



Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

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

Vesna B. Jovanović

**TIOLNA GRUPA Cys34 HUMANOG
SERUM-ALBUMINA: MOGUĆNOSTI I
ZNAČAJ ODREĐIVANJA U KLINIČKOJ
PRAKSI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013



University of Belgrade - Faculty of Chemistry

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

Vesna B. Jovanović

**Cys34 THIOL GROUP OF HUMAN
SERUM ALBUMIN: POSSIBILITIES AND
IMPORTANCE OF DETERMINATION IN
CLINICAL PRACTISE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

dr Ljuba Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

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

dr Vesna Dimitrijević-Srećković,
vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze:

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

Dr Ljubi Mandić, redovnom profesoru, mentoru, želim da se zahvalim na podršci i korisnim sugestijama u toku izrade doktorske disertacije.

Dr Vesni Dimitrijević-Srećković, vanrednom profesoru, želim da se zahvalim na dugogodišnjoj saradnji i podršci koju mi je pružala sve ove godine.

Prof. dr Miroslavu M. Vrviću želim da se zahvalim na korisnim savetima tokom pisanja teze.

Svim kolegama iz laboratorije 403, dr Jeleni Aćimović, Ani Penezić i Ivanu Pavićeviću zahvaljujem se na korisnim savetima i pomoći koju su mi pružili tokom eksperimentalnog rada.

Hvala mr Mariji Poštić-Takić, za analize masnokiselinskih profila.

Zahvaljujem se Mariji Đekić na uzorcima pacijenata.

Zahvaljujem se dr Mihajlu Spasiću i dr Snežani Spasić na podršci.

Zahvaljujem se studentima Ivani Milenković, Bojanu Vujiću i Gordani Gavrić, koji su radeći svoje diplomske radove u našoj laboratoriji dali svoj doprinos.

Zahvaljujem se kolegama iz lab. 401, 421 i 434 koji su svojim savetima i tehničkom podrškom doprineli izradi ove teze.

Mojoj voljenoj porodici

Beograd, 2013

Autor

TIOLNA GRUPA Cys34 HUMANOG SERUM-ALBUMINA: MOGUĆNOSTI I ZNAČAJ ODREĐIVANJA U KLINIČKOJ PRAKSI

Apstrakt

Humani serum albumin (HSA) ima više fizioloških funkcija, jedna od njih je odbrana organizma od oksidativnog i/ili karbonilnog stresa. Istaknuta funkcija je posledica prisustva jedne slobodne tiolne grupe ostatka Cys34 na površini njegovih molekula. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa bi moglo biti pogodno za procenu stepena oksidativnog i/ili karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima. Da bi našlo primenu u kliničkoj praksi, u prvom koraku potrebno je izolovati HSA iz seruma ili plazme, a potom odrediti sadržaj tiolnih grupa.

Ispitivanjem pouzdanosti metode izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue (CB) iz seruma zdravih osoba i dijabetičara, i kvantifikacije tiolne grupe, ustanovljeno je da je sadržaj HSA-SH grupa veći za 6 do 33 % od ukupnog sadržaju tiola seruma, odnosno da je tačnost metode mala (recovery sadržaja HSA-SH grupa od 113,6 do 130,1%). Utvrđena diskrepancija nije posledica uslova izolovanja (zapremina uzorka, karakteristike matriksa, protok kroz kolonu i vreme potrebno za izolovanje HSA i određivanje sadržaja SH grupa), prisustva pufera za izolovanje i drugih proteina u izolovanom HSA (čistoće od 88,4 do 91,4 %), uticaja proteina, malih molekula i jona prisutnih u serumu na određivanje HSA-SH, već selekcije HSA molekula od strane CB prema njihovoj konformaciji. Promena konformacije (utvrđena emisionom fluorescentnom spektroskopijom i CD), odnosno selekcija zavisi od vrste i broja molekula masnih kiselina (Mk) vezanih za HSA. Osim toga, priroda i broj Mk vezanih za HSA doprinose povećanju reaktivnosti HSA-SH grupa: konstanta brzine pseudo prvog reda za reakciju HSA-SH grupe s DTNB u CB-vezanoj-HSA frakciji ($21.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je veća u odnosu na nevezanu-HSA frakciju ($11.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), kao i u grupi dijabetičara ($n=20$) ($20.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($n=17$) ($12.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Recovery vrednosti sadržaja Cys34-SH grupa u CB-vezanim-HSA frakcijama (od 98,5 do 101,7 %), dobijene nakon odmaščivanja HSA, potvrdile su da metoda izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom nije pogodna za određivanje sadržaja HSA-SH grupa za kliničke svrhe.

U cilju postizanja veće pouzdanosti u izvođenju zaključaka o promenama sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima, optimizovana je metoda izolovanja HSA

iz seruma dvostepenim taloženjem sa amonijum-sulfatom (AS) (zasićenje AS od 54 % u prvom i od 70 % u drugom koraku), sa prinosom HSA od $69,7 \pm 4,4$ %. Način taloženja HSA (sa čvrstim AS-om ili zasićenim rastvorom AS-a) i uklanjanje AS-a iz izolovanog preparata, ne utiče značajno na čistoću izolovanog HSA, u kojem je pored monomera (zastupljenost $91,9 \pm 3,6$ %) dokazano (SDS PAG elektroforezom i imunoblotom) prisustvo dimera HSA (oko 10 %), tako da se predloženim postupkom izoluje HSA čistoće oko 100 %. Predložena metoda je jednostavna, brza i jeftina, što je važno za kliničku praksu. Omogućava precizno (RSD 3,2 %), tačno (recovery vrednost $101,2 \pm 2,0$ %, za opseg fizioloških vrednosti od 0,25 do 0,75 mol-SH/mol HSA) i pouzdano (doprinos HSA-SH ukupnom sadržaju tiola u serumu kod zdravih osoba iznosi $83,2 \pm 5,3$ %) određivanje sadržaja HSA-SH grupa. Predložena metoda može da se primeni i za izolovanje HSA iz plazme (ne postoji statistički značajna razlika između sadržaja Cys34-SH grupa HSA izolovanog iz plazme ili seruma (0.574 ± 0.026 ; 0.570 ± 0.028 mol-SH/mol HSA, resp.).

Mogućnost i značaj određivanja sadržaja HSA Cys34-SH grupe kao markera u kliničkoj praksi, proverena je određivanjem sadržaja HSA-SH grupa i ukupnih tiola u grupi: obolelih od tipa 2 dijabetesa (n=23) i kontrolnoj grupi (n=17); kod trudnica sa (n=15) i bez preeklampsije (n=15). U oba patološka stanja, kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa i sa preeklampsijom, dobijeno je statistički značajno smanjenje ($p < 0.05$) sadržaja HSA-SH grupa i ukupnih tiola seruma u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. Određivanje sadržaja HSA Cys34-SH grupa se može primenjivati kao marker procene karbonilnog stresa u ovim patološkim stanjima. Pored toga, nađeno je da se reaktivnost tiolne grupe Cys34 ostatka u ovim stanjima menja, što ima važne implikacije na mogućnost modulacije reaktivnosti (antioksidativnih svojstava) tiolne grupe pomoću suplemenata (na primer. masnih kiselina).

Ključne reči: pouzdanost određivanja tiolne grupe Cys34 HSA; reaktivnost Cys34 tiolne grupe; izolovanje HSA iz seruma i plazme; afinitetna hromatografija; metoda dvostepenog taloženja; masne kiseline vezane za HSA; karbonilni stres; dijabetes; preeklampsija.

Naučno polje: Biohemija

Naučna disciplina: Biohemija proteina

UDK number: 577.112

Cys34 THIOL GROUP OF HUMAN SERUM ALBUMIN: POSSIBILITIES AND IMPORTANCE OF DETERMINATION IN CLINICAL PRACTISE

Abstract

Human serum albumin (HSA) has a multitude of physiological functions, and one of them is to defend the organism against oxidative and/or carbonyl stress. This prominent function is enabled by the presence of single free Cys34 thiol group at the surface of HSA molecules. Determination of HSA-SH group content could be a suitable parameter for oxidative and/or carbonyl stress level assessment in different pathological states. In order to become applicable in clinical practice, it is necessary to isolate HSA from serum or plasma in the first, and then to determine the content of thiol group.

Monitoring of the reliability of affinity chromatography with Cibacron Blue (CB) for HSA isolation from serum of healthy and diabetic persons, and thiol group quantification, showed that HSA-SH group content was higher from 6 to 33% than the total serum thiols content, i.e. that the accuracy of this method is low (HSA-SH group content recovery ranging from 113.6 to 130.1%). This discrepancy is not caused by the isolation conditions (sample volume, matrix characteristics, column flow and the time needed for HSA isolation and SH group content determination), presence of buffer for HSA isolation and other proteins in isolated HSA preparation (purity range from 88.4 to 91.4%), influence of proteins, small molecules and ions present in the serum on the HSA-SH content determination, but the selection of HSA molecules by CB according to their conformations. The change in conformation (determined by emission fluorescent spectroscopy and CD), and accordingly the selection, depend on the type and the number of fatty acid (FA) molecules bound to HSA. Besides that, the nature and the number of HSA bound FAs contribute to the increase in HSA-SH group reactivity: pseudo-first order rate constant for the reaction HSA-SH group with DTNB in CB bound fraction ($21.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) is higher compared to unbound HSA fraction ($11.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), as well as in diabetic group ($n=20$) ($20.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) compared to the controls ($n=17$) ($12.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Recovery values for Cys34-SH group content in CB bound HSA fractions (from 98,5 to 101,7 %), acquired after HSA defatting, confirmed that isolation of HSA by affinity chromatography is not suitable for determination of HSA-SH group content in clinical practice.

A two step ammonium sulphate (AS) precipitation method for HSA isolation from serum (AS saturation from 54% in first step and 70% in second step), with HSA

yield of $69.7 \pm 4.4\%$, has been optimised in order to make more reliable conclusions about the changes in HSA-SH group content in different pathological states. HSA precipitation method (with solid AS or saturated AS solution) and the removal of AS from isolated preparation, has no significant influence on the purity of isolated HSA, where the presence of HSA dimer (about 10 %) was detected (by SDS PAG electrophoresis and immunoblot) along with the HSA monomer ($91.9\% \pm 3.6\%$ abundance), so the purity of isolated HSA can be regarded as 100%. The proposed method is simple, fast and low cost, which is of great importance for good clinical practice. It allows for precise (RSD 3,2%), accurate (with $101,2 \pm 2\%$ recovery for physiological values from 0,25 to 0,75 mol -SH/mol HSA) and reliable (HSA-SH contribution to the total serum thiols content in healthy persons is $83,2 \pm 5,3\%$) determination of HSA-SH group content. In addition, proposed method could be applicable for isolation of HSA from plasma samples (there is no significant statistical difference between the HSA Cys34-SH content isolated from plasma and serum (0.574 ± 0.026 ; 0.570 ± 0.028 mol-SH/mol HSA, resp.)).

The possibility and the importance of HSA Cys34-SH content determination as a marker in clinical practice, was tested by the determination of HSA-SH and total thiols content in group of: patients with diabetes mellitus type II (n=23) and control group (n=17); pregnant women with (n=15) and without preeclampsia (n=15). In both pathological states, in diabetic patients and pregnant women with preeclampsia, there is a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in HSA-SH group content as well as in total serum thiols content compared to appropriate controls. Determination of HSA Cys34-SH content could be applied as a marker for carbonyl stress level assessment in these pathological states. In addition, it was found that the reactivity of Cys34 thiol group in these pathological states changes, which is an important implication for possible modulation of its reactivity (antioxidant properties) by supplements (eg. fatty acids).

Key words: HSA Cys34 thiol group determination reliability; Cys34 thiol group reactivity; HSA isolation from serum and plasma; affinity chromatography; two-step precipitation method; HSA bound fatty acid; carbonyl stress; diabetes; preeclampsia.

Scientific field: Biochemistry

Scientific discipline: Protein Biochemistry

UDC number: 577.112

LISTA SKRAĆENICA

- AFP**- α -feto protein
- AGE**- Advanced Glycation Endproducts
- APS**- Amonijum persulfat
- AS**- Amonijum sulfat
- ATP**- Adenozin-5'-trifosfata
- BCIP**-5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat
- BFP**- Brom-fenol-plavo
- BKZ**- Bromkrezol zeleno
- CB**- Cibacron Blue
- CBB**-Coomassie Brilliant Blue
- CD**- Cirkularni dihiroizam
- CEC**- Karboksietil cistein
- CMC**- Karboksimetil cistein
- DTNB**-5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
- DTT**-Ditiotreitol
- GC**- Gas Chromatography
- Gc**- Protein G komplementa
- GSH**- Glutation
- 4-HDA**- 4- Hidroksi alkeni
- HSA**-Humani serum albumin
- Mk**- Masne kiseline
- MDA**-Malondialdehid
- MPO**- Mijeloperoksidaza
- NC**- Nitroceluloza
- NBT**-Nitro blue tetrazolium
- PAGE**- Polyacrilamide Gel Electrophoresis
- RER**- Rapavi endoplazmatični retikulum

ROS- Reactive Oxygen Species
RSD- Relativna standardna devijacija
SDS- Sodium dodecyl sulphate
SOD- Superoksid dizmutaza
SRP- Signal recognition particle
TEMED- N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin
TCA- Trihlorsirćetna kiselina
VDP- Vezujući vitamin D protein
ZAS- Zasićeni rastvor amonijum-sulfata

SADRŽAJ

	Strana
1. Uvod	1
2. Pregled literature	5
2.1. Humani serum albumin	5
2.1.1. Svojstva i funkcije	5
2.2. Struktura humanog serum-albumina	6
2.2.1. Genetska pripadnost HSA	6
2.2.2. Sinteza HSA i oslobađanje u cirkulaciju	7
2.2.3. Primarna struktura HSA	9
2.2.4. Sekundarna i tercijarna struktura HSA	10
2.3. Vezivna mesta na molekulu HSA	12
2.3.1. Vezivna mesta na molekulu HSA za Mk	12
2.3.2. Vezivna mesta na molekulu HSA za lekove	16
2.3.3. Vezivna mesta na molekulu HSA za druge molekule	17
2.3.4. Vezivna mesta na molekulu HSA za jone metala	18
2.4. Oksidativni i karbonilni stres	19
2.4.1. Oksidativni stres	19
2.4.1.1. Nastajanje ROS	20
2.4.1.2. Mehanizmi oštećenja lipida, nukleinskih kiselina i proteina ROS	22
2.4.2. Karbonilni stres	25
2.4.3. Odbrambeni mehanizmi u sprečavanju oksidativnog i karbonilnog stresa	28
2.5. Uloga HSA u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa	31
2.5.1. Uloga HSA u odbrani od oksidativnog stresa	31
2.5.1.1. Antioksidativna svojstva HSA određena vezivanjem liganda	32

2.5.1.2. <i>Antioksidativna svojstva HSA zbog posedovanja grupa (Cys 34 i Met)</i>	32
2.5.2. <i>Uloga HSA u odbrani od karbonilnog stresa</i>	34
2.5.3. <i>HSA - marker oksidativnog i karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima</i>	36
2.6. <i>Pregled metoda izolovanja humanog serum-albumina</i>	37
2.6.1. <i>Taložne metode</i>	37
2.6.2. <i>Hromatografske metode</i>	39
2.6.3. <i>Metode za izolovanje HSA i određivanje sadržaja HSA-SH grupa</i>	40
3. <i>Materijali i metode</i>	42
3.1. <i>Hemikalije</i>	42
3.2. <i>Aparati</i>	43
3.3. <i>Uzorci seruma i plazme</i>	43
3.4. <i>Izolovanje HSA iz seruma i plazme</i>	43
3.4.1. <i>Izolovanje HSA iz seruma afinitetnom hromatografijom</i>	44
3.4.2. <i>Izolovanje HSA iz seruma i plazme taloženjem sa amonijum-sulfatom (AS)</i>	45
3.5. <i>Metode</i>	46
3.5.1. <i>Određivanje koncentracije proteina</i>	46
3.5.1.1. <i>Određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom</i>	46
3.5.1.2. <i>Određivanje koncentracije proteina Biuretskim reagensom</i>	46
3.5.2. <i>Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom</i>	47
3.5.3. <i>Određivanje konstante brzine pseudo prvog reda</i>	47
3.5.4. <i>Biohemijske analize</i>	48

3.6. Elektroforetske tehnike	48
3.6.1. Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (nativna PAGE)	48
3.6.2 SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS PAGE)	50
3.6.3. Izoelektrofokusingiranje (IEF)	52
3.7. Imunoblot	53
3.7.1. Transfer proteina na membranu (western blot)	53
3.7.2. Detekcija HSA na membrani	53
3.8. Priprema uzoraka komercijalnog HSA	54
3.8.1. Redukcija komercijalnog HSA	54
3.8.2. Odmaščivanje uzorka HSA	55
3.8.3. Zamaščivanje uzorka HSA	56
3.8.4. Pripremanje uzoraka HSA određenog sadržaja HSA-SH grupa	56
3.9. Spektroskopske metode	57
3.9.1. Fluorescentna spektroskopija	57
3.9.2. Cirkularni dihiroizam (CD)	57
3.10. Analiza profila Mk vezanih za HSA	57
3.10.1. Izolovanje Mk vezanih za HSA	57
3.10.2. Pripremanje metil-estara Mk	58
3.10.3. Analiza Mk gasnom hromatografijom (GC)	58
3.11. Obrada rezultata	58
4. Rezultati i diskusija	59
4.1. Definisavanje uslova za izolovanje HSA iz seruma i za određivanje sadržaja HSA-SH grupa	59
4.1.1. Izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom	59

4.2. Pouzdanost metoda izolovanja HSA i kvantifikacije HSA-SH grupa	60
4.3. Validacija metoda izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom i određivanja sadržaja HSA-SH grupa	63
4.4. Ispitivanje uzroka koji dovode do povećanog doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu	64
4.4.1. Uslovi izolovanja HSA iz seruma afinitetnom hromatografijom	64
4.4.2. Uticaj pufera za izolovanje HSA na određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom	67
4.4.3. Pouzdanost metode određivanja sadržaja ukupnih tiola u serumu spektrofotometrijskom metodom s DTNB-om kao reagensom	69
4.4.4. Step en čistoće albumina izolovanog iz humanog seruma afinitetnom hromatografijom	71
4.4.4.1. Uticaj proteina prisutnih u izolovanom HSA na određivanje sadržaja HSA-SH grupa	74
4.5. Ispitivanje uticaja masnih kiselina vezanih za HSA na određivanje sadržaja HSA-SH grupa	76
4.5.1. Uticaj vezivanja masnih kiselina za humani serum albumin na konformacione promene njegovih molekula	76
4.5.2. Da li Mk vezane za HSA utiču na selektivnost Cibacron blue liganda prema molekulima HSA?	81
4.5.3. Uticaj Mk vezanih za HSA na reaktivnost i/ili dostupnost HSA-SH grupe	84
4.5.4. Uticaj odmaščivanja uzorka HSA na sadržaj HSA Cys34-SH grupa u frakciji vezanoj za kolonu sa Cibacron Blue	91
4.6. Izolovanje HSA taloženjem sa amonijum-sulfatom	94

<i>4.7. Uticaj amonijum-sulfata na čistoću izolovanog HSA i određivanje sadržaja tiol-grupa</i>	97
<i>4.8. Uticaj načina taloženja sa AS-om (čvrst ili zasićeni rastvor) na čistoću izolovanog HSA</i>	103
<i>4.9. Optimizacija uslova za izolovanje HSA iz seruma taloženjem s amonijum-sulfatom</i>	105
<i>4.10. Da li je kontaminirajuća traka, prisutna u HSA izolovanom iz seruma, dimer albumina?</i>	111
<i>4.11. Karakterizacija HSA izolovanog taloženjem sa amonijum-sulfatom</i>	114
<i>4.12. Određivanje sadržaja Cys34-SH grupa u HSA izdvojenom iz seruma nakon prvog, odnosno drugog koraka izolovanja</i>	116
<i>4.13. Validacija metode određivanja sadržaja Cys34-SH grupa u preparatima HSA izolovanim taloženjem sa amonium-sulfatom</i>	118
<i>4.13.1. Ispitivanje preciznosti metode</i>	118
<i>4.13.2. Ispitivanje tačnosti metode</i>	119
<i>4.13.3. Provera pouzdanosti metode</i>	121
<i>4.14. Izolovanje HSA iz plazme dvostepenim taloženjem sa amonijum-sulfatom</i>	123
<i>4. 15. Mogućnosti primene određivanja sadržaja HSA-SH grupa kao markera u kliničkoj praksi</i>	125

<i>4.15.1. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa kod osoba obolelih od dijabetesa</i>	125
<i>4.15.2. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa kod trudnica sa preeklampsijom</i>	128
<i>4.15.3. Uticaj Mk vezanih za HSA na reaktivnost Cys34-SH grupe u patološkim stanjima</i>	131
4. Zaključci	133
5. Literatura	139

1. UVOD

Humani serum albumin (HSA) je najzastupljeniji protein plazme (~0.6mM), sintetiše se u jetri u obliku preproalbumina (609 aminokiselinskih ostataka), koji se nakon obrade oslobađa u cirkulaciju (585 aminokiselinskih ostataka). Zbog velike zastupljenosti i relativno lakog izolovanja poznati su svi nivoi njegove strukture. Radi se o neglikozilovanom proteinu (66.4 kDa), čija struktura je organizovana u 3 homologa domena (I, II i III), a svaki od domena se deli na 2 subdomena (A i B). Izuzetna stabilnost i fleksibilnost ovog molekula potiče od 17 disulfidnih veza koje se isključivo nalaze unutar subdomena. HSA ima nekoliko važnih fizioloških i farmakoloških funkcija. Transportuje brojna endogena i egzogena jedinjenja kao što su masne kiseline (Mk), hem, tiroksin, bilirubin, hormoni, joni metala, lekovi i različiti ksenobiotici. Važnu ulogu ima i u održavanju pH i osmotskog pritiska plazme.

Pored navedenog, HSA ima i antioksidativnu ulogu, koja potiče od prisustva samo jedne slobodne tiolne grupe ostatka Cys34, koja može postojati u redukovanom i oksidovanom obliku. Kako je HSA najzastupljeniji protein plazme, on svojom slobodnom tiolom grupom doprinosi ukupnom sadržaju slobodnih tiola plazme sa oko 80 % i na taj način predstavlja jedan od najvažnijih ekstracelularnih antioksidanasa. Oksidativni stres, koji ima značajnu ulogu u patogenezi nekih bolesti, kao što su dijabetes, alkaptonurija, preeklampsija, apnea i bolesti jetre, bubrega i srca, povezan je sa smanjenjem sadržaja HSA-SH grupa usled reakcije tiolne grupe sa reaktivnim oksidativnim vrstama.

Sa druge strane, karbonilni stres, koji je prisutan u nekim patološkim stanjima kao što su dijabetes, Alzheimer-ova bolest, anemija, uremija, ateroskleroza i bolesti jetre i bubrega, takođe može dovesti do smanjenja sadržaja HSA-SH grupa usled karbonilovanja Cys34 tiol-grupe reaktivnim α -oksoaldehidima (glioksalom, metilglioksalom i 3-deoksiglukozonom). Cys34 tiolna grupa, prisutna na površini molekula HSA, pri fiziološkom pH mnogo je jači nukleofil od amino- i guanidino-grupa (59 bočnih ostataka lizina i 24 bočna ostatka arginina, resp.), što je čini reaktivnijom za karbonilovanje u normalnim i patološkim stanjima. U prvoj fazi reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina glukoza reaguje s amino-grupom na površini molekula proteina, stvara se Šifova baza koja Amadori premeštanjem prelazi u ketoaminski proizvod. Ovaj proizvod u drugoj fazi podleže reakcijama oksidacije i premeštanja uz oslobađanje reaktivnih dikarbonilnih jedinjenja (glioksala, metilglioksala i 3-deoksiglukozona), koji dalje dovode do stvaranja krajnjih proizvoda glikozilovanja (AGEs-Advanced glycation end products). Prisustvo reaktivnih α -okso-aldehida dovodi do povećanog karbonilovanja tiolne grupe Cys34 HSA, nastali primarni proizvod ove reakcije u sledećem koraku može reagovati sa amino-grupom

drugog molekula HSA i obrnuto, primarni proizvod reakcije amino-grupe i dialdehida može reagovati sa slobodnom tiolnom grupom drugog molekula proteina, što dovodi do umrežavanja molekula proteina. Ovi procesi mogu dovesti do razvoja mikro- i makro-angiopatskih komplikacija, do kojih dolazi u dijabetesu, bolestima srca i bubrega.

Zbog dugog poluživota (21 dan), velike zastupljenosti u plazmi, posedovanja slobodne tiolne grupe i lake dostupnosti za izolovanje, u poslednjih nekoliko godina fokus naučnih istraživanja usmeren je na ispitivanje antioksidativnih svojstava HSA, tj. na određivanje sadržaja HSA-SH grupa kao potencijalnog markera za procenu oksidativnog i/ili karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima. Da bi ovo određivanje našlo primenu u kliničkoj praksi potrebno je izolovati HSA iz seruma (plazme) u obliku koji će omogućiti tačno, precizno i reproduktivno određivanje sadržaja slobodnih HSA-SH grupa. Takođe, nastali proizvodi oksidativnih i neenzimskih posttranslacionih modifikacija HSA mogu biti potencijalni markeri za praćenje razvoja bolesti u kliničkoj praksi.

