i destilovana voda do stabilnog donjeg sloja. Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje, koristi se gornji sloj;
- 8) Pufer za pripremu uzoraka (PZU 5x koncentrovan). Za nativnu PAGE: 1,2 mL 0,5 mol/L TRIS-HCl (pH 6,8), 5,0 mL 98% glicerola, 1 mL 0,1% bromfenol-plavog (BFP), destilovana voda do 10 mL. Za SDS PAGE: 0,06 mol/L TRIS (pH 6,8); 25 % glicerol; 2% SDS; 0,0144 mol/L β-merkaptetoetanol (β-ME); 0,1 % BFP;

- 9) Donji pufer za elektroforezu (63 mmol/L Tris, pH 7,47): 22,7 g Tris, 150 mL 1 mol/L HCl i destilovana voda do 3 L;
- 10) Gornji pufer za elektroforezu (37,6 mmol/L Tris, 40 mmol/L glicin, pH 8,89): 4,56 g Tris, 3,0 g glicina i destilovana voda do 1 L;
- 11) Za SDS PAGE pufer za elektroforezu je jedan: (0,0025 mol/L Tris pH 8,3; koji sadrži 0,192 mol/L glicin i 0,1 % SDS): 3 g Tris, 14,4 g glicina, 10 mL 10 % SDS i destilovana voda do 1 L;
- 12) TEMED (N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin) za polimerizaciju;
- 13) Rastvor za fiksiranje i bojenje gelova (0,1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 0,2 g CBB G-250, 100 mL metanola, 20 mL sirćetne kiseline i destilovana voda do 200 mL;
- 14) Rastvor za obezbojavanje I (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 500 mL metanola, 100 mL sirćetne kiseline i destilovana voda do 1 L;
- 15) Rastvor za obezbojavanje II (5 % metanol, 7 % sirćetna kiselina): 50 mL metanola, 70 mL sirćetne kiseline i destilovana voda do 1 L.

Poliakrilamidni gelovi pripremaju se mešanjem opisanih rastvora u zapreminama i po redosledu prikazanom u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Zapremine rastvora i redosled mešanja pri pripremanju gelova za nativnu PAGE. Za SDS PAGE dodaju se zapremine rastvora SDS i destilovane vode označene zvezdicom *.

	Gel za razdvajanje		Gel za koncentrovanje
	9%	10%	4%
Monomer 1 (mL)	2,25	2,50	
Monomer 2 (mL)			2,0
TRIS pH 6.90 (mL)			1,0
TRIS pH 8.48 (mL)	2,50	2,50	
Destilovana voda (mL)	5,25	5,00/4,90*	0,75/0,7*
10% SDS (µL)		100	50

APS (μL)	100	100	75
Dezaeracija 5 min			
TEMED (μL)	7	7	5

Koncentracija uzoraka podesi se na 1 mg/mL, mešanjem sa puferom za pripremu uzorka i PB (0,1 mol/L, pH 7,4). Elektroforeza se izvodi pri konstantnom naponu od 80 V do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje i 180 V dok BFP ne dođe na 0,5 cm od donje ivice gela. Za SDS PAGE, uzorci su nakon dodavanja pufera za pripremu uzorka, sa SDS i β -ME, prokuvani tokom 5 min na 95 °C.

3.4.17.2. Izoelektrofokusing

Za ispitivanje promena u pI vrednosti uzoraka HSA izoelektrofokusingom (IEF), posebno pri karbonilaciji, korišćeni su sledeći rastvori:

- 1) Poliakrilamidni gel (5 %, 15 mL), pripremljen mešanjem sledećih rastvora:

Reagens	Zapremina
30% akrilamid	3,75 mL
Amfoliti	1,20 mL
Destilovana H₂O	9,90 mL
TEMED	15 μL
APS	100 μL

- 2) Katodni rastvor (0,05 mol/L NaOH): 0,2 g NaOH i destilovane vode do 100 mL. Dezaeracija 15 minuta;
- 3) Anodni rastvor (0,025 mol/L H₂SO₄): 0,14 mL konc. H₂SO₄ i destilovane vode do 100 mL;
- 4) Rastvor za fiksiranje (10 % TCA): 20 g TCA i destilovana voda do 200 mL;

- 5) Rastvor za ekvilibraciju gela (25 % metanol, 5 % sirćetna kiselina): 250 mL metanola, 50 mL sirćetne kiseline i destilovana voda do 1 L;
- 6) Rastvor za bojenje gela (0,1 % CBB R-250): 0,1 g CBB R-250 u 100 ml rastvora 5.

Pripremljeni rastvor za polimerizaciju do gela nalije se između ploča. Elektrode se natope u katodnom i anodnom rastvoru, višak rastvora se pokupi presovanjem između slojeva papirne vate, i pažljivo se nanese na krajeve gela, vodeći računa da se postave paralelno. IEF traje 1 h i 45 minuta pri uslovima: maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W. Nakon završenog IEF, gel se pažljivo skloni sa staklene ploče, ispere vodom, fiksira, ekvilibriše, boji i obezbojava rastvorom za ekvilibrisanje.

3.4.18. Imunoblot analiza sa autoradiografskom detekcijom

Promene u uzorcima HSA, kao i stepen karbonilacije, praćeni su i imunoblot metodom sa autoradiografskom detekcijom.

Reagensi:

- 1) Blot pufer, 25 mmol/L Tris (pH 8,3): (3 g Tris, 14,4 g glicina, 200 mL metanola i destilovana voda do 1 L); ovom puferu se ne podešava pH vrednost;
- 2) 10 x koncentrovani TBST pufer, 100 mmol/L (pH 7,4): 12,1 g Tris, 87 g natrijum-hlorida, 10 mL Tween-a 20 i destilovana voda do 1 L; pH podesiti pre dodatka Tween-a. Radni pufer se pravi razblaživanjem od 10 puta u destilovanoj vodi;
- 3) 5% i 1% rastvori sirćetne kiseline u destilovanoj vodi;
- 4) Rastvor Ponceau S boje za bojenje proteina na membrani (0,1 g Ponceau S, 5% rastvor sirćetne kiseline do 100 mL);
- 5) 5% rastvor odmašćenog mleka (5 g odmašćenog mleka, TBST pufer do 100 mL);
- 6) ECL reagens – po specifikaciji proizvođača;
- 7) Razvijajući i fiksir – po specifikaciji proizvođača.

Postupak: Nakon razdvajanja proteina elektroforezom (nativnom ili SDS PAGE) gel je prvo inkubiran u puferu za blot tokom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, formira se tzv. „sendvič“, koji obuhvata papir za hromatografiju, gel, membranu (nitrocelulozna, veličina

pora 0,2 μm , Whatman[®]) i ponovo papir za hromatografiju. Kako bi migracija proteina iz gela na membranu bila homogena, iz sklopljenog sendviča je neophodno istisnuti eventualne mehuriće vazduha. Sendvič postaviti u blot-jedinicu, tako da membrana bude okrenuta ka anodi. Transfer proteina se obavlja primenom konstantnog napona od 20 V u trajanju od 30-45 min po jednom gelu. Po završetku transfera, membrana se oboji rastvorom Ponceau S boje, blokira se 5% rastvorom odmašćenog mleka tokom 45 min, kratko se ispira TBST-puferom, stavlja u 1% rastvor (u odmašćenom mleku) odgovarajućih primarnih antitela i ostavlja preko noći na +4 °C. Po završetku inkubacije, membrana se ispira u TBST puferu i potom inkubira u rastvoru sekundarnih antitela (obeležениh sa peroksidazom iz rena (*eng.* horseradish peroxidase, HRP) na sobnoj temperaturi tokom 30 min. Ponavlja se ispiranje u TBST puferu i dodaje rastvor ECL (supstrat za HRP), i inkubira 3 do 5 min, uz mućkanje. Sa membrane se ukloni tečnost i u mračnoj sobi se stavlja u olovnu kasetu zajedno sa rendgenskim filmom. Na mestima gde je ECL reagovao sa HRP dolazi do hemiluminescencije, a zraci interaguju sa rentgen filmom (metoda autoradiografije). Nakon isteka vremena ekspozicije, koje se optimizuje za svaki uzorak (od nekoliko sekundi do 10 min), film se u mraku razvija sukcesivnim potapanjem u rastvor razvijaača (5 min), 1% sirćetne kiseline (1 min), i fiksira (5 min). Po razvijanju, filmovi se isperu pod mlazom česmenske vode, osuše na vazduhu, a intenzitet signala se analizira denzitometrijski.

3.4.19. Određivanje aktivnosti enzima oksidativnog stresa

U cilju utvrđivanja prisustva i/ili stepena oksidativnog stresa kod pacijenta sa dijagnozom DM II određena je aktivnost tri enzima u hemolizatima eritrocita: katalaze (CAT), superoksid-dizmutaze (SOD) i glutation-peroksidaze (GPx) u hemolizatima. Aktivnosti enzima izražene su u internacionalnim jedinicama po gramu hemoglobina (Hgb) (U/g Hgb). Sadržaj Hgb u hemolizatu određen je spektrofotometrijskom metodom sa Drabkin-ovim reagensom (kalijum-cijanid i kalijum-fericijanid) (**Tentori i Salvati, 1981**). Metoda se zasniva na pretvaranju hemoglobina u cijano-methemoglobin. Za pripremu Drabkin-ovog reagensa potrebno je:

- 0,05 g kalijum-cijanida
- 0,2 g kalijum-fericijanida

- 1,0 g natrijum-hidrogenkarbonata

Pomešati hemikalije i dopuniti destilovanom vodom do 1 L.

Postupak: Hemolizat dobijen zamrzavanjem i odleđivanjem eritrocita (20 µL) se pomeša sa Drabkin-ovim reagensom (2 mL). Nakon 20 min izmeri se apsorbancija bojenog proizvoda na 540 nm u odnosu na slepu probu reagensa. Koncentracija Hgb (g/L) izračunava se prema formuli:

$$C_{(\text{Hgb})} = 16114 \times A_{540} \times R / 11000.$$

U datoj formuli, 16114 je molekulska masa subjedinice Hgb, R je faktor razblaženja hemolizata, a 11000 je milimolarni ekstinkcioni koeficijent Hgb.

3.4.19.1. Određivanje aktivnosti katalaze

CAT je enzim koji katalizuje reakciju razlaganja vodonik-peroksida do vode i kiseonika. Aktivnost katalaze određena je po metodi **Claiborne-a (1984)**. Princip određivanja zasniva se na praćenju razlaganja vodonik-peroksida, odnosno merenju smanjenja njegove apsorbancije na 240 nm usled dejstva enzima.

Reagensi:

- 1) 0,05 mol/L fosfatni pufer, pH 7,0 (PB);
- 2) 30% vodonik-peroksid.

Postupak: Pomešaju se vodonik-peroksid i pufer u odnosu da apsorbancija na 240 nm bude između 0,525 i 0,550. U 1,5 mL ove smeše se doda 20 µL hemolizata i u pravilnim vremenskim intervalima prati se pad apsorbancije na 240 nm tokom 3 min. Za slepu probu se koristi PB, bez vodonik-peroksida. Aktivnost CAT izračunava se po formuli:

$$\text{Aktivnost CAT (U/g Hgb)} = \Delta A_{\text{uzorka}} \times 1000 \times 80 \times V_{\text{reakcione smeše}} / 43,6 \times C_{\text{hemoglobina}} \times V_{\text{uzorka}}$$

Vrednost 43,6 (L/mol cm) u formuli odgovara molarnom ekstinkcionom koeficijentu vodonik-peroksida.

3.4.19.2. *Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze*

Uloga SOD je da katalizuje dismutaciju superoksid-radikala do vodonik-peroksida i kiseonika. Princip određivanja aktivnosti SOD zasniva se na primeni sistema ksantin oksidaza/ksantin, u kome se generišu superoksid-radikali koji reaguju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium-hloridom, pri čemu nastaje crvena formazanska boja (**Arthur i Boyne, 1985**). Aktivnost SOD meri se stepenom inhibicije ove reakcije, a jedinica aktivnosti predstavlja onu količinu enzima koja uzrokuje 50% inhibicije reakcije.

Za određivanje aktivnosti SOD iskorišćen je komercijalni test RANSOD, prema uputstvu proizvođača testa. Promena apsorbcije se prati na 505 nm. Aktivnost SOD izražena je u U/g Hgb.

3.4.19.2. *Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze*

Glutacion peroksidaza (GPx) katalizuje redukciju hidroperoksida (kumen-hidroperoksida) pomoću redukovanog glutaciona. Oksidovani oblik glutaciona (GSSG), nastao u reakciji, pretvara se u redukovani oblik pomoću NADPH u prisustvu glutacion-reduktaze. Stoga se ovom metodom određuje aktivnost GSH-Px indirektno, preko reakcije kuplovane sa glutacion-reduktazom (**Paglia i Valentine, 1967**). Oksidacija NADPH do NADP^+ se prati spektrofotometrijski, kao smanjenje apsorbcije na 340 nm. Pad A_{340} je direktno proporcionalan aktivnosti GSH-Px u uzorku.

Za određivanje aktivnosti GPX iskorišćen je komercijalni test RANSEL prema uputstvu proizvođača testa. Aktivnost GPX je izražena u U/g Hgb.

3.5. Obrada rezultata

Za denzitometrijsku obradu rezultata korišćen je ImageJ program, a za statističku obradu programski paket OriginLab 8.0 (Origin Corporation, Northampton, USA). Slike su generisane upotrebom PyMol programskog paketa. Statistička obrada izvršena je

Studentovim t-testom, a korelacija između parametara izražena je Pearson-ovim koeficijentom korelacije. Normalnost raspodele rezultata ispitana je testom Kolmogorov-Smirnova. U slučajevima kada vrednosti nisu imale normalnu raspodelu za ispitivanje korelacije iskoršćen je Mann-Whitney-U test.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Humani serum albumin – karbonilacija i afinitet za vezivanje bakar(II)-jona

Kao što je napomenuto u pregledu literature, jedna od funkcija HSA u ljudskom organizmu je transport jona metala. Od posebne važnosti za ovu disertaciju je transport jona bakra. Iako je ceruloplazmin glavni depo bakra u cirkulaciji (70-90 % bakra vezano je za ovaj protein) (Lowe i sar., 2017), joni bakra se nalaze i u vidu labilnog/izmenljivog rezervoara u HSA molekulu i u His-Cu-His kompleksu (Linder i sar., 1991). Oko 10-15% ukupnog bakra u krvi vezano je za visokoafinitetno mesto na N-terminusu HSA molekula (Bal i sar., 2013). Karbonilacija/glikacija HSA molekula, koja je u velikom stepenu prisutna u dijabetesu (Lyons, 2002, Beisswenger i sar., 2001), može da dovede do promene konformacije HSA molekula. Pored toga, karbonilacija HSA utiče i na sadržaj Cys34-tiolne grupe u redukovanom obliku, za koju se zna da interaguje sa His3 (Christodoulou i sar., 1995) i čime može da utiče na vezivanje jona bakra. Rezultati prethodnih studija, u kojima je istraživan kapacitet karbonilovanog/glikovanog HSA da veže bakar(II)-jone *in vitro* i u dijabetesu (Argirova i Ortwerth, 2003; Guerin-Dubourg i sar., 2012), su kontradiktorni i nisu dali konačan odgovor na pitanje šta se dešava u uslovima kada dolazi do modifikacije HSA molekula. Ako se ima u vidu da su nevezani bakar(II)-joni redoks-aktivni i da u tom smislu podležu Fenton-ovoj i Haaber Weiss-ovoj reakciji, dakle reakcijama u kojima nastaju slobodni radikali (Kanti Das i sar., 2014), jasno je da bi uslovi u kojima dolazi do smanjenja afiniteta HSA prema bakar(II)-jonima mogli da dovedu do nastanka i/ili porasta oksidativnog stresa. Zato je od interesa da se ispita koliki je afinitet karbonilovanog/glikovanog HSA za vezivanje bakar(II)-jona. Za karbonilaciju HSA molekula korišćen je MG, α -oksoaldehid reaktivniji od glukoze oko 20 000 puta (Maessen i sar., 2015), koji u organizmu nastaje kao proizvod više puteva (Poglavlje 2.5.1.).

Iako HSA sadrži jedan ostatak Cys (Cys34) na površini molekula, sadržaj slobodnih tiolnih grupa u komercijalnom HSA i HSA izolovanom iz humanog seruma je znatno manji od jednog mola/mol HSA. Kako bi se ispitaio uticaj karbonilacije HSA molekula (MG) na

afinitet prema bakar(II)-jonima, komercijalni HSA je prvo redukovan do sadržaja slobodnih tiolnih grupa od 0,879 mol SH/mol HSA. Ovakav merkpto-HSA preinkubiran je sa MG (**Poglavlje 3.4.7.**) dajući karbonilovani HSA, HSA-MG, sa sadržajem SH grupa od 0,587 mol SH/mol HSA. Paralelno sa ovim uzorcima, testirano je vezivanje bakar(II)-jona za oksidovani HSA, sa sadržajem SH grupa od 0,400 mol SH/mol HSA (komercijalni HSA preparat). Svi uzorci HSA inkubirani su sa tri različite koncentracije bakar(II)-jona: 0,05 (kompleks I), 0,100 (kompleks II) i 0,200 (kompleks III) mol bakra(II)/mol HSA. Vrednosti koncentracije izabrane su tako da jedna (najniža) odgovara koncentraciji bakra u fiziološkim uslovima, druga je blago povišena, a treća je suprafiziološka. Ovakav model omogućava posmatranje sistema u fiziološkim i patološkim uslovima, u kojima dolazi do karbonilacije HSA molekula, i odgovor na pitanje da li se pri karbonilaciji menja kapacitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona. Sadržaj bakar(II)-jona u HSA kompleksima (I, II i III) određen je spektrofotometrijski sa batokuproinskim reagensom (**Poglavlje 3.4.11.**) i rezultati su prikazani u **Tabeli 4.**

Tabela 4. Uticaj sadržaja tiolne grupe merkpto-HSA (0,879 mol SH/mol HSA) i komercijalnog HSA (0,400 mol SH/mol HSA) na afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona. Bakar-HSA kompleksi I, II i III dobijeni su inkubacijom HSA sa 0,05, 0,10 i 0,20 mol bakar(II)-jona po molu HSA, redom. Svi eksperimenti urađeni su u triplikatu.

Bakar-HSA kompleks	Sadržaj Cu-(II) jona vezan za...		Smanjenje sadržaja Cu(II)-jona vezanih za HSA (%)
	Merkpto-HSA (mol/mol HSA±SD)	Komercijalni HSA (mol/mol HSA±SD)	Komercijalni HSA vs. merkpto-HSA
I	0,0512±0,0035	0,0438±0,0034	14,4
II	0,0959±0,0038	0,0809±0,0021	15,6
III	0,2025±0,0042	0,1420±0,0064	29,9

Merkapto-HSA kompleksi (I, II i III) vezali su sve dostupne bakar(II)-jone. S druge strane, kompleksi oksidovanog HSA vezali su za, redom, 14,4%, 15,6% i 29,9% manje ovih jona. Dobijeni rezultati ukazali su da je afinitet HSA prema bakar(II)-jonima u pozitivnoj korelaciji sa HSA-SH sadržajem. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima studije **Zhang-a i Wilcox-a (2009)**, koja je pokazala da se, i u *in vivo* i u *in vitro* uslovima joni bakra(II) preferencijalno vezuju za HSA molekule u kojima je tiolna grupa Cys34 u redukovanom obliku. Nađeno je da redoks-stanje tiolne grupe Cys34 utiče na hemijsko okruženje His3, udaljenog oko 20 Å od Cys34, a deo je visoko afinitetnog mesta za vezivanje jona bakra.

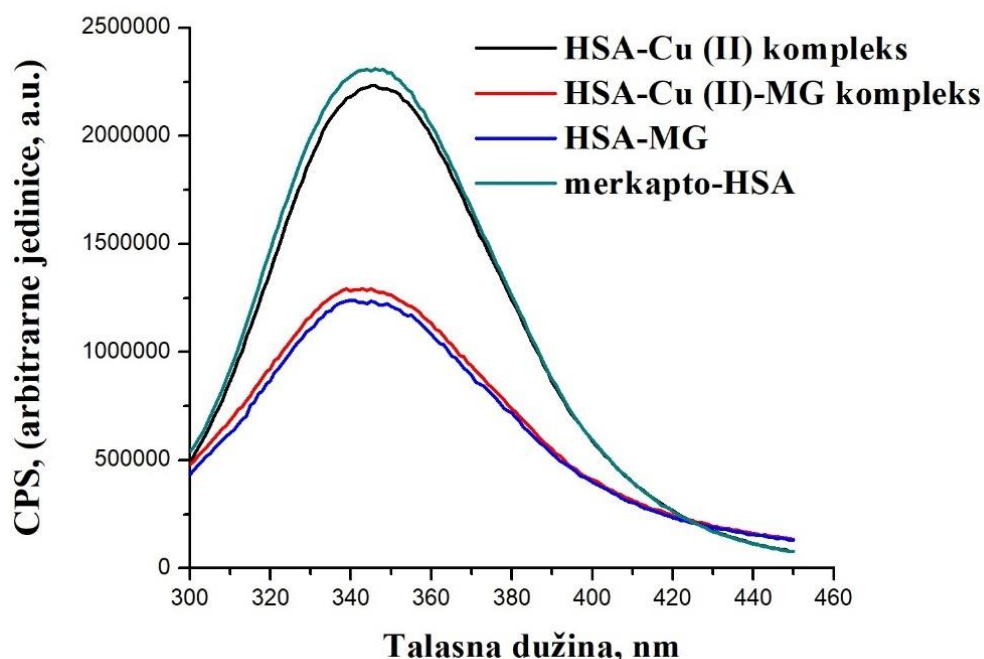
U poređenju sa merkapto-HSA, karbonilovani HSA, odnosno HSA-MG kompleksi I, II i III takođe vezuju bakar(II)-jone sa smanjenim kapacitetom, i to (redom) za 15,2%, 15,5% i 18,2% (**Tabela 5**). Smanjenje kapaciteta karbonilovanog HSA u odnosu na merkapto-HSA moglo bi biti posledica smanjenja sadržaja tiolne grupe Cys34, ali i posledica konformacionih promena koje molekul HSA trpi tokom modifikacije sa MG, pošto su mete za MG i ostaci i Lys i Arg (**Aćimović i sar., 2009.**).

Tabela 5. Uticaj karbonilacije merkapto-HSA na afinitet vezivanja bakar(II)-jona. Sadržaj HSA-SH grupa u merkapto-HSA iznosio je 0.879 mol SH/mol HSA, a u HSA-MG 0,587 mol SH/mol HSA. Bakar-HSA kompleksi I, II i III dobijeni su inkubacijom HSA sa 0.05, 0.100 i 0,200 mol bakar(II)-jona po molu HSA. Svi eksperimenti urađeni su u triplicatu.