Vezivanje Mk za HSA dovodi do značajnih konformacionih promena molekula HSA, koje dovode da tiolna grupa Cys34 (koja je smeštena u hidrofobnom džepu u subdomenu I) bude više ili manje izložena okolnoj sredini, a samim tim postaje više ili manje reaktivna (osetljiva) prema oksidativnom i karbonilnim vrstama. Ovo je od naročitog značaja u patološkim stanjima (dijabetesu, bolestima jetre i srca) koja su, pored povećanog oksidativnog i/ili karbonilnog stresa, praćena i povećanjem sadržaja slobodnih Mk u cirkulaciji, a istovremeno zahtevaju i primenu lekova koji mogu da se vežu za HSA i izazovu konformacione promene molekula HSA, kao i vezivanje Mk. Postranslacione modifikacije HSA malim molekulima mogu dovesti do promene njegove strukture i/ili funkcije, što ispitivanju ovih promena daje fundamentalni, ali i biomedicinski značaj. Stoga je izolovanje HSA važno, sa jedne strane zbog sagledavanja uticaja postranslacionih modifikacija molekula HSA na njegovu fiziološku funkciju (npr. vezivanje liganda), a sa druge strane zbog sagledavanja uticaja vezivanja endogenih (Mk) i egzogenih liganda (lekova) na postranslacione modifikacije HSA.

Uprkos brojnim predloženim metodama za izolovanje HSA, u kojima se najčešće kombinuju koraci izolovanja koji se baziraju na različitoj rastvorljivosti HSA i drugih proteina plazme ili na specifičnoj interakciji između HSA i različitih liganada, nijedna od njih, zbog tehničkih ili vremenskih zahteva, nije našla široku primenu u kliničkoj praksi. Zbog toga se poslednjih godina za izolovanje HSA i određivanje sadržaja HSA-SH grupa veoma često primenjuje jednostepena afinitetna hromatografija sa Cibacron Blue F3GA bojom. Kada smo mi primenili ovu metodu za određivanje sadržaja HSA-SH grupa radi

procene oksidativnog i/ili karbonilnog stresa kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa, ustanovili smo da je doprinos sadržaja HSA-SH grupa veći od ukupnog sadržaju tiola u serumu. Osim uočene diskrepancije, afinitetni matriks, pored HSA, vezuje i druge proteine plazme, koji mogu ometati određivanje sadržaja Cys34-SH grupa. Masne kiseline vezane za HSA (koje se kod uzoraka HSA mogu razlikovati i po vezanoj količini i po vrsti) utiču na afinitet vezivanja HSA za boju, što može uticati na efikasnost i reproduktivnost izolovanja HSA, ali i na tačnost, preciznost i reproduktivnost određivanja sadržaja slobodnih HSA-SH sadržaja. Stoga je prvi cilj ove teze bio da se ispita:

- primenljivost afinitetne hromatografije sa Cibacron Blue F3GA bojom za izolovanje HSA iz seruma u obliku koji omogućava tačno, precizno i reproduktivno određivanje sadržaja slobodnih Cys34-SH grupa humanog serum albumina.

Iz ovog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- definisanje uslova izolovanja, pogodnih za kliničku primenu (zahtevi - jednostavnost i brzina);
- provera pouzdanosti metode, od izolovanja do kvantifikacije HSA-SH sadržaja u kontrolnoj grupi i grupi obolelih od dijabetesa;
- ispitivanje uticaja različitih faktora na pouzdanost metode određivanja HSA-SH sadržaja (pufer za izolovanje; prisustvo drugih proteina, malih molekula i jona u serumu; zapremina uzorka; tip matriksa; čistoća izolovanog HSA; zastupljenost dimera HSA);
- ispitivanje uticaja Mk vezanih za HSA na: izolovanje HSA, promenu konformacije HSA molekula, selektivnost Cibacron Blue liganda prema molekulima HSA, reaktivnost HSA-SH grupe (kinetiku reakcije tiolne grupe Cys34 HSA s DTNB), dostupnost tiolne grupe za reakciju. Navedene uticaji ispitati u *in vitro* uslovima u prisustvu različitih Mk (miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske, eikozapentaenske i dokozaheksaenske), kao i u *in vivo* uslovima, u uzorcima kontrolne grupe i obolelih od dijabetesa.

Pored navedenih nedostataka, izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom zahteva vreme, što sa jedne strane nije praktično za kliničku primenu, a sa druge strane tokom izolovanja HSA može da dođe do promene sadržaja HSA-SH grupa usled njihove postepene oksidacije zbog disulfidne izmene sa prisutnim malim tiolima iz seruma. Iz ovih razloga drugi cilj ove teze bio je da se ispita:

- mogućnost izolovanja HSA iz seruma (plazme) dvostepenim taloženjem sa amonijum-sulfatom kao jednostavne i brze metode pogodne za kliničku primenu.

Iz ovog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- ispitivanje uslova izolovanja (zasićenja AS u prvom i drugom koraku taloženja sa ciljem dobijanja HSA velike čistoće i velikog prinosa, uticaja prisutnog AS na čistoću izolovanog HSA i na određivanje sadržaja Cys34-SH grupa sa DTNB), određivanje pouzdanosti određivanja sadržaja HSA-SH grupa, karakterizacija kontaminirajućih traka;
- karakterizacija izolovanog HSA (očuvanost sekundarne i tercijarne strukture, zastupljenost dimerske trake HSA, pI vrednost);
- validacija metode od izolovanja dvostepenim taloženjem sa AS do kvantifikacije Cys34-SH grupa, ispitivanje preciznosti i tačnosti metode, provera pouzdanosti metode određivanjem doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu zdravih osoba.

Da bi se doprinelo proširenju određivanja sadržaja HSA-SH grupa, kao markera procene karbonilnog i/ili oksidativnog stresa, sa naučnog na klinički nivo, kao i da bi se doprinelo razumevanju uloge tiolne grupe HSA-Cys34 u zaštiti od karbonilnog i oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima, treći cilj ove teze bio je:

- da se ispita primenljivost metode dvostepenog taloženja HSA sa AS za njegovo izolovanje iz plazme i seruma zdravih osoba,
- da se ispita mogućnost primene određivanja sadržaja tiolne grupe Cys34 humanog serum albumina kao markera u kliničkoj praksi.

Iz ovih ciljeva proistekli su sledeći zadaci:

- određivanje sadržaja Cys34-SH grupa u HSA koji je izolovan iz seruma i plazme zdravih osoba;
- određivanje sadržaja Cys34-SH grupa u HSA koji je izolovan postupkom dvostepenog taloženja iz seruma obolelih od dijabetesa i zdravih osoba (kontrolna grupa); određivanje sadržaja Cys34-SH grupa u HSA koji je izolovan afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue Sepharose-om; uporedni pregled dobijenih rezultata

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Humani serum albumin

2.1.1. Svojstva i funkcije

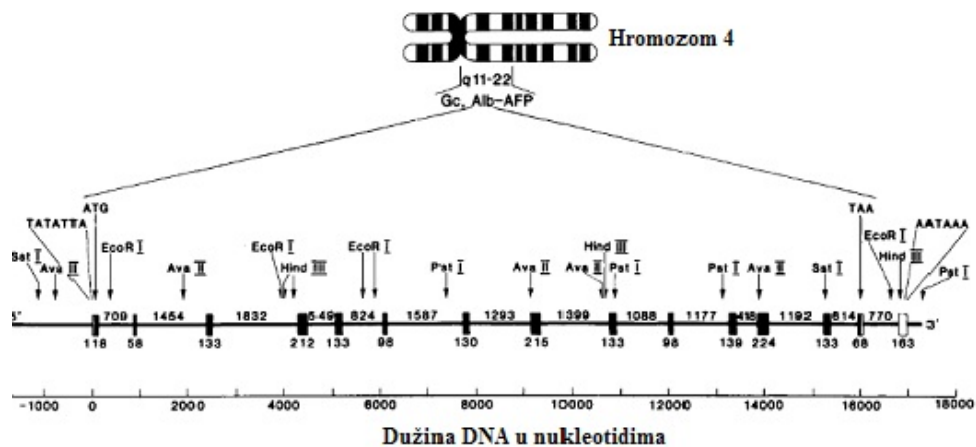
Humani serum albumin (HSA) se kao osnovni sastojak krvi i drugih telesnih tečnosti prvi put pominje u predavanju Ancell-a iz 1837 (Peters, 1996). HSA je najprisutniji protein u cirkulaciji, predstavlja 40-60 % ukupnih proteina plazme sa prosečnom koncentracijom od 42 g/l (640 μ M) (Peters, 1996). Pored u krvnoj plazmi, HSA je nađen još u tkivima i telesnim tečnostima (limfi, sinovijalnoj tečnosti, cerebrospinalnoj tečnosti). Kao glavni protein plazme, ima brojne fiziološke i farmakološke funkcije. HSA doprinosi sa 80 % koloidnom osmotskom pritisku i bitan je u distribuciji tečnosti između različitih delova organizma, takođe je najvećim delom odgovoran za održavanje pH krvi. Najistaknutija funkcija HSA proizilazi iz svojstva njegovih molekula da reverzibilno vezuju različite endogene i egzogene ligande, odnosno HSA ih transportuje kroz cirkulaciju. HSA je ključni transporter masnih kiselina (Mk) u cirkulaciji (Curry i Brick, 1999), s obzirom na to da su iste nerastvorne u krvnoj plazmi. HSA ima širok afinitet za vezivanje malih, negativno-naelektrisanih, aromatičnih jedinjenja (kao što su neki lekovi) (Petitpas i sar., 2001), međutim najveći afinitet pokazuje za vezivanje hematina i bilirubina. Pored toga, HSA formira kovalentne adukte sa piridoksil-fosfatom, Cys, glutationom (GSH), cistenil-glicinom, homocisteinom i različitim jonima metala kao što su Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II) i Au(II). Učešće HSA kao ključnog transportera ili depoa azot(II)-oksida (NO), koji je važan za brojne fiziološke procese, je još jedna važna funkcija HSA. Osim pomenutih, HSA ima funkciju uklanjanja kiseoničnih slobodnih radikala štiteći ostale konstituente plazme od njihovog oksidativnog dejstva. Na osnovu navedenih funkcija koje HSA ima, bez dileme se može reći da se radi o najmultifunkcionalnijem poznatom transportnom proteinu do danas (Schumaker, 1994).

Kod sisara HSA se sintetiše u jetri (dnevno oko 15 g) (Van der Vusse, 2009). U normalnim uslovima poluživot ovog proteina u plazmi iznosi oko 20 dana (Rondeau i Bourdon, 2011), a koncentracija u plazmi zavisi ne samo od ravnoteže između brzine sinteze u hepatocitima i katabolizma, već i od brzine transkapilarnog napuštanja cirkulacije (Peters, 1996). Oko 50 % količine HSA se kataboliše u mišićima i koži, dodatnih 10 % se gubi digestijom, a ostatak HSA se kataboliše u jetri (Peters, 1996).

2.2. Struktura humanog serum-albumina

2.2.1. Genetska pripadnost HSA

HSA je član multigeneske familije proteina kojoj još pripadaju α -fetoprotein (AFP), vitamin D vezujući protein (VDP) ili protein G komplementa (Gc), i α -albumin. Iako se AFP smatra fetalnim analogom HSA, njegova vezujuća svojstva su drugačija, što ukazuje da AFP može imati veći afinitet za neke nepoznate ligande važne u fetalnom razvoju. VDP igra važnu ulogu u regulaciji kalcijuma. Osim toga, AFP i VDP zajedno interaguju sa MHC kompleksom klase II. Ovi podaci ukazuju da ovi proteini mogu igrati važnu ulogu u modulaciji imunog sistema. Homologija aminokiselinske sekvence između α -albumina i ostalih članova albuminske superfamilije iznosi 36 % za HSA, 40 % za AFP i 21 % za VDP. Iako je polipeptidni lanac α -albumina za 7 aminokiselina kraći u odnosu na HSA, molekulska masa mu je veća za 20 000 Da (87 000 Da) u odnosu na HSA, što ukazuje da se radi o visoko glikozilovanom proteinu. HSA, iako homologne strukture sa pomenutim proteinima, nema sličnosti u pogledu imunoloških svojstava (Peters, 1996).

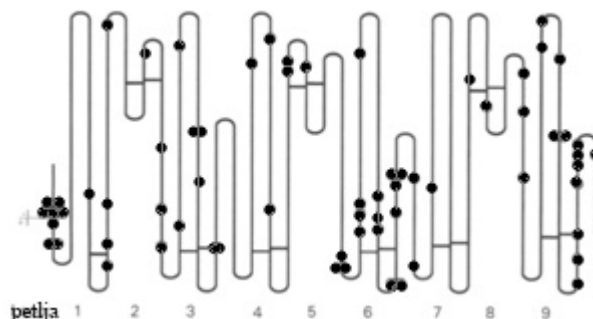


Slika 1. Struktura HSA gena. Egzoni su predstavljeni crnim pravougaonicima, a introni linijama koje ih spajaju. Brojevi prikazuju dužinu celog gena HSA, introna i egzona. Na slici su označene endonukleaze uključene u obradu primarnog transkripta i mesta njihovog delovanja (Peters, 1996).

Geni za biosintezu sva četiri proteina albuminske superfamilije nalaze se na dužem kraku četvrtog hromozoma u blizini centromere na poziciji q11-22 (Harper i Dugaiczky, 1983). Polazeći od 5'- kraja polinukleotida, geni su pozicionirani u nizu VDP, HSA, AFP i α -albumin (Urano i sar., 1984; Belanger i sar., 1994) (Slika 1). Dugaiczky i sar. (Minghetti

i sar., 1986) su prvi odredili sekvencu kompletnog gena za HSA, koji se sastoji od 19 011 nukleotida u nizu, od 14 introna i 15 egzona.

Usled mutacija u HSA genu javljaju se genetske varijante HSA, do sada je širom sveta identifikovano 77 različitih varijanti HSA (www.uniprot.org). Međutim, lokalizovano je samo 56 mesta u primarnoj strukturi HSA na kojima je došlo do mutacije (Slika 2), jer je identifikovano više varijanti HSA sa mutacijom na istoj amino-kiselini u sekvenci.



Slika 2. Šematska prikaz mesta u sekvenci (od 23. do 599. aminokiseline) molekula proalbumina HSA na kojima je došlo do mutacije. Paralelni kružići predstavljaju mesta na kojima je nađeno više mutacija na istoj amino-kiselini. Poprečne linije predstavljaju disulfidne veze. Za pravljenje prikaza korišćeni su podaci iz baze www.uniprot.org file PO2768.

2.2.2. Sinteza HSA i oslobađanje u cirkulaciju

HSA se sintetiše u hepatocitima kao neglikozilovani polipeptid u formi neaktivnog oblika preproalbumina, koji se sastoji od 609 aminokiselina. Za potpunu sintezu preproalbumina potrebno je oko 2 min, što odgovara brzini ugradnje 5 aminokiselinskih ostataka/s (Feldhoff i sar., 1977).

Prvih 18 aminokiselinskih ostataka na N-terminusa, u rastućem polipeptidnom lancu, predstavlja signalnu sekvencu (sastavljenu od hidrofobnih aminokiselina, Slika 3) koju prepoznaje SRP protein (signal recognition particle). SRP protein, sa vezanom signalnom sekvencom u hidrofobnom džepu, vezuje se za receptor na membrani ravnog endoplazmatičnog retikuluma (RER). Na ovaj način se narastajući nascentni polipeptidni lanac, ribozomi i iRNK vezuju za RER (Lingappa, 1989; Rapoport, 1992). Kada se sintetiše od 50 do 75 aminokiselinskih ostataka u narastajućem polipeptidnom lancu, SRP se uklanja, uz istovremeno vezivanje ribozoma za površinu membrane RER preko receptora

za ribosome (Wolin i Walter, 1993) i translokaciju polipeptidnog lanca kroz membranu RER. Kada polipeptidni lanac uđe u lumen RER, signalna peptidaza (koja je lokalizovana na unutrašnjoj strani membrane RER u blizini mesta translokacije peptidnog lanca kroz membranu) prepoznaje kraj signalne sekvence (ostatak Ser) i odseca je (Nothwehr i sar., 1990).

Nastali oblik HSA (proalbumin) ima na N-terminusu peptidnu sekvencu od 6 aminokiselinskih ostataka (propeptid od 19 do 24 aminokiseline, Slika 3), sastavljenu od tri hidrofobne i tri bazne aminokiseline, i kod većine sisara na kraju ove sekvence se nalazi Arg. Kako proalbumin ima dodatne tri bazne amino-kiseline u odnosu na zreo HSA, njegova elektroforetska pokretljivost je nešto manja u odnosu na zreo HSA (Tomaoki i sar., 1974). Pre nego što se završi potpuna sinteza polipeptidnog lanca, on započinje uz pomoć chaperona, koji se vezuju za nepotpuno uvijeni polipeptidni lanac, da se uvija u nativnu konformaciju uz istovremeno formiranje disulfidnih veza od N-terminusa (Ellis i van der Vies, 1991). Nakon pola minuta od završetka sinteze kompletnog polipeptidnog lanca formirano je svih 17 disulfidnih veza u HSA (Peters i Davidson, 1982).

Tokom sinteze plazma proteini i sekretorni proteini prelaze isti put u ćeliji (Palade, 1975; Palade, 1975). Nakon završetka translacije u RER, proalbumin se preko vezikula transportuje do cis-Goldžijevog aparata. U trans-Goldžijevom aparatu vrši se dalja obrada nascentnog proalbumina, uklanjanjem još 6 aminokiselinskih ostataka, pri čemu nastaje zreo HSA, koji ima 585 aminokiselinskih ostataka i koji ne zahteva dalju hemijsku obradu u vidu glikozilovanja. U trans-Goldžijevom aparatu putanje sekretornih proteina i proteina koji se ugrađuju u plazminu membranu se razdvajaju. Sekretorni proteini se pakuju u velike vezikule, a proteini plazma membrane u male (Saucan i Palade, 1994). Sekretovani HSA je neglikozilovani protein, molekulske mase (Mr) 66.4 kDa, mada se mogu detektovati i brojne glikozilovane forme, nastale kao posledica neenzimskih posttranslacionih modifikacija (Kragh-Hansen i sar., 2001).

Brzina sinteze HSA tesno zavisi od zaliha aminokiselina, naročito Trp, što može biti razlog pojačane sinteze HSA nakon svakog obroka (van der Vusse, 2009). Dnevno se sintetise oko 15 g HSA, pri čemu se značajne količine HSA ne skladište u hepatocitima (van der Vusse, 2009). U normalnim uslovima poluživot ovog proteina u plazmi iznosi oko 20 dana (Rondeau i Bourdon, 2011), a koncentracija u plazmi zavisi ne samo od ravnoteže između brzine sinteze u hepatocitima i katabolizma, već i od brzine transkapilarnog napuštanja cirkulacije (Peters, 1996). Oko 50 % količine HSA se kataboliše u mišićima i koži, dodatnih 10 % se gubi digestijom, a ostatak HSA se kataboliše u jetri (Peters, 1996).

2.2.3. Primarna struktura HSA

S obzirom na veliku zastupljenost molekula HSA u organizmu i lakoću izolovanja, davno su otkriveni svi nivoi njegove strukture. Aminokiselinska sekvenca HSA bila je poznata pre dobijanja cDNK sekvence. Dobijanju tačne sekvence prethodila je serija radova koja se bavila hemijskim fragmentisanjem i sekvenciranjem fragmenata. Thompson (1954) je objavio prve rezultate Edmanove degradacije Asp-Ala za humani i Asp-Thr za goveđi serum albumin. Dejstvom karboksipeptidaze White i sar. (1955) su određene četiri terminalne aminokiseline na C-terminusu. Witter i Tuppy (1960) su odredili sekvencu između 31. i 36. ostatka, i otkrili da sadrži jedan ostatak cisteina. Sugae i Jirgensons (1964) su odredili ostatke od 214. do 217. i utvrdili da ta sekvenca sadrži samo jedan ostatak triptofana. Bradshaw i Peters (1969) su sekvencirali ostatke od 1. do 24., Swaney i Klotz (1970) od 212. do 218., da bi 1975. godine kompletna sekvenca HSA bila objavljena gotovo istovremeno od strane timova iz Teksasa i Praga (Behrens, 1975; Meloun i sar., 1975) (Slika 3).

```
60 MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPF
120 EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEP
180 ERNECFLQHKDDNPNLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF
240 AKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAV
250 ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK LK
360 ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYAR
420 RHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAAD PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF E
480 QLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE VSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSV V
540 LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRR PCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTL
600 EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV
609 AASQAALGL
```

Slika 3. Primarna struktura HSA. Aminokiselinski ostaci, koji se odsecaju u endoplazmatičnom retikulumu (18 ostataka) i Goldžijevom aparatu (6 ostataka), obeleženi su crvenom i crnom bojom. Plavom, zelenom i ljubičastom bojom označeni su ostaci aminokiselina u domenu I, II i III, resp.

U primarnoj strukturi HSA nalazi se 35 Cys ostataka, koji su konzervirani kod svih vrsta sisara čija je sekvenca poznata do danas. Prvi ostatak Cys u sekvenci (Cys34) je slobodan, a ostalih 34 učestvuju u formiranju 17 disulfidnih veza koji su pozicionirani u

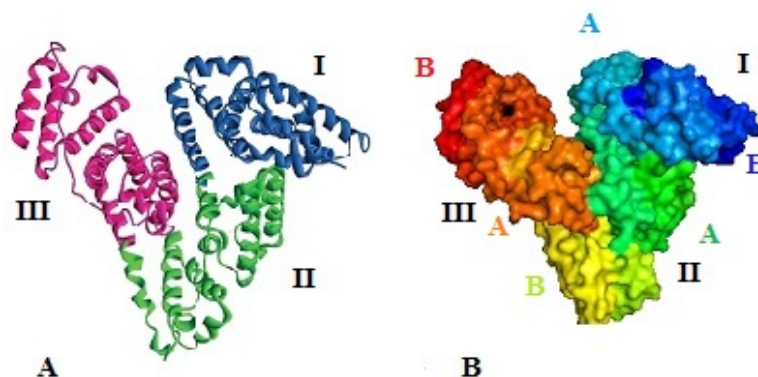
ponavljajućim serijama od 8 petlja-lin-petlja struktura, postavljenih oko 8 disulfidnih parova (Peters, 1996) (Slika 4) isključivo unutar subdomena. Ovakav jedinstven raspored disulfidnih veza u molekulu HSA doprinosi njegovoj izuzetnoj fleksibilnosti i stabilnosti u ekstremnim uslovima.

Za strukturu HSA je karakteristično prisustvo jednog slobodnog Cys ostatka (34. u sekvenci) i prisustvo samo jednog Trp ostatka (214. u sekvenci). Odsustvo sekvence Asn-X-Ser/Thr neophodne za N-glikozilovanje u primarnoj sekvenci HSA, izdvaja HSA od ostalih članova superfamije albumina (AFP, VDP i α -albumin), koji se u cirkulaciji javljaju kao glikozilovane forme. Postojanje homologije sekvence između članova ove superfamilije ukazuje da su proteini evoluirali od zajedničkog pretka. Ova interna strukturalna homologija je potvrđena kristalografskim istraživanjima HSA (He i Carter, 1992).

2.2.4. Sekundarna i tercijarna struktura HSA

U sekundarnoj strukturi HSA dominiraju α -heliksi, oko 67 % aminokiselina od ukupnog broja u sekvenci nalazi se u okviru heliksa, dok su β -pločice odsutne (Slika 4A). Za potpuno razumevanje biohemijskih svojstava i načina vezivanja liganada bilo je neophodno detaljno poznavanje 3D (trodimenzionalne) strukture HSA (Slika 4B). Najveća prepreka u otkriću 3D stukture HSA bila je dobijanje kristala HSA koji bi bili pogodni za kristalografiju. Tek 1989. godine Carter i sar. (1989) su uspjeli da od odmašćenog komercijalnog HSA dobiju tetragonalne kristale i da pomoću kristalografske analize sa rezolucijom 6 Å odrede 3D strukturu HSA. Tri godine kasnije, He i Carter (1992) su potvrdili sa boljom rezolucijom od 3,2 Å prethodno određenu 3D stukturu HSA.

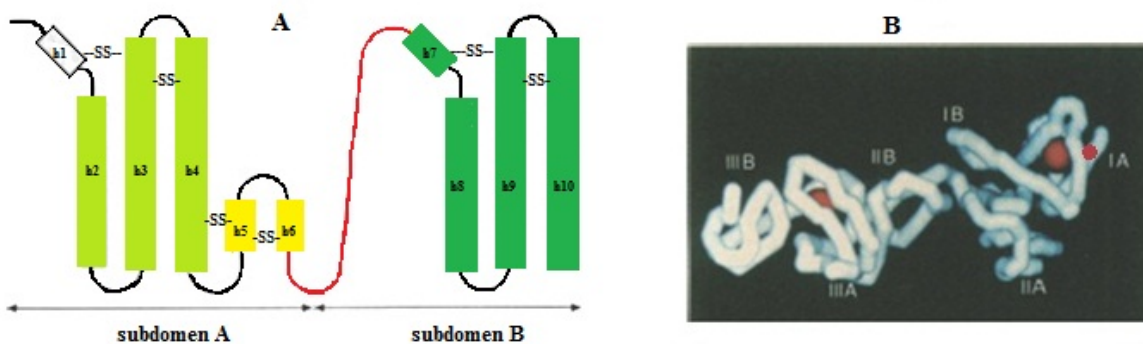
Kristalografska istraživanja HSA su pokazala da protein ima sroliki oblik, čije su dimenzije oko 80×80×80 Å, a prosečna debljina oko 30 Å. U strukturi HSA uočavaju se 3 homologa domena (I, II i III), a svaki od domena se deli na 2 subdomena (A i B) (Slika 4B). U svakom domenu postoji po 10 α -heliksa (označeni od h1 do h10), heliksi h1 do h4 nalaze se u okviru subdomena A, a heliksi h7 do h10 u okviru subdomena B (Slika 5). S-S most koji povezuje helikse h1 i h3 u subdomenima IIA i IIIA, ne postoji u subdomenu IA. Subdomeni su dopunjeni i sa dva dodatna kratka, antiparalelna heliksa, h5 i h6, koji su međusobno povezani sa par disulfidnih (S-S) mostova, tako da formiraju malu disulfidnu duplu petlju.



Slika 4. Sekundarna struktura (A) i tercijarna struktura dobijena X-ray kristalografijom (B) molekula HSA sa označenim domenima (I, II i III) i subdomenima (A i B) (He i Carter,1992).

U intradomenskim vezama između subdomena IA-IB, IIA-IIB i IIIA-IIIB, postoje produženi polipeptidi, a interdomenske veze predstavljaju spiralne produžetke C-terminalnog dela IB i IIB heliksa na N-terminalne helikse IIA i IIIA (He i Carter, 1992). Subdomeni IA, IB i IIA su čvrsto upakovani zajedno i formiraju uvećanu glavu molekula, dok subdomeni IIB, IIIA i IIIB formiraju produženi rep (Slika 5B). Subdomeni IA, IIA i IIIA su malo veći, svaki dopunjen sa paketom od 3 heliksa, koji imaju dodatne petlje ili male helikse. Dodatna elektronska gustina, kojoj doprinose subdomeni IA, IIA i IIIA, izgleda da odgovara malim disulfidnim petljama u aminokiselinskoj sekvenci i to doprinosi izuzetnim vezivnim svojstvima molekula HSA (Slika 5A). Svaki subdomen sadrži jednu od šest većih disulfidnih duplih petlji u aminokiselinskoj sekvenci, koje se u literaturi često pominju kao petlje označene od 1 do 9 (Slika 2). Stoga kombinacija petlji 1 i 2, 4 i 5, 7 i 8, predstavljaju 3 subdomena (IA, IIA i IIIA), a petlje 3, 6 i 9 subdomene (IB, IIB i IIIB). Dva najveća heliksa u strukturi se pojavljuju na interdomenskim vezama (IB-IIA i IIB-IIIA) i predstavljaju objedinjene C i N terminalne helikse oba domena.

Jedinstvena struktura molekula HSA obezbeđuje mu izuzetnu konformacionu fleksibilnost i mogućnost da vezuje brojne ligande čineći ga jednim od najmultifunkcionalnijih transportnih proteina poznatih do sada (Schumaker, 1994).



Slika 5. A) Topološka ilustracija subdomena u molekulu HSA (He i Carter, 1992). Obojeni su heliksii zajednički za svih 6 subdomena. Motiv se odlikuje kratkim heliksom, koga slede tri uzastopna duga heliksa, međusobno povezana parom disulfidnih mostova. Svaki subdomen sadrži jednu od šest većih disulfidnih duplih petlji u aminokiselinskoj sekvenci, koje se u literaturi često pominju kao petlje označene od 1 do 9.

B) Ilustracija molekulske konformacije HSA sa crvenom bojom označenim vezivnim mestima za ligande (I, II i III) (Carter i He, 1989).

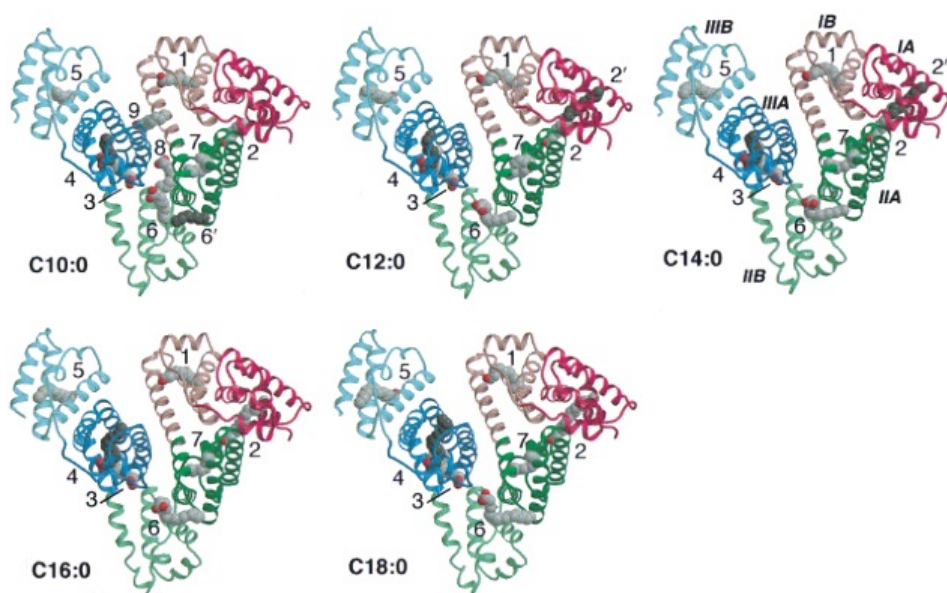
2.3. Vezivna mesta na molekulu HSA

Najistaknutija funkcija HSA je sposobnost da reverzibilno vezuje i transportuje kroz cirkulaciju čitav niz različitih endogenih i egzogenih liganda, kao što su: Mk, lekovi, hem, bilirubin, hormoni, aminokiseline i joni metala (Peters, 1996; Curry i Brick, 1999; Petitpas, 2001). Vezivna mesta za različite ligande asimetrično su raspoređena unutar strukture molekula HSA.

2.3.1. Vezivna mesta na molekulu HSA za MK

Jedna od osnovnih funkcija HSA u cirkulaciji je transport slobodnih neesterifikovanih Mk. Slobodne Mk (u anjonskom obliku) u cirkulaciji se nalaze u koncentraciji oko 1 mM, zbog njihove slabe rastvorljivosti u vodi (jer se u vodenoj sredini dimerizuju preko karboksilne grupe, pri čemu im se rastvorljivost dodatno smanjuje), oko 99,9 % Mk je vezano za HSA koji ih transportuje do ćelija koje ih koriste. Interakcija HSA sa Mk pokazana je u studiji Goodman-a i Gordona (1958), koja ukazuje na prisustvo 2

vezujuća mesta visokog afiniteta, 5 mesta umerenog i više od 20 niskoafinitetnih vezujućih mesta za slobodne Mk na molekulu HSA. Iako je broj vezivnih mesta za Mk na HSA odavno poznat, tek je u poslednje dve decenije zahvaljujući kristalografiji, tripsinskoj digestiji, NMR spektroskopiji i dirigovanim mutacijama određena tačna lokacija vezujućih mesta, kao i afinitet pojedinih vezujućih mesta za Mk (Reichenwallner i Hinderberger, 2013, Curry i sar., 1998). Na osnovu kristalografske studije, koju su sprovedi Bhattacharya i sar. (2000), konstruisane su trodimenzionalni modeli molekula HSA sa različitim Mk (od C10 do C18) (Slika 6).



Slika 6. Struktura HSA za koju su vezane različite Mk, generisana na osnovu kristalografskih podataka (Bhattacharya i sar., 2000). U strukturi se uočavaju tri homologa domena I (crvene boje), II (zelene) i III (plave), sa subdomenima A i B.

Sa Slike 6 vidi se da je sedam vezujućih mesta za Mk asimetrično raspoređeno u okviru molekula HSA (Curry i sar., 1998). Prvo vezujuće mesto je smešteno u subdomenu IB, dok je drugo mesto smešteno između dodirnih površina subdomena IA i IIA. U okviru subdomena IIIA nalaze se dva vezujuća mesta (treće i četvrto), a peto mesto smešteno je u subdomenu IIIB. Šesto vezujuće mesto se nalazi između dodirnih površina subdomena IIA i IIB, dok je sedmo mesto smešteno u subdomenu IIA (Curry, 2003). Vezujuća mesta za Mk na molekulu HSA se razlikuju po afinitetu, peto vezujuće mesto ima najviši afinitet, a zatim mesta dva i četiri (Simard i sar., 2006). Jedini triptofanski ostatak (Trp214) u

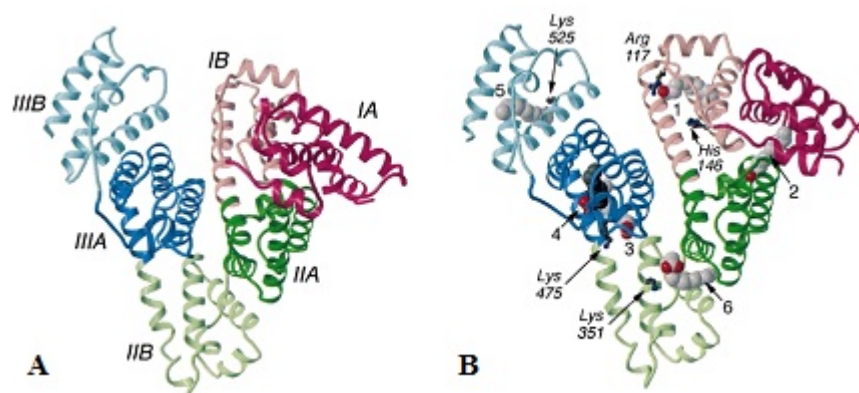
molekulu HSA doprinosi formiranju hidrofobnog vezujućeg mesta u okviru subdomena IIA, kao i formiranju hidrofobnih interakcija između dodirnih površina subdomena IIA i IIIA (He i Carter, 1992; Peters, 1996).

Ne postoje dva vezujuća mesta za Mk koja su identična, mada se svako vezujuće mesto sastoji od hidrofobnog džepa koji ostvaruje interakcije sa ugljovodoničnim lancem Mk i jednog ostatka polarne (uglavnom Ser ili Tyr) ili bazne amino-kiseline (Lys ili Arg) koja ostvaruje vodonične i elektrostatičke interakcije sa polarnom karboksilnom grupom Mk (Curry i sar., 1998; Thompson i sar., 1997). Ispitivanja su pokazala da dužina hidrofobnog repa Mk znatno utiče na afinitet vezivanja Mk za HSA. Dokazano je da povećanjem dužine repa Mk raste broj vezujućih mesta sa visokim afinitetom (Cistola i sar., 1987a, 1987b; Tonsgard i Meredith, 1991). Oktanoat i dekanat se vezuju za jedno ovakvo mesto, dok laurat i miristat se najverovatnije vezuju za dva mesta (Otagiri i Chuang, 2009). Takođe, sa povećanjem dužine lanca Mk, primarne konstante asocijacije rastu, ali ne linearno (Otagiri i Chuang, 2009). Mutacije u I i II domenu ne utiču značajnije na promenu afiniteta HSA prema Mk. Najuočljivije promene afiniteta, i to u smislu povećanja afiniteta, su uzrokovane mutacijama u III domenu. Genetska varijanta HSA Zagreb (-1Arg→Gln) je normalna, ali varijanta Krapina kod koje je došlo do supstitucije amino-kiseline na poziciji 573 uzrokuje ukupno smanjenje afiniteta prema Mk (Peters, 1996).

Vezivanje Mk za molekul HSA dovodi do dramatičnih konformacionih promena molekula HSA (Curry i sar., 1999) (Slika 7). Domeni I i III se pomeraju u levo, što ima za posledicu otvaranje centralne šupljine i povećanje širine molekula HSA sa 80 na 90 Å. Takođe, tokom vezivanja Mk za HSA dolazi do rotacije jednih domena u odnosu na druge. Na primer vezivanje miristinske kiseline za drugo vezujuće mesto između IA i IIA subdomena stabilizuje rotaciju domena I u odnosu na domen II. Vezivanje miristinske kiseline □□zaključava□□ nastalu konformaciju HSA u kojoj je polovina aminokiselinskih ostataka u subdomenima pomerena za oko 10 Å u odnosu na poziciju istih aminokiselinskih ostataka u odmašćenom HSA. Na ovaj način formira se potpuno vezujuće mesto za Mk u HSA (Curry i sar., 1998). Pod uticajem pH i nakon vezivanja liganda (Mk i lekova) dolazi do konformacionih promena molekula HSA. Između pH 2,3 i 4,3 HSA je u fast (F) obliku, koji se karakteriše slabom rastvorljivošću, povećanom vishoznošću i značajnim smanjenjem sadržaja α -heliksa u strukturi. Između pH 4,3 i 8,0 i u odsustvu alosternih liganda (Mk i lekova) HSA se nalazi u normalnom (N) obliku, za koji je karakteristična sroljika struktura HSA. Između pH 4,3 i 8,0 u prisustvu alosternih liganda (Mk i lekovi), ili

na pH iznad 8,0 u odsustvu liganda, HSA se nalazi u konformaciji koja je označena kao bazna (B), koju karakteriše smanjenje sadržaja α -heliksa u strukturi i povećanje afiniteta prema nekim ligandima, kao što je varfarin (Wilting i sar., 1980; Yamasaki i sar., 1999; Fasano i sar., 2001; Mattu i sar., 2001; Sakai i sar., 2001; Fasano i sar., 2002).

Pri normalnim fiziološkim uslovima, između 0,1 i 0,2 mol Mk je vezano za HSA. U toku gladovanja ili ekstremnog vežbanja (Spector, 1986; Brodersen i sar., 1990), ili u nekim patološkim stanjima, kao što je dijabetes, bolesti jetre i kardiovaskularnog sistema (Peters, 1996; Cistola, 1991) molarni Mk/HSA odnos može da poraste i preko 6:1.



Slika 7. Konformacione promene molekula HSA usled vezivanja Mk za HSA. Struktura odmašćenog HSA (A) generisana na osnovu PDB ID 1ao6 (Sugio i sar., 1999) i HSA zamašćenog sa miristinskom kiselinom (6 molekula) (B) generisana na osnovu PDB ID 1bj5 (Curry i sar., 1998). Obe kristalografske strukture su dobijene sa rezolucijom 2,5 Å. Na slici su označene bazne kiseline koje interaguju sa karboksilom grupom Mk.

Fiziološki značaj konformacionih promena molekula HSA koje se dešavaju usled vezivanja Mk, ako uopšte postoji još nije poznat. Pretpostavlja se da bi HSA receptori mogli na osnovu konformacije molekula HSA da razlikuju HSA molekule koji transportuju Mk od onih koji ne transportuju, i na taj način da efikasnije dostavljaju Mk ćelijama. Mada su do sada detektovani receptori na površini ćelije (Luiken i sar., 1997; Schnitzer i Oh, 1994), njihova uloga u vezivanju HSA i transportu Mk do ćelija još nije generalno prihvaćena.

2.3.2. Vezivna mesta na molekulu HSA za lekove

Pored Mk, brojni egzogenih ligandi (kao što su lekovi) mogu da se vežu za HSA. Veliki broj heterocikličnih organskih jedinjenja u anjonskom obliku (npr. varfarin, fenilbutazon itd.) prevashodno se vezuje za Sudlow I vezujuće mesto, koje se poklapa sa sedmim vezujućim mestom za Mk, a koje je smešteno u subdomenu IIA (Sudlow i sar., 1976). Za Sudlow II vezujuće mesto koje je lokalizovano u IIIA subdomenu, a koje se poklapa sa trećim i četvrtim vezujućim mestom za Mk, vezuju se jedinjenja sa aromatičnom strukturom kao što su: ibuprofen, diazepam i neki anestetici (Sudlow i sar., 1975; Carter i Ho, 1994; Ghuman i sar., 2005; Petitpas i sar., 2001). U tabeli 1 navedeni su samo neki ligandi koji se vezuju za različita vezujuća mesta unutar molekula HSA.

Tabela 1. Vezujuća mesta na molekulima HSA za neke od liganada (Ghuman i sar.,2005).

Vezujuće mesto						
Mk1	Mk2	Mk3- Mk4	Mk5	Mk6	Mk7	Šupljina
		Sudlow's II			Sudlow's I	
Miristat	Miristat	Miristat	Miristat	Miristat	Miristat	Jodipamid
Jodometacin		Propofol	Propofol	Halotan	Jodometacin	Tiroksin
Trijodobenzoat		Tiroksin	Tiroksin	Ibuprofen	Tiroksin	
Hem		Diflunisal		Diflunisal	Diflunisal	
Azapropazon		Diazepam			Trijodobenzoat	
		Halotan			Jodipamid	
		Ibuprofen			Varfarin	
					Fenilbutazon	
					Oksifenbutazon	

Činjenica da postoji alosterni efekat između različitih vezujućih mesta na molekulu HSA, odnosno vezivanje jednih liganda alosterno utiče na vezivanje drugih liganda usled promene konformacije molekula HSA prilikom njihovog vezivanja, dodatno usložnjava

problematiku izučavanja uloge molekula HSA. Na primer, vezivanje varfarina za Sudlow I vezujuće mesto alosterno utiče na vezivanje hema u prvom vezujućem mestu za Mk na HSA i *vice versa*, dok vezivanje diazepama ili ibuprofena za Sudlow II vezujuće mesto nema nikakav efekat na vezivanje hema (Baroni i sar., 2001; Ascenzi i sar., 2005; Bocedi i sar., 2005). Ovaj efekat postaje naročito značajan u patološkim stanjima kada se pored fizioloških molekula za HSA vezuju i lekovi. Takođe, uočen je alosterni efekat između vezivanja Mk i lekova za različita vezujuća mesta na HSA. Na primer, miristinska kiselina reguliše vezujuća svojstva HSA na kompleksan način, pri čemu je u regulaciju uključen sa jedne strane kompetitivni mehanizam (kada je Mk vezana u okviru Sudlow vezujućih mesta I ili II), a sa druge strane alosterni mehanizam (kada je Mk vezana za druga vezujuća mesta u odnosu na Sudlow I i II) (Chuang i Otagiri, 2002; Fanali i sar., 2005).

Koliko je međusobni efekat koji jedni ligandi imaju na druge pri vezivanju za HSA najbolje se ogleda kod lekova. Afinitet HSA za lekove je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na distribuciju i koncentraciju slobodnog leka u cirkulaciji. Sa jedne strane vezivanje leka za HSA je poželjno jer se na taj način povećava njegova rastvorljivost i distribucija, a opet sa druge strane nije poželjno da se lek jako veže za HSA, jer je na taj način sprečena distribucija leka do mesta delovanja uz istovremeni porast koncentracije leka u cirkulaciji. Uzimanje drugog leka koji se vezuje sa jačim ili slabijim afinitetom za HSA može da dovede do konformacionih promena molekula HSA, usled čega dolazi do oslobađanja leka sa manjim afinitetom za HSA. Naglo oslobađanja leka dovodi do porasta koncentracije slobodnog leka u cirkulaciji, veće dostupnosti prema ciljnim mestima i mogućih neželjenih efekata, a sa druge strane jače vezivanje leka sa većim afinitetom smanjuje njegovu dostupnost prema ciljnim mestima. Međusobni efekti lekova na vezivanje za HSA se dodatno usložnjavaju pri promeni koncentracije fizioloških molekula (Mk, bilirubina, hema tiroksina) koje HSA normalno transportuje, a koji se vezuju za Sudlow I i II vezujuća mesta ili alosterno utiču na njega (Ascenzi i sar., 2006).

2.3.3. Vezivna mesta na molekulu HSA za druge molekule

Bilirubin je drugi važan fiziološki molekul koji se vezuje za HSA. Bilirubin je krajnji proizvod katabolizma hema (nastaje oko 300 mg dnevno). Iako u svojoj strukturi ima dve karboksilne grupe i nekoliko polarnih grupa, nerastvoran je u vodi pri fiziološkom pH. Ovaj paradoks je rasvetljen određivanjem kristalne strukture bilirubina, gde je otkriveno da karboksilne grupe od propionskih ostataka grade intramolekulske vodonične veze sa

polarnim grupama iz ostatka molekula (Bonnett i sar., 1976) i zbog toga je nerastvoran u vodi. Kao lipofilan molekul transportuje se do jetre vezan za HSA, gde se konjuguje sa glukuronidima i prevodi u hidrofilan oblik.

Još tridesetih godina prošlog veka ustanovljena je veza između bilirubina i HSA (zajedno migriraju tokom elektroforeze i ultracentrifugiranjem (Peters, 1996), međutim stvarna potvrda dolazi od Martin-a (1949), koji pokazuje da bilirubin kristališe sa HSA. Od tada pa do danas objavljeni su brojni radovi koji su se bavili izučavanjem interakcije između bilirubina i HSA. Poznato je da HSA, sa relativno visokim afinitetom, vezuje dugolančane Mk i bilirubinske anjone (Peters, 1996). Vezivanje ova dva liganda se dešava primarno na odvojenim mestima (Wooley i Hunter, 1970) gde dugolančane Mk ne interferiraju sa bilirubinom za vezivna mesta sve dok odnos Mk i HSA ne bude iznad 4:1 (Metcalf i sar., 1981). Brojne studije koje su se zasnivale na merenju afiniteta vezivanja bilirubina za proteolitičke fragmente HSA su pokazale da se bilirubin sa visokim afinitetom vezuje za subdomen IIA (Reed i sar., 1975; Sjodin i sar., 1977; Petersen i sar., 2000). Međutim, Zunszain i sar. (2008) su kristalografski, sa rezolucijom 2,42 Å, odredili tačnu lokalizaciju vezujućeg mesta za bilirubin na HSA. Otkrili su da se u okviru subdomena IB nalazi hidrofobni džep L-oblika za koji se vezuje bilirubin. Diskrepanca između rezultata dobijenih na osnovu kristalografske studije i prethodnih studija sa fragmentima molekula HSA ukazuje još jednom na izuzetnu fleksibilnost molekula HSA i na njegovu veliku moć vezivanja različitih liganda ali i istog liganda na više vezujućih mesta sa različitim afinitetom (Tabela 1).

Pored pomenutih Mk i bilirubina, HSA vezuje prostaglandine (Tsai i sar., 1991), steroidne hormone (Watanabe i sar., 1991), vitamin D (Bikle i sar., 1986), žučne kiseline (Forruggia i Pico, 1993; Beckett i sar., 1981). Fischer i sar. (1993) su ustanovili da se testosteron i pregnenolon vezuju za domen II, dok se žučne kiseline mogu vezati za oba Sudlow vezujuća mesta, što zavisi od polarnosti same žučne kiseline (Forruggia i Pico, 1993; Beckett i sar., 1981). Malavolti i sar. (1989) su ustanovili da je 88 % žučnih kiselina u plazmi vezano za HSA, dok je preostalih 12 % raspoređeno između lipoproteinskih čestica svih klasa.

2.3.4. Vezivna mesta na molekulu HSA za jone metale

Pored anjonskih liganda, HSA može da veže i katjonske ligande poput jona metala. Od svih metala (Cu, Ni, Zn, Fe, Hg, Co, Ca, Al) koji se vezuju za HSA (Vallee i Falchuk,

1993; Lau i Sarkar, 1979; Halliwell, 1988; Laussac i Sarkar, 1984), bakar i nikal pokazuju najveći afinitet prema HSA. U plazmi, 90 % frakcije Cu(II) jona je vezan za ceruloplazmin, dok je 10% vezano za HSA (Halliwell, 1988). HSA poseduje na N-terminusu jedno vezujuće mesto sa visokim afinitetom za bakar(II) (Laussac i Sarkar, 1984). Prve četiri aminokiseline sa N-terminusa Asp-Ala-His-Lys, formiraju vezujuće mesto za Cu(II) jon. Između tetrapeptida i Cu(II)-jona se formira helatni kompleks u čijem centru je jon bakra, koji je okružen sa azotovim atomima koji potiču od terminalne α -amino grupe, dve prve peptidne veze, N atoma iz imidazolovog prstena His i Lys (Sadler i sar., 1994). Konstante asocijacije za bakar su između 11,2 i 16,2 (Masuoka i sar., 1993; Giroux i Schoun, 1981).

Ni(II) i Co(II)-joni se vezuju na sličan način za N-terminus HSA. Zato što je dijametar jona Ni(II) neznato veći od dijametra jona Cu(II) 1,1 Å u odnosu na 1,0 Å, Ka za jon nikla je manja od Ka za jon bakra, što dovodi da jon bakra polako zamenjuje jon nikla vezan za HSA (Glennon i Sarkar, 1982). Joni Zn(II), Al(III) i Cd(II) vezuju se mesta unutar molekula HSA koja nisu na N-terminusu (Giroux i Schoun, 1981; Sadler i sar., 1994). Jon Hg (II) se specifično vezuje za Cys34 u molekulu HSA. Prilikom vezivanja jona Hg(II) za HSA može da dođe do formiranja dimera HSA ili tercijarnog kompleksa HSA-Hg(II) Cys (Lau i Sarkar, 1979).