Bakar-HSA kompleks	Sadržaj bakar-(II) jona vezan za...		Smanjenja sadržaja bakar(II)-jona vezanih za HSA (%)
	Merkapto-HSA (mol/mol HSA ± SD)	HSA-MG (mol/mol HSA ± SD)	HSA-MG vs. merkapto-HSA
I	0,0512±0,0035	0,0434±0,0013	15,2
II	0,0959±0,0038	0,0810±0,0021	15,5
III	0,2025±0,0042	0,1655±0,0019	18,2

4.1.1. Konformacione promena molekula HSA pri karbonilaciji i vezivanju jona bakra

Konformacione promene na HSA molekulu tokom reakcije karbonilacije sa MG utvrđene su snimanjem fluorescentnih emisionih spektara HSA (**Slika 10, Tabela 6**), na talasnoj dužini ekscitacije koja odgovara Trp fluorescenciji. HSA molekul ima samo jedan Trp ostatak na poziciji 214 (**Peters, 1996**), koji se se ekscituje na $\lambda^{\text{exc}}=295$ nm i ima emisioni maksimum na $\lambda \approx 330$ nm. Fluorescentni emisioni spektri snimljeni su za uzorke: merkapto-HSA, HSA- MG, HSA-Cu(II)-kompleks i HSA-Cu(II)-MG kompleks.



Slika 10. Fluorescentni emisioni spektri merkapto-HSA, HSA-MG, HSA-Cu(II)-kompleksa (0,1 mmol Cu (II)/mol HSA) i HSA-Cu(II)-MG kompleksa. Koncentracija proteina bila je 0,6 $\mu\text{mol/L}$ Ekscitaciona talasna dužina bila je $\lambda^{\text{exc}}=295$ nm, a emisioni opseg $\lambda^{\text{em}}=300-450$ nm.

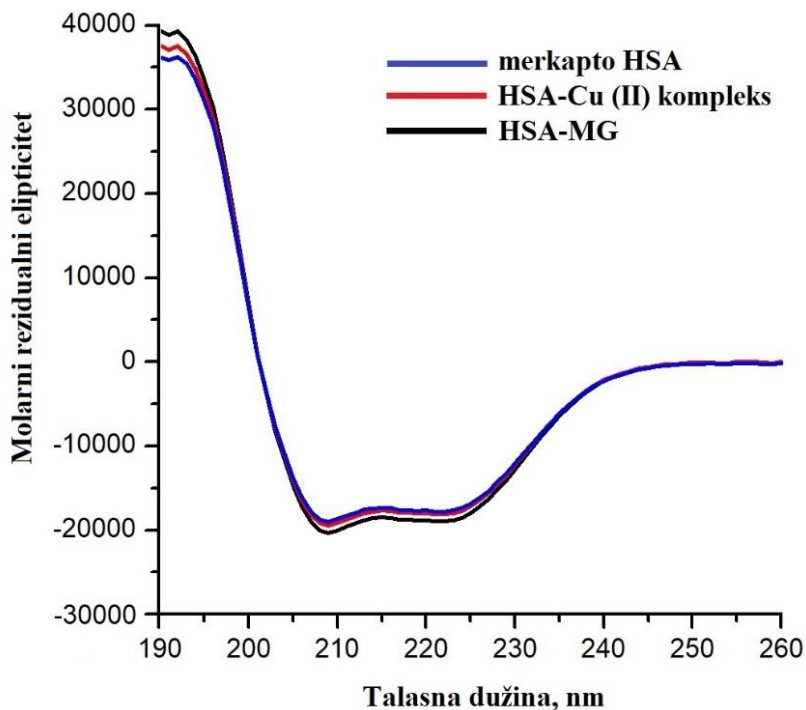
Nakon reakcije karbonilacije, intenzitet emisije u fluorescentnom spektru, na maksimumu koji odgovara $\lambda^{\text{em}}=346$ nm, smanjen je za 46% u poređenju sa merkapto-HSA (**Tabela 6**). Takođe, može se primetiti da se i uzorak HSA, koji sadrži vezane bakar(II)-jone,

nakon modifikacije sa MG (HSA-Cu(II)-MG kompleks) slično ponaša, pokazujući smanjenje intenziteta fluorescencije od 44 %. Samo vezivanje jona bakra gotovo da ne utiče na konformaciju HSA molekula. Uzorak HSA, koji ima vezane bakra(II)-jone (HSA-Cu(II)-kompleks), ima gotovo identičnu vrednost intenziteta emisije na maksimumu kao i merkapt-HSA.

Tabela 6. Smanjenje intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije HSA uzoraka nakon vezivanja jona bakra(II) i modifikacije sa MG.

Uzorak HSA	Smanjenje intenziteta fluorescencije na λ^{\max} u poređenju sa merkapt-HSA (%)
Merkapto-HSA	/
HSA-Cu(II)-kompleks	3,4
HSA-MG	46,3
HSA-Cu(II)-MG-kompleks	44,1

U cilju utvrđivanja da li razlike u emisionim fluorescentnim spektrima potiču samo od promena konformacije HSA molekula tokom reakcije karbonilacije, ili pak dolazi i do promena u njegovoj sekundarnoj strukturi, snimljeni su CD spektri u dalekoj-UV oblasti (oblast koja je karakteristična za sekundarne strukture) (**Slika 11**). Obradom spektara u CONTINILL programskom alatu nisu nađene značajne razlike između uzoraka HSA. Ova činjenica govori u prilog tome da reakcija karbonilacije HSA sa MG, kao ni vezivanje jona bakra(II), ne utiču na sekundarnu strukturu HSA. Dakle, smanjenje intenziteta fluorescencije pri karbonilaciji je posledica promene tercijarne strukture HSA molekula.



Slika 11. CD spektri (u dalekoj UV oblasti) merkaptto-HSA, HSA-Cu(II)-kompleksa i HSA-MG. Koncentracija proteina bila je 1 mg/mL.

Dobijeni rezultati potvrđuju pretpostavku da HSA molekuli sa smanjenim sadržajem Cys34-SH grupa imaju promenjen kapacitet za vezivanje bakar(II)-jona. Takođe, reakcija karbonilacije dovodi do velikog smanjenja afiniteta HSA prema bakru(II). To može imati značajne posledice u pogledu razvoja i/ili povećanja oksidativnog stresa, ako se ima u vidu sposobnost učešća slobodnih/nevezanih jona bakra(II) u redoks-reakcijama koje dovode do nastajanja slobodnih radikala. Ove posledice posebno su izražene u DM II, ali i drugim patološkim stanjima u kojima je jedan od dominantnih izvora oštećenja na ćelijama i tkivima upravo oksidativni stres, prouzrokovan generisanjem slobodnih radikala.

4.2. Da li reakcija karbonilacije Cys34-tiolne grupe ima uticaja na otpuštanje bakar(II)-jona iz HSA-Cu(II)-kompleksa?

Kako bismo došli do odgovora na ovo pitanje, u prvom koraku su nagrađeni HSA-Cu(II) kompleksi, a zatim je izvršena karbonilacija sa MG. Merkapto-HSA (sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,879 mol/molHSA) je pre-inkubiran sa tri različite koncentracije bakar(II)-jona (0,05, 0,100 i 0,200 mola Cu(II)/molHSA). Dobijeni HSA-Cu(II)-kompleksi I, II i III, kao i polazni merkapt-HSA, su u drugom koraku karbonilovani inkubacijom MG (**Poglavlje 3.4.7.**). Sadržaj vezanog bakra(II) u HSA-Cu(II)-MG-kompleksima (I, II i III) određen je spektrofotometrijski sa batokuproinskim reagensom, a sadržaj slobodnih tiolnih grupa sa DTNB reagensom (**Tabela 7**).

Tabela 7. Uticaj aerobne oksidacije i karbonilacije (sa MG) merkapt-HSA (sa 0,879 mol HSA-SH grupa /mol HSA) i HSA-Cu(II)-kompleksa na sadržaj HSA-SH grupa i vezanih bakar(II)-jona. Svaki eksperiment, kao i sva merenja, urađeni su u triplikatu.

Uzorak	Sadržaj HSA-SH grupa nakon 24 h inkubacije (mol SH/mol HSA)	Smanjenje sadržaja HSA-SH grupa u poređenju sa polaznim merkapt-HSA (%)	Sadržaj bakar(II)-jona vezanih za HSA (mol/mol HSA)		Smanjenje sadržaja vezanih bakar(II)-jona (%)
			0 h	24 h	
Merkapto-HSA	0,800±0,046	8,9	/	/	/
HSA-Cu(II) I	0,818±0,030	6,9	0,0511±0,0035	0,0496±0,0035	2,9
HSA-Cu(II) II	0,788±0,030	10,3	0,0979±0,0038	0,0920±0,0015	6,0
HSA-Cu(II) III	0,746±0,028	15,1	0,2025±0,0042	0,1855±0,0032	8,4

Merkapto- HSA-MG	0,587±0,049	33,2	/	/	/
HSA- Cu(II) I-MG	0,600±0,021	31,7	0,0511±0,0035	0,0432±0,0042	15,5
HSA- Cu(II) II-MG	0,586±0,041	33,3	0,0979±0,0035	0,0814±0,0033	16,8
HSA- Cu(II) III-MG	0,538±0,060	38,8	0,2025±0,0042	0,1675±0,0019	17,3

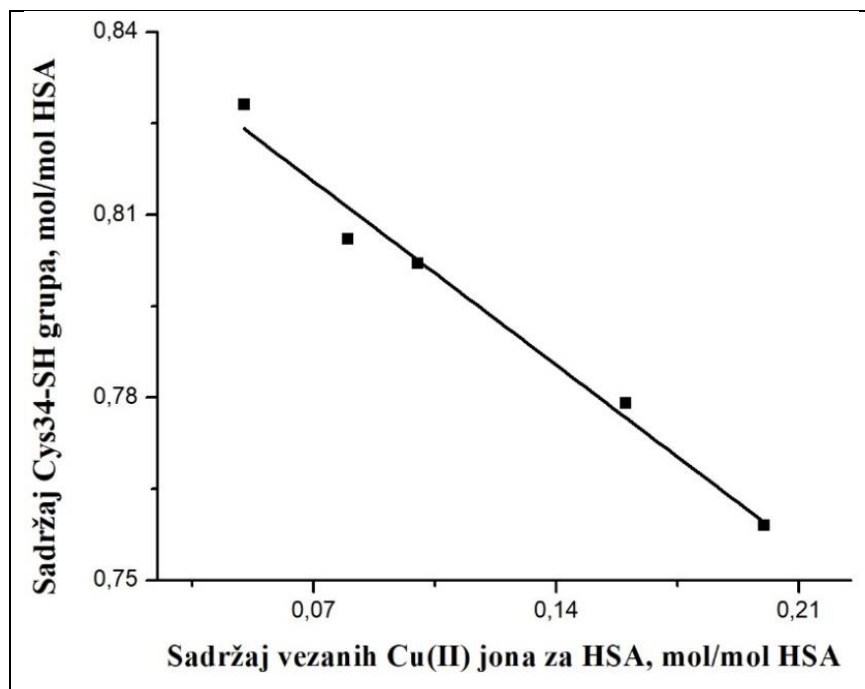
Inkubacija merkapto-HSA tokom 24 h na 37 °C dovodi do smanjenja HSA-SH sadržaja za skoro 9 %, i to smanjenje uzrokovano je aerobnom oksidacijom Cys34-tiolne grupe. Sa druge strane, smanjenje sadržaja HSA-SH grupa u kompleksima HSA-Cu(II)-I, II i III se razlikovalo (6,9 %, 10,3 % i 15,1 %), potvrđujući postojanje korelacije između sadržaja Cys34 tiolne grupe na HSA molekulu i sadržaja vezanih bakar(II)-jona.

U cilju sagledavanja da li je smanjenje sadržaja Cys34-SH grupa na HSA-kompleksima I, II i III posledica samog kompleksiranja sa jonima bakra, ili aerobne oksidacije, ili možda oba faktora, dizajniran je novi eksperiment. Naime, sintetisano je pet HSA-Cu(II)-kompleksa, inkubacijom merkapto-HSA sa 0,05, 0,08, 0,0, 0,16 i 0,20 mola bakar(II)-jona po molu HSA, tokom 40 min u mraku, na +4 °C. Sadržaji HSA-SH grupa u ovim kompleksima prikazani su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Promena sadržaja HSA Cys34 tiolne grupe tokom dobijanja HSA-Cu(II) kompleksa, polazeći od merkapto-HSA (0,879 mol SH/molHSA) i pet različitih koncentracija bakar(II)-jona. Eksperiment je urađen u triplikatu, kao i svako pojedinačno određivanje.

Sadržaj Cu(II)- jona inkubiranih sa merkapto-HSA (mol/mol HSA)	Sadržaj HSA-SH grupa nakon inkubacije merkapto-HSA sa Cu(II)-jonima (mol/mol HSA) ± SD	Smanjenje sadržaja HSA-SH grupa u odnosu na merkapto-HSA (0,879 mol SH/molHSA)	
		(mol/ mol HSA) ± SD	(%)
0,05	0,828±0,003	0,051±0,003	5,8
0,08	0,806±0,005	0,073±0,006	8,3
0,10	0,802±0,010	0,077±0,011	8,8
0,16	0,779±0,004	0,100±0,003	11,4
0,20	0,759±0,008	0,120±0,008	13,7

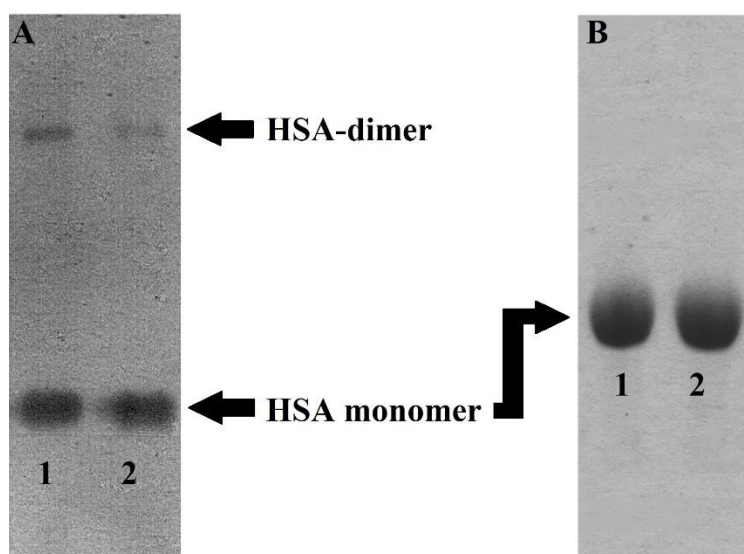
Može se zaključiti da vezivanje bakar(II)-jona za HSA dovodi do smanjenja sadržaja slobodne Cys34 tiolne grupe, kao i da je ovo smanjenje proporcionalno koncentraciji bakar(II)-jona u inkubacionoj smeši. Linearnom regresionom analizom utvrđena je visoka negativna korelacija između sadržaja tiolne grupe i jona bakra(II); (Pearson-ov koeficijent korelacije iznosi 0,996, $p < 0,001$) (Slika 12).



Slika 12. Korelacija između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja bakar(II)-jona vezanih za merkpto-HSA ($R=0,996$; $p<0,001$).

Upoređivanje promena u sadržaju HSA-SH grupa u HSA-Cu(II) kompleksima I, II i III, dobijenim nakon 40 min inkubacije (**Tabela 8**) i nakon 24 h inkubacije (**Tabela 7**), pokazalo je da ne postoje značajne razlike za istu koncentraciju bakra: 5,8 %, 8,8 % i 13,7 % naspram 6,9 %, 10,3 % i 15,1 %. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da vezivanje bakar(II)-jona dovodi do smanjenja sadržaja Cys34 tiolne grupe na površini molekula HSA. Takođe, ovi rezultati upućuju da bi bakar(II)-joni, tokom kompleksiranja sa merkpto-HSA, mogli da dovedu do oksidacije tiolne grupe Cys34 i na taj način da utiču na redoks-status samog HSA molekula, što je u skladu sa istraživanjima **Gryzunov-a i sar. (2003)**. U cilju provere ove pretpostavke, urađena je nativna PAGE uzoraka HSA (HSA-Cu(II)-kompleksa II i merkpto-HSA), a zatim denzitometrijska analiza gela (**Slika 13. A.**). Takođe, isti uzorci analizirani su i SDS-redukujućom PAGE (**Slika 13. B.**), u cilju provere da li vezivanje bakra dovodi do oksidacije drugih funkcionalnih grupa čijim bi umrežavanjem mogao nastati homodimer. Utvrđeno je da je intenzitet trake, koja odgovara dimeru HSA dobijenom u

slučaju HSA-Cu(II)-kompleksa II, za 10 % veći u odnosu na dimersku traku merkaptio-HSA. Ovaj procenat gotovo da je identičan sa procentom smanjenja (10,3%) sadržaja HSA-SH grupa nakon 24 h inkubacije merkaptio-HSA sa bakra(II)-jonima. Ovim je nedvosmisleno dokazano da bakar(II)-joni tokom inkubacije sa merkaptio-HSA dovode do oksidacije tiolne grupe Cys34, stvara se disulfidni most koji povezuje dva molekula HSA, odnosno homodimer, imajući u vidu da je SDS-redukujućom PAGE istih uzoraka pokazano da se dobijaju identične trake (**Slika 13. B.**).



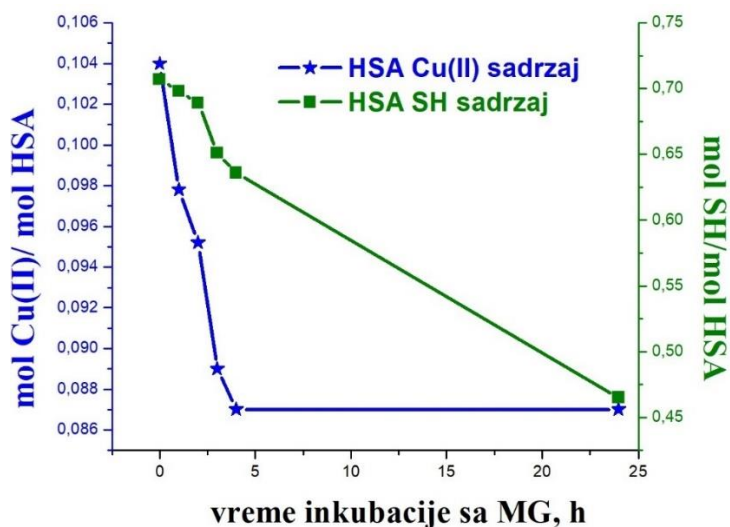
Slika 13. A. Nativna PAGE uzoraka HSA: HSA-Cu(II)-kompleksa II (traka 1) i merkaptio-HSA (traka 2). Elektroforeza je urađena na 10 % poliakrilamidnom gelu, a po 2 μg proteina je naneto u svaki bunar; **B.** Redukujuća SDS PAGE uzoraka HSA-Cu(II)-kompleksa II (traka 1) i merkaptio-HSA (traka 2). Elektroforeza je urađena na 10 % poliakrilamidnom gelu, a po 3 μg proteina je naneto u svaki bunar

Reakcija karbonilacije merkaptio-HSA (sa sadržajem HSA-SH grupe od 0,879 mol/mol HSA) sa MG tokom 24^h dovodi do smanjenja sadržaja tiolne grupe za 33,2 % (prikazano u **Tabeli 7**), što je u skladu sa rezultatima **Aćimović i sar. (2010)**. Sličan procenat smanjenja sadržaja HSA-SH grupa dobijen je i pri karbonilaciji HSA-Cu(II) kompleksa I, II i III (31,7 %, 33,3 % i 38,8 %, redom). Međutim, kada se uzme u obzir smanjenje sadržaja HSA-SH grupa do koga dolazi pri sintezi samih kompleksa (inkubacijom sa bakar(II)-jonima), sagledava se da je procenat smanjenja izazvan karbonilacijom zapravo manji i iznosi

24,8 %, 23,0 % i 23,6 %. Treba takođe istaći da je, tokom karbonilacije kompleksa I, II i III sa MG, utvrđeno da smanjenje sadržaja Cys34 tiolne grupe prati smanjenje sadržaja vezanih jona Cu(II) za 15,5 %, 16,8 % i 17,3 %. Dakle, tokom modifikacije HSA-Cu(II)-kompleksa sa MG dolazi do otpuštanja bakar(II)-jona.

4.2.1. Da li je karbonilacija ostatka Cys34 sa MG uzrok otpuštanja jona bakra(II) iz HSA-Cu-kompleksa?

Odgovor na ovo pitanje dobijen je praćenjem promena sadržaja HSA-SH grupa i vezanih Cu(II)-jona tokom 24 h inkubacije HSA-Cu(II)-kompleksa II sa MG (**Slika 14**). Može se uočiti da je trend toka krive reakcije karbonilacije Cys34 tiolne grupe sličan trendu krive oslobađanja bakar(II)-jona iz kompleksa. Oslobađanje jona bakra dešava se u prvih 3-4 h inkubacije. Nakon prvog časa inkubacije oslobađa se 6,6 % vezanog bakra, a nakon 4 h 16,3%. U nastavku inkubacije do 24 h, sadržaj bakra(II) vezanog za HSA se više ne menja. Izračunavanjem odnosa između procenta smanjenja sadržaja Cys34-SH grupe tokom karbonilacije HSA-Cu(II)-kompleksa II i procenta smanjenja vezanih bakar(II)-jona (R), dobijene su vrednosti u opsegu od 0,21 do 2,10 (**Tabela 9**).



Slika 14. Promena sadržaja vezanih Cu(II)-jona i sadržaja HSA-SH grupa tokom 24 h inkubacije HSA-Cu(II)-kompleksa II sa MG.

Tabela 9. Smanjenje (u %) sadržaja vezanih Cu(II)-jona i sadržaja HSA-SH grupa, kao i njihov odnos (R) dobijen tokom 24-časovne inkubacije HSA-Cu(II)-kompleksa II sa metilglioksalom.

Vreme (h)	Smanjenje sadržaja Cys34-SH grupa (%)	Smanjenje sadržaja vezanih Cu(II)-jona (%)	Odnos, R
1	1,4	6,6	0,21
2	2,5	8,5	0,29
3	8,0	14,4	0,56
4	10,0	16,3	0,61
24	34,2	16,3	2,10

Rezultati ovog eksperimenta pokazali su da je otpuštanje jona bakra(II) iz HSA-Cu(II)-kompleksa II, slično vezivanju jona za HSA, odnosno da zavisi od redoks-statusa Cys34-SH grupe. Takođe je važno istaći da je uticaj reakcije karbonilacije na procenat smanjenje vezivanja Cu(II)-jona za HSA (15,2 %, 15,5 % i 18,2 %), dobijen u eksperimentu ispitivanja kapaciteta HSA za vezivanje ovih jona (**Tabela 5**), gotovo identičan procentu otpuštenih bakar(II)-jona iz HSA-Cu(II)-kompleksa (15,5 %, 16,8 % i 17,3 %) (**Tabela 7**). Ovakav rezultat bi bio sasvim očekivan ukoliko bi smanjenje sadržaja HSA-SH grupa bilo isključivi uzrok utvrđenih promena u kapacitetu HSA za vezivanje bakar(II)-jona, posebno ako se uzme u obzir da je u oba eksperimenta korišćena jednaka koncentracija agensa za modifikaciju (MG). Ipak, treba imati u vidu da bakar(II)-joni grade jake tetragonalne komplekse sa biološkim ligandima koji sadrže atom azota, što je prema **Banci i sar. (2010)** od izuzetnog značaja za brzu izmenu liganda prilikom unutarćelijskih transfera. Stoga bi otpuštanje bakar(II)-jona, tokom reakcije karbonilacije HSA-Cu(II) kompleksa sa MG, moglo biti posledica i konformacionih promena molekula HSA.