2.4. Oksidativni i karbonilni stres

2.4.1. Oksidativni stres

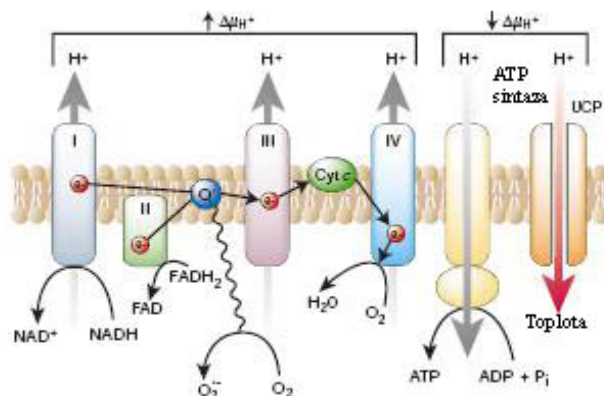
Tokom evolucije kod anaerobnih organizama molekularni kiseonik (O_2) je odabran kao krajnji akceptor elektrona prilikom oksidacije energetskih goriva u cilju generisanja hemijske energije u obliku adenozin-5'-trifosfata (ATP), u procesu oksidativne fosforilacije (Berner i sar., 2007). Uporeba kiseonika pored efikasnije ekstrakcije energije iz molekula goriva u odnosu na anaerobne organizme, omogućila je oblikovanje organizama po pitanju njihove veličine, organizacije i načina razmnožavanja (pojava placent). Sa druge strane, O_2 je uključen u biosintezu brojnih bioloških molekula poput tirozina, sterola, polinezasićenih Mk, nikotinske kiseline, hidroksiprolina i hidroksilizina, koji su esencijalni za mnoge ćelijske strukture i procese (Ma, 2010).

Upotreba O_2 je, sa jedne strane dala značajnu prednost aerobnim organizmima u odnosu na anaerobne organizme, ali je sa druge strane dovela do generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) poput superoksidanjon-radikala ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil-radikala (OH^{\cdot}) i vodonik-peroksida (H_2O_2). ROS, nastale bilo kao sporedni proizvodi metabolizma ili kroz delovanje specijalizovanih enzima, zbog prisustva nesparenih elektrona su veoma reaktivne

i dovode do oksidativnog stresa. U oksidativnom stresu ROS reaguju sa lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama dovodeći do ireverzibilnih oštećenja ovih molekula, što ima za posledicu promenu njihove funkcije (Ma, 2010). Danas se smatra da ROS i oksidativni stres leže u osnovi brojnih patoloških procesa u skoro svim aerobnim organizmima (Ma, 2010).

2.4.1.1. Nastajanje ROS

Najčešći izvor ROS je elektron-transportni lanac u kojem dolazi do parcijalne redukcije O_2 . U normalnim fiziološkim uslovima od ukupno potrošenog O_2 samo 1 do 2 % se prevodi u $O_2^{\cdot-}$ (Berner i sar., 2007). Međutim u uslovima povećanog generisanja elektron-donora u Krevsovom ciklusu (NADH i $FADH_2$) i njihovog uključivanja u elektron-transportni lanac dolazi do povećanog pumpanja protona kroz mitohondrijalnu membranu i generisanja višeg membranskog potencijala ($\Delta\mu_{H^+}$), koji inhibira transport elektrona na kompleks III, pri čemu se produžava poluživot slobodnoradikalskog intermedijera koenzima Q (ubikinona) koji parcijalno redukuje (samo sa jednim elektronom) O_2 do $O_2^{\cdot-}$ (Slika 8) (Jovanović, 2008).

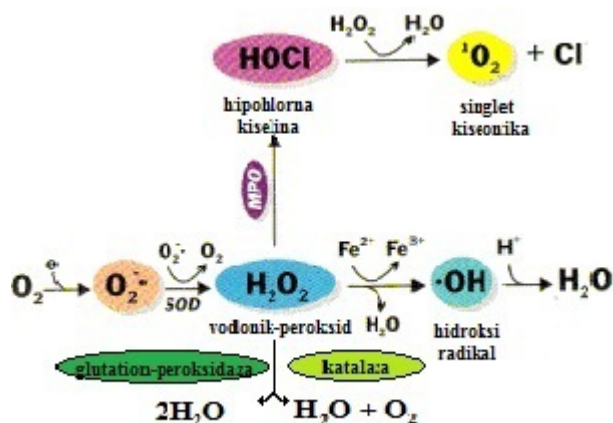


Slika 8. Nastajanje superoksidanjon-radikala u elektron-transportnom lancu u mitohondrijama

Pored elektron-transportnog lanca, ROS mogu nastati delovanjem radijacije (UV zračenje), toksičnih supstanci (parakvat) i lekova (adriamicin, bleomicin) (Berner i sar., 2007).

Od nastalog superoksidanjon-radikala generišu se druge ROS (Grisham, 1992; Moslen, 1994) (Slika 9). Zato što je $O_2^{\cdot-}$ veoma toksičan, neenzimskom i enzimski

katalizovanom reakcijom odvija se brza dismutacija $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 i O_2 . Iako je neenzimska reakcija dismutacije brza, pod dejstvom enzima superoksidne dismutaze (SOD) ova reakcija se odvija 4 puta brže u odnosu na nekatalizovanu reakciju.



Slika 9. Nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta od superoksidanjon-radikala. SOD - superoksid dismutazs, MPO - mijeloperoksidaza.

H_2O_2 , koji je manje toksičan od $O_2^{\cdot-}$, ali i dalje opasan po organizam, redukuje se pomoću tri mehanizma. U prvom mehanizmu detoksifikacije, H_2O_2 je susprtat za dva enzima, katalazu i glutation-peroksidazu. Katalaza prevodi H_2O_2 do H_2O i O_2 , a glutation-peroksidaza do $2H_2O$. Drugim mehanizmom meijeloperoksidaza (MPO) iz neutrofila prevodi H_2O_2 do hipohlorne kiseline (HClO). Ovaj mehanizam se svrstava u odbrambeni, pošto je HClO jako oksidaciono sredstvo koje deluje baktericidno u fagocitnim ćelijama, kao što su neutrofilni. Reakcijom HClO i H_2O_2 nastaje pored H_2O i hloridnog jona, i siglet kiseonika (1O_2). Fiziološka uloga singlet kiseonika može da bude dvojaka. Pri niskim koncentracijama deluje kao signalni molekul, a pri visokim koncentracijama deluje citotoksično, jer kao ROS oštećuje lipide, proteine i nukleinske kiseline u ćeliji (Devasagayam i Kamat, 2002). U trećem mehanizmu (toksičnom) H_2O_2 se spontanom reakcijom katalizovanom $Fe(II)$ ili $Cu(I)$ jonima (Fentono-vom reakcijom) prevodi u visoko reaktivni $\cdot OH$ radikal, koji odmah reaguje sa bilo kojim biološkim molekulom (RH) iz koga oduzima vodonikov atom. Kao rezultat nastaje radikal biološkog molekula ($R\cdot$).

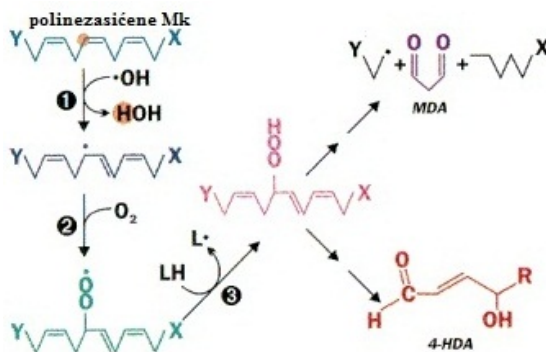
2.4.1.2. Mehanizmi oštećenja lipida, nukleinskih kiselina i proteina ROS

Od svih ROS, smatra se da OH^\cdot izaziva najveća oštećenja. Pored gore navedene reakcije OH^\cdot može još nastati u sledećim reakcijama (Wallace, 1997):

- homolitičkim raskidanjem veze u vodi uzled jonizujućeg zračenja, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{OH}^\cdot$
- homolitičkim raskidanjem veze u peroksinitritu, $\text{HONO} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{NO}_2^\cdot$
- reakcijom ozona sa fenolnim jedinjenjima, $\text{PH} + \text{O}_3 \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{O}_2 + \text{P}$,

Reaktivni OH^\cdot može reagovati sa svim biološkim makromolekulima (lipidima, nukleinskim kiselinama i ugljenim hidratim) oduzimajući im atom vodonika. Nastali sekundarni radikal (R^\cdot), koji je stabilniji i sa dužim poluživotom, može da reaguje sa drugim biološkim molekulima nastavljajući lančanu reakciju.

Polinezasićene Mk predstavljaju najosetljivije mete delovanja OH^\cdot . Oduzimanjem atoma vodonika sa polinezasićenih Mk započinje proces lipidne peroksidacije (Slika 10).



Slika 10. Peroksidacija nezasićenih masnih kiselina. Reakcijom između različitih lipida i ROS nastaju brojni proizvodi, među kojima su i 4-hidroksialkeni (4-HDA) i malondialdehid (MDA), koji nastaje kada je u lipidu prisutno tri ili više nezasićenih veza.

U prvom koraku nastali lipidni radikal reaguje sa O_2 uz nastajanje lipidperoksid-radikala (korak 2). U sledećem koraku lipidperoksidni-radikal može da oduzme atom vodonika od drugog lipida uz nastajanje hidroperoksida lipida (koji se takođe ubraja u ROS) i lipid-radikala. Oba nastala proizvoda mogu dalje nastaviti lančanu reakciju. Kao posledica ovih reakcija formiraju se brojni proizvodi, među kojima su najznačajni 4-hidroksialkeni (4-HDA) i malondialdehid (MDA), koji služe kao markeri za procenu lipidne peroksidacije

Maddipati i Marnett, 1987). Osim ROS, drugi radikali, UV zračenje ili radijacija mogu započeti lipidnu peroksidaciju.

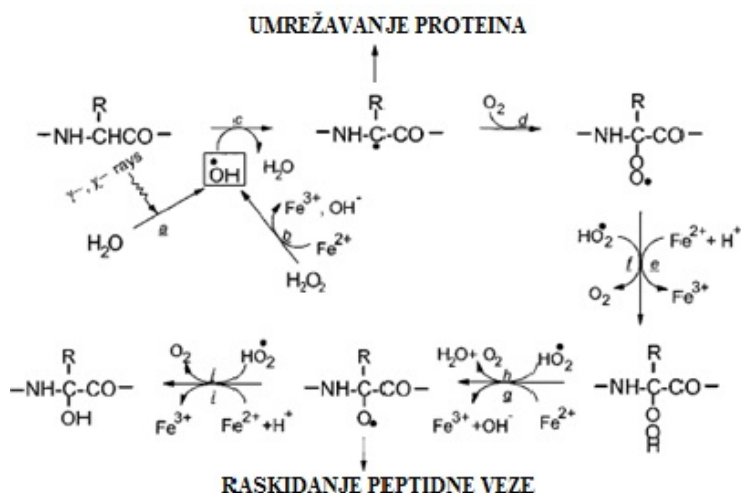
Nukleinske kiseline (DNA i RNA) su drugi važni biomakromolekuli koji predstavljaju ciljnu metu delovanja ROS. Oksidativno oštećenje DNA sa ROS, dovodi do modifikacije baza, oksidacije deoksiriboze, kidanja polinukleotidnog lanca i umrežavanja (cross-links) između DNA i proteina. Različite ROS vrste mogu da generišu različite proizvode, tako na primer delovanjem $\text{OH}\cdot$ na baze DNA nastaju različiti proizvodi. Hidroksilovanjem guanina na C-8 nastaje 8-oxo-7,8-dehidro-2'-deoksiguanozin i proizvod sa otvorenim prstenom 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formaminodipirimidin, dok hidriksilovanjem adenina nastaje 8-OH-adenin i 2-OH-adenin. Hidroksilovanjem timina nastaje timin-glikol, a citozina citozin-glikol (Wiseman i Halliwell, 1996). Kao posledica oštećenja nukleinskih kiselina može doći do mutacija na molekulu DNA, grešaka u toku procesa transkripcije i translacije i sinteze abnormalnih proteina (Stadtman, 2004).

Proteini su treća grupa biomakromolekula veoma podložna delovanju ROS. Obzirom na raznolikost gradivnih blokova (20 različitih aminokiselina) koji izgrađuju proteine u odnosu na lipide i nukleinske kiseline, broj mogućih proizvoda koji nastaju delovanjem ROS na proteine je najveći. Generalno, ROS mogu dovesti do oksidacije bočnih aminokiselinskih ostataka, umrežavanja proteina, i oksidacije polipeptidne kičme uz njenu fragmentaciju (Berlett i Stadtman, 1997).

Oksidacija peptidne kičme (Slika 11) započinje napadom $\text{OH}\cdot$ (koji je generisan bilo kojom gore navedenom reakcijom) prilikom čega ovaj radikal oduzima atom vodonika iz peptidne kičme uz nastajanje radikala na C-atomu. Ovaj radikal brzo reaguje sa O_2 i dobija se intermedijerni alkilperoksil-radikal, koji stupa u reakciju sa protonovanim superoksidanjon-radikalom ($\text{HO}_2\cdot$) i nastaje alkilperoksid. Nastali alkilperoksid stupa u reakciju sa $\text{HO}_2\cdot$ uz nastajanje alkoksil-radikala, koji u reakciju sa $\text{HO}_2\cdot$ gradi hidroksil-derivat proteina (Berlett i Stadtman, 1997). Alkil-, alkilperoksil- i alkoksil-radikal koji su dobijeni tokom navedenih reakcija mogu sporednim reakcijama, sa drugim aminokiselinama istog ili drugog molekula proteina, dalje generisati nove radikale na C-atomu. Međutim, u odsustvu kiseonika, kada je reakcija, obeležena sa slovom d na šemi (Slika 11) blokirana, nastali radikal na C-atomu može reagovati sa istim takvim radikalom pri čemu se dobijaju umreženi (kroslinkovani) derivati.

Sa druge strane, generisanje alkoksi-radikala omogućava raskidanje peptidne veze jednom od dve predložene putanje, diamidnom ili α -aminoacidnom (Wallace, 1997; Berlett i Stadtman, 1997). Diamidnom putanjom peptidna veza se raskida tako se dobija

fragment sa N-terminusa peptida koji ima diamidnu strukturu, a fragment sa C-terminusa peptida ima izocijanatnu strukturu (Slika 12A). Raskidanjem peptidne veze α -aminoacidnom putanjom dobija se fragment sa N-terminusa peptida koji ima amidnu strukturu na svom C-terminusu i peptid sa C-terminusa koji na N-terminusu ima N- α -ketoacil derivat (Berlett i Stadtman, 1997).

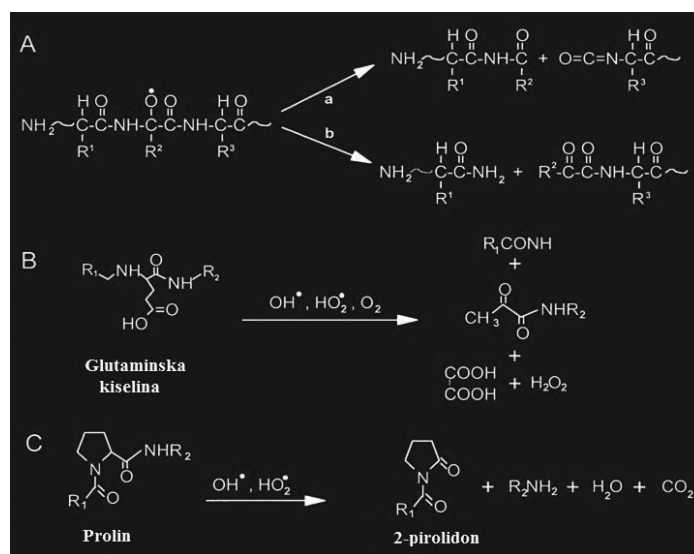


Slika 11. Oksidacija peptidne veze sa ROS (Berlett i Stadtman, 1997).

Bočni ostaci glutaminske kiseline i prolina) nakon inicijalnog napada $\text{OH}\cdot$ i $\text{HO}_2\cdot$ mogu da učestvuju u raskidanju peptidne veze uz formiranje proizvoda prikazanih na Slici 12B i C (Uchida i sar., 1990).

Jonizujuće zračenje može da dovede do oksidacije bočnih ostataka svih aminokiselina. Međutim, ROS reaguju samo sa nekim od njih dajući proizvode koji su prikazani u Tabeli 2. pretpostavlja se da i druge aminokiseline mogu da reaguju sa ROS samo nastali proizvodi još nisu okarakterisani.

Bočni ostaci aminokiselina Cys i Met se oksiduju sa svim vrstama ROS, čak i pri blagim uslovima Cys ostaci se oksiduju do disulfida, a Met gradi metionin-sulfoksid. Sve aromatične aminokiseline su sklone oksidaciji sa ROS, pri čemu nastaju pored raznih hidroksil-derivata i kinurenin, DOPA i 3-nitro-Tyr.



Slika 12. Šema putanja raskidanja peptidne veze: diamidne (Aa), α -amidacione (Ab); glutaminskom kiselinom (B) i prolinom (C), modifikovanim sa OH^\bullet i HO_2^\bullet (Stadmant, 2004).

Tabela 2. Bočni aminokiselinski ostaci koji reaguju sa ROS i proizvodi koji nastaju (Stadmant, 2004).

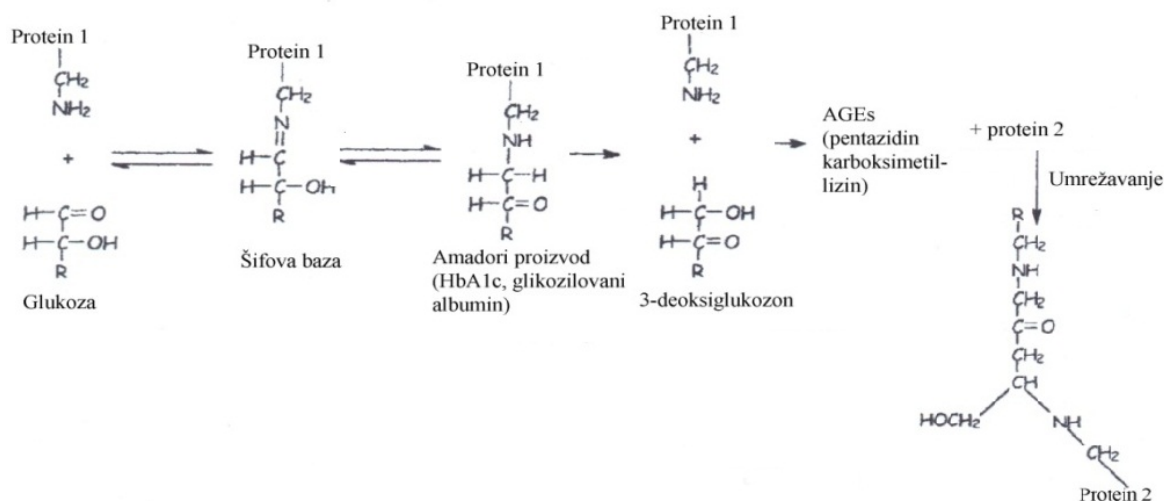
Bočni ostatak	Produkt
Arg	Semialdehid- Glu
Cys	Disulfidi: Cys-S-S-Cys, Cys-S-S-R
Glu	4-hidroksil-glutamat, piruvat, α -ketoglutarat
His	2-okso-His
Leu	3- i 4-hidroksi-Leu
Lys	Semialdehid 2-aminoadipinske kiseline, 3-, 4- i 5-hidroksi-Lys
Met	Metionin-sulfoksid, metionin-sulfon
Phe	2-, 3- i 4-hidroksi-Phe
Pro	Semialdehid- Glu, piro-Glu, 2-pirolidon, 4-hidroksi-Pro
Thr	2-amino-3-keto-buterna kiselina
Trp	N-formil-kinurenin, kinurenin, 2-,4-,5-,6- i 7-hidroksi-Trp
Tyr	3,4 dihidroksi-Phe(DOPA), Tyr-Tyr kroslinkovane proteine, 3-nitro-Tyr
Val	3- i 4-hidroksi-Val

2.4.2. Karbonilni stres

Tokom svog života proteini su izloženi brojnim enzimskim ili neenzimskim posttranslacionim modifikacijama (Rondeau i Bourdon, 2011). U nekim patološkim

stanjima, postoji povećani fluks ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze, galaktoze) i reaktivnih dikarbonil-jedinjenja (glioksala, metilglioksala, 3-deoksiglukozona), koji mogu reagovati sa bočnim lancima aminokiselinskih ostataka Lys, Arg i Cys (Aćimović i sar., 2010) (zbog njihovih nukleofilnih svojstava) dovodeći do povećanog neenzimskog glikozilovanja (glikacije) proteina (Koga i Kasayama, 2010), odnosno karbonilnog stresa. Ovim procesima su naročito podložni proteini koji imaju dug poluživot i koji su zastupljeni u visokoj koncentraciji u telesnim tečnostima i tkivima.

Proces glikozilovanja je spora neenzimska Maillard-ova reakcija, koja započinje reakcijom između aldehidne grupe ugljenih hidrata (glukoze, fruktoze, galaktoze) i N-terminalne amino grupe ili ε-amino grupe Lys proteinskih molekula. Stvara se Schiff-ova baza koja se Amadori premeštanjem prevodi u više stabilan, ali još uvek reverzibilan, ketoaminski derivat (Mayer i Freedman, 1983; Brownlee i sar., 1984)(Slika13). Nastala Schiff-ova baza i ketoaminski derivat predstavljaju rane proizvode glikozilovanja.



Slika 13. Reakcije neenzimskog glikozilovanja proteina

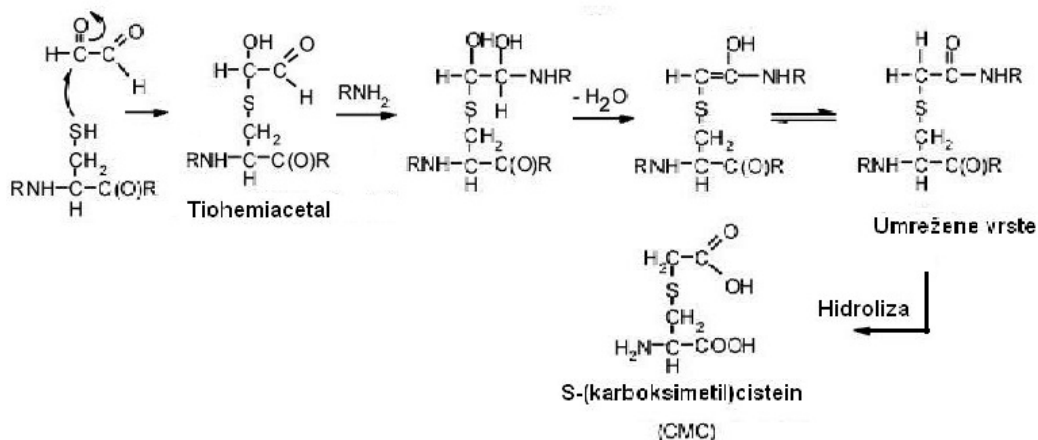
Stepen glikozilovanja proteina određen je koncentracijom reaktanata i stabilnošću nastalog proizvoda. Ispitivanjem karakteristika reakcija ključnih za neenzimsko glikozilovanje proteina došlo se do saznanja da ketoaminski derivat nastaje veoma sporo i da je veoma stabilan. Zato se na osnovu određivanja koncentracije modifikovanih proteina ukupnih ili pojedinačnih može zaključiti o koncentraciji reaktanata (posebno glukoze) u toku dužeg perioda. Neenzimskim glikozilovanjem menja se struktura proteina, što ima za posledicu promenu njihovih osobina i funkcija.

Proizvodi produženog glikozilovanja (AGEs), tj. proizvodi nastali posle inicijalne reakcije glikozilovanja su identifikovani tek nakon proučavanja glikozilovanja strukturnih proteina sa dugim poluživotom. Ketoaminska grupa nastala u reakciji glikozilovanja ovih proteina, prolazi kroz seriju dodatnih sporih reakcija (oksidacije, polimerizacije i ciklizacije), u kojima nastaju reaktivni dikarbonili (3-deoksiglukozon (3-DG), metilgliksal i gliksal), koji dalje dovode do formiranja krajnjih reaktivnih proizvoda (AGEs)(Slika 14). Ovi veoma reaktivni molekuli reaguju sa amino grupa i tiolnom grupom aminokiselinskih ostataka dovodeći do umrežavanja proteina. Nastali AGEs su ireverzibilno vezani za proteine, tako da njihov nivo u tkivima raste u stanjima karbonilnog stresa. Danas se smatra da karbonilni stres, pored oksidativnog stresa, leži u osnovi razvoja brojnih patoloških stanja među kojima su dijabetes, bolesti srca, jetre i bubrega (Oettl i sar., 2008; Matsuyama i sar., 2009; Sebekova i sar., 2012; Wratten i sar., 2001; Rasheed, 2006; Guerin-Dubourg i sar., 2012; Thornalley, 2008).

Prvobitno se mislilo da proizvodi produženog glikozilovanja primarno nastaju usled ne-enzimske reakcije između ekstracelularnih proteina i glukoze. Međutim, sada je poznato da je brzina kojom nastaju AGEs usled ekstracelularne hiperglikemije manja od brzine nastajanja ovih proizvoda u reakciji dikarbonilnih jedinjenja i proteina u ćeliji. Dakle, intracelularna hiperglikemija je primarni inicijalni događaj koji dovodi do nastajanja i intracelularnih i ekstracelularnih proizvoda produženog glikozilovanja (Degenhardt i sar., 1998). Ovaj fenomen može se objasniti na sledeći način. Usled intracelularne hiperglikemije dolazi do većeg generisanja reaktivnih dikarbonila (auto-oksidacijom glukoze generiše se gliksal (Wells-Knecht i sar., 1995), razlaganjem Amadori proizvoda nastalih od glukoze (1-amino-1-deoksifruktozo-lizinskog adukta) generiše se 3-deoksiglukozon, a neenzimskom hidrolizom gliceraldehid-3-fosfata i dihidroksiacetonfosfata generišu se najznačajnije količine metilgliksala (Thornalley, 1990). Osim navedenih načina nastanka reaktivnih dikarbonila, oni se mogu generisati u sporednim reakcijama u metabolizmu proteina, lipida i DNA, a kako su 20 000 puta reaktivniji od glukoze u reakciji neenzimskog glikozilovanja (Thornalley, 2005), mogu da reaguju sa amino i guanidino grupama intracelularnih i ekstracelularnih proteina formirajući proizvode produženog glikozilovanja (Lo i sar., 1994; Thornalley, 2005). Takođe, reaktivni dikarbonili su moćni modifikujućí agensi i molekula DNA (Thornalley i Rabbani, 2013).

Reaktivni dikarbonili reaguju ne samo sa amino i guanidino grupama, već i sa tiolnim grupama proteina. Reakcija sa tiolnom grupom je veoma brza i reverzibilna (Slika

14). U fiziološkim uslovima dovodi do stvaranja hemitioacetala (Zeng i Davies, 2005), koji daljim preuređivanjem prelazi u C-(karboksimetil)-cistein (CMC, u slučaju glioksala) (Zeng i Davies, 2005; Thorpe i Baynes, 2003) ili u S-(2-karboksietil)-cisteina (CEC, u sličaju metilglioksala). CMC i CEC se označavaju kao AGEs (Thorpe i Baynes, 2003; Alt i sar., 2004; Mostafa i sar., 2007; Sharma i Santhoshkumar, 2009) i predloženi su kao korisni markeri za otkrivanje prisustva dikarbonila u biološkim sistemima.



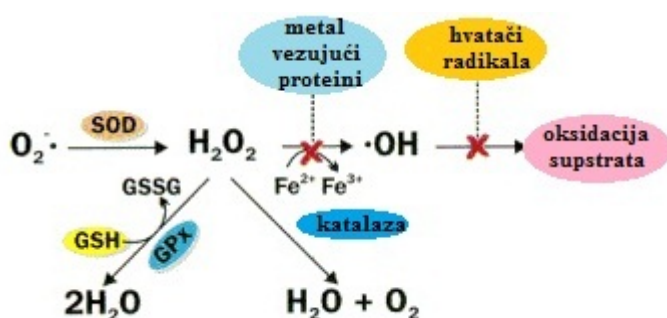
Slika 14. Mehanizam reakcije metilglioksala sa tiol grupom iz proteina

Značaj metilglioksala u umrežavanju (kroslinkovanju) proteina nije dovoljno proučen. Zeng i Davies (2006) su predložili mehanizam po kome karbonilna grupa proizvoda (hemitioacetala) inicijalne reakcija metilglioksala sa amino ili tiol grupom postaje meta za napad druge slobodne tiol (ili amino) grupe proteina.

2.4.3. Odbrambeni mehanizmi u sprečavanju oksidativnog i karbonilnog stresa

Aerobni organizmi poseduju različite mehanizme za uklanjanje nastalih ROS (Slika 15). Ključni koraci su posredovani enzimima SOD (koja brzo dismutacijom uklanja veoma reaktivni $O_2^{\cdot-}$, prevodeći ga u manje toksičan H_2O_2 i O_2), katalazom i glutation-peroksidazom (GPx) (koje H_2O_2 prevode do $O_2 + H_2O$ i $2H_2O$, resp.). Pošto reakcija koju katalizuje glutation-peroksidaza zahteva GSH kao susprtat, brzina ove reakcije zavisi od koncentracije GSH u ćeliji, koja je uslovljena GSSG/GSH odnosom. GSSG/GSH odnos je pokazatelj redoks stanja ćelije, koji je važan u odbrani od oksidativnog stresa.

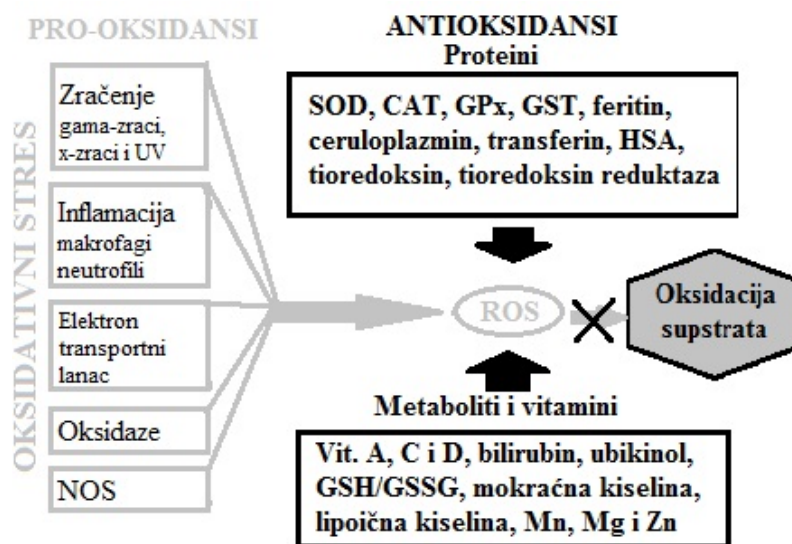
Oksidativni stres se često definiše kao poremećaj ravnoteže između prooksidanata i antioksidanata, pri čemu on može biti posledica smanjenja nivoa antioksidanata i/ili povećanja nivoa ROS u organizmu (Sies, 1991; Halliwell i Whiteman, 2004). Antioksidant je definisan kao bilo koja supstanca koja je prisutna u niskim koncentracijama u odnosu na supstat koji može da se oksiduje, a koja značajno usporava ili sprečava oksidaciju tog supstrata (Halliwell i Whiteman, 2004). Stoga su, pored navedenih ključnih enzima koji su direktno uključeni u uklanjanje ROS, identifikovani i drugi molekuli u organizmu koji imaju antioksidativnu ulogu (Slika 16).



Slika 15. Odbrambeni mehanizmi protiv ROS.

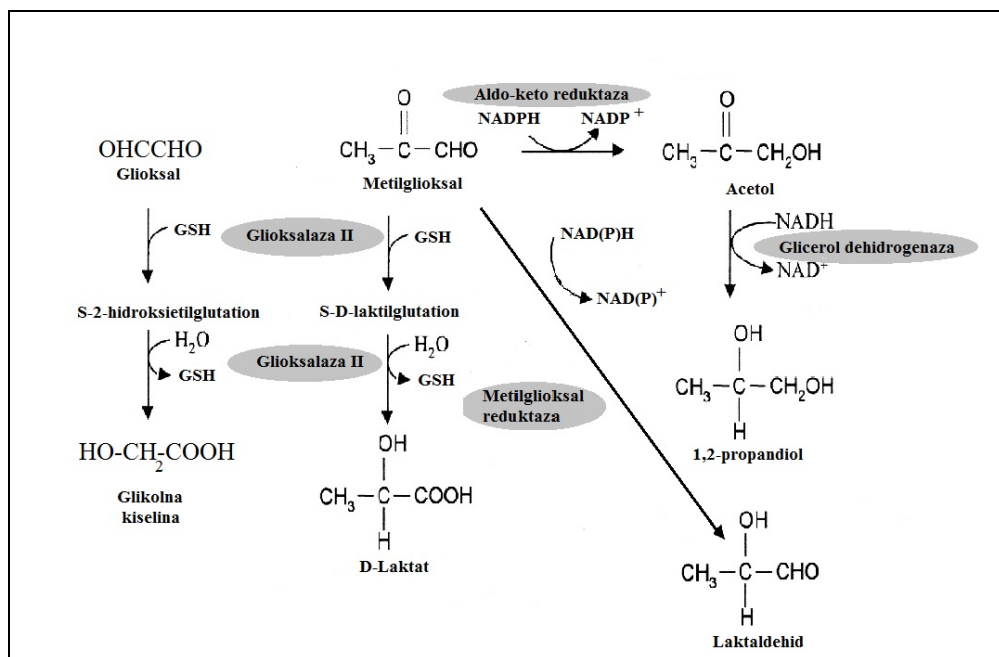
Ovi molekuli se mogu podeliti u dve grupe, proteini i mali molekuli (metaboliti i vitamini) (Stadmant, 2004). Kako je napred istaknuto, joni gvožđa (II) katalizuju Fentonovu reakciju u kojoj se generiše $\cdot OH$. Proteini feritin, transferin i laktoferin imaju antioksidativnu ulogu jer vezivanjem i transportom jona gvožđa smanjuju njihovu koncentraciju i time generisanje ROS. Sa druge strane, skupljači radikala poput vitamina E, pokazuju antioksidativnu ulogu prekidajući lančane radikalske reakcije. Nastali radikal vitamina E je veoma stabilan. Enzimskim putem može se pretvoriti nazad u neradikalski oblik. Na ovaj nači skupljači radikala završavaju lančane reakcije i sprečavaju radikalska oštećenja biomakromolekula.

Značaj odbrambenih mehanizama protiv ROS postaje jasan ako se posmatra distribucija antioksidanata u celom organizmu. Na mestima na kojima je veća verovatnoća nastajanja ROS usled više koncentracije O_2 (poput mitohondrija i eritrocita), nalaze se i veće koncentracije antioksidanata poput vitamina E, enzima (SOD, katalaze i GPx) i supstrata (GSH) (Ma, 2010).



Slika 16. Prikaz pro-oksidanata i anti-oksidanata. Step en oksidacije biomakromolekula zavisi od odnosa pro-oksidanata i anti-oksidanata u organizmu.

U normalnim fiziološkim stanjima dikarbonili glioksal i metilglioksal generišu se u toku metabolizma. Zbog njihove izuzetne reaktivnosti, veoma rano u evoluciji razvio se enzimski sistem koji je uključen u detoksifikaciju ovih metabolita (Inoue i Kimura, 1995) i koji se nalazi u citosolu svih ćelija (prokariota i eukariota)(Dixon i sar., 1998). Uklanjanje reaktivnih dikarbonila se odvija sukcesivnim delovanjem dva tiol-zavisna enzima, glioksilaze I i II. GSH je uključen u katalizu, a kao proizvodi reakcija detoksifikacije nastaju molekuli koji se mogu uključiti u metabolizam. Metilglioksal se preko intermedijera S-D-laktilglutaciona prevodi do D-laktata, dok se glioksal prevodi do glikolne kiseline preko intermedijera S-2-hidroksietilglutaciona (Slika 17) (Thornalley, 1990). Pored ovog enzimskog sistema, reaktivni dikarbonili mogu biti supstrati i za druge reduktaze (Suzuki i sar., 1998).



Slika 17. Put detoksifikacije metilglioksala i glioksala glioksalazom I i II

2.5. Uloga HSA u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa

HSA, nakon sekrecije u cirkulaciju, podleže različitim postranslacionim modifikacijama, od kojih su oksidacija, glikozilovanje i nitrozilacija tri najvažnije posttranslacione modifikacije (Otagiri i Chuang, 2009). Kako HSA ima dug poluživot (oko 20 dana) i visoku koncentraciju u plazmi (od 35 do 61 g/l) u odnosu na druge proteine, u poslednjih nekoliko godina fokus naučnih istraživanja usmeren je na ispitivanje uloge HSA u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa.

2.5.1. Uloga HSA u odbrani od oksidativnog stresa

Pored transportne uloge, HSA ima i antioksidativnu ulogu. Ova uloga potiče sa jedne strane od svojstva HSA da vezuje različite ligande, a sa druge strane od prisustva reaktivnih funkcionalnih grupa bočnih aminokiselinskih ostataka na površini molekula.

2.5.1.1. Antioksidativna svojstva HSA određena vezivanjem liganda

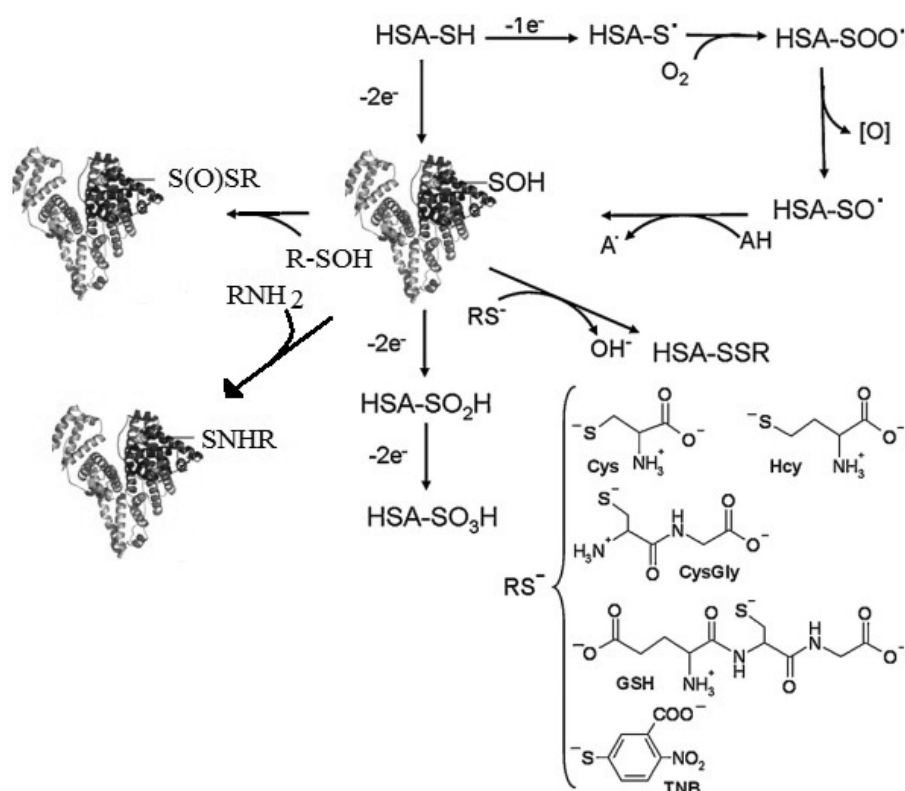
Zbog mogućnosti vezivanja različitih liganda, HSA pokazuje antioksidativnu ulogu na dva načina: ligandi vezani za HSA su zaštićeni od oksidacije (npr. Mk) ili je sprečeno da se ponašaju kao prooksidanti (npr. metali). Od svih lipida, polinezasićene Mk su najosetljivije prema oksidaciji, i vezivanjem za HSA (preko ostataka Lys 351, Lys 475 i Arg 117) (Rondeau i Bourdon, 2011) one su zaštićene od oksidacije, mada za to ne postoje direktni dokazi. HSA, zbog sposobnosti da vezuje bilirubin (Zunszain i sar., 2008), pokazuje indirektna antioksidativna svojstva, jer nastali kompleks deluje kao inhibitor lipidne peroksidacije (Neuzil i Stocker, 1993) i oštećenja vitamina E peroksil-radikalima (Neuzil i Stocker, 1994). Još jedan aspekt antioksidativne aktivnosti HSA proističe iz svojstva da vezuje homocistein, aminokiselinu koja nastaje u toku katabolizma Met i koja se dovodi u vezu sa generisanjem oksidativnog stresa u endotelu i razvojem ateroskleroze (Weiss i sar, 1989, Papatheodorou i Weisse, 2007). Antioksidativna svojstva HSA, takođe, uključuju vezivanje katjona Cu(II) i u manjoj meri Fe(II) (Turell i sar., 2009), pri čemu se na taj način sprečava generisanje $\text{OH}\cdot$ od H_2O_2 u Fentonovoj reakciji, u kojoj ovi metali učestvuju kada se nalaze u slobodnom obliku (Turell i sar., 2009, Prousek, 2007).

2.5.1.2. Antioksidativna svojstva HSA zbog posedovanja grupa (Cys 34 i Met)

S obzirom na činjenicu da je HSA najzastupljeniji protein plazme i da ima slobodnu Cys34-SH grupu u I domenu na površini molekula (Peters, 1996), on najviše doprinosi ukupnom sadržaju slobodnih tiola (proteinskih i neproteinskih) u plazmi (Oetl i Stauber, 2007). Kod zdravih odraslih osoba, oko 70 do 80 % HSA Cys 34-SH grupe se nalazi u redukovanom obliku, 25 % formira disulfidne mostove sa malim tiolima (cisteinom, cisteinilglicinom, homocisteinom, γ -glutamilcisteinom i glutationom) (Turell i sar., 2009), a mali udeo je oksidovan do sulfenske i sulfinske kiseline i nitrozilovan u obliku HSA-SNO. U redukovanom obliku HSA-Cys34-SH grupa ispoljava antioksidativna svojstva, tako što vezuje reaktivne slobodne radikale (Bourdon i Blanche, 2001), i na taj način doprinosi da HSA bude glavni vanćelijski antioksidans (Otagiri i sar., 2009, Halliwell, 1988).

Oksidacijom HSA Cys34-SH grupe stvara se sulfenska kiselina (HSA-SOH) (centralni intermedijer u reverzibilnoj i ireverzibilnoj modifikaciji radikalskih vrsta), koja pokazuje i nukleofilna i elektrofilna svojstva (Slika 18). Ovaj dualni karakter sulfenske kiseline ispoljava se u kondezaciji sa drugim molekulom sulfenske kiseline i formiranjem

tiosulfinata (RS(O)SR) (Turell i sar., 2009). Sulfenska kiselina može da reaguje sa drugim tiolima i da nagradi mešovite disulfide (Roche i sar., 2008), koji se mogu enzimski i neenzimski sa tiolnim reagensom ponovo prevesti do slobodnih tiola. Alternativno, u prisustvu oksidujućih vrsta sulfenska kiselina može se dalje oksidovati do sulfinske kiseline (RSO₂H) i sulfonske kiseline (RSO₃H), koje obično ne mogu reagovati sa tiolima (Turell i sar., 2009). Takođe, sulfenska kiselina može reagovati sa slobodnom amino-grupom uz nastajanje amida (RSNHR'), koji se može redukovati do slobodnog tiola (Allison i sar., 1973).



Slika 18. Tiolna grupa Cys34 humanog serum-albumina kao antioksidans i proizvodi reakcije koji mogu nastati pri ispoljavanju ove uloge.

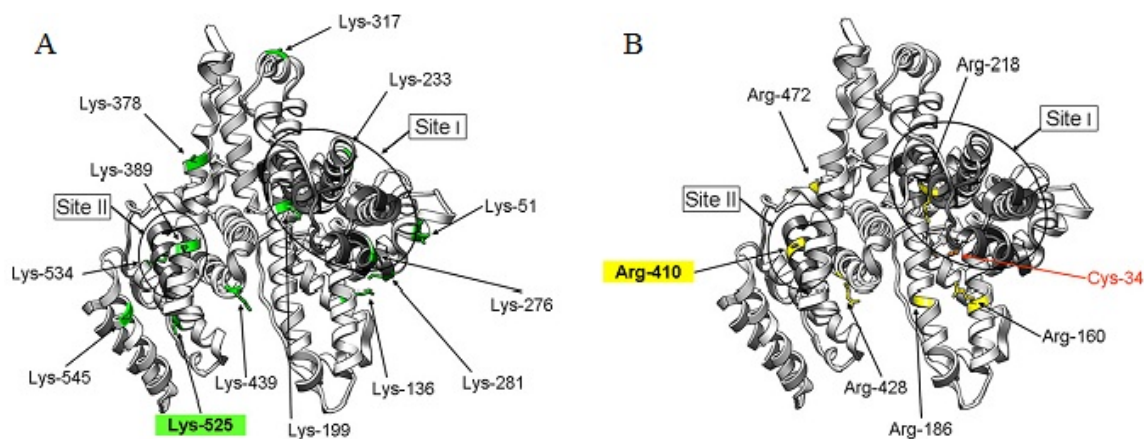
Pored ostatka Cys34, šest ostataka Met u molekulu HSA, takođe, doprinose ukupnoj antioksidativnoj ulozi HSA (Bourdon i sar., 2005). Met može da se oksiduje različitim oksidansima, uz nastajanje metionin-sulfoksida (Berlett i Stadtman, 1997). Dalja oksidacija sulfoksida do sulfona dešava se samo pod drastičnim uslovima i nije zabeležena u fiziološkim uslovima (Roche i sar., 2008). Metionin-sulfoksid se dejstvom redukujućih

sredstava srednje jačine ili dejstvom metionin-sulfoksid-reduktaze prevodi u Met. Na osnovu ovog svojstva ostatka Met, Levin i sar. (1996), su predložili hipotezu da oksido/redukcioni ciklus ostatka Met u biološkim sistemima služi za uklanjanje ROS i zaštitu drugih proteina od modifikacije sa ROS.

Na kraju, hipohlorna kiselina, koja se generiše delovanjem mijeloperoksidaze na H_2O_2 u neutrofilima i monocitima (Weiss, 1989), može da se veže za HSA i da bude uklonjena iz cirkulacije, pri čemu se sprečava modifikacija α_1 -antiproteaze ovom kiselinom (Halliwell, 1988).

2.5.2. Uloga HSA u odbrani od karbonilnog stresa

Zbog dugog poluživota, visoke zastupljenosti u telesnim tečnostima i strukturnih karakteristika, HSA ima važnu ulogu u odbrani od karbonilnog stresa, pored odbrane od oksidativnog stresa. U karbonilnom stresu dolazi do povećanog fluksa ugljenih-hidrata i reaktivnih dikarbonilnih jedinjenja, koji u reakcijama neenzimskog glikozilovanja dovode do modifikacija različitih aminokiselinskih ostataka na površini molekula proteina. Ostaci Lys i Arg i Cys34 su glavne mete za neenzimsko glikozilovanje proteina i ovi ostaci najviše doprinose ulozi HSA u odbrani od karbonilnog stresa.



Slika 19. Ostaci aminokiselina na površini HSA molekula, koji učestvuju u reakciji neenzimskog glikozilovanja (Rondeau i Bourdon, 2011)

Na površini molekula HSA nalazi se 59 ostataka Lys, različito podložnih reakciji glikozilovanja. Utvrđeno je da se u *in vivo* uslovima 13 ostataka Lys modifikuje tokom karbonilnog stresa, pri čemu Lys525 predstavlja dominantno mesto glikozilovanja (uprkos njegovoj nepristupačnosti u nativnoj konformaciji) (Rondeau i Bourdon, 2011)(Slika 19A).

Pored ostataka Lys, značajan doprinos ulozi HSA u odbrani od karbonilnog stresa daju 24 ostatka Arg. Slično Lys, i ostataci Arg pokazuju različitu osetljivost prema glikozilovanju. U *in vivo* uslovima identifikovano je šest ostataka Arg koji se glikoziluju, pri čemu Arg na poziciji 410 (sastavni deo Sudlow' II mesta za vezivanje lekova) predstavlja dominantno mesto glikozilovanja (Rondeau i Bourdon, 2011) (Slika 19B).

Na površini molekula HSA prisutan je samo jedan ostatak Cys (Cys34). Zbog činjenice da je jači nukleofil od amino- i guanidino-grupe pri fiziološkom pH, brzo reaguje sa reaktivnim dikarbonilima (metilgliksalom, gliksalom i 3-dezoksigliukozonom) koji se generišu u patološkim stanjima poput dijabetesa (Thornalley, 2005). Reakcija α -oksoaldehida sa HSA-Cys34-SH je veoma brza i reverzibilna i dovodi do stvaranja hemitioacetala (Aćimović i sar., 2010). Nastali hemitioacetal daljim preuređivanjem daje AGEs (CMC i CEC), koji su predloženi kao markeri pogodni za otkrivanje prisustva dikarbonila u biološkim sistemima. Takođe, dokazano je da je Cys34 uključen u proteinsko umrežavanje i nastajanje krajnjih proizvoda glikovanja (Desai i sar., 2010).

Pored reaktivnih dikarbonila i ostali ugljeni hidrati (glukoza, galaktoza, fruktoza i dr.) mogu modifikovati HSA u slučaju povećanja njihovih koncentracija (npr. kod dijabetesa, galaktozemije i fruktozemije). Procenat modifikovanih aminokiselinskih ostataka na površini molekula proteina zavisi od njihove reaktivnosti, od prirode i brzine anomerizacije (Rondeau i Bourdon, 2011). *In vitro* istraživanja su pokazala da su galaktoza i riboza efikasnije u glikaciji proteina od glukoze, zbog veće zastupljenosti acikličnog oblika, u kojem aldehidna grupa, koja učestvuje u reakciji stvaranja Šifove baze, slobodna.