Fluorescentni emisioni spektri karbonilovanih merkapto-HSA i HSA-Cu(II)-kompleksa II, odnosno konformacione promene su gotovo identične (**Slika 10**). Smanjenje intenziteta fluorescencije karbonilovanih uzoraka na maksimumu emisije iznosi 46,3 % i 44,1 % (**Tabela 6**). Sa druge strane, odnos (R) između procenta smanjenja HSA-SH sadržaja,

usled karbonilacije HSA-Cu(II)-kompleksa (I, II i III) sa MG, i procenta otpuštenih bakar(II)-jona iz ovih kompleksa nakon karbonilacije, iznosi $2,12 \pm 0,28$ (**Tabela 10**). Kada je u pitanju aerobna oksidacija HSA-Cu(II)-kompleksa, ovaj odnos je gotovo isti i iznosi $1,96 \pm 0,36$.

Tabela 10. Zavisnost procesa otpuštanja bakar(II)-jona iz HSA-Cu(II) kompleksa I, II i III tokom aerobne oksidacije i karbonilacije Cys34 tiolne grupe. R predstavlja odnos smanjenja sadržaja HSA-SH grupa i smanjenja sadržaja vezanih Cu(II) jona.

Kompleks	Cys34 tiolna grupa	Smanjenje sadržaja HSA-SH grupa (%)	Smanjenje sadržaja vezanih Cu(II)-jona (%)	Odnos, R	Srednja vrednost odnosa R \pm SD
I	Aerobna oksidacija	6,9	2,9	2,38	$1,96 \pm 0,36$
II		10,3	6,0	1,71	
III		15,1	8,4	1,80	
I	Karbonilacija sa MG	24,8	12,9	1,92	$2,12 \pm 0,28$
II		23,0	11,5	2,00	
III		23,6	9,7	2,44	

Ranije je pokazano da se tokom reakcije karbonilacije HSA menja njegova konformacija, a time i dostupnost Cys34 tiolne grupe (**Aćimović i sar., 2010**). Naši rezultati pokazuju da se promene konformacije ne dešavaju prilikom aerobne oksidacije. Stoga se može zaključiti da vezivanje i otpuštanje bakar(II)-jona za/sa HSA uglavnom zavisi od redoks-stanja slobodne Cys34 tiolne grupe. Drugim rečima, ukoliko dođe do karbonilacije ili aerobne oksidacije Cys34-SH grupe, smanjiće se i afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona, ili, ukoliko su ovi joni već vezani doći će do njihovog otpuštanja. Ovaj zaključak ima direktne implikacije na patološka stanja, za koja je karakterističan karbonilni stres kao što su dijabetes, Alchajmerova bolest, ciroza jetre, ateroskleroza, uremija, anemija itd. (**Miyata i sar., 2002; Picklo i sar., 2002; Šebeková i sar., 2002**), i u kojima dolazi do povišenog fluksa

MG i drugih reaktivnih di-karbonilnih jedinjenja (glioksal i 3-deoksiglukozon). U ovim stanjima, reakcija karbonilacije mogla bi značajno doprineti smanjenju sadržaja HSA-SH grupa, a time i smanjenju afiniteta/kapaciteta HSA za vezivanje bakar(II)-jona. Nevezani joni bakra(II), kao redoks-aktivni, dalje doprinose razvoju i pogoršanju postojećeg oksidativnog stresa, pokrećući Fenton-ovu reakciju.

4.3. Međudejstva HSA, masnih kiselina i bakar(II)-jona: uticaj na reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Vezivanje MK za molekul HSA dovodi do promena u njegovoj konformaciji (Yamato i sar., 2007; Kitamura i sar., 2014; Curry i sar., 1998; Curry i sar., 1999). Kao što je već napred istaknuto, antioksidativne karakteristike HSA zavise od nukleofilnih svojstava tiolne grupe ostatka Cys34, ali i od njene izloženosti/dostupnosti. Iako ostatak Cys34 nije direktno uključen u vezivanje MK za molekul HSA, nađeno je da se njegova reaktivnost menja pri stvaranju kompleksa HSA-MK (Pavićević i sar., 2014). Takođe je utvrđeno da promena reaktivnosti zavisi i od tipa MK koja se vezuje i da MK iz ribljeg ulja, koje se često koriste u suplementaciji, i u terapijskim dozama (Šunderić i sar., 2019), značajno povećavaju reaktivnost Cys34-SH grupe (Pavićević i sar., 2014). Polazeći od zaključaka, do kojih se došlo u prethodnim eksperimentima, da:

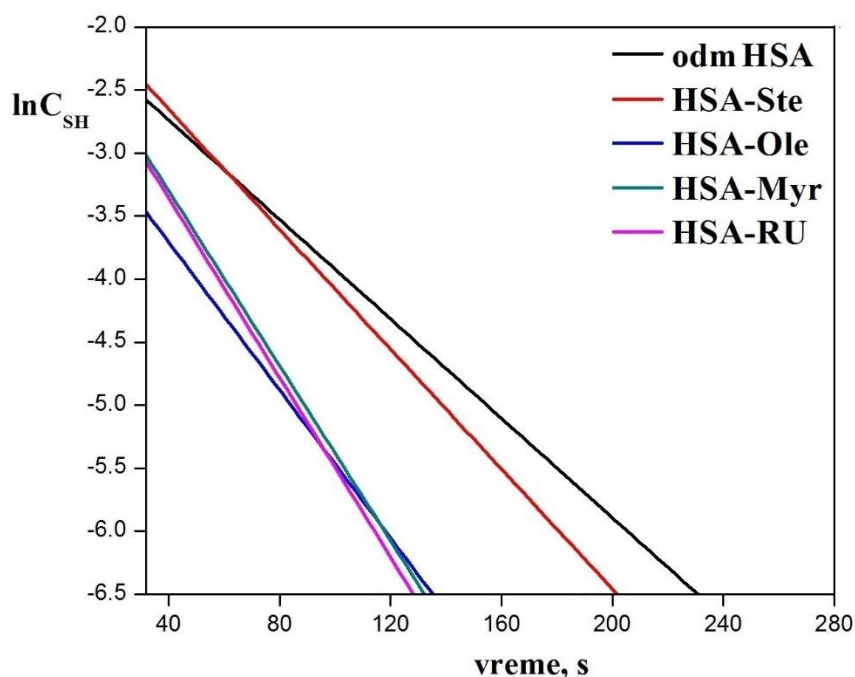
- afinitet HSA za vezivanje bakar (II)-jona zavisi od oksidativnog statusa tiolne grupe Cys34;
- tiolna grupa Cys34 jeste meta za reakciju karbonilacije sa MG;
- se reaktivnost Cys34-SH grupe menja usled vezivanja MK za HSA molekul;

kao i činjenice da je sadržaj MK često povećan u stanjima sa karbonilnim stresom poput dijabetesa (Roden i sar., 2000; Staehr i sar., 2003), ispitivanje kompleksnog odnosa HSA, MK, prelaznog metala i agensa za modifikaciju, i njihovog uticaja na reaktivnost tiolne grupe ima izuzetan značaj. Zato je dizajniran *in vitro* model koji je trebalo da omogućiti sagledavanje promena reaktivnosti Cys34-SH grupe i afiniteta HSA za vezivanje Cu(II)-jona nakon vezivanja MK za HSA, u prisustvu i odsustvu reagensa za karbonilaciju.

4.3.1. Vezivanjem bakar(II)-jona za kompleks HSA-masna kiselina menja se reaktivnost Cys34-SH grupe

Napred je istaknuto da se reaktivnost Cys34-SH grupe menja pri vezivanju MK za HSA, kao i da promena reaktivnosti zavisi od tipa vezane masne kiseline, dužine i zasićenosti njenog lanca (**Pavićević i sar., 2014**). Eksperimenti izvedeni u cilju sagledavanja uticaja bakar(II)-jona na reaktivnost Cys34-SH grupe kompleksa HSA-MK pokazali su da i vezivanje ovih jona, kao i broj vezanih MK po molekulu HSA (mol MK/mol HSA), takođe utiču na reaktivnost Cys34-SH grupe.

HSA ima sedam vezivnih mesta različitog afiniteta za vezivanje MK srednjeg i dugog lanca (**Curry i sar., 1999; Petipas i sar., 2001 i Bhattacharaya i sar., 2000**). Pri normalnim fiziološkim uslovima, od 0,1 do 0,2 mola MK vezano je po molu HSA. U perifernoj cirkulaciji, u patološkim uslovima poput dijabetesa ovaj odnos može biti veći (**Roden i sar., 2000; Staehr i sar., 2003**). Zato je za potrebe naših eksperimenata, HSA inkubiran sa različitim MK u molarnom odnosu HSA:MK 1:4 (**Poglavlje 3.4.6**). Pri datim uslovima inkubacije vezano je 4 molekula miristinske, 4 molekula MK iz ribljeg ulja (EPA+DHA), 3,3 molekula oleinske kiseline i 1,1 molekul stearinske kiseline po molekulu HSA. Reaktivnost tiolne grupe u dobijenim kompleksima (Myr-HSA, RU-HSA, Ole-HSA i Ste-HSA) praćena je u reakciji sa DTNB, određivanjem konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (**k'**). Linearizovane reakcione kinetike tiolne grupe odmašćenog HSA i HSA-MK kompleksa, i DTNB prikazane su na **Slici 15**, a vrednosti **k'** u **Tabeli 11**. Vezivanje MK za HSA povećava reaktivnost tiolne grupe kod svih ispitivanih HSA-MK kompleksa. Povećanje se kreće u opsegu od 20 do 80 %.



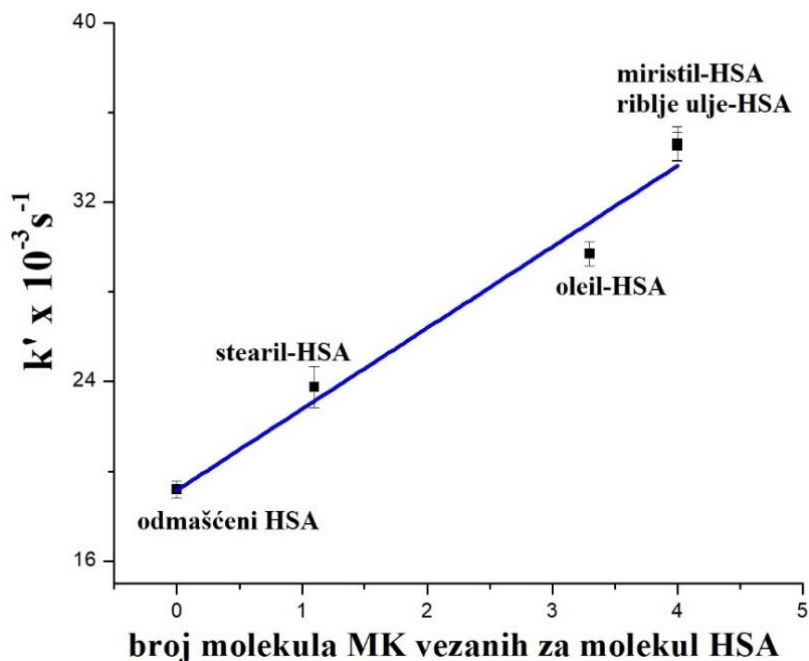
Slika 15. Linearizovane kinetike reakcije Cys34 tiolne grupe, odmašćenog HSA i HSA-MK kompleksa, sa DTNB. Myr - miristinska kiselina, RU - MK iz ribljeg ulja, Ole - oleinska kiselina i Ste - stearinska kiselina.

Tabela 11. Uticaj tipa i broja molekula MK vezane za HSA na vrednost konstante brzine reakcije (k') tiolne grupe Cys34 sa DTNB, pre i posle vezivanja Cu(II)-jona. k' je izražena kao srednja vrednost \pm SD za tri određivanja.

Uzorak	mol MK/mol HSA	$k' \times 10^{-3} s^{-1}$	
		Pre vezivanja Cu(II)-jona	Posle vezivanja Cu(II)-jona
Odmašćeni HSA	/	19,20 \pm 0,38	19,23 \pm 0,17
Stearil-HSA	1,1	23,76 \pm 0,92	23,81 \pm 0,51
Oleil-HSA	3,3	29,70 \pm 0,54	35,73 \pm 0,35*
Miristol-HSA	4,0	34,60 \pm 0,78	41,11 \pm 0,32*
Riblje ulje-HSA	4,0	34,50 \pm 0,64	41,09 \pm 0,61*

* $p < 0,05$, u poređenju sa HSA-MK kompleksima bez vezanih Cu(II)-jona

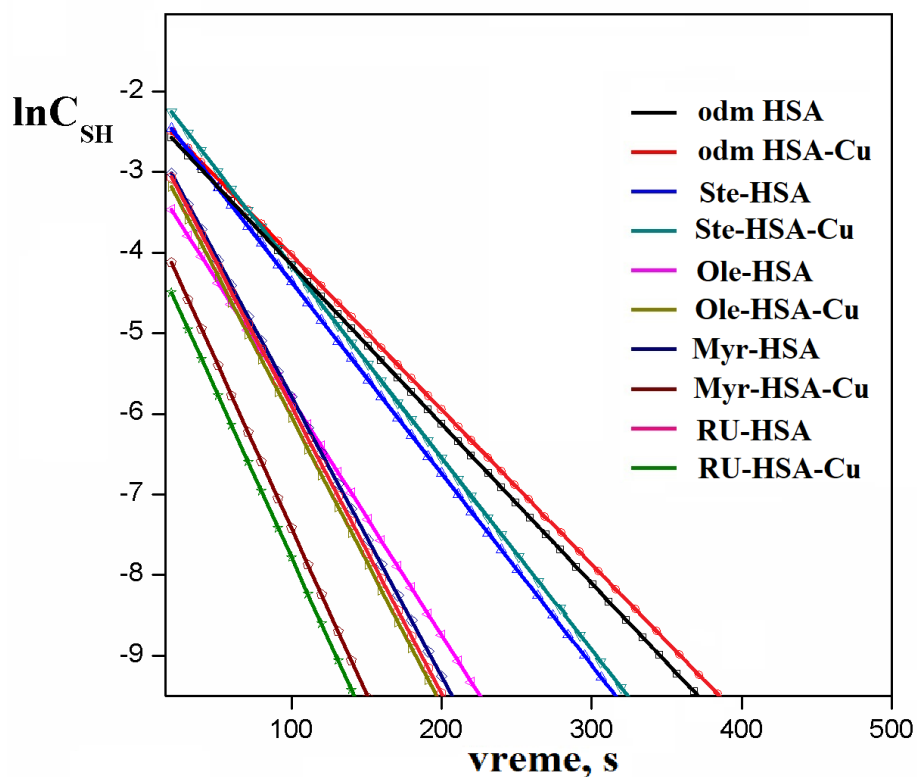
Kada se broj molekula vezanih masnih kiselina za HSA korelira sa k' vrednostima, koje odgovaraju reaktivnosti Cys34-SH grupe u HSA-MK kompleksima, dobija se značajna pozitivna korelacija ($R=0,970$, $p<0,001$; **Slika 16**). Dakle, reaktivnost Cys34 tiolne grupe raste sa porastom broja vezanih masnih kiselina. Vezane masne kiseline se na ovaj način ističu kao još jedan faktor koji bitno utiče na redoks-status HSA molekula.



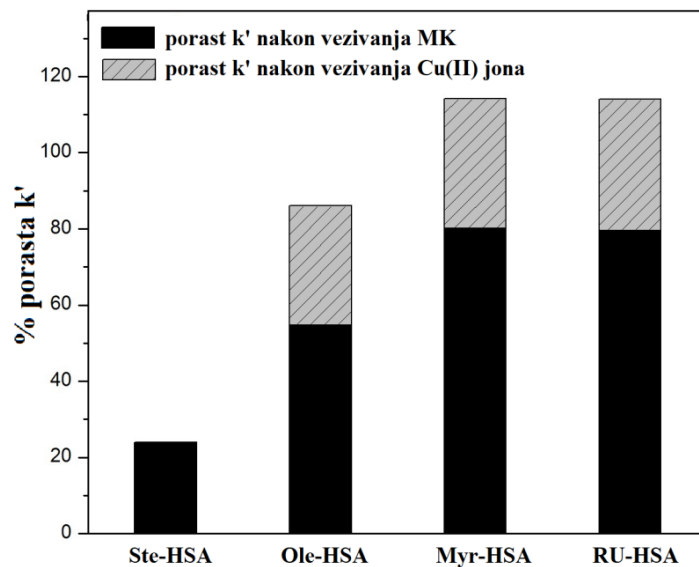
Slika 16. Zavisnost reaktivnosti (k') Cys34 tiolne grupe od broja molekula masnih kiselina vezanih za HSA. Vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije iznosi 0,970, ($p<0,001$).

Efekti vezivanja jona bakra(II) za odmašćeni HSA i HSA-MK-komplekse prikazani su u **Tabeli 11** i na **Slici 17**. Odmašćeni HSA-Cu(II) i Ste-HSA-Cu(II) kompleks ne pokazuju značajne promene u reaktivnosti Cys34 tiolne grupe nakon vezivanja bakar(II)-jona ($19,20$ vs. $19,23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ odnosno $23,76$ vs. $2,81 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Sa druge strane, vezivanje bakra izaziva značajno povećanje reaktivnosti Cys34-SH grupe u slučaju kada je za HSA vezana Myr, Ole i RU (**Tabela 11**), u odnosu na ove iste komplekse bez jona bakra-(II). U odnosu na odmašćeni HSA, Cys34-SH grupa kompleksa HSA-MK-Cu(II) pokazuje porast u reaktivnosti u opsegu od 86% za Ole-HSA-Cu(II), do 114% za Myr-HSA-Cu(II) i RU-HSA-

Cu(II) komplekse (**Slika 18**). Posebno treba istaći da prosečan doprinos samog vezivanja jona bakra(II) porastu reaktivnosti Cys34-SH grupe za sve komplekse iznosi oko 33%. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da je sadržaj vezanih bakar(II)-jona jednak u svim MK-HSA-Cu(II) kompleksima.



Slika 17. Uticaj vezivanja jona bakra i masnih kiselina na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA. Linearizovane kinetike reakcije tiolne grupe (sa DTNB) uzoraka: odmašćenog HSA (odm HSA), odmašćenog-HSA-Cu(II)-kompleksa (odm HSA-Cu), MK-HSA kompleksa i MK-HSA-Cu(II)-kompleksa. Myr-miristinska kiselina, RU-masne kiseline iz ribljeg ulja, Ole-oleinska kiselina i Ste-stearinska kiselina.



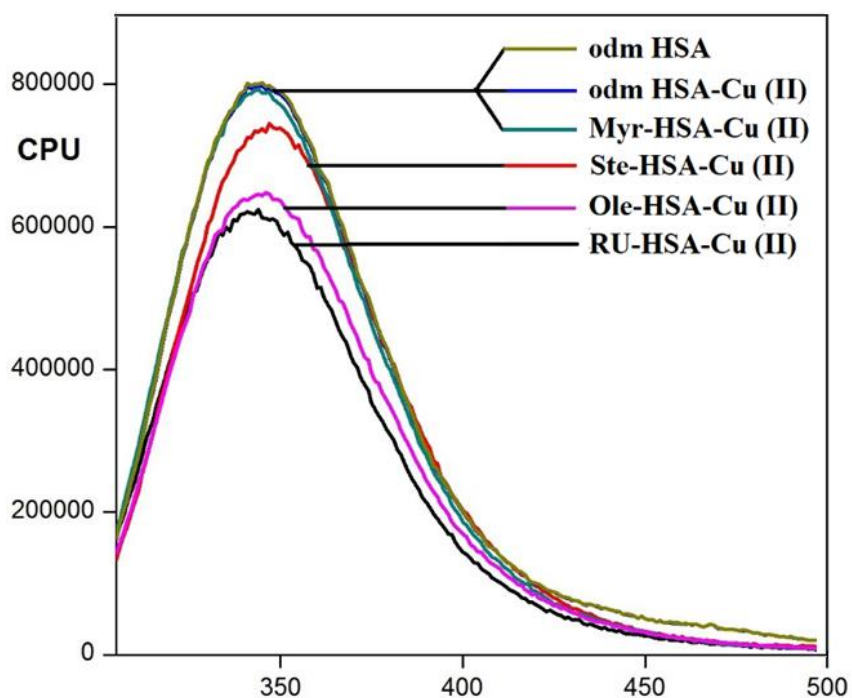
Slika 18. Grafički prikaz porasta reaktivnosti (k') Cys34-SH grupe HSA molekula u MK-HSA kompleksima, nakon vezivanja masnih kiselina, a potom jona bakra(II) za HSA. Myr-miristinska kiselina, RU-masne kiseline iz ribljeg ulja, Ole-oleinska kiselina i Ste-stearinska kiselina

4.3.2. Promena konformacije HSA i izloženosti ostatka Cys34 u kompleksima MK-HSA-Cu(II)

4.3.2.1. Zašto vezivanje masnih kiselina i jona bakra za HSA dovodi do velikog povećanja reaktivnosti tiolne grupe Cys34?

Kristalografske studije pokazale su da MK dugog lanca imaju zajednička vezivna mesta, a detaljniji eksperimenti ukazali su na razliku u interakcijama koje se ostvaruju pri vezivanju različitih MK za HSA (**Petipas i sar., 2001**). Ove studije pokazale su, takođe, da afinitet vezivnog mesta za MK zavisi od dužine njenog lanca i stepena nezasićenja (zasićena, mono- i poli-nezasićena). Da li je uočeni porast reaktivnosti HSA-Cys34-SH grupe u kompleksima MK-HSA-Cu(II) posledica različitih konformacionih promena HSA molekula, usled vezivanja MK i jona bakra(II), ispitano je snimanjem emisionih fluorescentnih spektara ovih kompleksa, ekscitacijom Trp214 na 295 nm (**Slika 19**).

Vezivanje jona bakra(II) za HSA nije dovelo do promena u fluorescentnom emisionom spektru. Rezultat je očekivan, ako se uzme u obzir da je visoko-afinitetno mesto za vezivanje bakar(II)-jona na N-terminusu (**Rozga i sar., 2007**). Vezivanje Ste, Ole i RU izaziva smanjenje intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije ($\lambda_{em}=344$ nm). Ipak, vezivanje mono-nezasićene Ole i poli-nezasićenih MK dugog lanca iz ribljeg ulja (EPA i DHA) izazivaju najveće promene u emisionim spektrima HSA, odnosno njegovoj konformaciji. Ove promene mogu nastati zbog geometrije samih liganada, pošto lanci Ole, EPA i DHA nisu linearni već imaju „uvijenu“ konformaciju, te prilikom njihovog vezivanja za HSA dolazi do prilagođavanja „tunela“ koji predstavljaju vezivna mesta.