Procesi glikacije i glikooksidacije HSA dovode do promene njegove strukture (promene naelektrisanja i 3D-strukture HSA) i funkcije (afiniteta HSA za vezivanje liganada, pojave novih vezivnih mesta za određene ligande i smanjenje antioksidativne aktivnosti HSA) molekula HSA. Proces glikacije ne utiče znatno na sekundarnu strukturu proteina, ali je ustanovljeno da produžena inkubacija sa ugljenim hidratima (glukozom, fruktozom i ribozom) podstiče prelaz HSA iz forme, u kojoj su zastupljeni samo α -heliksi, u formu, u kojoj ima i β -pločica (Rondeau i Bourdon, 2011). Pored toga, glikacija HSA molekula dovodi do stabilizacije njegove sekundarne i tercijarne strukture, što može uticati na produženo vreme boravka glikovanog HSA u cirkulaciji.

2.5.3. HSA - marker oksidativnog i karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima

Danas se smatra da su oksidativne i ne-enzimske post-translacione modifikacije proteina uzrok nastanka i razvoja brojnih patoloških stanja. Znajući da antioksidativna svojstva HSA potiču od jedne slobodne, tiolne grupe Cys34, za očekivati je da će udeo oksidovanog HSA (usled modifikacije sa reaktivnim kiseoničnim vrstama i/ili reaktivnim ugljenim hidratima i dikarbinilima) rasti u brojnim patološkim stanjima. Poslednjih nekoliko godina, mnogi radovi posvećeni su istraživanju promena antioksidativnih svojstava HSA u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

U *in vivo* uslovima, kod zdravih osoba od 1 do 10 % ukupne količine HSA je ne-enzimski glikozilovano HSA (Rondeau i Bourdon, 2011; Oettl i Stauber, 2007), što ujedno predstavlja 80 % količine svih ne-enzimski glikozilovanih proteina u cirkulaciji (Oettl i Stauber, 2007). U fiziološkim uslovima, glikacija glukozom čini 30 % ukupnog ne-enzimskog glikozilovanja proteina. Međutim kod dijabetičara sa lošom glikemijskom kontrolom, procenat glikovanog HSA može biti veći od 90 % ukupne količine HSA u cirkulaciji (Rondeau i Bourdon, 2011). Zbog kraćeg poluživota HSA (21 dan) u odnosu na hemoglobin (120 dana), glikovani HSA je predložen kao pogodan marker kratkoročne glikemijske kontrole. Kako dnevne fluktacije koncentracije glukoze lakše utiču na proteine plazme nego na hemoglobin, u *in vivo* uslovima stopa ne-enzimskog glikozilovanja HSA je 9 puta veća u odnosu na hemoglobin. Klinička manifestacija glikozilovanja HSA u dijabetesu ogleđa se u izmenjenom vezivanju nekih lekova (Rondeau i Bourdon, 2011).

Pored glikovanog HSA, CMC i CEC (krajnji proizvodi glikozilovanja HAS) su predloženi kao markeri karbonilnog stresa u dijabetesu, hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji (naročito kod pacijenata na hemodijalizi), cirozi jetre, anemiji, uremiji i aterosklerozi (Koga i Kasayama, 2010).

Danas se oksidativni stres smatra glavnim uzrokom procesa starenja u mnogim, ako ne i svim, aerobnim životinjskim vrstama. Proces starenja je povezan sa porastom udela oksidovanih oblika proteinskih i neproteinskih tiola unutar i/ili van ćelije (Droge, 2002). Era i sar. (1995) su našli da starenje kod zdravih osoba dovodi do pada sadržaja HSA-SH grupa od 0,76 (određeno kod dvadesetogodišnjaka) do 0,48 mol-SH/mol HSA (određeno kod sedamdesetogodišnjaka). Osim starenja, u patološkim i fiziološkim stanjima koja su praćena oksidativnim stresom, takođe, dolazi do pada sadržaja HSA-SH grupa. Tako je smanjenje sadržaja HSA-SH grupa nađeno u dijabetesu (Guerin-Dubourg, 2012, Faure i

sar., 2008, Faure i sar., 2004), opstruktivnoj apnei (Faure i sar., 2008), bolestima bubrega (Matsuyama i sar., 2009, Terawaki i sar., 2004), bolestima jetre (Oettl i sar., 2008) i u toku intenzivnog fizičkog napora (Imai i sar., 2002). Takođe, nađeno je da sadržaj HSA-SH grupa prati tok razvoja nekih bolesti. Kod pacijenata sa hroničnim otkazima bubrega nađena je jaka korelacija između smanjenja sadržaja HSA-SH grupa i napredovanja bolesti (Terawaki i sar., 2004). Uočeno je da HSA podleže intenzivnoj oksidaciji kod primarnog nefrotskog sindroma (Otagiri i sar., 2009).

Modifikacija molekula HSA u različitim patološkim stanjima može imati važne fiziološke implikacije. Tako na primer, oksidacija ključnih aminokiselinskih ostataka HSA, između kojih i Arg410, može da dovede do eliminacije HSA i skraćivanja poluživota njegovih molekula. Modifikacije HSA u dijabetesu dovode do konformacionih promena, odnosno do izmenjenog vezivanja lekova usled veće izloženosti hidrofobnih regiona u molekulu, a to dalje može da utiče na efikasnost terapije (Otagiri i sar., 2009). Koliki je značaj održavanja odnosa redukovane/oksidovane forme HSA-SH grupa u fiziološkim granicama, za odbranu od oksidativnog i/ili karbonilnog stresa HSA, pokazuju i podaci o sprovođenju niza naučnih i kliničkih studija sa ciljem određivanja korisnosti primene komercijalnih preparata HSA (u kojima je prisutan nizak sadržaj HSA-SH grupa) u kliničkoj praksi (Erstad i sar., 1991).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da određivanje sadržaja HSA-SH grupa, može biti koristan marker za procenu stepena oksidativnog i/ili karbonilnog stresa, razvoja, praćenja i tretmana bolesti. Stoga je izolovanje HSA (iz seruma ili plazme zdravih osoba i pacijenata) visoke čistoće, od posebnog značaja za određivanje sadržaja HSA-SH grupa, kao i za ispitivanje drugih svojstava HSA koja se menjaju u patološkim stanjima.

2.6. Pregled metoda izolovanja humanog serum-albumina

2.6.1. Taložne metode

Cohn i sar. (1946) su iskoristili najveću rastvorljivost i najnižu pI vrednost (oko 5) HSA u odnosu na druge proteine plazme, da bi razvili prvu metodu za izolovanje HSA iz plazme za kliničke svrhe. Metoda se sastoji iz niza koraka taloženja hladnim etanolom sa snižavanjem pH i temperature rastvora. Ovim načinom izolovanja dobijen je HSA veoma niske čistoće, a izolovani proteini su bili delimično denaturisani, tako da su mnogi autori nastojali da modifikuju Cohn-ovu metodu sa ciljem dobijanja boljih rezultata prilikom

izolovanja HSA (Slika 20). Postupci izolovanja HSA, su se razlikovali po načinu taloženja, broju koraka prilikom izolovanja, prinosu i čistoći izolovanih preparata.

Plazma (taloženje na niskim temperaturama)				
Supernatant I	Supernatant I	Supernatant I	Supernatant I+A	Izmena pufera
Supernatant II i III	Supernatant II i III	Supernatant A	Frakcija IV	Centrifugiranje
Frakcija IV-I	Frakcija IV-I	Frakcija IV	Frakcija V	Anjonska hromatografija
Frakcionisanje 30% EtOH	Frakcija IV-4	Frakcija V	Dijafiltracija	Katjonska hromatografija
Uklanjanje EtOH	Frakcija V	Uklanjanje EtOH	Anjonska hromatografija	Gel hromatografija
Punjenje	Uklanjanje EtOH	Punjenje	Pasterizacija	Formulacija
Pasterizacija	Punjenje	Pasterizacija	Punjenje	Punjenje
	Pasterizacija		Pasterizacija	Pasterizacija
Rastvor plazma proteina	Rastvor HSA	Rastvor HSA	Rastvor HSA	Rastvor HSA
Hink i sar. 1957	Cohn i sar. 1946	Kistler i sar. 1962	Zenlab proces, 1991	Hromatografski proces, 1983

Slika 20. Upporedni prikaz metoda izolovanja HSA (Jacobs i sar., 2005)

Još davne 1932, Rase je upotrebio 80 % aceton, koji sadži trihlorsirćetnu kiselinu (TCA), za odvajanje HSA iz seruma, da bi Rodkey (1965a, 1965b) opisao jednostavnu metodu za kvantitativno odvajanje globulina od HSA primenom sličnog pristupa. HSA je iz smeše TCA-etanol istaložio natrijum-acetatom. Iwata i sar. (1968) su dali uporedni pregled do tada objavljenih metoda za izolovanje HSA, koje se zasnivaju na taloženju etanolom. Da bi se što bolje okarakterisao HSA *in vivo* (promena strukture, funkcije, turn over HSA), u normalnim i patološkim stanjima, nametnula se potreba za metodama izolovanja koje su jednostavne i brze. Tako su Jacobs i sar. (2005) ispitivali primenljivost metode izolovanja

HSA isključivo taloženjem etanolom u jednom koraku. Metoda je jednostavna i brza, ali je izolovani HSA bio kontaminiran drugim proteinima seruma (oko 8 %), i metoda je zahtevala veliku zapreminu seruma.

Za taloženje HSA primenjivan je i amonijum-sulfat (AS), koji je nezamenljiv prilikom taloženja velikih količina polaznog materijala (Scopes, 1994) zbog niza prednosti, kao što je činjenica da AS i druge neutralne soli stabilizuju proteine, inhibiraju bakterijski rast i aktivnost kontaminirajućih proteaza. Međutim, pokazano je da i taloženje AS ne daje zadovoljavajuće rezultate (Travis i sar., 1976). U izolovanom HSA, pored prisustva drugih proteina iz plazme, detektuju se i druge nečistoće poput Mk, bilirubina, hematina i jona metala (kao što su Ni i Cu), zbog visokog afiniteta HSA ka ovim ligandima. Primenom nekih metoda izolovanja u izolovanom HSA nađen je visok sadržaj dimernog oblika HSA (do 20 %) (Suchmaker, 1994).

Ipak kombinacijom više koraka taloženja i korišćenjem različitih sredstava za taloženje (Slika 20) moguće je dobiti HSA zadovoljavajuće čistoće, međutim ove višestepene metode izolovanja HSA uglavnom dugo traju i komplikovane su, tako da nisu pogodne za kliničku praksu.

2.6.2. Hromatografske metode

U mnogim radovima taložne metode izolovanja HSA kombinuju se sa hromatografskim (jonoizmenjivačka i gel) metodama prečišćavanja, pojedinačnim ili više stepenim, u cilju dobijanja što čistijeg HSA (Slika 20) (Hage, 1999; Tanaka i sar., 2001; Barsukov i sar., 2009). Tako su Ivanov i sar. (1997) pri izolovanju HSA iz patoloških uzoraka plazme kombinovali taloženje polietilen-glikolom sa jonoizmenjivačkom hromatografijom, što se pokazalo pogodnim, jer su promene strukture HSA i denaturacija proteina tokom izolovanja svedene na minimum. Da bi se dodatno poboljšala čistoća izolovanog HSA razvijena je automatska FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) metoda. Izolovan je HSA visoke čistoće (do 99 %) (Hage, 1999), međutim ova procedura nije pogodna za kliničku praksu, jer dugo traje i tehnički je zahtevna (Jacobs i sar., 2005).

Kao alternativa za višestepene taložne metode, i metode u kojima se kombinuju taložne i hromatografske metode, razvijena je afinitetna hromatografija iz jednog koraka (Travis, 1976), koja se zasnova na specifičnim interakcijama između HSA i tekstilne boje Cibacron Blue F3-GA. Ova metoda je primenjena ne samo za izolovanje HSA iz plazme,

nego i za uklanjanje HSA pri izolovanju drugih proteinskih frakcija plazme (Leatherbarrow i Dean, 1980; Gianazza i Arnaud, 1982). Međutim, ova metoda ne garantuje visok stepen čistoće izolovanog HSA (Sereikaite i sar., 2005), jer Cibacron Blue F3-GA može, kao ligand, da veže i druge proteine, kao što su fosfolipaza A2, humani interferon α -2b, lizozim, γ -globuline, alkalnu fosfatazu (Sereikaite i sar., 2005) i laktat dehidrogenazu (Johansson i sar., 1991).

Vezivanje drugih proteina za imobilizovanu boju je bilo iskorišćeno kao dokaz da dati protein poseduje dinukleotid vezujuće mesto (Thompson i sar., 1975). Međutim, pokazano je da se proteini kao interferon i HSA, vezuju za imobilizovanu boju iako ne poseduju dinukleotid vezujuća mesta (Lagercrantz i sar., 1983). Interakcije između HSA i Cibacron Blue uključuju vezujuće mesto za bilirubin (Leatherbarrow i Dean, 1980). Vezivanje Mk dugog lanca za HSA značajno povećava konstantu disocijacije kompleksa HSA i boje, dok vezivanje bilirubina ne daje isti efekat (Metcalf i sar. 1981).

Za izolovanje HSA iz seruma i plazme razvijena je i imunoafinitetna hromatografija sa poliklonskim ptičijim IgY antitelima. Međutim, primenom ove metode se, zbog ukrštene reaktivnosti antitela prema drugim proteinima plazme, ne dobija potpuno čist preparat HSA (Huang i sar., 2005).

2.6.3. Metode za izolovanje HSA i određivanje sadržaja HSA-SH grupa

Zbog uloge koju HSA ima u odbrani od oksidativnog i/ili karbonilnog stresa, koji su uzročnici i/ili posledice nekih patoloških stanja, poslednjih godina veliki broj radova je posvećen određivanju antioksidativne uloge HSA i time određivanju sadržaja HSA-SH grupa, sa ciljem da se ispita da li promena sadržaja HSA-SH grupa može biti potencijalni marker za procenu stepena oksidativnog i/ili karbonilnog stresa u kliničkoj praksi, odnosno za procenu antioksidativnog kapaciteta. Pregledom literature, ustanovljeno je da postoje dva različita pristupa za određivanje sadržaja HSA-SH grupa. U prvom, sadržaj HSA-SH grupa se određuje u preparatu HSA koji je prethodno izolovan iz biološkog materijala, dok se u drugom određivanje sadržaja HSA-SH grupa radi direktno iz biološkog materijala.

Autori, koji primenjuju prvi pristup za određivanje sadržaja HSA-SH grupa, koriste afinitetnu hromatografiju sa Cibacron Blue ligandom kao jednostavnu i relativno brzu (postupak izolovanja traje 40 min) metodu za izolovanje HSA (Faure i sar., 2008; Guerin-Dubourg i sar., 2012; Faure i sar., 2005). Kod drugog pristupa, svi autori (Oetl i sar., 2008; Tarawaki i sar., 2004; Matsuyama i sar., 2009) koriste HPLC (high-performance liquid

chromatography) metodu koji su razvili Imai i sar. (2002), a koja je bazirana na jonoizmenjivačkoj hromatografiji. HSA se razdvaja u tri frakcije: redukovani HSA (merkaptHSA), oksidovani HSA (mešoviti derivati HSA sa malim tiolima) i oksidovani HSA (derivati sulfonske, sulfinske i sulfenske kiseline). Detekcija HSA frakcija vrši se fluorescentnim detektorom sa eksitacijom na 280 nm i emisijom na 340 nm. Sama hromatografija traje 40 minuta (Imai i sar., 2002). Ako se uporede ova dva pristupa, može se zaključiti da:

- prvi pristup ne zahteva skupu opremu, istovremeno se može izolovati više uzoraka batch postupkom (Faure i sar. 2005, 2008), zahteva veću zapreminu uzorka seruma (0,5-1 ml) pa je i izolovana količina HSA veća u odnosu na drugi pristup (2 μ l), što je pogodno ako je potrebno iskoristiti izolovani HSA i za druge analize (masnokiselinski profil, elektroforeze, itd),

- drugi pristup je pogodan samo ako se određuje sadržaj HSA-SH grupa. Međutim, budući da zahteva skupu opremu, nije pogodan za kliničku praksu.

U ovoj tezi ispitana je mogućnost određivanja sadržaja HSA-SH grupa kao potencijalnog markera za procenu stepena karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima, posle izolovanja albumina iz seruma afinitetnom hromatografijom, i mogućnost primene ove metode u kliničkoj praksi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hemikalije

Sve hemikalije primenjene u ovom radu bile su p.a. čistoće:

- Kalijum-natrijum-tartarat, natrijum-hidroksid, bakar(II)-sulfat-pentahidrat, kalijum-jodid, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina), BCIP (5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat), NBT (nitro blue tetrazolium), standardi Mk, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, amonijum-sulfat anhidr., Ponceau-S, (Sigma Chemicals, St. Louis)
- Akrilamid, bisakrilamid, glicin (Gly), natrijum-hidrogen fosfat, natrijum-dihidrogen fosfat, natrijum-acetat, trihlor sirćetna kiselina (TCA), amonijum-sulfat, anhmagnezijum-hlorid, etanol, dimetilformamid, fosforna kiselina, ditiotreitol (DTT), Coomassie Brilliant Blue (CBB), glicerol, brom-fenol-plavo (BFP), hloroform, n-heksan, n-butanol, amonijum-hidroksid amonijum-persulfat (APS), TEMED (N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin), Tween-20 (Merck, Darmstadt)
- HSA liquicolor kit sa 3',3'',5',5''-tetrabrom-m-krezolsulfonfaleinom (bromkrezol zeleno, BKZ) je nabavljen od Human, Wiesbaden, Nemačka.
- Cibacron Blue Sepharose 6 Fast Flow je nabavljena od GE Healthcare (Uppsala, Sweden), a Cibacron Blue 3G Agarose Type 3000-CL od Sime (Sigma Chemicals, St. Louis)
- 20 % rastvor HSA je nabavljen od Baxter, Beč, Austrija. Ovaj preparat, namenjen za kliničku upotrebu, obično sadrži ~ 0,4 mmol -SH/mmol HSA.
- Metanol, sirćetna kiselina, hlorovodonična kiselina, natrijum-hlorid (Zorka pharm, Šabac)
- TRIS (tris-(hidroksimetil)-aminometan) proizvođača (ICN, Galenika, Beograd)
- Natrijum-hidroksid proizvođača (Lachema, Češka)
- Marker i za SDS elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Zečije anti-HSA poliklonsko antitelo i kozije anti-zečije antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom proizvođača (Calbiochem, San Diego, USA)
- Standardi polinezasićenih MK (PUFA-2 standard mixture) (Restec, Bellefonte, PA).

3.2. Aparati

U radu je korišćena sledeća oprema: centrifuge Tehtnica LC 320 i Ependorf MiniSpin®, pH metar Radiometar PHM 26, sušnica Instrumentaria ST 05, centrikoni za ultrafiltraciju (Amicon Ultra-15, Millipore, Carrigtwohill, Ireland), vodeno kupatilo NeoMedica, automatske pipete Brand, tehnička vaga Chyo MK 500C, magnetna mešalica Labortechnik i vorteks Tehtnica EF 102, spektrofotometar UV/VIS Beckman DU-50 spektrofotometru (Fullerton, CA), Hoefler® SE 260 elektroforetska jedinica (San Francisco, SAD), spektrofluorimetar Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan), CD spektrometar J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) i gasni hromatograf Shimazu GC 2014 (kyoto, Japan).

3.3. Uzorci seruma i plazme

Uzorci krvi od osoba obolelih od dijabetesa tip 2, koji su hospitalizovani zbog loše glikemijske kontrole ($HbA_{1c} > 8,0$) i zdravih volontera odgovarajućih godina i pola, skupljani su između 07:00 i 08:00^h nakon noćnog gladovanja. Serum je odvojen centrifugiranjem nakon koagulisanja krvi na sobnoj temperaturi. Plazma je odvojena centrifugiranjem (4000 g, 10 min) pune krvi neposredno posle vađenja krvi. Plazma i serum upotrebljeni su odmah za izolovanje HSA i biohemijske analize. Serumi trudnica sa i bez preeklampsije su nakon izolovanja zamrznuti i čuvani na -80°C do analize.

3.4. Izolovanje HSA iz seruma i plazme

U literaturi su navedeni brojni postupci za izolovanje HSA iz seruma i plazme (Peters, 1996). Zbog definisanog cilja da primenjeni postupak izolovanja HSA bude što brži i jednostavniji, zbog potencijalne primene u kliničke svrhe, u ovom radu HSA je izolovan iz seruma i/ili plazme upotrebom afinitetne hromatografije ili taloženjem sa AS.

3.4.1. Izolovanje HSA iz seruma afinitetnom hromatografijom

Za izolovanje HSA iz seruma primenjena je afinitetna hromatografija sa Cibacron Blue Sepharose®6 Fast Flow ili Cibacron Blue Agarose F3-GA (Travis i sar, 1976).

Reagensi:

- 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 7,2
- 1,5 M NaCl u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2,
- 0,1 M natrijum-hidroksid
- 70 % etanol
- 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH 7,2, 20 % etanol

Postupak:

Kolona (4,3 × 0,8 cm) je napakovana matriksom sa Cibacron Blue bojom, isprana i ekvilibrisana sa deset zapremina kolone 20 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7,2 (početni pufer). Uzorak (1 ml) je nanet na kolonu i nevezani proteini sa kolone su eluirani sa 56 ml početnog pufera. Vezani proteini sa kolone su eluirani sa 40 ml početnog pufera, koji sadrži 1,5 M NaCl. Prvih 28 ml vezanih proteina je sakupljeno i koncentrovano ultrafiltracijom pomoću centrikona (Ultracel®-10K Millipore, USA). Da bi se uklonio NaCl, skoncentrovani HSA je dalje razblažen sa 0,1 M natrijum-fosfatim puferom pH 7,4 i ponovo skoncentrovan ultrafiltracijom. Izolovani HSA je upotrebljen za određivanje sadržaja HSA-SH grupa i za elektroforetska ispitivanja.

Za *in vitro* eksperimente, komercijalni HSA je prvo ispran od kaprilata ultrafiltracijom korišćenjem centrikona. Gore navedeni uslovi za izolovanje HSA su primenjeni za razdvajanje komercijalnog HSA na vezanu i nevezanu frakciju, što je prvih 36 ml sa kojim se eluira nevezana frakcija sakupljeno, ultrafiltracijom skoncentrovano i upotrebljeno za analizu.

Čvrsto vezani proteini sa kolone su uklonjeni postupkom čišćenja i regeneracije kolone. Kolona se prvo ispira sa 5 zapremina kolone 0,1 M natrijum-hidroksidom, a zatim sa 5 zapremina kolone 70 % etanolom, na kraju se kolona ekvilibriše sa 5 zapremina kolone 20 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7,2.

Kolona se čuva do 7 dana u 70 % etanolu (sterilizacija), a više od 7 dana u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2, koji sadrži 20 % etanol.

3.4.2. Izolovanje HSA iz seruma i plazme taloženjem sa amonijum-sulfatom (AS)

Različita rastvorljivost globulina i HSA u rastvorima različitih zasićenja AS (HSA je rastvoran u poluzasićenim rastvorima AS, dok se globulini talože), iskorišćena je za izolovanje HSA iz seruma i plazme.

Reagensi:

- Zasićeni rastvor amonijum-sulfata (ZAS) pripremljen je rastvaranjem čvrstog AS u ključaloj destilovanoj vodi. Kada se rastvor ohladi, procedi se i podesi mu se pH na 7,4 pomoću koncentrovanog amonijum-hidroksida.

Promena zasićenja u rastvoru AS pri dodavanju ZAS računa se po formuli: $Vol = (100 \cdot (S_2 - S_1)) / (1 - S_2)$. Vol je zapremina ZAS (ml) koju treba dodati u 100 ml rastvora zasićenja S_1 da bi se dobilo zasićenje S_2 .

Postupak:

HSA je iz seruma i/ili plazme izolovan taloženjem sa ZAS u dva koraka. U prvom koraku ZAS se pažljivo kap po kap dodaje u uzorak do zasićenja AS 54 %, uz neprestano mešanje na vorteksu. Staloženi globulini su odvojeni centrifugiranjem u toku 5 min na 4000 g (MiniSpin® centrifuga, Eppendorf). Supernatant u kome se nalazi HSA, iskorišćen je za drugi korak taloženja, u kome se izoluje HSA. U supernatant dodavan je u kapima ZAS do zasićenja AS 70 %, uz neprestano mešanje na vorteksu. Staloženi HSA je uklonjen centrifugiranjem u toku 10 min na 6000 g. Supernatant je uklonjen, a talog HSA je rastvoren u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,4. Da bi se eliminisao AS, rastvor HSA je dodatno razblažen sa 5 ml istog pufera i koncentrovan ultrafiltracijom pomoću centrikona. Izolovani HSA je upotrebljen za dalje analize

Komercijalni HSA sa različitim sadržajem HSA-SH grupa je podvrgnut gore opisanoj proceduri taloženji sa AS-om.

3.5 Metode

3.5.1 Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina su korišćene biuretska metoda (ukupni proteini) i metoda sa brom-krezol zelenim (BKZ) reagensom.