Slika 19. Fluorescentni emisioni spektri kompleksa odmašćenog HSA, odmašćenog HSA-Cu(II) i MK-HSA-Cu(II) kompleksa. Koncentracija proteina bila je 0,6 $\mu\text{mol/L}$. Talasna dužina ekscitacije bila je 295 nm, a emisija je snimljena u opsegu talasnih dužina od 300 do 500 nm. Masne kiseline u kompleksima: Myr-miristinska kiselina, RU-masne kiseline iz ribljeg ulja, Ole-oleinska kiselina i Ste-stearinska kiselina.

Vezivanje Ste evidentno utiče na okruženje hidrofobnog džepa u kome se nalazi Trp214, pri čemu samo vezivanje ove MK ima manji uticaj na reaktivnost Cys34-SH grupe. Ovakav rezultat može se objasniti time što se u datim eksperimentalnim uslovima, za HSA vezao samo jedan molekul Ste, pri čemu je to vezivno mesto udaljeno od Cys34-SH grupe, što je u skladu sa rezultatima **Bhattacharya i sar. (2000)**.

Sa druge strane, vezivanje četiri molekula Myr za jedan molekul HSA, iako dovodi do značajnog porasta reaktivnosti Cys34-SH grupe (**k'**), ne dovodi do značajne promene u fluorescentnom emisionom spektru. Vezivanje Myr ima mali efekat na 3D strukturu domena HSA koji sadrži Trp214, što je u skladu sa literaturnim podacima (**Curry i sar., 1999**). Miristinska kiselina izaziva velike promene u reaktivnosti Cys34-SH grupe verovatno zbog činjenice da se njeni molekuli izuzetno dobro uklapaju u vezivne džepove na HSA, te na taj način utiču na izloženost/dostupnost tiolnog ostatka rastvaraču.

4.3.2.2. Kolika je izloženost ostatka Cys34 rastvaraču, odnosno dostupnost za reakciju?

U odmašćenom HSA ona iznosi svega 0,7 % (**Torres, 2012**). Kolika je vrednost izloženosti u kompleksima HSA sa MK, kada dođe do promene konformacije i promena u okruženju tiolne grupe? Naime, tiolna grupa je neposredno okružena polarnim i grupama koje lako jonizuju: Asp38, imidazolskim prstenom His39 i hidroksilnom grupom Tyr84 (**Stewart i sar., 2005**). Stoga, pri vezivanju masnih kiselina za HSA, zbog promene konformacije može da se menja rastojanje između S atoma Cys34 i pomenutih ostataka u odnosu na odmašćeni HSA, kao i da se značajno menja reaktivnost Cys34-SH. Upotrebom ASAView programskog paketa, izračunata je dostupnost rastvaraču aminokiselinskih ostataka Cys34, ali i Trp214, u molekulima HSA ko-kristalisanim sa određenim masnim kiselinama (što odgovara MK-HSA kompleksima). Strukture ovih HSA molekula preuzete su iz Proteinske banke podataka (Protein Data Bank, PDB). Dostupnost Trp214 je razmotrena da bi se uporedile izračunate konformacione promene sa eksperimentalno dobijenim fluorescentnim emisionim spektrima, za iste PDB unose.

Rezultati, prikazani u **Tabeli 12** pokazuju da je dobijeno veoma dobro slaganje između izračunate vrednosti izloženosti ostataka Trp214 rastvaraču i snimljenih emisionih

fluorescentnih spektara, koji potiču od emisije Trp214. Izloženost Trp214 kada je za HSA vezana Myr (25,8%) i u odmašćenom HSA je identična, a to je slučaj i sa fluorescentnim spektrima ovih uzoraka.

Tabela 12. Izračunata dostupnost/izloženost ostataka Cys34 i Trp214 rastvaraču (%) u različitim MK-HSA kompleksima, upotrebom programskog paketa ASAView. ^aPDB unos koji odgovara kompleksu HSA sa arahidonskom kiselinom (Ara) korišćen je kao aproksimacija u slučaju vezivanja poli-nezasićenih masnih kiselina dugog lanca za molekul HSA.

Ostatak	Odm-HSA	Ste-HSA	Ole-HSA	Myr-HSA	Ara-HSA ^a
	PDB: 1AO6	PDB:1E7I	PDB:1GNI	PDB:1E7G	PDB: 1GNJ
Cys34	0,7	4,9	3,5	5,6	4,9
Trp214	25,8	29,9	32,0	25,8	29,1

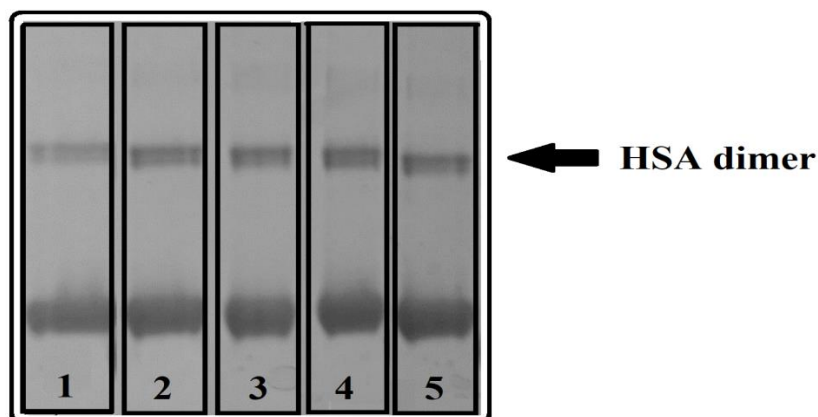
Izračunata vrednost izloženosti ostatka Cys34 (4.9%) u Ste-HSA kompleksu je velika i moglo bi se očekivati da uticaj vezivanja Ste na reaktivnost Cys34-SH grupe bude veći. Međutim, PDB unos za koji je ASAView računao dostupnost Cys34 ostatka sadrži sedam molekula stearinske kiseline koji su vezani za HSA, što upućuje na to da je svih sedam mesta za vezivanje masnih kiselina zauzeto. U našem eksperimentalnom model-sistemu, od ponuđena četiri molekula, HSA je vezao samo jedan. Stoga je efekat stearinske kiseline na dostupnost ostatka Cys34, odnosno reaktivnost njegove tiolne grupe manje izražen.

Vezivanje Ole, prema ASAView programu, uzrokuje najveću izloženost ostatka Trp214 u odnosu na odmašćeni HSA, što je u skladu sa dobijenim fluorescentnim spektrima i činjenicom da ova mono-nezasićena masna kiselina u cis-konformaciji, svojim vezivanjem za HSA izaziva veće konformacione promene u okolini Trp214 od zasićenih masnih kiselina.

PDB unos, koji je korišćen kao aproksimacija kompleksa u kome se za HSA vezuju poli-nezasićene masne kiseline dugog lanca (npr. arahidonska kiselina, Ara-HSA), prema

ASView programu ima manje uticaja na izloženost Trp214 od Ole (4,9 vs 3,5%). Iz snimljenih fluorescentnih spektara, sa druge strane, vidi se da vezivanje RU (EPA i DHA), dovodi do najvećih razlika u intenzitetu emisije Trp214. Mogući uzrok ovih razlika je broj nezasićenih veza u molekulima (u Ara 4, a u EPA i DHA 5, odnosno 6), što čini da je i prilagođavanje liganda vezivnim mestima u HSA molekulu verovatno drugačije.

Potvrda da izloženost ostataka Cys34 raste sa vezivanjem MK za HSA, te da ovaj porast zavisi i od vrste vezane masne kiseline, dobijena je i primenom native PAGE na uzorke MK-HSA-Cu(II) kompleksa (**Slika 20, Tabela 13**). Pokretljivost odmašćenog HSA-Cu(II) kompleksa i različitih MK-HSA-Cu(II) kompleksa (uzorci 1-5) gotovo je jednaka, sa R_f vrednostima između 0,450 i 0,457 (**Tabela 13**). Može se zaključiti da vezivanje različitih MK za HSA, iako dovodi do promene konformacije HSA, ne uzrokuje promenu pokretljivosti ovih uzoraka u nativnom PAA gelu. Ako se ima u vidu da se nativnom PAGE uzorci razdvajaju po naelektrisanju i po veličini i obliku molekula, jasno je da vezivanje masnih kiselina za HSA ne uzrokuje promenu naelektrisanja HSA, a porast mase MK-HSA uzoraka nije dovoljno veliki da bi se ovom tehnikom mogle uočiti razlike u odnosu na odmašćeni HSA. Sa druge strane, denzitometrijskom analizom gela (**Tabela 13**), upotrebom ImageJ programskog paketa, utvrđeno je da je udeo HSA-dimerske trake u kompleksima različit (od 17,5 do 24,6 %). Dimerizacija HSA uzoraka je, kako je napred istaknuto, uzrokovana kompleksiranjem sa bakar(II)-jonima. Međutim, analiza pokazuje da postoji trend dodatnog porasta udela dimerske trake kod MK-HSA-Cu(II) uzoraka u odnosu na odmašćeni-HSA-Cu(II) kompleks. Ovaj trend verovatno je posledica povećanja dostupnosti/izloženosti Cys34-SH grupe okolnoj sredini usled vezivanja masnih kiselina, i u skladu je sa teorijski dobijenim vrednostima izračunatim pomoću ASAVIEW programa.

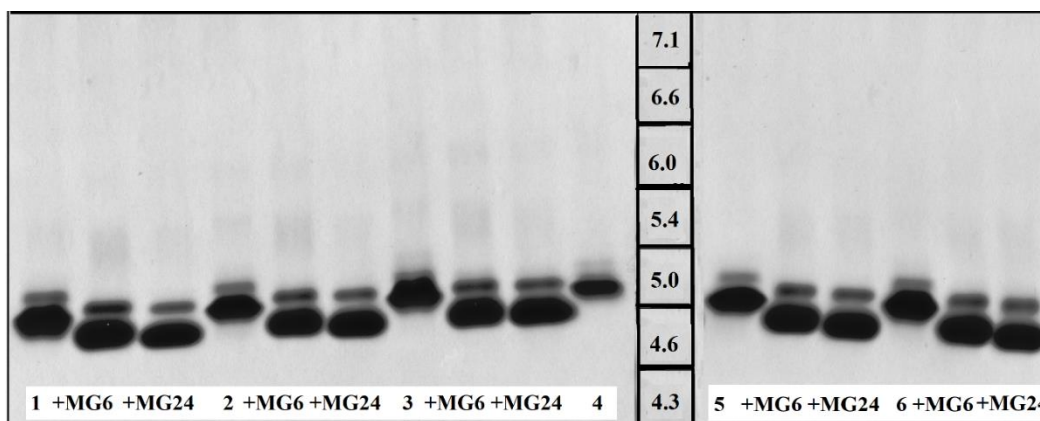


Slika 20. Nativna elektroforeza odmašćenog HSA-Cu i MK-HSA-Cu(II) kompleksa na 9 % gelu. Nanošeno je po 1 mg/mL uzorka u svaki bunar (15 μ L). 1- odmašćeni HSA-Cu(II) kompleks, 2-Myr-HSA-Cu(II) kompleks, Ole-HSA-Cu(II) kompleks, Ste-HSA-Cu(II) kompleks, RU-HSA-Cu(II) kompleks, redom. Myr-miristinska kiselina, RU-masne kiseline iz ribljeg ulja, Ole-oleinska kiselina i Ste-stearinska kiselina.

Tabela 13. Pokretljivost (R_f vrednosti) monomerskih traka odmašćenog HSA-Cu(II) i MK-HSA-Cu(II) kompleksa na gelu. Procentni udeo dimerske trake u HSA kompleksima, dobijen je nakon denzitometrijske analize.

	Kompleks	Udeo dimerske trake (%)	R_f vrednost monomerske trake
1	Odmašćeni-HSA-Cu(II)	17,5	0,452
2	Miristol-HSA-Cu(II)	24,4	0,450
3	Oleil-HSA-Cu(II)	24,6	0,455
4	Stearil-HSA-Cu(II)	21,8	0,453
5	Riblje ulje-HSA-Cu(II)	24,6	0,457

U cilju preciznije (u odnosu na PAA) provere efekta vezivanja MK na ukupno naelektrisanje HSA molekula, urađeno je izoelektrofokusranje odmašćenog HSA-Cu(II) i MK-HSA-Cu(II) kompleksa u opsegu 4,3 do 7,1 pH jedinica (**Slika 21**). Očitavanjem pI vrednosti uzoraka sa gela, na osnovu dobijene standardne prave ($r^2 = 0,988$), utvrđeno je da se one menjaju, ali ne u značajnoj meri (od 4,54 do 4,71). Ovakav rezultat u skladu je sa rezultatima native PAGE i potvrđuje zaključak da vezivanje MK za molekul HSA utiče na lokalnu strukturu, oko samog vezivnog mesta, ali ne uzrokuje značajnije perturbacije koje bi dovele do promene ukupnog naelektrisanja HSA. Dodatna traka na gelu za svaki uzorak, osim za uzorak odmašćenog merkaptio-HSA, verovatno je dimer HSA čija se pI vrednost ne razlikuje značajno između uzoraka.



Slika 21. Prikaz gela nakon izoelektrofokusranja uzoraka. Uzorci: 1- Ole-HSA-Cu(II); 2 - Myr-HSA-Cu(II); 3 – odmašćeni merkaptio-HSA-Cu(II); 4 - redukovani odmašćeni HSA (kao kontrola); 5 - Ste-HSA-Cu(II); 6 - RU-HSA-Cu(II); +MG6 - odgovarajući uzorak inkubiran sa metilglioksalom tokom 6 h; +MG24 - odgovarajući uzorak inkubiran sa metilglioksalom tokom 24 h.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da istovremeno vezivanje masnih kiselina i bakar(II)-jona za molekul HSA dovodi do gotovo dvostrukog povećanja reaktivnosti Cys34-SH grupe u odnosu na odmašćeni HSA. U ovom povećanju reaktivnosti Cys34-SH grupe, doprinos bakar(II)-jona je konstantan i iznosi oko jedne trećine.

Imajući u vidu ulogu HSA kao dominantnog antioksidanta, glavnog transportera MK i drugog po redu depoa bakar(II)-jona u cirkulaciji čoveka, jasno je zašto reaktivnost Cys34-SH grupe HSA molekula ima veliki značaj. Modulacijom redoks-potencijala HSA u patološkim stanjima poput dijabetesa, uremije, preeklampsije, kao i u starenju, moglo bi se postići olakšavanje simptoma bolesti ili prevencija komplikacija koje su vezane za oksidativni i karbonilni stres, a koje su veoma izražene u ovim patologijama (**Rabbani i sar., 2016**). Ovo je posebno relevantno kada se govori o MK koje potiču iz ribljeg ulja koje se koriste u intervenciji ishranom, u terapijskim dozama.

4.4. Uticaj reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II)-kompleksa na vezivanje Cu(II)-jona

Uticaj oksidativnog stresa odnosno karbonilnog strsa (kao vrste oksidativnog stresa) na razvoj sekundarnih komplikacija u dijabetesu i drugim patološkim stanjima mogao bi se smanjiti modulacijom redoks-potencijala Cys34-tiolne grupe, posebno ako se ima u vidu da pored antioksidativne uloge ona ima važnu ulogu i u „hvatanju“ reaktivnih karbonilinih jedinjenja (**Roche i sar., 2008**).

Reaktivnost Cys34-tiolne grupe, u sistemu u kome je povećano i vezivanje slobodnih MK za HSA i stepen karbonilacije molekula HSA, ispitana je od strane Pavićevića i sar. (**2014**) u našoj laboratoriji. Utvrđeno je da se reaktivnost Cys34-tiolne grupe u svim kompleksima (sa Myr, Ste i Ole kiselinom) menja na isti način, tj. da njena reaktivnost usled karbonilacije opada (u rasponu od 1,3 do 1,8 puta u zavisnosti od vezane masne kiseline) u odnosu na odmašćeni karbonilovani HSA. Drugim rečima, MG utiče na sve HSA-MK komplekse na sličan način, tako što smanjuje reaktivnost tiolne grupe Cys34. Jedini faktor koji dovodi do razlika u reaktivnosti je tip vezane masne kiseline. Sa druge strane, rezultati ove disertacije, prikazani u prethodnim poglavljima, pokazali su da na reaktivnost Cys34-SH grupe sinergistički utiče vezivanje masnih kiselina i vezivanje bakar(II)-jona. Polazeći od navedenog, kao i od činjenica:

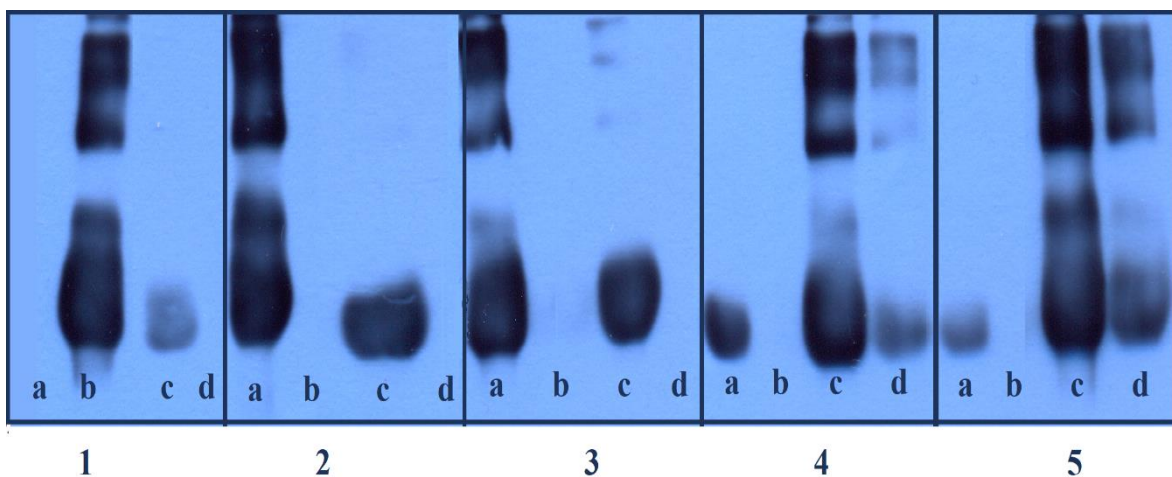
- da se joni bakra(II) preferencijalno vezuju za merkapto-HSA (**Penezić i sar., 2015**), kao i
- da postoji prostorna komunikacija između visoko-afinitetnog mesta za vezivanje bakara(II)-jona koje se nalazi na N-terminusu HSA, odnosno His3, i Cys34 (**Christodoulou i sar., 1995**),

u nastavku ove disertacije je detaljnije ispitano šta se dešava u kompleksnom sistemu, u kome je povećan sadržaj masnih kiselina i sadržaj redoks-aktivnih bakara(II)-jona, kao i u kome se reakcija karbonilacije odigrava u većem stepenu (**Blache i sar., 2015**).

Za ispitivanje su pripremljeni kompleksi HSA sa masnim kiselinama (Ste, Myr, Ole, RU) i jonima bakara(II). Metilglioksal je odabran kao agens za *in vitro* modifikaciju/karbonilaciju HSA molekula. U **Poglavlju 2.5.1.** prikazani su putevi stvaranja ovog reaktivnog α -oksoaldehida pri normalnim fiziološkim uslovima. U dijabetesu je nastajanje MG povećano za pet do šest puta (**Lapolla i sar., 2003**). Količina MG, odnosno molski odnos MG:HSA (10 mmol/L MG : 0.5 mmol/L HSA), primenjen pri karbonilaciji *in vitro* u ovom radu, je visok i za patološke uslove (dijabetes). Velika koncentracija metilglioksala omogućila je inkubaciju HSA u kraćem vremenskom periodu (24 h). U nekim studijama predložena je upotreba nižih koncentracija metilglioksala, upravo imajući u vidu pato-fiziološku relevantnost eksperimentalnog modela u odnosu na *in vivo* uslove (**Anguizola i sar., 2013**), i dobijanje tzv. „minimalno glikovanog“ HSA. Međutim, inkubacija HSA sa reagensom za modifikaciju u tom slučaju traje duže od 24 h, čime se povećava rizik od kontaminacije uzorka patogenima iz okoline tokom alikvotiranja. Sa druge strane, primena viših koncentracija metilglioksala može dovesti do agregacije molekula HSA i geliranja inkubacione smeše, čime se onemogućava dalje ispitivanje i analiza ovakvih uzoraka.

Efikasnost karbonilacije uzoraka (odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks i MK-HSA-Cu(II)-kompleksi) metilglioksalom imunoblotom sa autoradiografskom detekcijom, primenom anti-DNP antitela (**Slika 22**). Metoda se, kao što je opisano u **Poglavlju 3.4.13.**, zasniva na specifičnoj reakciji DNPH reagensa sa karbonilnom grupom HSA molekula. Nakon modifikacije uzoraka, elektroforetskog razdvajanja i transfera na membranu,

kovalentno vezani DNP molekuli detektovani su sa anti-DNP antitelima. Pored svakog DNP-modifikovanog uzorka, u bunar je naneta i odgovarajuća kontrola koja nije modifikovana primenom DNPH reagensa.



Slika 22. Rezultati imunoblota i autoradiografske detekcije primenom anti-DNP antitela: Primarna antitela – zečija anti-DNP poliklonska antitela u razblaženju 1:5000; Sekundarna antitela - poliklonska anti-zečji IgG antitela konjugovana sa HRP u razblaženju 1:10000; dužina ekspozicije bila je 5 min. Legenda: **1** – odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks (**a** - kontrola uzorka 1 nakon 24 h inkubacije sa MG bez DNPH, **b** - uzorak 1 inkubiran sa MG tokom 24 h, **c** - uzorak 1 bez MG, **d** - kontrola uzorka 1 bez MG i DNPH); **2** – Ole-HSA-Cu(II) kompleks (**a** - uzorak 2 inkubiran sa MG tokom 24 h, **b** - kontrola uzorka 2 nakon 24 h inkubacije sa MG bez DNPH, **c**-uzorak 2 bez MG, **d** - kontrola uzorka 2 bez MG i DNPH); **3** – Ste-HSA-Cu(II)-kompleks (**a** – uzorak 3 inkubiran sa MG tokom 24 h, **b** – kontrola uzorka 3 nakon 24 h inkubacije sa MG bez DNPH, **c** – uzorak 3 bez MG, **d** – kontrola uzorka 3 bez MG i DNPH); **4** – Myr-HSA-Cu(II)-kompleks (**a** – uzorak 4 bez MG, **b** – kontrola uzorka 4 bez MG i DNPH, **c** – uzorak 4 inkubiran sa MG tokom 24 h, **d** – kontrola uzorka 4 inkubiranog sa MG tokom 24 h); **5** – RU-HSA-Cu(II)-kompleks (**a** – uzorak 4 bez MG, **b** – kontrola uzorka 4 bez MG i DNPH, **c** – uzorak 4 inkubiran sa MG tokom 24 h, **d** – kontrola uzorka 4 inkubiranog sa MG tokom 24 h)

Tokom 24 h inkubacije sa MK odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks i sva četiri MK-HSA-Cu(II)-kompleksa su karbonilovani (**Slika 22**). Dodatno se u ovim uzorcima uočavaju i trake na većim molekulskim masama, koje potiču od umrežavanja tj. oligomerizacije, a

vidljiva je i fragmentacija HSA molekula. Densitometrijska analiza i poređenje traka koje prikazuju uzorke modifikovane sa MG nije bilo moguće usled prevelikog pozadinskog fona, prejakog signala i takozvanog „razvlačenja“ traka, te shodno tome nije bila moguća međusobna kvantifikacija uzoraka.

Uticaj reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II) kompleksa na vezivanje/otpuštanje bakar(II)-jona ispitan je određivanjem sadržaja slobodnih Cys34-SH grupa i sadržaja vezanih Cu(II)-jona u nultom vremenu i nakon 24-časovne inkubacije kompleksa MK-HSA-Cu(II) sa MG (**Tabela 14**).

Tabela 14. Sadržaji Cys34-SH grupa i Cu(II)-jona vezanih za HSA, pre i nakon reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II) kompleksa sa MG. Kompleksi HSA (0,5 mmol/L) su inkubirani sa 10 mmol/L MG u 10 mmol/L PBS (pH=7,4) tokom 24h na 37 °C. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za tri određivanja.

Cu(II) kompleks sa...	Sadržaj slobodnih -SH grupa, (mol/molHSA)		Sadržaj vezanih Cu(II)-jona (mol/molHSA)	
	pre karbonilacije	nakon karbonilacije	pre karbonilacije	nakon karbonilacije
Odm-HSA	0,833±0,011	0,602±0,012	0,0965±0,0016	0,0832±0,0019
Ste-HSA	0,871±0,020	0,575±0,019	0,1014±0,0010	0,0844±0,0014
Ole-HSA	0,873±0,013	0,588±0,017	0,0975±0,0023	0,0817±0,0017
Myr-HSA	0,872±0,011	0,560±0,010	0,0969±0,0014	0,0800±0,0016
RU-HSA	0,741±0,019	0,403±0,011	0,0901±0,0010	0,0703±0,0013

Pri karbonilaciji, sadržaj slobodnih Cys34-SH grupa u kompleksima smanjuje se od 27,7%, u slučaju odmašćenog-HSA-Cu(II) kompleksa, do 45,6% za RU-HSA-Cu(II) kompleks (**Tabela 15**). Ova smanjenja praćena su smanjenjem sadržaja vezanih bakar(II)-jona (od 13,8 % do 21,9 %), fenomen već opisan u **Poglavlju 4.2**. Najveća promena pri karbonilaciji odigrala se u RU-HSA-Cu(II) kompleksu, iz koga je, u skladu sa prethodnim

rezultatima, otpušteno 21,9 % vezanih bakar(II)-jona. Odnos smanjenja sadržaja Cys34-SH grupa i smanjenja sadržaja vezanih bakar(II)-jona (R) za ovaj kompleks iznosi 2,08 (**Tabela 15**). Ostali MK-HSA-Cu(II) kompleksi, kao i odmašćeni-HSA-Cu(II) kompleks, prate ovaj obrazac ponašanja prilikom modifikacije sa MG, te se odnos R za sve uzorke kreće oko 2 (**Tabela 15**).

Tabela 15. Smanjenje sadržaja Cys34-SH grupa i sadržaja jona bakra(II) vezanih za HSA (%), do koga je došlo pri karbonilaciji MK-HSA-Cu(II) kompleksa metilglioksalom. R predstavlja odnos procenata smanjenja dva parametra.

Cu(II) kompleks sa...	% smanjenja tiolne grupe Cys34	% smanjenja vezanih Cu(II)-jona	R ($\Delta C_{SH}/\Delta Cu(II)$)
Odm-HSA	27,7	13,8	2,01
Ste-HSA	33,9	16,8	2,02
Ole-HSA	32,6	16,2	2,01
Myr-HSA	35,8	17,4	2,05
RU-HSA	45,6	21,9	2,08

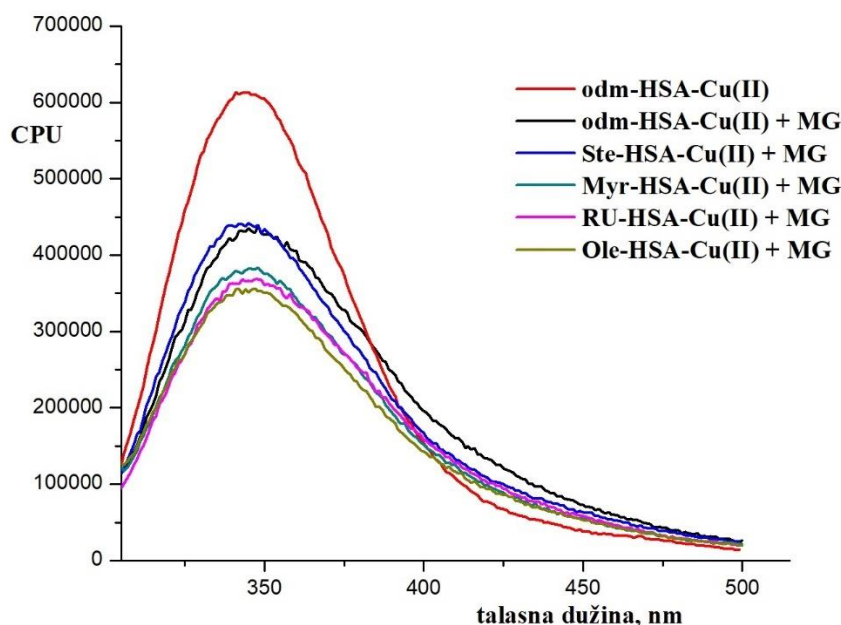
U reakciji karbonilacije metilglioksalom reaguju i amino-grupe, što ukazuje da i sam N-terminus, koji je deo visoko-afinitetnog mesta za vezivanje jona bakra(II), može biti modifikovan. Njegova karbonilacija, mogla bi da dovede do smanjenja sadržaja vezanih bakar(II)-jona, tj. do njihovog otpuštanja iz kompleksa. Iako je sa hemijske tačke gledišta ova reakcija moguća, praćenjem kinetike reakcije metilglioksala sa ostacima aminokiselina na površini molekula HSA utvrđeno je da amino-grupe reaguju mnogo sporije od guanidino- i tiolne grupe (**Aćimović i sar., 2009**), tako da je njihov doprinos otpuštanju jona bakra u toku 24-časovne inkubacije verovatno neznatan.

Ispitivanje reaktivnosti tiolne grupe pri vezivanju masnih kiselina i bakar(II)-jona za HSA (**Tabela 11, Slika 17, Poglavlje 4.3.1.**) pokazalo je značajan porast (86-114%) u reaktivnosti Cys34 tiolne grupe, međutim, tokom reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II)-kompleksa, nije izmerena tako izražena promena (**Tabela 15**). Cys34 tiolna grupa kompleksa

MK-HSA-Cu(II) je u odnosu na odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks, izreagovala u iznosu većem za samo 5-18 % (33,9-45,6% u odnosu na 27,7%). Dobijena razlika bi mogla biti posledica reakcije karbonilacije molekula HSA.

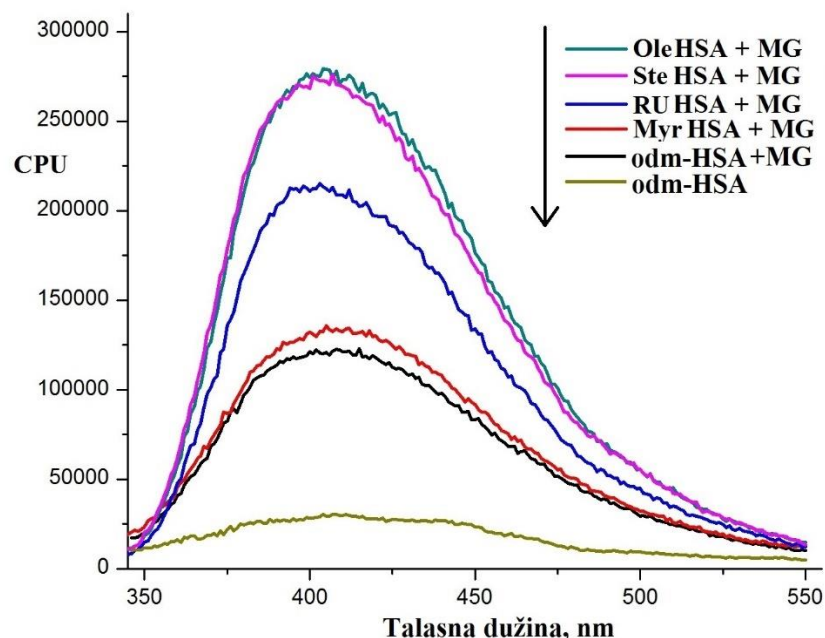
Kako bismo objasnili ovaj neočekivan rezultat u reaktivnosti tiolne grupe, dobijen pri karbonilaciji MK-HSA-Cu(II) kompleksa, i proverili pretpostavku o karbonilaciji kao njegovom uzroku, određen je sadržaj guanidino-grupa Arg na površini kompleksa MK-HSA-Cu(II), koje su zaostale posle reakcije karbonilacije sa MG. Na površini molekula HSA nalazi se 24 ostatka Arg, za koja je pokazano da reaguju veoma brzo sa metilglioksalom (**Westwood i sar., 1995; Aćimović i sar., 2009**). Saglasno tome, *in vitro* karbonilacijom MK-HSA-Cu(II)-kompleksa sa MG izmeren je smanjen sadržaj guanidino-grupa za 42 % do 45 % kod svih kompleksa. Jednako smanjenje sadržaja guanidino grupa dobijeno je i za odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks. Dakle, vezivanje masnih kiselina i vezivanje bakar(II)-jona za HSA ne dovodi do promena u reaktivnosti guanidino-grupa. Kako guanidino-grupe trenutno reaguju sa metilglioksalom (**Aćimović i sar., 2009**), i to znatno brže od tiolne grupe, može se zaključiti da je tokom reakcije karbonilacije metilglioksal izreagovao prvo sa ostacima Arg. Ovi rezultati ukazuju da brza karbonilacija Arg ostataka metilglioksalom može dovesti do dodatnih konformacionih promena u MK-HSA-Cu(II)-kompleksima, i time do smanjenja dostupnosti/izloženosti Cys34 tiolne grupe, odnosno njene reaktivnosti.

U cilju provere ove pretpostavke snimljeni su fluorescentni emisijski spektri odmašćenog-HSA-Cu(II) i karbonilovanog MK-HSA-Cu(II)-kompleksa (**Slika 23**). Nakon pobuđivanja Trp214 na $\lambda^{exc} = 295$ nm, za sve karbonilovane uzorke HSA dobijeno je slično smanjenje (od $35,2 \pm 6,5$ %) intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije. Ovi rezultati upućuju na zaključak da različiti MK-HSA-Cu(II)-kompleksi, koji su ispitivani u okviru ove disertacije, imaju sličnu podložnost modifikaciji sa MG. Iako je pokazano da se reaktivnost/dostupnost Cys34-tiolne grupe značajno povećava usled vezivanja različitih MK (u različitim odnosima) i jona bakra(II), ishod reakcije karbonilacije ostaje skoro nepromenjen, odnosno, dominantan uticaj na modifikaciju Cys34-tiolne grupe ima reakcija karbonilacije.



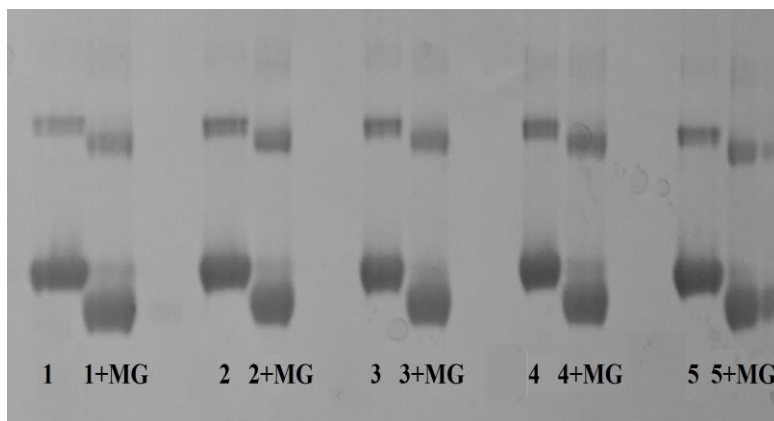
Slika 23. Fluorescentni emisijski spektri MK-HSA-Cu(II)-kompleksa (0,5 mmol/L HSA) modificiranih sa 10 mmol/L MG tokom 24-časovne inkubacije na 37 °C, kao i modificiranog i nemodificiranog odmašćenog-HSA-Cu(II) kompleksa (odm-HSA-Cu(II)), snimljeni pri talasnoj dužini ekscitacije $\lambda^{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$.

Imajući u vidu da uočeno smanjenje intenziteta fluorescencije, koje isključivo potiče od Trp214, može biti posledica promena nastalih u okolini ovog ostatka, ali i posledica gašenja emisije (*eng.* quenching) novoformiranim fluoroforima koje pripadaju krajnjim proizvodima glikacije, snimljeni su i fluorescentni emisijski spektri karakteristični za AGEs, kod kojih je modificovan ostatak Arg (**Slika 24**). Snimljeni spektri potvrdili su prisustvo argilpirimidina i pentozidina, dobro definisanih AGEs, koji nastaju modifikacijom Arg (**Ahmed i sar., 2002; Schmitt i sar., 2005**). Treba naglasiti da su podaci dobijeni snimanjem ovih spektara kvalitativni i informativne prirode, zato što AGEs-i imaju visoku apsorpciju, koja utiče na smanjenje izmerenog intenziteta fluorescencije, tako što apsorbuju ekscitovanu svetlost bez emisije (**Schmitt i sar., 2005**).



Slika 24. Fluorescentni emisijski spektri AGEs različitih HSA-MK-Cu(II)-kompleksa (0,5 mmol/L HSA), snimljeni na talasnoj dužini ekscitacije $\lambda^{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$.

Dominantan uticaj reakcija karbonilacije na modifikaciju Cys34-tiolne grupe evidentan je i iz analize nativnog PAGE gela prikazanog na **Slici 25** (trake obeležene sa +MG). Naime, pokretljivost odmašćenog-HSA-Cu(II)-kompleksa, kao i ostalih MK-HSA-Cu(II)-kompleksa (trake 1 - 5) je skoro jednaka. Mobilnost monomernih i dimernih traka modifikovanih kompleksa u PAA gelu povećana je u odnosu na nemodifikovane uzorke. Karbonilovani kompleksi se brže kreću ka anodi zbog porasta ukupne negativne šarže, usled kovalentnog vezivanja MG za ostatke Arg i Lys. Izoelektrična tačka ovih uzoraka je u odnosu na alikvot pre dodavanja reagensa za karbonilaciju niža (**Slika 21**).



Slika 25. Nativna PAGE odmašćenog HSA-Cu(II) i MK-HSA-Cu(II) kompleksa na 9 % gelu. Nanošeno je po 1 mg/mL uzorka u svaki bunar (15 μ L). 1 - odmašćeni HSA-Cu(II)-kompleks, 2 - Myr-HSA-Cu(II)-kompleks, 3 - Ole-HSA-Cu(II)-kompleks, 4 - Ste-HSA-Cu(II)-kompleks, 5 - RU-HSA-Cu(II)-kompleks; +MG – (redom, isti) kompleksi inkubirani sa 10 mM MG 24 h na 37 °C. Myr - miristinska kiselina, RU - MK iz ribljeg ulja, Ole - oleinska kiselina i Ste - stearinska kiselina.

Na kraju, treba istaći da, iako nije nađena značajna promena u sadržaju Cys34-tiolnih grupa (smanjenje sadržaja od 5 do 18 %), pri karbonilaciji MK-HSA-Cu(II)- kompleksa metilglioksalom, u odnosu na odmašćeni-HSA-Cu(II)-kompleks, ova promena sadržaja Cys34 tiolne grupe je prisutna u svim uzorcima i direktno utiče na afinitet HSA prema bakar(II)-jonima. Ako se ima u vidu katalitička priroda bakar(II)-jona tj. njegova sposobnost da učestvuje u Fenton-ovoj reakciji i time dovede do stvaranja slobodnih radikala, kao i činjenica da su afinitet HSA prema ovim jonima i reaktivnost Cys34-SH grupe međusobno povezane, i ovako relativno mala promena može biti od velikog fiziološkog značaja. Zato je važno držati ove faktore pod striktnom kontrolom u smislu sprečavanja slobodno-radikalskog procesa.

4.5. Relevantnost *in vitro* istraživanja za *in vivo* uslove: pacijenti sa dijagnozom *Diabetes mellitus* tip II

Diabetes mellitus je jedno od najčešćih hroničnih oboljenja. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization-WHO, <https://www.who.int/publications-detail/global-report-on-diabetes>) iz 2014. godine, skoro 422 miliona osoba u svetu boluje od dijabetesa (od kojih 750 000 u Srbiji), pri čemu je 90-95 % obolelih kategorizovano kao tip II (**American Diabetes Association, 2008**). DM II je hronično metaboličko oboljenje koje karakteriše povećana koncentracija glukoze u cirkulaciji, usled razvijene insulinske rezistencije ili zbog nedovoljne proizvodnje insulina (<https://www.who.int/health-topics/diabetes>). Dugotrajna hiperglikemija dovodi do neenzimskog glikozilovanja proteina, Maillard-ove reakcije, u kojoj preko Schiff-ove baze i Amadori proizvoda dolazi do generisanja krajnjih proizvoda glikacije-AGE (**Ahmed, 2005**).

Ako se uzme u obzir da se MG (reaktivni α -oksoaldehid) generiše neenzimski, tj. spontanom razlaganjem triozofosfata, autooksidacijom ugljenih hidrata i degradacijom glukoze, kao i preko manje zastupljenih metaboličkih puteva koji uključuju Maillard-ovu reakciju i lipidnu peroksidaciju, i da je reaktivniji od glukoze 20000 puta (**Maessen i sar., 2015**), postaje jasno zašto ovo izuzetno reaktivno jedinjenje ima značajnu ulogu u patofiziologiji i razvoju sekundarnih komplikacija u dijabetesu. Studije su potvrdile da se u dijabetesu stvaraju 5 do 6 puta veće količine MG u odnosu na 120 μ mol na dan, koliko iznosi produkcija kod zdravih osoba (**Phillips i sar., 1993; Lapolla i sar., 2003**).

Studije koje su ispitivale dijabetes ukazale su na postojanje oksidativnog stresa i smanjenog sadržja HSA Cys34-SH grupe kod ovih pacijenata, ali i povišene koncentracije serumskog bakra i MG, posebno kod pacijenata sa DM II (**Faure i sar., 2008; Matafome i sar., 2013; Supriya i sar., 2013.**). Takođe, u poslednjih 30 godina pokazana je i povezanost razvoja sekundarnih komplikacija (posebno vaskularnih) sa porastom karbonilnog stresa u ovoj grupi pacijenata (**Lyons i sar., 2002**). Međutim, studije u kojima je predmet istraživanja bio uticaj metilglioksala na HSA (kako *in vitro* tako i u dijabetesu) i posebno na njegov

afinitet prema jonima bakra(II), dale su oprečne rezultate (Argirova i sar., 2003; Guerin-Dubourg i sar., 2012).

Imajući u vidu napred prikazane rezultate, dobijene pri *in vitro* ispitivanju potencijala reakcije karbonilacije molekula HSA, i posebno tiolne grupe Cys34, na vezivanje/otpuštanje bakar(II)-jona, kao i pri ispitivanju efekata različitih MK vezanih za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (karbonilovane i nemodifikovane), isti parametri, odnosno posledice ovih efekata određivani su u *in vivo* sistemu kod pacijenata sa DM II i potom i upoređeni sa parametrima kod zdravih osoba.

4.5.1. Promene u sadržaju HSA-SH grupe i bakar(II)-jona vezanih za HSA

Promene u sadržaju slobodne Cys34-SH grupe i bakar(II)-jona vezanih za HSA analizirane su kod 29 pacijenata obolelih od DM II i kod 20 zdravih osoba (kontrolna grupa). Određen je sadržaj bakar(II)-jona i ukupnih tiola u serumu, izolovan je HSA iz seruma ispitanika i određeni sadržaji Cys34-SH grupe i vezanih jona bakra(II). Određena je i koncentracija glikovanog hemoglobina HbA_{1c} (klinički marker glikemijske kontrole). Rezultati su prikazani u **Tabeli 16**.

Tabela 16. Koncentracija HbA_{1c}, sadržaj ukupnih tiola i bakar(II)-jona u serumu, kao i sadržaj Cys34 i bakar(II)-jona vezanih za HSA, kod pacijenata sa dijagnozom *Diabetes mellitus* tip II i kod zdravih osoba. Crvenom bojom prikazani su uzorci pacijenata, a plavom kontrolni uzorci.