3.5.1.1. Određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom

Za određivanje koncentracije HSA u serumu i plazmi upotrebljena je standardna metoda koja se koristi u kliničkim laboratorijma (Dumas i sar., 1997).

Reagensi:

- HSA liquicolor kit sa 3',3'',5',5''-tetrabrom-m-krezolsulfonftaleinom (BKZ) je nabavljen od Human (Wiesbaden, Nemačka).

Postupak:

U epruveti je pomešano 10 µl uzorka i 1 ml reagensa. Nakon 5 min inkubiranja na 25 °C izmerena je apsorbanca na 578 nm prema slepoj probi reagensa. Dobijena apsorbanca je korigovana za slepu probu uzorka. Koncentracija HSA je određena pomoću standardne prave ($y=0,0155x + 0,028$, $r=0,993$) pripremljene od komercijalnog HSA (od 1 do 100 g/l). Sva određivanja su urađena u triplicatu. Za izražavanje koncentracije HSA u serumu (mM) uzeta je molekulska masa HSA 66468 Da.

3.5.1.2. Određivanje koncentracije proteina Biuretskim reagensom

Koncentracija ukupnih proteina u pojedinim fazama izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom ili taloženjem sa AS, određena je Biuretskim reagensom (Kingsley, 1939).

Reagensi:

- Biuretski reagens (zasebno rastvoriti 4,5 g kalijum-natrijum-tartarata, 4 g natrijum-hidroksida, 1,5 g bakar-sulfata pentahidrata, 2,5 g kalijum-jodida i nakon mešanja rastvora dopuniti ddH₂O do 500 ml).

Postupak:

U epruveti je pomešano 20 μ l uzorka i 1 ml reagensa. Nakon 30 minuta inkubiranja na 25 °C izmerena je apsorbanca na 546 nm prema slepoj probi reagensa. Dobijena apsorbanca je korigovana za slepu probu uzorka. Koncentracija HSA je određena pomoću standardne prave ($y=0,00517x + 0,00294$) pripremljene od komercijalnog HSA (od 1 do 100 g/l). Sva određivanja su urađena u triplikatu.

3.5.2. Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom

Sadržaj ukupnih tiola seruma (proteinskih i neproteinskih) i HSA-SH grupa u izolovanom HSA određen je spektrofotometrijski modifikovanom Ellmanovom metodom (Bulaj i sar., 1998).

Reagensi:

- 1 M Tris pH 8
- 2 mM 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB) reagens: 7,92 mg DTNB, 68 mg natrijum-acetata i ddH₂O do 10 ml):
- 0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4

Postupak:

U epruveti je pomešana ista zapremina (100 μ l) uzorka, 1 M Tris pufera (pH 8) i DTNB reagensa, a zatim je dodata ddH₂O do 1 ml. Nakon inkubiranja 30 min na 25 °C, merena je apsorbanca na 412 nm prema slepoj probi reagensa. Dobijena apsorbanca je korigovana za apsorbancu uzorka. Koncentracija tiola je određena na osnovu standardne prave ($y=0.00136x-0.00935$, $r=0.999$) snimljene sa rastvorima Cys (koncentracije od 0,001 do 1 mM). Vrednosti sadržaja tiola u serumu su izražene u mmol/l, a sadržaj HSA-SH grupa u mol-SH/mol HSA. Sva određivanja su urađena u triplikatu.

3.5.3. Određivanje konstante brzine pseudo prvog reda

Za praćenje kinetike reakcije između DTNB-a i HSA-SH grupa, odnosno za određivanje konstante brzine pseudo prvog reda, molarni odnos komercijalnog HSA ili izolovanog HSA iz seruma zdravih osoba i pacijenata i DTNB-a bio je 1:50.

Reagensi:

- 1 M Tris pH 8

- 5 mM DTNB reagens: 19,8 mg DTNB, 170 mg natrijum-acetata i ddH₂O do 10 ml):
- 0,1M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4

Postupak:

Pre određivanja reakcionih brzina, svi reagensi i uzorci su prethodno preinkubirani 5 min na 37°C. U epruveti je pomešana ista zapremina (100 µl) uzorka HSA (0,1mM) i 1 M Tris pufera (pH 8) sa 700 µl ddH₂O. Nakon toga je u reakcionu smešu dodato 100 µl 5mM DTNB reagensa i odmah po mešanju u intervalima od 10 s merena je apsorbancija prema slepoj probi reagensa na 37°C do završetka reakcije. Linearizovanjem logaritma sadržaja HSA-SH grupa u funkciji vremena dobija se prava linija čiji nagib predstavlja negativnu vrednost konstante brzine pseudo prvog reda (k) za reakciju HSA-SH grupa sa DTNB-om.

3.5.4. Biohemijske analize

Sadržaj triglicerida u serumu određen je enzimskom metodom korišćenjem komercijalnog kita za određivanje triglicerida (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Sadržaj HbA_{1c} frakcije je određen HPLC metodom.

3.6. Elektroforetske tehnike

Za praćenje postupka izolovanja HSA iz seruma (afinitetnom hromatografijom ili taloženjem sa AS-om) i za određivanje čistoće izolovanog HSA korišćena je nativna i SDS elektroforeza.

3.6.1. Nativna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (nativna PAGE)

U ovom radu su upotrebljeni sledeći osnovni rastvori za elektroforezu:

1. Monomerni rastvor za razdvajajući gel (40 % akrilamid, 5 % bisakrilamid): 38 g akrilamida, 2 g bisakrilamida i ddH₂O do 100 ml.
2. Monomerni rastvor za koncentrujući gel (6,25 % akrilamid, 20 % bisakrilamid): 5 g akrilamida, 2 g bisakrilamida i ddH₂O do 100 ml.
3. Pufer za razdvajajući gel (947 mM Tris, pH 8,48): 11,47 g Tris-a, 1M HCl 28,9 ml i ddH₂O do 100 ml, sa 1 M HCl podesiti pH na 8,48. Oznaka u tabeli je Tris pH 8,48.

4. Pufer za koncentrujući gel (158 mM Tris, pH 6,90): 1,92 g Tris-a, 1N H₃PO₄ 25,6 ml i ddH₂O do 100 ml, sa 1N H₃PO₄ podesiti pH na 6,90. Oznaka u tabeli je Tris pH 6,90.
5. Inicijator 10 % (w/v) APS: 0,2 g APS i ddH₂O do 10 ml. Oznaka ovog rastvora u tabeli je APS.
6. Rastvor za nadslojavanje (n-butanol zasićen vodom): n-butanol 10 ml i ddH₂O do stabilnog donjeg sloja. Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje, koristi se gornji sloj.
7. Pufer za pripremu uzoraka (PUZ 5x koncentrat)

0,5 M Tris HCl pH 6,8	1,2 ml
Glicerol 98 %	5,0 ml
0,1 % bromfenol-plavo (BFP)	1,0 ml
dd H₂O do	10 ml

8. Donji pufer za elektroforezu (63 mM Tris, pH 7,47): 22,7 g Tris, 1N HCl 150 ml i ddH₂O do 3 l.
9. Gornji pufer za elektroforezu (37,6 mM Tris, 40 mM glicin, pH 8,89): 4,56 g Tris, 3,0 g glicina i ddH₂O do 1 l.
10. Rastvor za fiksiranje i bojenje (0,1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 0,2 g CBB G-250, 100 ml metanola, 20 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 200 ml.
11. Rastvor za obezbojavanje I (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 500 ml metanola, 100 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 1 l.
12. Rastvor za obezbojavanje II (5 % metanol, 7 % sirćetna kiselina): 50 ml metanola, 70 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 1 l.

Poliakrilamidni gelovi su pripremljeni mešanjem rastvora prikazanih u Tabeli 3.

Tabela 3. Priprema poliakrilamidnog gela za nativnu PAGE.

	Razdvajajući gel		Koncentrujući gel
	(9 %)	(10 %)	(4 %)
Monomerni rastvor 1.	2,25 ml	2,50 ml	
Monomerni rastvor 2.			2 ml
Tris pH 8,48	2,5 ml	2,5 ml	
Tris pH 6,90			1 ml
H₂O	5,25 ml	5,0 ml	0,75 ml
APS	100 µl	100 µl	75 µl
Dezaeracija 5 - 10 min			
TEMED	7 µl	7 µl	5 µl

Uzorci su pripremljeni tako da koncentracija proteina u svakom uzorku iznosi 5 mg/ml, mešanjem sa PUZ-om i 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4. Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu: 80 V do ulaska BFP u gel za razdvajanje i 180 V dok BFP ne dođe do 0,5 cm od ivice gela.

3.6.2 SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS PAGE)

SDS PAGE je rađena po originalnoj Laemmli-jevoj proceduri (Laemmli, 1970). U ovom radu su upotrebljeni sledeći osnovni rastvori za SDS elektroforezu:

1. Monomerni rastvor (30 % akrilamid, 2,7 % bisakrilamid u odnosu na akrilamid): 14,6 g akrilamida, 0,4 g bisakrilamida i ddH₂O do 50 ml.
2. Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris pH 8,8): 4,54 g Tris-a i ddH₂O do 25 ml, sa 1M HCl podesiti pH na 8,8. Oznaka u tabeli je Tris pH 8,8.
3. Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris pH 6,8): 1,5 g Tris-a i ddH₂O do 25 ml, sa 1M HCl podesiti pH na 6,8. Oznaka u tabeli je Tris pH 6,8.
4. Inicijator 10 % (w/v) APS: 0,2 g APS i ddH₂O do 10 ml. Oznaka ovog rastvora u tabeli je APS.

5. Rastvor za nadslojevanje (n-butanol zasićen vodom): n-butanol 10 ml i ddH₂O do stabilnog donjeg sloja. Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje, koristi se gornji sloj.
6. Pufer za pripremu uzoraka (PUZ 5x koncentrat) (0,06 M Tris pH 6,8; 25 % glicerol; 2 % SDS; 0,0144 M β-merkaptotanol (β-ME); 0,1 % BFP;)

Reagens	Zapremina (ml)
0,5 M Tris pH 6,8	1,2
99 % Glicerol	5,0
10 % SDS	2,0
0,1 % BFP	1
Komercijalni β-ME	0,5
dd H₂O do	10

7. Pufer za elektroforezu (0,0025 M Tris pH 8,3; 0,192 M glicin; 0,1 % SDS): 3 g Tris-a, 14,4 g glicina, 10 ml 10 % SDS-a i ddH₂O do 1 l.
8. Rastvor za fiksiranje i bojenje (0,1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 0,2 g CBB G-250, 100 ml metanola, 20 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 200 ml.
9. Rastvor za obezbojavanje I (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina): 500 ml metanola, 100 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 1 l.
10. Rastvor za obezbojavanje II (5 % metanol, 7 % sirćetna kiselina): 50 ml metanola, 70 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 1 l.

Uzorci su pripremljeni tako da koncentracija proteina u svakom uzorku iznosi 5 mg/ml, mešanjem sa PUZ-om i 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4. Pre nanošenja u bunare, uzorci su prokuvani 5 min na 95°C i vorteksirani posle kuvanja. Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu: 80 V do ulaska BFP u gel za razdvajanje i 180 V dok BFP ne dođe do 0,5 cm od ivice gela.

Poliakrilamidni gelovi su pripremljeni mešanjem rastvora prikazanih u Tabeli 4.

Tabela 4. Priprema poliakrilamidnog gela za SDS PAGE.

	Razdvajajući gel (12 %)	Koncentrujući gel (4 %)
Monomerni rastvor	4,0 ml	0,665 ml
Tris pH 8,8	2,5 ml	-
Tris pH 6,8	-	1,25 ml
SDS (10%)	110 µl	50 µl
H₂O	3,3 ml	3 ml
APS	100 µl	100 µl
	Dezaeracija 5 - 10 min	
TEMED	7 µl	6 µl

3.6.3. Izoelektrofokuseranje (IEF)

U ovom radu su upotrebljeni sledeći osnovni rastvori za IEF:

1. Poliakrilamidni gel (5 %, 15 ml) je pripremljen mešanjem sledećih rastvora:

Reagens	Zapremina
30 % akrilamid	3,75 ml
Amfoliti	1,2 ml
ddH₂O	9,9 ml
TEMED	15 µl
APS	100 µl

2. Katodni rastvor (0,05 M NaOH): 0,2 g NaOH i ddH₂O do 100 ml. Deaerisanje 15 min.
3. Anodni rastvor (0,025 M H₂SO₄): 0,14 ml konc. H₂SO₄ i ddH₂O do 100 ml.
4. Rastvor za fiksiranje (10 % TCA): 20 g TCA i ddH₂O do 200 ml.

5. Rastvor za ekvibraciju (25 % metanol, 5 % sirćetna kiselina): 250 ml metanola, 50 ml sirćetne kiseline i ddH₂O do 1 l.
6. Rastvor za bojenje (0,1 % CBB R-250): 0,1 g CBB R-250 u 100 ml rastvora 5.

Gel se pripremi kao i ostali poliakrilamidni gelovi, nalije se između ploča dimenzija 8 x 13 cm, debljine 1 mm. 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 postavljaju paralelno. IEF traje 1 h i 45 min pri uslovima: maksimalna jačina struje 50 mA, maksimalni napon 2000 V i maksimalna snaga 10 W. Nakon završenog IEF-a, gel se pažljivo skloni sa staklene ploče, ispere vodom, fiksira, ekvilibriše, boji i obezbojava rastvorom za ekvilibrisanje.

3.7. *Imunoblot*

Vezivanje antitela IgG prema HSA ispitano je imunoblotom.

3.7.1. *Transfer proteina na membranu (western blot)*

Proteini (HSA) iz gela nakon native i SDS elektroforeze su prebačeni na nitrocelulozu (NC) membranu pod dejstvom električne struje jačine 0,8 mA/cm² gela u sendviču od 6 slojeva filter papira odgovarajućih dimenzija (dimenzije filter papira moraju tačno da odgovaraju dimenzijama gela koji se blotuje). NC membrana se postavlja prema anodi. Semi-dry uslovi podrazumevaju da sendvič mora da bude dobro očeđen od pufera za blot. Elektrotransfer traje 90 minuta. Trake se vizualizuju sa Ponceau-S.

Pufer za blot Tris pH 8,3: 2,9 g Tris-a, 1,45 g glicina, 100 ml metanola i ddH₂O do 500 ml.

3.7.2. *Detekcija HSA na membrani*

U ovom eksperimentu korišćeni su sledeći rastvori:

1. TBS (0,03 M Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,8).
2. T-TBS (0,05 % Tween-20 u TBS-u).
3. Rastvor za blokiranje (0,5 % želatin u T-TBS).
4. Rastvor primarnog antitela (zečije IgG anti-HSA poliklonsko antitelo je 10000 x razblaženo sa rastvorom 3).

5. Rastvor sekundarnog antitela (kozije anti-zečije IgG antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom je 80000 x razblaženo sa rastvorom 3.).
6. Precipitirajući supstrat alkalne fosfataze, BCIP/NBT (30 mg NTB-a rastvoriti u 600 μ l 70 % dimetil-formamida i 17,1 mg BCIP-a rastvoriti u 340 μ l 100 % dimetil-formamida. 66 μ l rastvora NTB-a i 33 μ l rastvora BCIP-a dodati u 10 ml pufera za supstrat, procediti i iskoristiti u roku od 1 h).
7. Pufer za supstrat: 1,21 g Tris-a, 10 mg $MgCl_2 \cdot 5H_2O$, ddH₂O do 10 ml.

Postupak

1. Hidratacija membrane i ispiranje Ponceau-S (1x ddH₂O i 1x T-TBS, 5 min).
2. Blokiranje membrane sa rastvorom 3 (1 h na šejkeru na 25°C).
3. Odliti rastvor 3 i naliti primarno antitelo u rastvoru 3 (1 h na šejkeru na 25°C).
4. Ispiranje sa T-TBS-om (3 x 10 min).
5. Sekundarno antitelo u rastvoru 3 (1 h na šejkeru na 25°C).
6. Ispiranje sa T-TBS-om (3 x 10 min) i TBS-om (1 x 10 min).
7. Ispiranje sa puferom za supstrat (1 x 5min).
8. Vizualizacija sa rastvorom 6 uz mešanje, reakcija se prekida sa ddH₂O.
9. Sušenje NC traka između slojeva filter papira i skeniranje.

3.8. Priprema uzoraka komercijalnog HSA

Za svrhe nekih eksperimenata bilo je potrebno komercijalni rastvor HSA redukovati, odmastiti i kontrolisano zamastiti.

3.8.1. Redukcija komercijalnog HSA

Komercijalni HSA sadrži oko 0,4 mol-SH/mol HSA, tako da je za potrebe eksperimenata u kojima je sadržaj HSA-SH grupa trebao biti viši od 0,4 mol-SH/mol HSA, komercijalni HSA redukovan sa ditioneitolom (DTT),.

Postupak

1. Pre redukcije, određen je tačan sadržaj HSA-SH grupa u komercijalnom HSA.
2. Ogovarajuća količina HSA (2 ml, 200 g/l) je mešana sa DTT u molarnom odnosu 1:1 (molarni odnos oksidovanih tiol grupa u HSA : DTT), 1 h na 37°C u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu, pH 7.4.

3. Ultrafiltracijom korišćenjem centrikona (Ultracel®-30K centrikon, Millipore, USA) višak DTT je uklonjen sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 iz rastvora redukovanog HSA,.
4. Redukovani HSA je skoncentrovan do koncentracije oko 100 g/l.
5. Nakon redukcije sadržaj HSA-SH grupa u redukovanom HSA je bio oko 0,96 mol-SH/ mol HSA.
6. HSA pripremljen na ovaj način je korišćen za pripremanje uzoraka sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,4 do 0,8 mol-SH/mol HSA.

3.8.2. Odmašćivanje uzorka HSA

Komercijalni rastvor HSA sadrži vezane Mk, za potrebe eksperimenata u kojima je korišćen odmašćeni HSA, Mk su uklonjene tretiranjem komercijalnog HSA aktivnim ugljem (Chen, 1967).

Postupak

1. Komercijalni HSA (200 g/l, 10 ml) razblažiti 2 puta sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4.
2. U razblaženi rastvor HSA, uz mešanje dodati 1,0 g aktivnog uglja i pomoću 3 M HCl podesiti pH rastvora na 3.
3. Ostaviti zakišeljani rastvor da se meša na ledu 1 h, a potom ukloniti aktivni uglj centrifugiranjem 15 min na 6000 g.
4. U odvojenom supernatant pomoću 1 M NaOH podesiti pH na 7.
5. Ultrafiltracijom isprati rastvor odmašćenog HSA sa 10 puta većom zapreminom 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,4. Nakon ispiranja rastvor HSA skoncentrovati do koncentracije oko 100 g/l.

3.8.3. Zamašćivanje uzorka HSA

Zamašćivanje se izvodi tretiranjem odmašćenog redukovano ili neredukovanog komercijalnog HSA sa zasićenim rastvorima Mk u metanolu (50 mM).

Postupak

1. Odrediti koncentraciju HSA u rastvoru odmašćenog HSA. Rastvor odmašćenog HSA razblažiti 0,1 M natrijum fosfatnim puferom pH 7,4 do željene koncentracije (mM) i prema njoj izračunati potrebnu količinu štoka rastvora Mk (50 mM) koju je potrebno dodati da bi molarni odnos Mk/HSA bio od 1:1 do 1:6.
2. Iz izmerene potrebne količine štoka rastvora Mk, prvo je organski rastvarač isparen pod stujom azota, a zatim je dodat rastvor odmašćenog HSA. Smeša je inkubirana do 90 min u vodenom kupatilu na 37 °C.
3. Nakon inkubacije, rastvor zamašćenog HSA je upotrebljen za snimanje fluorescentnih i CD spektara, određivanje konstanti brzina psudo prvog reda za reakciju HSA-SH grupe i DTNB-a i za razdvajanje komercijalnog HSA na vezanu i nevezanu frakciju na koloni Cibacron blue.

3.8.4. Pripremanje uzoraka HSA određenog sadržaja HSA-SH grupa

Nakon postupka odmašćivanja i/ili redukcije komercijalnog HSA određen je sadržaj HSA-SH grupa. Za potrebe eksperimenata u kojima je sadržaj HSA-SH grupa trebao biti viši od 0,4 mol-SH/mol HSA, pripremljeni su uzorci HSA na sledeći način:

- od komercijalnog HSA koji je redukovano i neredukovano pripremljene su smeše sa sadržajem HSA-SH grupa 0,4; 0,5; 0,6 i 0,8 mol-SH/mol HSA.
- od odmašćenog komercijalnog HSA koji je redukovano i neredukovano pripremljene su smeše sa sadržajem HSA-SH grupa 0,4; 0,5; 0,6 i 0,8 mol-SH/mol HSA.
- od kontrolisano zamašćenog komercijalnog HSA sa stearinskom kiselinom u odnosu Mk/HSA 4:1 koji je redukovano i neredukovano pripremljene su smeše sa sadržajem HSA-SH grupa 0,4; 0,5; 0,6 i 0,8 mol-SH/mol HSA.

3.9. Spektroskopske metode

Za ispitivanje uticaja vezivanja Mk za HSA na promenu konformacije molekula HSA korišćena je fluorescentna i CD spektroskopija.

3.9.1. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentni spektri su snimljeni na spektrofluorimetru Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan). Emisioni spektar rastvora HSA (2 μ M) je snimljen od 300 do 450 nm, nakon ekscitacije na 295 nm. Finalni spektri su predstavljani kao srednja vrednost dva skeniranja u kvarcnoj kiveti dužine puta 1 cm, uz širinu slit-a (3 nm) i korekciju dobijenog spektra za spektar slepe probe (0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4).

3.9.2. Cirkularni dihroizam (CD)

CD spektri su snimljeni na J-815 spektrometru (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Za snimanje spektara pripremljeni su rastvori odmašćenog HSA (1 mg/ml) u 0,01 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,4 (kontrola) i smeša HSA i Mk (miristinske, stearinske i oleinske kiseline) u molarnom odnosu 1:4. Far-UV CD spektri (od 185 do 250 nm) su snimljeni pri sledećim uslovima: dužina puta kivete 0,01 cm, temperatura 25 °C, očitavanja u 0.1 nm intervalima (50 nm/min) sa osetljivošću ± 200 mdeg. Near-UV CD spektri (od 260 do 320 nm) su snimljeni pri sledećim uslovima: dužina puta kivete 1 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 pufer.

3.10. Analiza profila Mk vezanih za HSA

3.10.1. Izolovanje Mk vezanih za HSA

Rastvor izolovanog HSA je mešan sa smešom hloroform:metanol (2:1) u zapreminskom odnosu 1:2 uz dodatak antioksidanta 2,6-di-terc-butil-4-metilfenola i internog standarda (Mk 13:0). Smeša je propuštena kroz kolonu anhidrovanog amonijum-sulfata, organska faza sa ekstahovanim Mk je sakupljena i uparena do suva u struji azota.

3.10.2. Pripremanje metil-estara Mk

Metil-estri izolovanih Mk su pripremljeni postupkom transmetilacije. U suvi ostatak izolovanih Mk dodat je 1 ml sumporne kiseline (1 M u metanolu) i termostatirano je 2 h na 85 °C. Nagrađeni metil-estri su ekstrahovani tri puta sa 0,5 ml heksana, a zatim je heksan uparen do suva u struji azota.

3.10.3. Analiza Mk gasnom hromatografijom (GC)

Analiza Mk GC sprovodi se posle njihovog prevođenja u nepolarne metil-estre. Za GC analizu zasićenih i nezasićenih Mk primenjuju se polarne kolone, kao što je polietilenglikol stacionarna faza (Carbowax-tipa), a za razdvajanje *cis* i *trans* izomera polinezasićenih Mk primenjuju se biscijanopropil-faze.

Mk su analizirane na gasnom hromatografu Shimazu GC 2014 (Kyoto, Japan) koji je opremljen sa plameno-jonizacionim detektorom i kapilarnom kolonom Restek-2380 (polietilenglikolna stacionarna faza), dimenzija 60 m i 0,20 mm ID. Uzorak ranije pripremljenih metil-estara Mk neposredno pre analize rastvoren je u 5 µl heksana i injektovan u kolonu. Protok nosećeg gasa (helijuma) je 11 ml/min. Protok vazduha sa zatvorenim MAKE UP-om je 500 ml/min, a vodonika 50 ml/min. Hromatograf je povezan sa kompjuterom koji putem programa Lab Solutions obrađuje podatke razdvajanja. Pojedinačne Mk su identifikovane upoređivanjem retencionog vremena uzorka sa retencionim vremenima standarda masnih kiselina (37 mix, Supelco). Kvantifikacija Mk je urađena upoređivanjem integraljenih površina pikova svih Mk sa površinom standarda (Mk 13:0) poznate koncentracije.