Uzorak	Ukupni tioli (mmol/L)	HSA-SH (mol/molHSA)	Serumski Cu(II) (μmol/L)	HSA-Cu(II) (mmol/molHSA)	HbA _{1c} (%)
1p	0,265	0,483	42,3	0,0098	11,5
2p	0,330	0,557	41,1	0,0103	10,8
3p	0,265	0,589	34,1	0,0109	10,3
4p	0,413	0,568	24,5	0,0110	9,1
5p	0,383	0,675	43,7	0,0130	8,9
6p	0,219	0,580	44,6	0,0111	11,1
7p	0,220	0,563	25,2	0,0100	11,0

8p	0,255	0,450	33,6	0,0088	11,5
9p	0,321	0,518	28,0	0,0096	10,8
10p	0,199	0,468	24,3	0,0088	12,8
11p	0,205	0,494	25,2	0,0099	11,2
12p	0,335	0,594	27,5	0,0109	10,3
13p	0,369	0,581	41,1	0,0104	9,1
14p	0,391	0,612	34,1	0,0116	8,9
15p	0,315	0,491	24,5	0,0089	11,1
16p	0,361	0,672	43,2	0,0131	8,1
17p	0,373	0,579	42,6	0,0095	10,0
18p	0,384	0,620	26,2	0,0116	9,8
19p	0,324	0,558	38,6	0,0096	10,8
20p	0,372	0,605	28,0	0,0110	9,0
21p	0,380	0,560	34,3	0,0108	9,1
22p	0,343	0,600	38,5	0,0108	9,8
23p	0,300	0,578	36,4	0,0104	10,8
24p	0,341	0,596	29,5	0,0101	9,6
25p	0,353	0,597	33,7	0,0097	10,5
26p	0,388	0,597	39,8	0,0097	9,3
27p	0,265	0,489	40,7	0,0088	11,6
28p	0,347	0,566	43,9	0,0095	10,3
29p	0,348	0,503	29,0	0,0097	10,3
Srednja vrednost ±SD	0,323 ± 0,061	0,563 ± 0,056	34,4 ± 7,1	0,1031 ± 0,01	10,3 ± 1,1
1k	0,431	0,829	30,8	0,0133	<6
2k	0,449	0,734	27,0	0,0130	<6
3k	0,360	0,829	30,9	0,0190	<6
4k	0,401	0,740	29,8	0,0128	<6

5k	0,485	0,848	26,7	0,0126	<6
6k	0,472	0,755	25,5	0,0170	<6
7k	0,441	0,790	28,7	0,0121	<6
8k	0,497	0,812	29,1	0,0123	<6
9k	0,432	0,808	30,5	0,0154	<6
10k	0,435	0,767	26,0	0,0120	<6
11k	0,412	0,760	26,3	0,0129	<6
12k	0,416	0,795	27,1	0,0127	<6
13k	0,430	0,813	30,7	0,0132	<6
14k	0,438	0,744	29,3	0,0125	<6
15k	0,451	0,770	26,9	0,0133	<6
16k	0,452	0,814	31,1	0,0134	<6
17k	0,497	0,792	29,7	0,0123	<6
18k	0,539	0,799	29,4	0,0160	<6
19k	0,445	0,805	30,4	0,0129	<6
20k	0,447	0,788	26,1	0,0130	<6
Srednja vrednost ± SD	0,446 ± 0,039	0,789 ± 0,032	28,60 ± 1,8	0,1359 ± 0,01	<6

Upoređivanjem srednjih vrednosti ispitivanih parametara, dobijenih za grupu obolelih u odnosu na kontrolnu grupu, može se videti da je sadržaj ukupnih serumskih tiola kod pacijenata manji za 27,5 %, a sadržaj HSA-SH grupa za 28,5 %. Sadržaj bakar(II)-jona vezanih za HSA manji je za 24,1 %, dok je sadržaj ukupnog serumskog bakra povećan za oko 20 %. Porast sadržaja serumskog bakra je u skladu sa literaturnim podacima (**Sarkar i sar., 2010; Xu i sar., 2013.**). Primenom Student-ovog *t*-testa utvrđeno je da su sve četiri navedene razlike statistički značajne: između sadržaja ukupnih serumskih tiola ($p < 0,01$), sadržaja HSA-SH grupa ($p < 0,01$), sadržaja jona bakra(II) vezanih za HSA ($p < 0,01$), kao i ukupnog serumskog sadržaja bakar(II)-jona ($p < 0,05$).

Smanjenje sadržaja HSA-SH grupa kod pacijenata sa DM II u odnosu na zdrave osobe je očekivano i u skladu je sa rezultatima *in vitro* eksperimenata, kao i sa prethodno objavljenim rezultatima **Jovanović i sar. (2013)**. Takođe, na osnovu *in vitro* istraživanja, ali i rezultata **Guerin-Dubourg i sar. (2012)**, kod pacijenata obolelih od DM II očekivan je i niži sadržaj bakar(II)-jona vezanih HSA. Od značaja je istaći da se upoređivanjem odnosa procenta smanjenja sadržaja HSA-SH grupa i procenta smanjenja sadržaja bakar(II)-jona vezanih za HSA (odnosno relacije R) između pacijenata i zdravih osoba, dobijaju vrednosti od 0,50 do 2,54, što je gotovo identično sa vrednostima ovog odnosa dobijenim u gore opisanom *in vitro* modelu (**Tabela 10, Poglavlje 4.2**). Između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja jona bakra(II) vezanih za HSA, kod osoba obolelih od dijabetesa, nađena je veoma jaka pozitivna korelacija ($R=0,833$, $p<0,001$). Svim navedenim potvrđeno je da vezivanje/otpuštanje bakar(II)-jona za/sa HSA molekula i u *in vivo* uslovima zavisi od redoks-stanja slobodne Cys34 tiolne grupe. Ukoliko dođe do karbonilacije ili oksidacije Cys34-SH grupe, smanjuje se afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona i dolazi do njihovog otpuštanja. Da je visok stepen karbonilacije prisutan u ispitanjoj grupi pacijenata sa DM II vidi se i po dobijenim vrednostima koeficijenta korelacije parametara sa HbA_{1c}. Naime, upoređivanjem sadržaja HSA-SH grupa i koncentracije HbA_{1c}, kao i sadržaja ukupnih serumskih tiola sa HbA_{1c}, izračunate su vrednosti Pearson-ovog koeficijenta ($R= - 0,827$, $p<0,001$ odnosno $R= - 0,803$, $p < 0,001$), koje potvrđuju veoma jaku negativnu korelaciju.

Dakle, sagledavanjem ovih rezultata u kontekstu prethodnih dobijenih *in vitro* eksperimenatima, može se zaključiti da modifikacija HSA molekula u dijabetesu (*in vivo*) dovodi do smanjenja sadržaja HSA-SH grupa i smanjenja afiniteta/kapaciteta za vezivanje bakar(II)-jona.

4.5.2. Uzroci smanjenja sadržaja Cys 34 tiolnih grupa i otpuštanja jona bakra sa HSA u dijabetesu

U prethodnom poglavlju pokazano je da je sadržaj Cys34 tiolne grupe kod obolelih od dijabetesa statistički značajno ($p < 0,01$) manji u odnosu na kontrolnu grupu. Smanjenje sadržaja HSA-SH ima za posledicu otpuštanje jona bakra, koji kao redoks-aktivni mogu da doprinesu razvoju i pogoršanju postojećeg oksidativnog stresa, pokrećući Fenton-ovu reakciju u kojoj se stvaraju slobodni radikali. Cys34 tiolna grupa je hvatač α -oksoaldehida, ali i antioksidant. Stoga, smanjenje sadržaja tiolnih grupa može biti posledica reakcije karbonilacije, zbog veće proizvodnje reaktivnih dikarbonila u hiperglikemiji (**Poglavlje 2.5.1.**), ili oksidacije druge vrste. Zato su ispitani stepen karbonilacije i stanje oksidativnog stresa u grupi obolelih od DM II u odnosu na kontrolnu grupu.

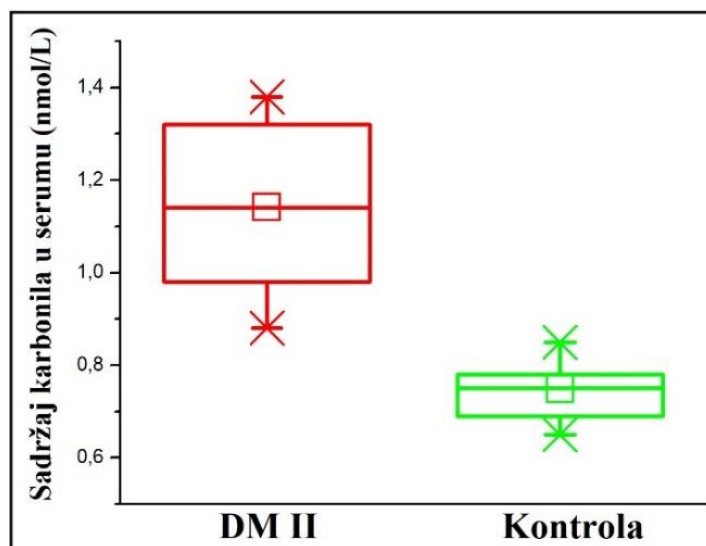
4.5.2.1. Modifikacija HSA molekula u dijabetesu – karbonilacija i nastajanje AGEs

Da je visok stepen karbonilacije uzrok smanjenja sadržaja tiolnih grupa u grupi obolelih od dijabetesa zaključeno je indirektno, na osnovu korelacije sadržaja HSA-SH grupa, odnosno sadržaja ukupnih serumskih tiola sa HbA1c. Određivanjem sadržaja ukupnih karbonila u serumu, kao i karbonila HSA izolovanog iz seruma, omogućena je realna procena stepena karbonilacije kod osoba obolelih od DM II, odnosno karbonilnog stresa.

Sadržaj karbonila u serumu određen je spektrofotometrijskom metodom sa DNPH kao reagensom. Srednja vrednost sadržaja karbonila kod obolelih od dijabetesa ($1,14 \pm 0,17$ nmol/L) veća je za 34 % u odnosu na kontrolnu grupu ($0,75 \pm 0,06$ nmol/L; **Tabela 17, Slika 26**). Razlika je statistički značajna na nivou $p < 0,05$. Brojni literaturni podaci takođe podržavaju ove rezultate, posebno ako se ima u vidu da je u dijabetesu povišena koncentracija glukoze u cirkulaciji, čijom se autooksidacijom stvaraju reaktivni dikarbonili koji modifikuju proteine (**Thornalley i sar., 1999; Rondeau i sar., 2011; Neelofar i sar., 2017**).

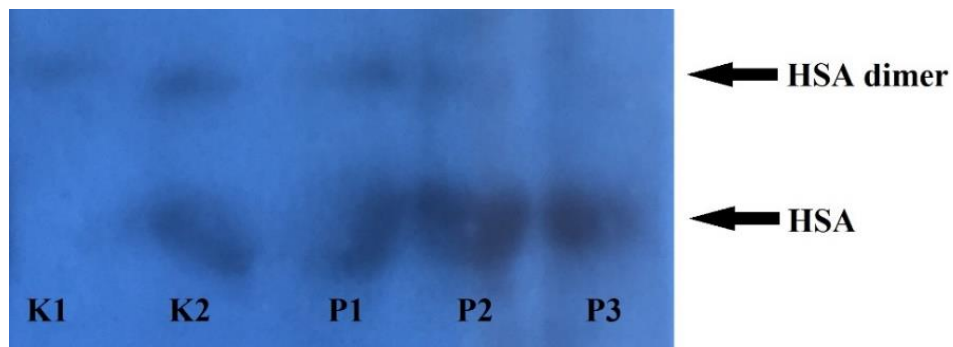
Tabela 17. Sadržaj karbonila u serumu pacijenata obolelih od dijabetesa tipa II (crveno) i u serumu zdravih osoba (plavo), određen pomoću DNPH reagensa.

Uzorak pacijenta	Serumski sadržaj karbonila (nmol/L)	Uzorak zdravog	Serumski sadržaj karbonila (nmol/L)
p1	1,21	k1	0,77
p2	0,98	k2	0,85
p3	1,34	k3	0,69
p4	0,98	k4	0,78
p5	0,98	k5	0,65
p6	1,38	k6	0,69
p7	1,12	k7	0,83
p8	1,14	k8	0,75
p9	1,20	k9	0,75
p10	0,89	k10	0,72
p11	1,21	k11	0,74
p12	0,98	k12	0,77
p13	1,34	k13	0,85
p14	0,88	k14	0,69
p15	0,98	k15	0,78
p16	1,38	k16	0,65
p17	1,32	k17	0,69
p18	1,34	k18	0,83
p19	1,32	k19	0,75
p20	0,89	k20	0,77
p21	1,21	/	/
p22	0,98	/	/
p23	1,34	/	/
p24	0,88	/	/
p25	0,98	/	/
p26	1,38	/	/
p27	1,12	/	/
p28	1,14	/	/
p29	1,20	/	/
Srednja vrednost ± SD	1,14 ± 0,17		0,75 ± 0,06



Slika 26. Distribucija sadržaja karbonila u serumu zdravih osoba (kontrola; n=20) i pacijenata sa dijabetesom tip II (n=29).

Spektrofotometrijska metoda za određivanje sadržaja karbonila je manje osetljiva kada je u pitanju izolovani protein. Zato je za određivanje stepena karbonilacije HSA izolovanog iz seruma pacijenata i zdravih osoba primenjena tehnika imunoblota sa autoradigrafskom detekcijom, uz upotrebu anti-DNP antitela (**Slika 27**). Radi što bolje procene i u prosečavanja uzoraka, slučajnim odabirom, napravljena su tri zbirna uzorka od pojedinačnih uzoraka pacijenata (P1, P2 i P3, n= 10, 10 i 9 redom) i dva zbirna uzorka od kontrolnih uzoraka (K1 i K2, n=10 za oba). Densitometrijskom analizom filma pomoću programskog paketa ImageJ dobijeni su podaci o relativnom odnosu karbonila u uzorcima. Kontrolni uzorci (K1 i K2) sadrže za 36% manje karbonila na monomeru HSA u odnosu na HSA obolelih od dijabetesa. Na dimerskoj traci nije nađeno značajno povećanje. Veliki stepen karbonilacije HSA je očekivan, imajući u vidu da je HSA najzastupljeniji protein u cirkulaciji (0,6 mmol/L, tj. 40-60% ukupnih proteina), sa relativno dugim poluživotom (od 17,3 dana) (**Peters, 1996**). Ovim je omogućena njegova duža izloženost glukozi i reaktivnim karbonilima u uslovima hiperglikemije (srednja vrednost HbA_{1c} za 29 pacijenata uključenih u ovu studiju iznosi 10,25±1,05 %), odnosno značajnija karbonilacija.

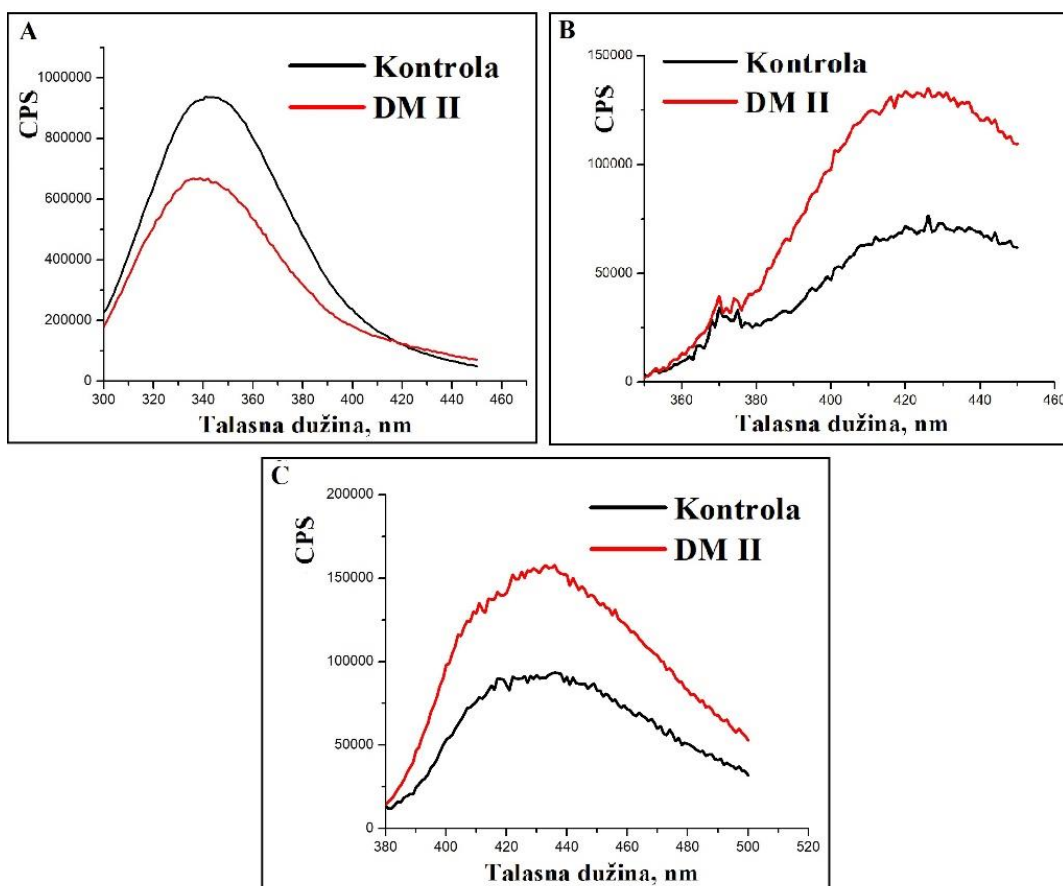


Slika 27. Autoradiogram uzoraka HSA deerivatizovanih sa DNPH nakon imunoblota sa anti-DNPH antitelom. K - kontrolni zbirni uzorci 1 i 2; P – zbirni uzorci pacijenata 1, 2 i 3.

Karbonilacijom HSA menja se njegova konformacija, što je utvrđeno snimanjem fluorescentnih emisionih spektara i to:

- na talasnoj dužini ekscitacije (290 nm), koja odgovara tzv. „unutrašnjoj“ fluorescenciji, a potiče od Trp214, i
- na dodatne dve ekscitacione talasne dužine (335 i 365 nm), koje su karakteristične za nove fluorofore koje nastaju upravo glikacijom HSA (Schmitt i sar., 2005).

Rezultati su prikazani na **Slici 28**.



Slika 28. Fluorescentni emisioni spektri zbirnih uzoraka HSA izolovanih iz seruma pacijenata obolelih od DM II (DM II) i zdravih osoba (Kontrola) ($n=29$ i $n=20$ redom). Koncentracija proteina bila je $0,6 \mu\text{mol/L}$. **A.** $\lambda^{\text{exc}}=290 \text{ nm}$. **B.** $\lambda^{\text{exc}}=335 \text{ nm}$. **C.** $\lambda^{\text{exc}}=365 \text{ nm}$.

Na talasnoj dužini ekscitacije koja odgovara Trp214 ($\lambda^{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$), intenzitet fluorescencije HSA na maksimumu emisije je kod pacijenata manji za 28,7 % u odnosu na uzorak HSA kod zdravih osoba (**Slika 28 A.**). Pomeranje maksimuma fluorescencije HSA kod pacijenata od 1 nm ne može se smatrati značajnim. Smanjenje intenziteta fluorescencije ukazuje na promenu hemijske okoline Trp214, odnosno Trp214 je usled konformacionih promena molekula HSA postao izloženiji rastvaraču. Sa druge strane, gašenje fluorescentnog signala može biti izazvano i nastankom novih fluorofora koje se ekscituju u opsegu talasnih dužina na kojima počinje emisija Trp214. Da su nove fluorofore zaista nastale, pokazano je

snimanjem emisionih fluorescentnih spektara na talasnim dužinama koje odgovaraju AGEs (**Slika 28 - B i C.**). Na talasnoj dužini od 335 nm pobuđuju se proizvodi glikacije u kojima je modifikovan Arg, a na talasnoj dužini od 365 nm karboksi-metil-lizin (CML). Kao što se sa **Slike 28 (B i C)** može videti, oba proizvoda prisutnija su kod osoba obolelih od DM II. Dakle, smanjenje intenziteta fluorescencije koja potiče od Trp214 u uzorku HSA, izlovanom iz seruma pacijenata, zapravo je posledica promene konformacije samog HSA molekula kao i nastajanja novih fluorofora procesom glikacije.

Porast sadržaja karbonila u serumu pacijenata (za 36 %) i na HSA molekulu (za 34 %) u odnosu na zdrave osobe, kao i rezultati spektrofluorimetrijskih ispitivanja promena na HSA molekulu u hiperglikemiji, nedvosmisleno dokazuje postojanje karbonilnog stresa kod pacijenata sa dijagnozom DM II. Poznato je da karbonilna jedinjenja reaguju ne samo sa amino- i guanidino-grupama, već i sa tiolnom grupom proteina, smanjujući sadržaj tiolne grupe (što je konstatovano u dijabetesu), odnosno smanjujući afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona.

4.5.2.2. Oksidativni stres kod pacijenata sa dijagnozom Diabetes mellitus tip II

Oksidativni stres kod pacijenata sa dijagnozom *Diabetes mellitus* tip II dobro je okarakterisan u literaturi (**Đorđević i sar., 2017; Pavlović i sar., 2002; Tomlinson i sar., 2008**). Hronična hiperglikemija, prisutna u DM II, dovodi do oksidativnog stresa na više načina, narušavajući između ostalog, pro/antioksidativni balans u ćeliji. Povećanje sadržaja slobodnih bakar(II)-jona u dijabetesu može da doprinese povećanju sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta (**Roche, 2008**). Slobodni joni bakra povećavaju autooksidaciju glukoze i stvaranje reaktivnih karbonilnih jedinjenja kraćeg lanca (**Bal, 2013**), kao i stvaranje reaktivnih α -oksoaldehida iz ranih proizvoda glikacije (**Thornalley, 1999**). Sa druge strane, sadržaj HSA-SH grupa, koje su vanćelijski redoks-regulator (**Carballal i sar., 2007**), smanjuje se zbog karbonilacije i time se smanjuje i antioksidativni potencijal HSA (**Faure i sar., 2005**).

Unutarćelijska antioksidativna zaštita u osnovi se zasniva na aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-peroksidaze (GPx) (**Vincent i sar.,**

2004; Maritim i sar., 2003; Szaleczky i sar., 1999). Dejstvo SOD predstavlja prvu liniju enzimske odbrane od superoksid-radikala, katalizujući dismutaciju superoksid-anjon-radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik-peroksida i kiseonika. Vodonik-peroksid se dalje metaboliše dejstvom CAT i GPx. GPx je aktivnija pri nižim koncentracijama vodonik-peroksida (i ima ulogu u sprečavanju lipidne peroksidacije), dok se aktivnost CAT povećava sa porastom koncentracije ovog supstrata (Đorđević i sar., 2017; Đorđević i sar., 2004). Takođe je pokazano da ekspresija ovih enzima može promeniti unutarćelijsku insulinsku signalnu kaskadu i time favorizovati ćelijska oštećenja (Cheng i sar., 2011; Evans i sar., 2003; Ceriello i sar., 2004).

U cilju sagledavanja nivoa oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od DM II, u hemolizatima eritrocita, određene su aktivnosti enzima odgovornih za antioksidativnu zaštitu (SOD1, CAT i GPx) (Tabela 18). Srednje vrednosti aktivnosti SOD1 i CAT su manje kod pacijenata obolelih od DM II (1067 ± 135 IU/g Hb odnosno 84 ± 8 IU/g Hb) u odnosu na zdrave osobe (1301 ± 124 IU/g Hb i 111 ± 26 IU/g Hb), dok je srednja vrednost aktivnosti GPx povišena (96 ± 9 IU/g Hb vs. 70 ± 7 IU/g Hb). Kako vrednosti aktivnosti nisu imale normalnu raspodelu prema Kolmogorov-Smirnov testu, za izračunavanje statističkih parametara korišćeni su neparametrijski testovi. Primenom Mann-Whitney U-testa, utvrđeno je da su razlike između vrednosti dijabetičnih pacijenata i zdravih osoba, u aktivnosti sva tri enzima, statistički značajne na nivou $p < 0,05$.

Tabela 18. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u hemolizatu eritrocita pacijenata DM II (crveno) i u hemolizatu eritrocita zdravih osoba (plavo). Rezultat je izražen po g Hb (određenom u hemolizatu eritrocita).

Uzorak	Enzim, IU/ g Hb		
	SOD	CAT	GPX
p1	1010	77	102
p2	1144	99	120
p3	1320	70	98
p4	1089	69	92
p5	980	88	94
p6	1148	92	102

p7	1154	90	102
p8	878	84	120
p9	1219	96	98
p10	1223	91	92
p11	1010	87	94
p12	1144	86	102
p13	1320	77	97
p14	1089	99	80
p15	981	70	88
p16	1148	69	87
p17	1154	88	85
p18	878	92	95
p19	1219	90	108
p20	1223	84	103
p21	1011	96	92
p22	899	91	94
p23	1110	87	102
p24	883	86	97
p25	987	83	80
p26	1014	79	88
p27	874	78	87
p28	889	76	85
p29	958	80	95
Srednja vrednost ± SD	1067 ± 135	84 ± 8	96 ± 9
k1	1160	170	58
k2	1302	107	65
k3	1124	121	60
k4	1330	88	67
k5	1312	104	79
k6	1206	118	76
k7	1580	99	68
k8	1364	65	68
k9	1286	122	81
k10	1352	170	66
k11	1160	107	60
k12	1302	121	67
k13	1124	88	79
k14	1330	104	76
k15	1312	118	68
k16	1206	99	68
k17	1580	65	80
k18	1364	122	68

k19	1286	125	81
k20	1352	118	78
Srednja vrednost ± SD	1301 ± 124	111 ± 26	70 ± 7

Smanjena aktivnost SOD1 u hemolizatu eritrocita pacijenata sa DM II opisana je u literaturi i verovatno je posledica glikacije Cu-Zn-SOD (Arai i sar. 1987; Kawamura i sar. 1992). Redukcija u aktivnosti CAT takođe je literaturno opisana i verovatno je posledica unutarćelijske akumulacije vodonik-peroksida, zbog autooksidacije glukoze (Đorđević i sar., 2017). Porast u aktivnost GPx, sa druge strane, deluje kao neočekivan rezultat, međutim, ako se ima u vidu da je kod dijabetičara izražena i lipidna peroksidacija (Colas i sar., 2011; Madhikarmi i sar., 2013), verovatno da pojačana aktivnost i/ili ekspresija ovog enzima predstavlja adaptivni odgovor organizma na povećani oksidativni stres.

U cilju sagledavanja međusobne povezanosti opšteg oksidativnog stresa i karbonilnog stresa (kao posebne vrste oksidativnog stresa) kod pacijenata sa DM II, izračunate su vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije između sadržaja ukupnih karbonila i aktivnosti enzima (Tabela 19). Negativne vrednosti koeficijenta korelacije ukazuje da se sa povećanjem karbonilnog stresa smanjuje aktivnost enzima antioksidativne zaštite.

Tabela 19. Vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije između sadržaja karbonila i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite kod pacijenata sa dijagnozom DM II .

Enzim	Koeficijent korelacije sa sadržajem ukupnih karbonila u serumu
SOD	-0.74
CAT	-0.83
GPX	-0.76

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je kod pacijenata sa dijagnozom DM II izražen oksidativni stres, koji je direktno povezan stepenom sa karbonilnog stresa.

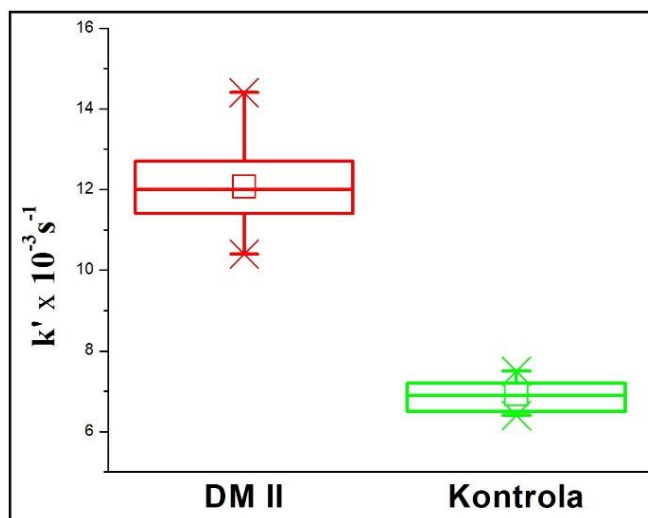
4.5.3. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA kod pacijenta obolelih od dijabetesa tipa II

In vitro eksperimenti su pokazali da vezivanje MK i bakar(II)-jona za molekule HSA dovodi do promena u izloženosti, odnosno reaktivnosti Cys34 tiolne grupe. Dosadašnje studije pokazale su da je u dijabetesu povećana koncentracija lipida u cirkulaciji (Staeher, i sar., 2003), kao i da je povećana lipoliza odnosno koncentracija slobodnih MK. Rezultati istraživanja Pavićevića i sar. (2014) su pokazali da je sadržaj MK vezanih za HSA kod pacijenata obolelih od dijabetesa statistički značajno povećan (tri puta više nego kod zdravih osoba). Imajući u vidu da je, sa druge strane, kod ovih pacijenata sadržaj bakar(II)-jona vezanih za HSA smanjen (Poglavlje 4.5.1.), od značaja je bilo ispitati kako promena ova dva parametara *in vivo*, u grupi pacijenata sa DM II, utiče na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA. Reaktivnost ove grupe ispitivana je na isti način kao i u *in vitro* eksperimentima, određivanjem konstante brzine reakcije tiolne grupe HSA (izolovanog iz seruma) sa DTNB (Poglavlje 3.4.10.). Sva određivanja urađena su u triplikatu, a rezultati su prikazani u Tabeli 20. Normalnost raspodele k' vrednosti proverena je Kolmogorov-Smirnov testom, i prikazana box-plot grafikom na Slici 29.

Tabela 20. Vrednosti konstante brzine (k') reakcije Cys34 tiolne grupe HSA, izolovanog iz seruma pacijenata sa DM II (crveno) i osoba kontrolne grupe (plavo), sa DTNB.

Uzorak	$k' \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Uzorak	$k' \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
p1	11,4	k1	7,4
p2	11,6	k2	6,9
p3	12,2	k3	6,5
p4	12,7	k4	7,2
p5	14,4	k5	6,4
p6	12,9	k6	7,1
p7	12,7	k7	6,9

p8	10,4	k8	7,3
p9	11,8	k9	6,8
p10	10,4	k10	6,5
p11	12,1	k11	7,5
p12	12,1	k12	6,4
p13	11,5	k13	7,1
p14	14,3	k14	6,9
p15	11,2	k15	7,3
p16	13,2	k16	6,8
p17	12,0	k17	6,5
p18	12,8	k18	7,5
p19	11,4	k19	6,5
p20	12,1	k20	7,2
p21	12,2	/	/
p22	12,1	/	/
p23	12,0	/	/
p24	11,3	/	/
p25	11,0	/	/
p26	11,9	/	/
p27	11,2	/	/
p28	12,1	/	/
p29	11,8	/	/
Srednja vrednost ± SD	12,0 ± 0,9		6,9 ± 0,4



Slika 29. Raspodela vrednosti kinetičke konstante (k') za reakciju DTNB-a sa tiolnom grupom Cys34 HSA, izolovanog iz seruma pacijenata sa dijagnozom Diabetes mellitus tip II ($n = 29$, crveni pravougaonik) i seruma zdravih osoba ($n = 20$, zeleni pravougaonik).

Srednja vrednost kinetičke konstante za reakciju DTNB-a sa tiolnom grupom Cys34 kod pacijenata sa dijabetesom ($12,0 \pm 0,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) gotovo je dvostruko veća nego kod zdravih osoba ($6,9 \pm 0,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Primenom Studentovog t -testa utvrđeno je da je razlika statistički značajna na nivou $p < 0,05$. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim u *in vitro* eksperimentima, kojima je pokazano da se vezivanjem MK za molekul HSA povećava reaktivnost/dostupnost Cys34-SH grupe albumina. Sa druge strane, u *in vitro* eksperimentima utvrđeno je da vezivanje bakar(II)-jona za HSA dovodi do dodatnog povećanja reaktivnosti tiolne grupe. Međutim, iako je kod pacijenata obolelih od DM II utvrđen smanjeni sadržaj vezanih bakar(II)-jona (za 24,1 %), ovo smanjenje nije imalo značajan uticaj na promenu reaktivnosti tiolne grupe zbog dominantnije uloge MK. Dodatno, modifikacija HSA u karbonilnom stresu doprinosi promeni konformacije HSA (**Poglavlje 4.5.2.1.**) i većoj izloženosti tiolne grupe Cys34 okolnoj sredini (većoj reaktivnosti i smanjenju sadržaja) (**Penezić i sar., 2019**). Nalaz o povećanju reaktivnosti/izloženosti tiolne grupe HSA kod obolelih od dijabetesa ima veliki biomedicinski značaj s obzirom na već pomenutu činjenicu da je Cys34 tiolna grupa dobar hvatač reaktivnih karbonila i moćan antioksidant u cirkulaciji.

5. ZAKLJUČCI

Humani-serum albumin predstavlja dominantnu zaštitu od oksidativnog i karbonilnog stresa u cirkulaciji, zahvaljujući slobodnoj Cys34 tiolnoj grupi, kao i sposobnosti da veže, i time iz cirkulacije (privremeno ili trajno) ukloni, ligande koji su potencijalni izazivači ovih stanja.

Antioksidativna uloga HSA, pored redoks-aktivnosti tiolne grupe Cys34, zavisi i od njegove sposobnosti da veže bakar(II)-jone. MK, koje dospevaju u cirkulaciju, vezuju se takođe za HSA koji je glavni transporter ovih molekula, i mogu da utiču na reaktivnost tiolne grupe i njena antioksidativna svojstva. Sa druge strane, antioksidativna svojstva i sposobnost molekula HSA da vežu određene ligande, mogu da se značajno menjaju i u uslovima povećane karbonilacije (glikacije) koja se u značajnoj meri odvija u različitim patološkim stanjima poput dijabetesa tipa II. Zato je predmet istraživanja ove disertacije bio utvrđivanje potencijala reakcije karbonilacije HSA (*in vitro* i *in vivo*) na afinitet HSA molekula za vezivanje bakar(II)-jona, odnosno na otpuštanje ovih jona iz kompleksa sa HSA, kao i sagledavanje efekata vezivanja različitih MK za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (karbonilovane i nemodifikovane), a time i na vezivanje/otpuštanje jona bakra(II).

Ispitivanjem uticaja reakcije karbonilacije HSA molekula *in vitro* na afinitet vezivanja bakar(II)-jona dokazano je da karbonilacija HSA, posebno Cys34 tiolne grupe, uzrokuje smanjenje afiniteta HSA molekula prema jonima bakra. Uporednim određivanjem sadržaja vezanih bakar(II)-jona za oksidovani (aerobno) i karbonilovani HSA naspram redukovanog HSA pokazano je da je smanjenje afiniteta za vezivanje jona bakra(II) posledica promene redoks-statusa Cys34 tiolne grupe. Pokazano je, takođe, da reakcija karbonilacije *in vitro* dovodi do konformacionih promena na HSA molekulu, ali ne i do promene u sekundarnoj strukturi ovog proteina.

Da bi se sagledalo da li reakcija karbonilacije (kao i aerobne oksidacije) HSA molekula i Cys34-tiolne grupe utiče na otpuštanje vezanih jona bakra nagrađeni su HSA-Cu(II)-kompleksi sa različitim sadržajem vezanih jona. Sinteza HSA-Cu(II)-kompleksa, odnosno vezivanje jona bakra korelira sa smanjenjem sadržaja slobodne Cys34 tiolne grupe

($r=0,996$, $p<0,001$), koja se pri tome oksiduje. Karbonilacijom HSA-Cu(II)-kompleksa sa metilglioksalom sadržaj tiolne grupe se dalje smanjuje. Smanjuje se i sadržaj vezanih jona Cu(II), odnosno dolazi do njihovog otpuštanja iz kompleksa. Odnos (R) između procenta smanjenja HSA-SH sadržaja i procenta otpuštenih bakar(II)-jona iz ovih kompleksa nakon karbonilacije iznosi $2,12 \pm 0,28$. Kada je u pitanju aerobna oksidacija HSA-Cu(II)-kompleksa, procenti smanjenja sadržaja tiolne grupe i vezanog bakra su manji u odnosu na dobijene pri karbonilaciji kompleksa, ali je vrednost R odnosa gotovo jednaka i iznosi $1,96 \pm 0,36$. Imajući u vidu da naši rezultati pokazuju da se promena konformacije (koja bi, ukoliko postoji, mogla uticati na otpuštanje bakar(II)-jona) ne dešava prilikom aerobne oksidacije, može se zaključiti da vezivanje i otpuštanje bakar(II)-jona za/sa HSA molekula uglavnom zavisi od redoks-stanja slobodne Cys34 tiolne grupe. Dakle, karbonilacija ili aerobna oksidacija Cys34-SH grupe, dovode do smanjenja afiniteta HSA za vezivanje bakar(II)-jona, kao i do otpuštanja ovih jona iz već nagrađenih kompleksa sa HSA. Ovaj zaključak ima direktne implikacije na patološka stanja u kojima je povećan karbonilini stres, konkretno, dijabetes tipa II za koji je karakterističan povišeni fluks MK i drugih reaktivnih di-karbonilinih jedinjenja (glioksal i 3-deoksi-glukozon). Smanjenje sadržaja HSA-SH grupa i posledično smanjenje afiniteta/kapaciteta HSA za vezivanje bakar(II)-jona u dijabetesu tipa II usled karbonilacije moglo bi dovesti do dodatnog razvoja oksidativnog stresa, jer nevezani bakar(II)-joni, kao redoks-aktivni, pokreću Fenton-ovu reakciju kojom se generišu slobodni radikali.

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je ispitivanje međudejstva HSA, MK i bakar(II)-jona, i njegovog uticaj na reaktivnost Cys34 tiolne grupe. Polazeći od prethodnih saznanja da se reaktivnost Cys34 tiolne grupe i konformacija HSA molekula menjaju usled vezivanja masnih kiselina, kao i od napred istaknutog zaključka da afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona zavisi od redoks-statusa tiolne grupe, koja je i meta za karbonilaciju, dizajniran je *in vitro* model koji nam je omogućio da ispitamo promenu reaktivnosti Cys34-SH grupe, kao i afiniteta HSA za vezivanje Cu(II)-jona, nakon vezivanja masnih kiselina za HSA, u prisustvu i bez prisustva reagensa za karbonilaciju. Vezivanje MK (Ste, Ole, Myr i MK iz RU) za HSA povećava reaktivnost Cys34 tiolne grupe u opsegu od 20 do 80 %, jer izaziva promenu konformacije HSA a time i izloženosti/dostupnosti ostataka Cys34.

Konstanta brzine reakcije (pseudo-prvog reda) tiolne grupe sa DTNB-om raste sa porastom broja molekula vezanih MK ($r=0,970$, $p<0,001$). Vezivanje bakar(II)-jona za odmašćeni HSA i stearil-HSA-Cu(II)-kompleks (zbog malog broja vezanih molekula Ste) ne dovodi do značajne promene u reaktivnosti Cys34 tiolne grupe. Sa druge strane, vezivanje jona bakra za HSA-MK komplekse koji sadrže Myr, Ole i MK izolovane iz preparata RU uzrokuju značajan porast reaktivnosti Cys34 tiolne grupe u iznosu od 86 do 114%. Doprinos vezivanja bakar(II)-jona porastu reaktivnosti tiolne grupe HSA-MK kompleksa je konstantan i iznosi oko 33%, što je u saglasnosti sa jednakim sadržajem vezanog bakra u svim MK-HSA-Cu(II)-kompleksima. Polazeći od prethodnog zaključka da na reaktivnost Cys34-SH grupe sinergistički utiče vezivanje MK i bakar(II)-jona, da se joni bakra(II) preferencijalno vezuju za redukovani HSA i da postoji prostorna komunikacija između His3 visoko-afinitetnog mesta za vezivanje bakar(II)-jona i Cys34, ispitano je šta se dešava u kompleksnom sistemu, u kome je povećan sadržaj MK, redoks-aktivnih bakar(II)-jona i reaktivnih karbonilnih jedinjenja, odnosno kakav je uticaj reakcije karbonilacije MK-HSA-Cu(II)-kompleksa na vezivanje/otpuštanje jona bakra(II). Karbonilacijom odmašćenog HSA-Cu(II)-kompleksa postižu se: smanjenje reaktivnosti Cys34 tiolne grupe, smanjenje sadržaja ovih grupa (za 27,7%), kao i otpuštanje vezanih Cu(II)-jona (u iznosu od 13,8 %, odnos R iznosi 2,08). Neočekivano, a imajući u vidu izražen porast reaktivnosti Cys34 tiolne grupe nakon vezivanja MK i jona bakra(II) (od 86 do 114%), karbonilacijom MK-HSA-Cu(II)-kompleksa se ne postiže jednako izraženo smanjenje sadržaja tiolnih grupa (33,9 - 45,6%). U poređenju sa karbonilovanim odmašćenim HSA-Cu(II)-kompleksom ono je veće tek za 5-18%. Male razlike između kompleksa potiču upravo od tipa i broja molekula MK vezanih za HSA. Na osnovu ovih rezultata i na osnovu ispitivanja karbonilacije ostataka Arg, snimljenih fluorescentnih emisionih spektara karbonilovanih kompleksa i spektara karakterističnih za AGEs, utvrđeno je da reakcija karbonilacije (zbog konformacionih promena HSA i promena dostupnosti Cys34 tiolne grupe) ima dominantni uticaj na smanjenje sadržaja HSA-SH grupa. Iako je dobijena promena u sadržaju Cys34-tiolnih grupa pri karbonilaciji MK-HSA-Cu(II)-kompleksa mala (5-18%), ona je veoma značajna jer direktno utiče na afinitet HSA za vezivanje bakar(II)-jona. Otpuštanje redoks-aktivnog jona bakra iz HSA-kompleksa pri karbonilaciji može da dovede do stvaranja slobodnih radikala putem Fenton-ove reakcije.

Relevantnost *in vitro* ispitivanja potencijala reakcije karbonilacije molekula HSA, i posebno tiolne grupe Cys34, na vezivanje/otpuštanje bakar(II)-jona, kao i ispitivanje efekata različitih MK vezanih za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe (karbonilovane i nemodifikovane) proverena je u *in vivo* sistemu, kod pacijenata sa DM II (n=29), određivanjem istih parametra i upoređivanjem sa parametrima kod zdravih osoba (n=20). Cilj ovih analiza bio je sagledavanje promena u afinitetu HSA prema jonima bakra kod pacijenata sa DM II, kao i da li potencijalno otpuštanje jona bakra iz kompleksa sa HSA (uzrokovano karbonilacijom) utiče na stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, odnosno na promenu u aktivnosti enzima odbrane od oksidativnog stresa. Analizom rezultata, u kontekstu dobijenih iz *in vitro* eksperimenata, može se zaključiti da modifikacija HSA molekula u dijabetesu (*in vivo*) dovodi do smanjenja sadržaja HSA-SH grupa i smanjenja afiniteta/kapaciteta za vezivanje bakar(II)-jona. Između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja jona bakra(II) vezanih za HSA nađena je veoma dobra pozitivna korelacija ($R=0,833$, $p<0,001$), čime je potvrđeno da i u *in vivo* uslovima vezivanje/otpuštanje bakar(II)-jona za/sa HSA molekula zavisi od redoks-stanja slobodne Cys34 tiolne grupe. Značajan porast sadržaja karbonila u serumu pacijenata (za 36 %) i na HSA molekulu (za 34 %) u odnosu na zdrave osobe i rezultati spektrofluorimetrijskih ispitivanja promena na HSA u hiperglikemiji, nedvosmisleno dokazuju postojanje karbonilnog stresa kod pacijenata sa dijagnozom DM II. Karbonilna jedinjenja reaguju ne samo sa amino- i guanidino-grupama, već i sa tiolnom grupom proteina, što uzrokuje smanjenje sadržaja Cys34 tiolne grupe u dijabetesu, odnosno smanjenje afiniteta HSA molekula za vezivanje bakar(II)-jona. Određivanjem aktivnosti enzima zaduženih za antioksidativnu zaštitu (SOD1, CAT i GPx), kao i međusobne povezanosti opšteg oksidativnog i karbonilnog stresa kod ovih pacijenata, došlo se do zaključka da je oksidativni stres prisutan u većoj meri kod pacijenata, i da korelira sa karbonilnim stresom.

Imajući u vidu da je sadržaj bakar(II)-jona vezanih za HSA smanjen kod pacijenata sa dijabetesom tip II, a sadržaj masnih MK, ispitano je kako promena ova dva parametara *in vivo* utiče na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA. Reaktivnost tiolne grupe Cys34, odnosno srednja vrednost konstante brzine reakcije tiolne grupe sa DTNB, je kod pacijenata sa DM II skoro dvostruko veća u odnosu na zdrave osobe. Povećanje reaktivnosti/izloženosti tiolne

grupe HSA kod obolelih od dijabetesa ima veliki značaj s obzirom na već pomenutu činjenicu da je Cys34 tiolna grupa dobar hvatač reaktivnih karbonila i moćan antioksidant u cirkulaciji.

Rezultati dobijeni u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima efekata karbonilacije i vezivanja masnih kiselina na sposobnost HSA da vezuje/otpušta jone bakra u cirkulaciji imaju fundamentalni, ali i biomedicniski značaj.

6. LITERATURA

Acimovic, J. M., B. D. Stanimirovic, N. Todorovic, V. B. Jovanovic and Lj. M. Mandic (2010). "Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal." *Chem Biol Interact* **188**(1): 2130.

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

Aćimović J. M., Stanimirović B. D. and Lj.M. Mandić (2009) The role of the thiol group in protein modification with methylglyoxal *J. Serb. Chem. Soc.* **74**(8–9): 867–883.

Ahmed N. (2005). Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications *Diabetes Res Clin Pract.* **67**(1):3-21.

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

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

Arai K., Iizuka S., Tada Y., Oikawa K., Taniguchi N., (1987). Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* **924**(2):292-6.

Argirova M.D., Ortwerth B.J. (2003). Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **420**(1):176-184.

Arthur J.R., Boyne R. (1985). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci.* **36**(16):1569-75.

Ascenzi P., di Masi A., Fanali G., Fasano M. (2015) Heme-albumin: an honorary enzyme. *Cell Death Dis* **6**, e1895.

Bal W., Christodoulou J., Sadler P.J., Tucker A. (1998). Multi-metal binding site of serum albumin. *A J Inorg Biochem.* **70**(1):33-9.

Bal W., Sokołowska M., Kurowska E., Faller P. (2013) Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta.* **1830**(12):5444-55.

Banci L., Bertini I., McGreevy K. S. and Rosatoab A. (2010). Molecular recognition in copper trafficking *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 695-710.

Beeken W.L., Imredy K. (1962). Catabolism of rat serum albumin *in vitro* by mitochondrial preparations of rat liver – pH effect *Biochim. Biophys. Acta*, **62**: 579-581.

Beisswenger P.J., Howell S.K., O'Dell R.M., Wood M.E., Touchette A.D., Szwegold B.S. (2001). alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care.* **24**(4):726-32.

Bern M., Sand K.M., Nilsen J., Sandlie I., Andersen J.T. (2015). The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery. *J Control Release.* **10**;211:144-62.

Bhattacharya A.A., Grüne T., Curry S. (2000). Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol.* **10**;303(5):721-32.

Blache D., Bourdon E., Salloignon P., Lucchi G., Ducoroy P., Petit J.M., Verges B. and Lagrost L. (2015). Glycated Albumin With Loss of Fatty Acid Binding Capacity Contributes to Enhanced Arachidonate Oxygenation and Platelet Hyperactivity: Relevance in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* **64**(3): 960-972.

Boal A.K., Rosenzweig A.C. (2009). Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev.* **109**(10):4760-79.

Bonanata J., Turell L., Antmann L., Ferrer-Sueta G., Botasini S., Méndez E., Alvarez B., Coitiño E.L. (2017). The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic Biol Med.* **108**:952-962.

Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J.F., Margaritis I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol.* **35**:107-15.

Brewer G.J., Johnson V., Dick R.D., Kluin K.J., Fink J.K., Brunberg J.A. (1996). Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate. II. Initial therapy in 33 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Arch Neurol.* **53**(10):1017-25.

Brings S., Fleming T., De Buhr S., Beijer B., Lindner T., Wischnjow A., Kender Z., Peters V., Kopf S., Haberkorn U., Mier W., Nawroth P.P. (2017). A scavenger peptide prevents methylglyoxal induced pain in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **1863**(3):654-62.

Brodersen R., Andersen S., Vorum H., Nielsen S.U. and Pedersen A.O. (1990). Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur J Biochem* **189**(2): 343-349.

Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* **101**(4):527-37.

Bulaj G., Kortemme T. and Goldenberg D.P. (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* **37**(25): 8965-72.

Carballal S., Alvarez B., Turell L., Botti H., Freeman B.A., Radi R. (2007). Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids.* **32**(4):543-51.

Carter, D. C. and J. X. Ho (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* **45**: 153-203.

Ceriello A., Hanefeld M., Leiter L., Monnier L., Moses A., Owens D., Tajima N., Tuomilehto J. (2004). Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med.* **164**(19):2090-5.

Chen, R. F. (1967). Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J Biol Chem* **242**(2): 173-181.

Cheng X., Richard C., Siow M., and Mann G.E. (2011). Impaired Redox Signaling and Antioxidant Gene Expression in Endothelial Cells in Diabetes: A Role for Mitochondria and the Nuclear Factor-E2-Related Factor 2-Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Defense Pathway. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* **14**,(3): 469-87.

Christodoulou J., Sadler P. J., Tucker A. (1994). A New Structural Transition of Serum Albumin Dependent on the State of Cys34: Detection by ¹H-NMR Spectroscopy *European Journal of Biochemistry* **94** 0702/3.

Christodoulou J., Sadler P. J., Tucker A. (1995). ¹H NMR of albumin in human blood plasma: drug binding and redox reactions at Cys 34 *FEBS Letters* **376**:1-5.

Cistola, D. P. and D. M. Small (1991). Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* **87**(4): 1431-41.

Claiborne A. Catalase activity. In: Greenwald R.A., editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press Inc.; Boca Raton: 1984. pp. 283–284.

Clerici, M., G. Colombo, F. Secundo, N. Gagliano, R. Colombo, N. Portinaro, D. Giustarini, A. Milzani, R. Rossi and I. Dalle-Donne (2014). Cigarette smoke induces alterations in the drug-binding properties of human serum albumin. *Blood Cells Mol Dis* **52**(4): 166-174.

Colas, R., Sassolas, A., Guichardant, M., Cugnet-Anceau C., Moret M., Moulin P., Lagarde M., Calzada C. (2011). LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. *Diabetologia* **54**, 2931.

Cooper G.J., Chan Y.K., Dissanayake A.M., Leahy F.E., Keogh G.F., Frampton C.M., Gamble G.D., Brunton D.H., Baker J.R., Poppitt S.D. (2005). Demonstration of a hyperglycemia-driven pathogenic abnormality of copper homeostasis in diabetes and its

reversibility by selective chelation: quantitative comparisons between the biology of copper and eight other nutritionally essential elements in normal and diabetic individuals. *Diabetes*. **54**(5):1468-76.

Curry S. (2009). Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab Pharmacokinet*. **24**(4):342-57.

Curry S., Brick P. and Franks N. P. (1999). Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* **1441**(2-3): 131-140.

Curry S., Mandelkow H., Brick P. and Franks N. (1998). Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* **5**(9): 827-835.

de Almeida I. T., Cortez-Pinto H. Fidalgo G., Rodrigues D. and Camilo M.E. (2002). Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* **21**(3): 219-223.

Djordjevic A., Spasic S., Jovanovic-Galovic A., Djordjevic R., Grubor-Lajsic G.(2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med*. **16**(6):367-72.

Đorđević G., Sretenović S., Stamenović J., Stojanov A. (2017). Correlation between erythrocyte superoxide dismutase and catalase levels and peripheral nerve conduction in diabetic neuropathy patients. *Acta Medica Medianae*. **56**: 78-83.

Ellis R.J., van der Vies S.M. (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*. **60**:321-47.

Evans J.L., Goldfine I. D., Maddux B.A. and Grodsky (2003). G.M. Are Oxidative Stress-Activate Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? *Diabetes* **52**(1): 1-8.

Evans T. W. (2002). Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* **16** Suppl 5: 6-11.

Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M. and Ascenzi P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* **33**(3): 209-290.

Faure P., Tamisier R., Baguet J-P., Favier A., Halimi S., Lévy P., Pépin J-L. (2008.) Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome *European Respiratory Journal* **31**: 1046-1053.

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

Folch J., Lees M., Sloane S.G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* **226**(1):497-509.

Fowler M.J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes, *Clinical Diabetes* **26** (2) 77-82.

Gaetke L.M., Chow C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* **189**(1-2):147-63.

Gaetke L.M., Chow-Johnson H.S., Chow C.K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* **88**(11):1929-38.

Gollan J.L., Deller D.J. (1973). Studies on the nature and excretion of biliary copper in man. *Clin Sci.* **44**(1):9-15.

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

Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. (2012). Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* **38**(2):171-8.

Gupta .1, Lis C.G. (2010). Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature. *Nutr J.* **22**;9:69. doi: 10.1186/1475-2891-9-69.

Ito S., Fujita H., Narita T., Yaginuma T., Kawarada Y., Kawagoe M., Sugiyama T. (2001). Urinary Copper Excretion in Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy *Nephron* **88**:307–312.

Jagt D.L., Hunsaker L.A. (2003). Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase, *Chemico-Biological Interactions* **143–144**:341-51.

Jouven X., Charles M.A., Desnos M., Ducimetière P. (2001). Circulating nonesterified fatty acid level as a predictive risk factor for sudden death in the population. *Circulation.* **104**(7):756-61.

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

Kahn S.E., Cooper M.E., Del Prato S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future, *The Lancet*, **383**, (9922): 1068-83.

Kamal J.K., Behere D.V. (2005). Binding of heme to human serum albumin: steady-state fluorescence, circular dichroism and optical difference spectroscopic studies. *Indian J Biochem Biophys.* **42**(1):7-12.

Kanti Das, T.K., Wati M.R., Fatima-Shad K. (2014). Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Arch. Neurosci*, **2**(3): e20078.

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

Kawakami A., Kubota K., Yamada N., Tagami U., Takehana K., Sonaka I., Suzuki E., Hirayama K. (2006). Identification and characterization of oxidized human serum albumin. *The FEBS Journal*, **273**(14):3346-57.

Kawamura N., Ookawara T., Suzuki K., Konishi K., Mino M., Taniguchi N. (1992). Increased glycosylated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* **74**(6):1352-4..

Kitamura i sar., 2014;. Kitamura K, Takegami S., Tanaka R., Ahmed Omran A. and Kitade T. (2014). Effect of Long-Chain Fatty Acids on the Binding of Trifluoromazine to Human Serum Albumin: A Spectrophotometric Study. *Sci Pharm.* **82**(2): 233–245.

Koga M., Murai J., Saito H., Mukai M., Kasayama S. (2009). Serum glycosylated albumin, but not glycosylated haemoglobin, is low in relation to glycemia in hyperuricemic men. *Acta Diabetol.* **47**(2):173-7.

Kozłowski H., Bal W., Dyba M., Kowalik-Jankowska T. (1999). Specific structure–stability relations in metalloproteins, *Coordination Chemistry Reviews* **184**(1): 319-46.

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

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

Lau S-J., Sarkar B. (1971). Ternary Coordination Complex between Human Serum Albumin, Copper (II), and L-Histidine, *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 5938-43.

Lee P., Wu X. (2015). Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Curr Pharm Des.* **21**(14):1862-5.

Lee, J. Y. and M. Hirose (1992). Partially folded state of the disulfide-reduced form of human serum albumin as an intermediate for reversible denaturation. *J Biol Chem* **267**(21): 14753-14758.

Letelier M.E., Molina-Berríos A., Cortés-Troncoso J., Jara-Sandoval J., Holst M., Palma K., Montoya M., Miranda D., González-Lira V. (2010). DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA.* **22**(2):279-86.

Levitt D.G. (2003) The pharmacokinetics of the interstitial space in humans, *BMC Clin Pharmacol* **3**:3.

Levitt D.G. and Levitt M.D., (2016). Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements, *Int J Gen Med.* **9**: 229–255.

Li H., Grigoryan H., Funk W.E., Lu S.S., Rose S., Williams E.R., Rappaport S.M. (2010). Profiling Cys34 adducts of human serum albumin by fixed-step selected reaction monitoring *Mol Cell Proteomics.* **10**(3):M110.004606.

Liberati A., Moja L., Moschetti I., Gensini G.F., Gusinu R. (2006). Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. *Intern Emerg Med.* **1**(3):243-5.

Linder M.C. (1991). Extracellular Copper Substituents and Mammalian Copper Transport. In: *Biochemistry of Copper. Biochemistry of the Elements*, **10**. Springer, Boston, MA.

Lowe, J., Taveira-da-Silva, R. and Hilário-Souza, E. (2017). Dissecting copper homeostasis in diabetes mellitus. *IUBMB Life*, **69**: 255-262.

Lyons T.J. and Jenkins A.J., (1997). Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev (Alex)*. **5**(4): 365–391.

Madhikarmi N.L., Murthy K.R.S., Rajagopal G., Singh P.P., (2013). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with type 2 diabetes in relation to obesity in Pokhara – Nepal, *Journal of Diabetology*, **4**(1):5.

Maessen D.E., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G. (2015). The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)*. **128**(12):839-61.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. 3rd. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. **17**(1):24-38.

Matafome P., Sena C., Seica R. (2013). Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine*. **43**(3):472-84.

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**:1614–1625.

Mercer J.F. (1998). Menkes syndrome and animal models. *Am J Clin Nutr*. **67**(5 Suppl):1022S-1028S.

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

Minghetti P.P., Ruffner D.E., Kuang W.J., Dennison O.E., Hawkins J.W., Beattie W.G., Dugaiczky A. (1986). Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem*. **25**;261(15):6747-57.

Miyata T. (2002). Alterations of non-enzymatic biochemistry in uremia, diabetes, and atherosclerosis ("carbonyl stress"). *Bulletin et Memoires de L'academie Royale de Medecine de Belgique*. **157**(3-4):189-96.

Mlakar A., Spitteller G. (1996). Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid. *Chem Phys Lipids*. **25**;79(1):47-53.

Naidu S., Peterson M.L., Spear B.T. (2010). Alpha-fetoprotein related gene (ARG): a new member of the albumin gene family that is no longer functional in primates. *Gene*. **449**(1-2):95-102.

Naka T., Kaneto H., Katakami N., Matsuoka T., Harada A., Yamasaki Y., Matsuhisa M. and Shimomura I. (2013). Association of serum copper levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes *Endocrine Journal* **60**(3):393-6.

Neelofar K., Ahmad J. (2017). An overview of in vitro and in vivo glycation of albumin: A potential disease marker in diabetes mellitus. *Glycoconj J*. **34**: 575-584.

Neuzil, J., Stocker, R. (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem*. **269**: 16712–16719.

Nothwehr S.F., Gordon J.I. (1990). Structural features in the NH₂- terminal region of a model eukaryotic signal peptide influence the site of its cleavage by signal peptidase, *J. Biol. Chem.*, **249**:4452-59.

Oettl K., Stauber R.E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*. **151**(5):580-590.

Ogasawara Y., Mukai Y., Togawa T., Suzuki T., Tanabe S., Ishii K. (2007). Determination of plasma thiol bound to albumin using affinity chromatography and high-performance liquid

chromatography with fluorescence detection: Ratio of cysteinyl albumin as a possible biomarker of oxidative stress, *Journal of Chromatography B*, **845**(1):157-63.

Ohgami R.S., Campagna D.R., McDonald A., Fleming M.D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. **108**(4):1388-94.

Öhrvik H., Thiele D.J. (2015). The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J Trace Elem Med Biol*. **31**:178-182.

Oliver i Opie, 1994 Oliver, M.F. and LH Opie, Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias, *The Lancet*, 343, (8890), 155 – 8.

Paglia D.E., Valentine W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. **70**(1):158-69.

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

Pavićević I.D., Jovanović V.B., Takić M.M., Penezić A.Z., Aćimović J.M., Mandić Lj.M., (2014). Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal, *Chemico-Biological Interactions*, **224**: 42-50.

Pavlović D., Đorđević V., Kocić G. (2002). A cross-talk between oxidative stress and cell signaling, *FACTA UNIVERSITATIS Series: Medicine and Biology* **9**(2): 131 – 7.

Penezić A.Z., Aćimović J.M., Pavićević I.D., Takić M.M., Jovanović V.B., Mandić Lj. M. (2019). The interplay between copper(II), human serum albumin, fatty acids, and carbonylating agent interferes with Cys 34 thiol reactivity and copper binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **24**(1):61-70.

Penezić A.Z., Jovanović V.B., Pavićević I.D., Aćimović J.M., Mandić Lj.M. (2015). HSA carbonylation with methylglyoxal and the binding/release of copper(II) ions. *Metallomics : Integrated Biometal Science*. **7**(10):1431-38.

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

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

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

Picklo M.J., Montine T.J., Amarnath V., Neely M.D. (2002). Carbonyl Toxicology and Alzheimer's Disease, *Toxicology and Applied Pharmacology* **184**(3):187-97.

Prakash S. (2017). Role of human serum albumin and oxidative stress in diabetes. *J Appl Biotechnol Bioeng.* **3**(1):281-5.

Prohaska J.R., (2008). Role of copper transporters in copper homeostasis, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **88**(3):826S–9S.

Rabbani i sar. 2016 Rabbani, N., Xue, M. & Thornalley, P.J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J* **33**, 513–525 (2016).

Rapoport T.A. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science.* **258**:931-936.

Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS Letters.* **582**(13): 1783-7.

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

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

Rogowska-Wrzesinska A., Wojdyla K., Nedić O., Baron C.P., Griffiths H.R. (2014). Analysis of protein carbonylation — pitfalls and promise in commonly used methods, *Free Radical Research*, **48**(10):1145-62.

Rondeau P., Singh N. R., Caillens H., Tallet F., Bourdon E., Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes, *Free Radical Biology and Medicine*, **45**(6):799-812.

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

Rosenzweig A.C. (2001). Copper Delivery by Metallochaperone Proteins, *Accounts of Chemical Research* **34**(2):119-28.

Rózga, M., Sokołowska, M., Protas, A.M., Bal W. (2007). Human serum albumin coordinates Cu(II) at its N-terminal binding site with 1 pM affinity. *J Biol Inorg Chem* **12**:913–8.

Rubino F.M., Pitton M., Di Fabio D., Colombi A. (2009). Toward an “omic” physiopathology of reactive chemicals: thirty years of mass spectrometric study of the protein adducts with endogenous and xenobiotic compounds. *Mass Spectrom. Rev.* **28**:725–784.

Sarkar A., Dash S., Barik B.K., Muttigi M.S., Kedage V., Shetty J.K., Prakash M. (2010). Copper and ceruloplasmin levels in relation to total thiols and GST in type 2 diabetes mellitus patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB.* **25**(1):74-6.

Sastry C.S.P., Tummuru M.K. (1984). Spectrophotometric determination of arginine in proteins, *Food Chemistry* **15**(4), 257-60.

Sbarouni E., Georgiadou P., Marathias A., Panagiotakos D., Geroulanos S., Voudris V. (2010). Ischemia-modified albumin in acute aortic dissection. *J. Clin. Lab. Anal.*, **24**:399-402.

Schmitt A., Schmitt J., Münch G., Gasic-Milencovic J. (2005). Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Analytical Biochemistry* **338**(2):201-15.

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

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

Shaklai N., Garlick R.L. and Bunn H.F. (1984). Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.* **259**:3812-7.

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

Slater R.J. (1986). Experiments in Molecular Biology. *Quarterly Review of Biology*, **159**(2).

Smuda M., Glomb M.A. (2013). Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angew. Chem.* **52**:4887–91.

Sokolowska, M., Krezel, A., Dyba, M., Szewczuk, Z. and Bal, W. (2002). Short peptides are not reliable models of thermodynamic and kinetic properties of the N-terminal metal binding site in serum albumin. *European Journal of Biochemistry* **269**:1323-31.

Song Y.H., Naumova A.K., Liebhaber S.A., Cooke N.E. (1999). Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res.* **9**(6):581-7.

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

Spector A.A. (1986). Structure and lipid binding properties of serum albumin, *Methods in Enzymology*, Academic Press, **128**: 320-39.

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

Steinfeld J.L., Waldmann T., Delea C.S. (1961). Metabolism of infused serum albumin in the hypoproteinemia of gastro-intestinal protein loss and in analbuminemia. *Trans Assoc Am Physicians.* **74**:180-94.

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

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

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

Sun S.F., Wong F. (1985). Determination of L-tryptophan-serum albumin binding by highperformance liquid chromatography, *Chromatographia*, **20**:495-499.

Supriya M.S., Pinnelli V.B., Murgod R., Raghavendra D.S., (2013). Evaluation of serum copper, magnesium and glycated haemoglobin in type 2 diabetes mellitus. *Asian J Pharm Clin Res*, **6**(2):188-90.

Szaleczky E., Prechl J., Fehér J., Somogyi A. (1999). Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus--a rational approach. *Postgraduate Medical Journal.* **75**(879):13-7.

Szwergold B., Kappler F., Brown T. (1990). Identification of Fructose 3-Phosphate in the Lens of Diabetic Rats. *Science*, **247**(4941), 451-4.

Šebeková K., Kupčová V., Schinzel R., Heidland A. (2002). Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis – amelioration by liver transplantation, *Journal of Hepatology*, **36**(1):66-7.

Šunderić M., Robajac D., Gligorijević N., Miljuš G., Nedić O., Smilkov K., Gjorgieva Ackova D., Rudić-Grujić V. and Penezić A. (2019). Is There Something Fishy About Fish Oil? *Current Pharmaceutical Design* **25**:1747.

Takikawa H., Sugiyama Y., Hanano M., Kurita M., Yoshida H., Sugimoto T., (1987). A novel binding site for bile acids on human serum albumin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **926**(2):145-53.

Tanaka A., Kaneto H., Miyatsuka T., Yamamoto K., Yoshiuchi K., Yamasaki Y., Shimomura I., Matsuoka T.A., Matsuhisa M. (2009). Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr J.* **56**(5):699-706.

Taverna, 2013 Taverna M., Marie A., Mira J. (2013). Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann. Intensive Care* **3**:4.

Tentori L. and Salvati A.M. (1981). Hemoglobinometry in human blood. *Meth. Enzymol.* **76**:705–715.

Thornalley P. J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*, **23**(1-2):125–150.

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

Tomlinson, D.R. and Gardiner, N.J. (2008). Diabetic neuropathies: components of etiology. *Journal of the Peripheral Nervous System*, **13**:112-121.

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

Tsai E. C., Hirsch I. B., Brunzell J. D., Chait A. (1994). Reduced Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity and Increased Susceptibility of LDL to Oxidation In Poorly Controlled IDDM Diabetes **43**(8):1010-4.

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

Turnlund J.R. (1998). Human whole-body copper metabolism, *The American Journal of Clinical Nutrition* **67**(5):960S-4S,

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

Vander Jagt i sar., 2001 Vander Jagt DL, Hassebrook RK, Hunsaker LA, Brown WM, Royer RE., Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications., *Chem Biol Interact.* 2001 Jan 30;130-132(1-3):549-62.

Vincent A.M., Russell J.W., Low P., Feldman E.L. (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy, *Endocrine Reviews*, **25**(4):612-28.

Wells-Knecht K.J., Zyzak D.V., Litchfield J.E., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry.* **34**(11):3702-3709.

Westwood M.E., Thornalley P.J. (1995). Molecular characteristics of methylglyoxal modified bovine and human serum albumins: comparison with glucose derived advanced glycation endproductmodified serum albumins. *Protein Chem.* **14**:359–372.

Winge D.R. and Mehra R.K. (1990). Host defenses against copper toxicity. *Int Rev Exp Pathol.* **31**:47-83.

Xu J., Zhou Q., Liu G., Tan Y., Cai L. (2013). Analysis of serum and urinal copper and zinc in Chinese northeast population with the prediabetes or diabetes with and without complications. *Oxidative medicine and cellular longevity* 635214.

Yamato M., Shiba T., Yoshida M., Ide T., Seri N., Kudou .W., Kinugawa S., Tsutsui H. (2007). Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *The FEBS Journal* **274**:3855-3863.

Zak B. (1958). Simple procedure for the single sample determination of serum copper and iron, *Clinica Chimica Acta*, **3**(4):328-34.

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

Zyzak D.V., Richardson J.M., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1995). Formation of Reactive Intermediates from Amadori Compounds under Physiological Conditions, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316(1):547-54.

Biografija autora

Ana Penezić, rođena je 25.11.1979. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,21 i ocenom 10 na diplomskom radu, čime je stekla zvanje diplomirani biohemičar. Tokom poslediplomskog obrazovanja završila je program Master biohemičar tokom školske 2010/2011. godine u laboratoriji prof. dr Ljube Mandić. Doktorske studije biohemije, pod mentorstvom prof. dr Ljube Mandić upisala je 2011. godine na studijskom programu Doktor biohemijskih nauka, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od 2014. godine zaposlena je u Institutu za primenu nuklearne energije, INEP, na Odeljenju za metabolizam, kojim rukovodi dr Olgica Nedić, prvo kao istraživač-pripravnik, a od 2015. godine kao istraživač-saradnik.

Koautor je 14 naučnih radova iz kategorija M21 i M22, od kojih je jedan revijalni, kao i jednog poglavlja u knjizi. Takođe je autor više saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Član je Srpskog hemijskog društva i Biohemijskog društva Srbije.