3.11. Obrada rezultata

Za obradu rezultata korišćen je program Origin Lab 8.0 (Origin Corporation, USA). Normalnost distribucije podataka je ispitana korišćenjem Shapiro-Wilk-ovog testa. Statističke analize su izvršene Studentovim t-testom (two i pair t-testom). Podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (S.D.) Odnosi između varijabli su ocenjivani Pirsonovom korelacionom analizom. Vrednosti $p < 0,05$ smatraju se statistički značajnim. Program ImageJ je korišćen za denzitometrijsku analizu gelova.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Definisane uslova za izolovanje HSA iz seruma i za određivanje sadržaja HSA-SH grupa

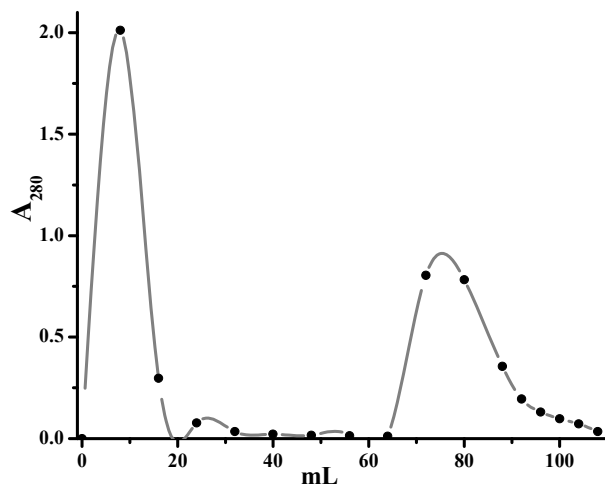
U velikom broju objavljenih naučnih radova izučavane su neenzimske modifikacije amino- i guanidino-grupa aminokiselinskih bočnih ostataka proteina seruma, u uslovima hiperglikemije, karbonilnog i/ili oksidativnog stresa. U poslednjih nekoliko godina fokus istraživanja je usmeren na modifikaciju -SH grupe najobilnijeg proteina seruma, HSA (Aćimović i sar. 2010). Iako se na površini HSA molekula nalazi samo jedna -SH grupa koja potiče od Cys34 (Anraku i sar., 2001), ova grupa zbog obilnosti HSA (Peters 1996) ima veliki značaj u odbrani od oksidativnog i/ili karbonilnog stresa. Stoga praćenje promene sadržaja HSA-SH grupe omogućava procenu stanja oksidativnog stresa (Himmelfarb i sar., 2001; Matsuyama i sar., 2009; Guerin-Dubourg i sar., 2012) i/ili karbonilnog stresa (Matsuyama i sar., 2009) u različitim patološkim stanjima.

4.1.1. Izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom

Za ispitivanje promena sadržaja HSA-SH grupe u različitim patološkim stanjima, neophodno je izolovati HSA iz seruma. Kako je afinitetna hromatografija sa Cibacron Blue Sepharose-om ili Agarose-om, često upotrebljavana za izolovanje HSA u kliničkim studijama (Faure i sar., 2008; Guerin-Dubourg i sar., 2012; Hage, 1999, Sereikaite, 2005), i u ovom radu je zbog brzine i jednostavnosti izolovanja izabrana ova metoda (metoda je opisana u poglavlju 3.4.1).

Tipičan elucioni hromatogram proteina dobijen afinitetnom hromatografijom iz seruma zdrave osobe, prikazan je na Slici 21. Na hromatogramu se uočavaju dva jasno odvojena pika. Prvi pik potiče od nevezanih proteina, koji su sa kolone eluirani sa 20 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7,2, a drugi pik koji se eluira sa 1,5 M NaCl u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2 potiče od vezanih proteina, tj. HSA. U svim narednim eksperimentima nevezani proteini eluirani su kao jedna frakcija zapremine od 56 ml. Pri izolovanju HSA sakupljane su prve četiri najkoncentrovanije frakcije eluirane sa 1,5 M NaCl u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2. U ovoj zapremini eluata eluira se oko 91 % ukupne količine HSA. U svim narednim eksperimentima izolovanja, HSA je eluiran sa kolone kao jedna frakcija zapremine 28 ml, koja je dalje koncentrovana. Ova zapremina je

izabrana i zbog činjenica da bi se daljim sakupljanjem eluata razblažile početne, koncentrovanije proteinske frakcije, produžilo vreme izolovanja i koncentrovanja HSA, što bi moglo doprineti oksidaciji tiol-grupa (uticaj na određivanje).



Slika 21. Tipičan hromatogram razdvajanja proteina seruma zdrave osobe na koloni napunjennoj Cibacron Blue 3G-Sepharose-om 6 Fast Flow

4.2. Pouzdanost metoda izolovanja HSA i kvantifikacije HSA-SH grupa

Definisani uslovi izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom iz prethodnog eksperimenta primenjeni su za izolovanje HSA iz uzoraka seruma zdravih osoba (n=10) i pacijenata obolelih od tipa 2 dijabetesa (n=10). Zbog oksidativnog i/ili karbonilnog stresa prisutnog u dijabetesu, izabrana je grupa dijabetičara, jer se kod njih očekuje manji sadržaj ukupnih tiola u serumu u odnosu na kontrolnu grupu. Pouzdanost metode (od izolovanja do kvantifikacije) proverena je određivanjem ukupnog sadržaja tiola (proteinskih i neproteinskih) u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabelama 5 i 6.

Tabela 5. Rezultati određivanja ukupnog sadržaja tiola u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa u HSA izolovanom afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue Sepharose-om (mol-SH/mol HSA) i njihovog doprinosa (%) ukupnom sadržaju tiola u serumu zdravih osoba (n=10).

	Serum HSA ^a		Ukupan sadržaj tiola u serumu (mmol/l)	Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA)	Doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola seruma	
	(g/l)	(mmol/l)			(mmol/l) ^b	(%)
1	53,5	0,805	0,539	0,777	0,625	111
2	52,2	0,786	0,493	0,671	0,528	107
3	50,6	0,760	0,385	0,640	0,486	126
4	46,8	0,705	0,328	0,495	0,349	106
5	48,7	0,733	0,305	0,453	0,332	106
6	50,2	0,756	0,330	0,493	0,373	113
7	47,4	0,714	0,391	0,660	0,471	120
8	53,2	0,801	0,459	0,736	0,589	128
9	61,1	0,920	0,452	0,597	0,549	121
10	53,7	0,808	0,302	0,441	0,356	118
X±σ			0,398 ± 0,084	0,596 ± 0,120	0,466 ± 0,107	116 ± 8

^aZa određivanje koncentracije HSA u serumu (mmol/l) korišćena je Mr HSA 66468 Da.

^bDoprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu izračunat je po sledećoj formuli: sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) * serum HSA (mmol/l)

Vrednosti sadržaja HSA u serumu nalaze u rasponu od 46,8 do 61,1 g/l kod zdravih osoba, a kod dijabetičara od 40,1 do 58,7 g/l. Srednja vrednost sadržaja HSA u serumu dijabetičara je malo niža u odnosu na zdrave osobe (50,6 ± 5,6; 51,7 ± 4,1 g/l, resp.) i nalazi se u granicama referentnih (normalnih) vrednosti (od 28 do 61 g/l), čime je zadovoljen kriterijum pri izbora obolelih od dijabetesa da nemaju razvijenu nefropatiju. Ukupan sadržaj tiola u serumu zdravih osoba nalazi se u rasponu od 0,302 do 0,539 mmol/l, a kod dijabetičara od 0,302 do 0,428 mmol/l. Srednja vrednost ukupnog sadržaja tiola u serumu zdravih osoba (0,398 ± 0,084 mmol/l) je malo viša u odnosu na grupu dijabetičara (0,376 ± 0,045 mmol/l). Odsustvo statistički značajne razlike u ukupnom sadržaju tiola u serumu između grupa moglo bi se objasniti malim brojem ispitanika u grupama. Sadržaj HSA-SH grupa kod zdravih osoba je u opsegu od 0,441 do 0,777 mol -SH/mol HSA, a kod

dijabetičara od 0,469 do 0,661 mol -SH/mol HSA. Srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupa su skoro identične u obe grupe ($0,596 \pm 0,120$; $0,599 \pm 0,061$ mol -SH/mol HSA, resp.).

Tabela 6. Rezultati određivanja ukupnog sadržaja tiola u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue Sepharose-om (mol-SH/mol HSA) i njihovog doprinosa (%) ukupnom sadržaju tiola u serumu obolelih od tipa 2 dijabetesa (n=10).

	Serum HSA ^a		Ukupan sadržaj tiola u serumu (mmol/l)	Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA)	Doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola	
	(g/l)	(mmol/l)			(mmol/l) ^b	(%)
1	55,3	0,832	0,401	0,641	0,533	133
2	47,4	0,714	0,391	0,661	0,472	121
3	52,0	0,783	0,424	0,603	0,472	111
4	40,1	0,603	0,311	0,653	0,393	127
5	53,7	0,808	0,398	0,607	0,49	123
6	55,0	0,828	0,428	0,645	0,534	125
7	58,7	0,884	0,366	0,469	0,415	113
8	47,9	0,721	0,342	0,528	0,381	111
9	51,3	0,772	0,402	0,613	0,473	118
10	44,3	0,666	0,302	0,569	0,379	125
X±σ			0,376±0,045	0,599±0,061	0,454±0,059	121±7

^aZa određivanje koncentracije HSA u serumu (mmol/l) korišćena je Mr HSA 66468 Da.

^bDoprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu izračunat je po sledećoj formuli: sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) * serum HSA (mmol/l)

Kada se izračunaju doprinosi HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu zdravih osoba, oni se nalaze u rasponu od 0,332 do 0,625 mmol/l, a kod dijabetičara od 0,379 do 0,534 mmol/l. Sve vrednosti doprinosa HSA-SH grupa (%) ukupnom sadržaju tiola u serumu su više u svim uzorcima u obe grupe (od 6 do 28 % kod zdravih osoba, odnosno od 11 do 33 % kod dijabetičara)(Tabele 5 i 6). Može se zaključiti da određivanje sadržaja HSA-SH grupa, kada se HSA izoluje afinitetnom hromatografijom, nije pouzdano. Iz ovog zaključka proistekao je sledeći zadatak, ispitivanje preciznosti i pouzdanosti metode izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom.

4.3. Validacija metoda izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom i određivanja sadržaja HSA-SH grupa

Tačnost i preciznost metode, od izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom do određivanja sadržaja HSA-SH grupa, ispitani su sa rastvorom komercijalnog HSA čiji je sadržaj HSA-SH odgovarao realnim uzorcima (0,4; 0,5 i 0,6 mol -SH/mol HSA). Izolovanje HSA i određivanje HSA-SH grupa urađeno je u triplicatu. Dobijene su vrednosti za relativnu standardnu devijaciju (RSD, preciznost metode) od 4,31 % do 5,90 % (Tabela 7). Srednje recovery vrednosti (tačnost metode) sadržaja HSA-SH grupa iznosile su od 113,6±6,7% do 130,1±6,4 % i slagale su se sa dobijenim vrednostima (%) za doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u realnim uzorcima (Tabele 5 i 6).

Zaključeno je da je metoda izolovanja HSA i određivanja -SH grupa precizna ali netačna, i da je to glavni razlog smanjene pouzdanosti određivanja sadržaja HSA-SH grupa nakon izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom.

Tabela 7. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA) u izolovanom HSA afinitetnom hromatografijom iz rastvora komercijalnog HSA (sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,4 do 0,6 mol -SH/mol HSA). Rezultati su dati kao srednja vrednost ± SD za tri ponovljena eksperimenta. Preciznost metode izražena je kao RSD.

Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA)		Recovery (%)	RSD (%)
Očekivani	Određeni		
0.40	0.520±0.025	130.1±6.4	4.81
0.50	0.649±0.028	129.9±5.6	4.31
0.60	0.682±0.040	113.6±6.7	5.90

Smanjenoj tačnosti metode određivanja sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA afinitetnom hromatografijom, odnosno povećanju doprinosa sadržaja HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu, mogli bi da doprinesu sledeći faktori:

- uslovi izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom,

- uticaj pufera za izolovanje HSA na određivanje sadržaja HSA sa BKZ reagensom ,
- pouzdanost određivanja sadržaja ukupnih tiola u serumu sa DTNB,
- čistoća izolovanog HSA,
- uticaj masnih kiselina (MK) vezanih za HSA na izolovanje HSA i reaktivnost HSA-SH grupe.

4.4. Ispitivanje uzroka koji dovode do povećanog doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu

4.4.1. Uslovi izolovanja HSA iz seruma afinitetnom hromatografijom

Ispitivanje zapremine uzorka seruma nanetog na kolonu

Prilikom definisanja uslova izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue-Sepharose-om, upotrebljeni su literaturni podaci za ovu metodu izolovanja HSA (primenjenu u kliničkim studijama (Faure i sar., 2008; Guerin-Dubourg i sar., 2012; Hage, 1999, Sereikaite, 2005)): zapremina seruma od 1 ml i zapremina matriksa od 2 ml. Kako se u ovoj zapremini seruma nalazi količina HSA koja prevazilazi kapacitet afinitetne kolone sa 2 ml matriksa, provereno je da li smanjenje zapremine (0,1; 0,2; 0,5 i 1 ml) uzorka seruma (sa ukupnim sadržajem tiola od 0,446 mmol/l) ima efekat na smanjenje doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu. Dobijene vrednosti doprinosa HSA-SH prikazane su u Tabeli 8.

Pri korišćenju zapremine od 0,1 i 0,2 ml seruma za izolovanje HSA, na kolonu je naneto 4,7 i 9,4 mg HSA, što je ispod kapaciteta kolone koju preporučuje proizvođač (18 mg HSA po ml/suvog matriksa, tj. za kolonu upotrebljenu u ovom radu (2 ml vlažnog matriksa) kapacitet kolone je od 9 do 12 mg HSA). Korišćenjem većih zapremine (0,5 i 1 ml) seruma za izolovanje HSA, na kolonu je naneto 23,5 i 47 mg HSA, što premašuje kapacitet kolone. Sa kolone je skinuto samo 28,7; 18; 11,6 i 14 % (resp.) od ukupne količine HSA koja je naneta na kolonu. Zaključeno je da bez obzira na upotrebljenu zapreminu (od 0,1 do 1 ml) seruma za izolovanje HSA ne postiže se zasićenost svih liganada molekulima HSA. Primenom afinitetne hromatografije iz seruma se izoluje od 10 do 30 % HSA molekula koji su naneti na kolonu.

Tabela 8. Rezultati određivanja sadržaja HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA) u izolovanom HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue Sepharose-om iz 0,1; 0,2; 0,5 i 1 ml uzorka seruma (ukupnog sadržaja tiola 0,446 mmol/l) i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu.

Serum			Kolona		Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA)	Doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola seruma	
(ml)	(g/l)	(mmol/l)	HSA ^a			(mmol/l) ^b	(%)
			Naneto (mg)	Izolovano (mg)			
0,1			4,7	1,35	0,848	0,599	134
0,2	47	0,707	9,4	1,7	0,808	0,571	128
0,5			23,5	2,7	0,805	0,569	127
1,0			47,0	6,6	0,667	0,471	106

^aZa određivanje koncentracije HSA u serumu (mmol/l) korišćena je Mr HSA 66468 Da.

^bDoprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu izračunat je po sledećoj formuli: sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) * serum HSA (mmol/l)

Sadržaj HSA-SH grupa u izolovanom HSA nalazi se u opsegu od 0,667 do 0,848 mol -SH/mol HSA, što dovodi da je doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu veći za 6 do 34 %. Kako je za zapreminu seruma od 1 ml dobijena najmanja razlika između doprinosa HSA-SH grupa i ukupnog sadržaja tiola u serumu, ova zapremina seruma odmeravana je u svim daljim izolovanjima HSA. Na osnovu svega može se zaključiti da:

- zapremina uzorka seruma upotrebljena za izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom nije uzrok većeg doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu,
- se pri izolovanju HSA afinitetnom hromatografijom molekuli HSA vezuju za Cibacron Blue različitim afinitetom, odnosno dolazi do selekcije molekula HSA koji se vezuju za kolonu.

Ispitivanje uticaja matriksa za koji je vezana Cibacron Blue boja na doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu

Na tržištu su u ponudi različiti afinitetni matriksi sa Cibacron Blue bojom. Kod svih matriksa boja Cibacron Blue je kovalentno vezana za umreženu agarozu, međutim oni se međusobno mogu razlikovati po stepenu umreženosti agaroze, ukupnom kapacitetu vezivanja HSA za matriks i optimalnom protoku pufera kroz kolonu napunjenu matriksom. U prethodnim eksperimentima upotrebljavan je matriks Cibacron Blue 3G-Sepharose 6 Fast Flow, koji omogućava brže protoke kroz kolonu. Na taj način skraćuje se vreme potrebno za izolovanje HSA i sprečava promena sadržaja HSA-SH grupe u toku izolovanja usled njihovog oksidovanja. Da bi se ispitao uticaj matriksa (umreženost i protok pufera kroz kolonu) na, u prethodnim poglavljima, istaknutu diskrepancu između sadržaja HSA-SH grupa i njihovog doprinosa ukupnim tiolima seruma, HSA je izolovan iz 15 uzoraka seruma (9 uzoraka zdravih osoba i 6 uzoraka dijabetičara) primenom Cibacron Blue 3G-Sepharose 6 Fast Flow i Cibacron Blue 3G Agarose Type 3000-CL (manji protok pufera kroz kolonu). Srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupa dobijene primenom oba matriksa nisu se statistički značajno razlikovale ($0,628 \pm 0,077$ mol -SH/mol HSA; $0,617 \pm 0,057$ mol-SH/mol HSA, resp.) (Tabela 9). Pair-sample t-test je, takođe, pokazao da ne postoji statistička značajna razlika između sadržaja HSA-SH grupa dobijenih za pojedinačne uzorke izolovane upotrebom navedenih matriksa. Zaključeno je da postojeće razlike umreženosti matriksa, protoka kroz kolonu i vremena izolovanja HSA ne dovode do utvrđenih promena sadržaja HSA-SH grupa.

Kada se izračuna doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola seruma, dobijen primenom oba matriksa dobijaju se vrednosti koje su više za 1 do 38 %. Dobijena srednja vrednost doprinosa HSA-SH grupa za matriks Cibacron Blue 3G-Sepharose 6 Fast Flow (122 ± 10 %) je gotovo jednaka vrednosti dobijenoj za Cibacron Blue 3G Agarose Type 3000-CL (120 ± 7 %). Dakle, karakteristike matriksa, kao što su umreženost i protok kroz kolonu, nemaju uticaja na uočenu diskrepancu između određenog sadržaja HSA-SH grupa i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu.

Tabela 9. Rezultati određivanja ukupnog sadržaja tiola u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA) u izolovanom HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue 3G-Sepharose 6 Fast Flow i sa Cibacron Blue 3G Agarose Type 3000-CL, i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu (%) za 15 uzoraka seruma.

	Serum HSA ^a	Ukupan sadržaj tiola seruma	Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/molHSA)		Doprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola seruma			
					Sepharose		Agarose	
	(mmol/l)	(mmol/l)	Sepharose	Agarose	(mmol/l) ^b	(%)	(mmol/l) ^b	(%)
1	0,920	0,452	0,681	0,610	0,626	138	0,561	124
2	0,808	0,302	0,450	0,441	0,364	120	0,356	118
3	0,819	0,438	0,693	0,672	0,568	130	0,550	126
4	0,844	0,459	0,703	0,660	0,593	130	0,557	121
5	0,835	0,499	0,717	0,651	0,599	120	0,544	109
6	0,831	0,427	0,532	0,600	0,442	103	0,499	117
7	0,850	0,451	0,671	0,659	0,570	126	0,560	124
8	0,832	0,477	0,672	0,633	0,559	117	0,527	110
9	0,765	0,408	0,658	0,614	0,503	123	0,470	115
10	0,783	0,424	0,674	0,603	0,528	124	0,472	111
11	0,832	0,401	0,578	0,641	0,481	120	0,533	132
12	0,772	0,401	0,527	0,600	0,407	101	0,463	115
13	0,666	0,302	0,615	0,569	0,410	136	0,379	125
14	0,603	0,311	0,652	0,654	0,393	126	0,394	127
15	0,828	0,428	0,594	0,645	0,492	115	0,534	125
X±σ			0,628±0,077	0,617±0,057		122±10		120±7

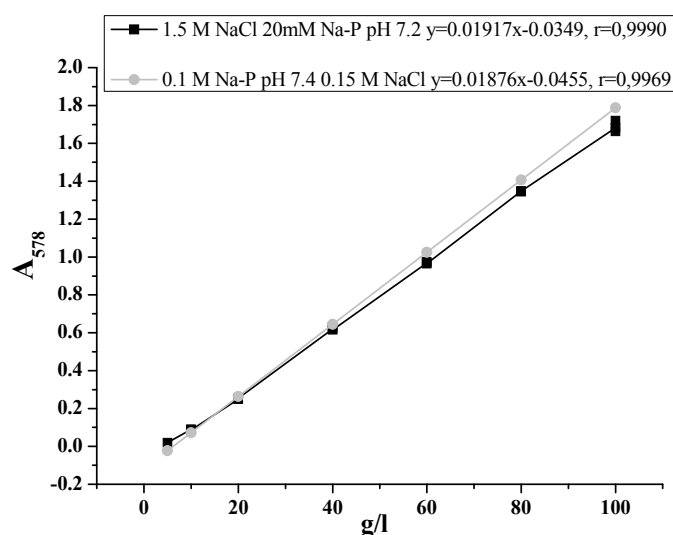
^aZa određivanje koncentracije HSA u serumu (mmol/l) korišćena je Mr HSA 66468 Da.

^bDoprinos HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu izračunat je po sledećoj formuli: sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) * serum HSA (mmol/l)

4.4.2. Uticaj pufera za izolovanje HSA na određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom

Za određivanje koncentracije HSA u serumu i u frakcijama HSA dobijenim afinitetnom hromatografijom primenjena je metoda sa BKZ reagensom. Metoda se zasniva na specifičnom vezivanju molekula HSA i boje, pri čemu dolazi do pomeranja položaja apsorpcionog maksimuma boje. Normalne vrednosti pH krvi nalaze se u opsegu od 7,35 do

7,45 (Butris, 2007) i veće su od pH vrednosti pufera upotrebljenog pri izolovanju HSA afinitetnom hromatografijom (0,02 M natrijum-fosfatnog pufera, pH 7,2, koji sadrži 1,5 M NaCl). Kako u literaturi nisu nađeni podaci o uticaju visoke jonske sile (1,5 M NaCl) i promene pH vrednosti, na vezivanje HSA za BKZ boju, u ovom delu rada ispitan je uticaj ovih faktora na određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom. Snimljene su standardne prave sa rastvorima komercijalnog HSA, pripremljenim sa puferima: 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom (pH 7,4) i 0,02 M natrijum-fosfatnim puferom (pH 7,2) koji sadrži 1,5 M NaCl (Slika 22).



Slika 22. Standardne prave snimljene upotrebom rastvora komercijalnog HSA (sa sadržajem proteina od 5 do 100 g/L), koji su pripremljeni u 0,02 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2, koji sadrži 1,5 M NaCl(—); i u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,4, koji sadrži 0,15 M NaCl (—)

Dobijene standardne prave se gotovo preklapaju u opsegu koncentracija HSA od 5 do 30 g/l. Pri većim koncentracijama HSA, porast jonske sile i smanjenje pH vrednosti dovodi do snižavanja vrednosti apsorbance na 578 nm u odnosu na standardnu pravu dobijenu sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom, pH 7,4. Da li se ova razlika nalazi u okviru analitičke greške, provereno je upoređivanjem koncentracija HSA dobijenih korišćenjem obe standardne prave. Tako, za vrednost apsorbance od 1,100 (koja bi odgovarala

koncentraciji HSA od 61 g/l, tj. gornjoj referentnoj vrednosti za zdrave osobe), vrednost koncentracije HSA određena pomoću standardne prave pripremljene sa 0,02 M natrijum-fosfatnim puferom, pH 7,2, 1,5 M NaCl bila bi za 3 % niža od određene vrednosti pomoću druge standardne prave. Dakle, prisustvo pufera za izolovanje u rastvorima HSA ne utiče na određivanje koncentracije HSA sa BKZ, pa samim tim ni na određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

4.4.3. Pouzdanost metode određivanja sadržaja ukupnih tiola u serumu spektrofotometrijskom metodom s DTNB-om kao reagensom

Zbog činjenice da serum predstavlja kompleksnu smešu proteina, malih molekula i jona, od kojih većina nije prisutna u rastvorima izolovanog HSA, ispitan je uticaj prisustva ovih supstanci na određivanje ukupnog sadržaja tiola u serumu spektrofotometrijskom metodom sa DTNB-om kao reagensom. Proveren je, takođe, i uticaj prisustva pufera za izolovanje (0,02 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,2, 1,5 M NaCl) u rastvorima HSA na određivanje ukupnog sadržaja tiola u serumu sa DTNB. Pouzdanost određivanja proverena je metodom standardnog dodatka. U pool seruma (koji sadrži 200 μ M tiol-grupa koje potiču od HSA, malih tiola i drugih proteina) dodate su različite količine tiol-grupa koje potiču samo od HSA (komercijalni HSA, 200 g/l, 96 % čistoće, koji sadrži 0,42 mol -SH/mol HSA, koji je razblažen sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4, ili 20 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7,2 1,5 M NaCl) ili je početni serum samo razblažen 1,5 puta sa navedenim puferima. Rezultati određivanja prikazani su u Tabeli 10.

Prisustvo proteina, malih molekula i jona u serumu ne utiče na pouzdanost određivanja sadržaja ukupnih tiola seruma sa DTNB-om. RSD vrednosti se nalaze u opsegu od 1,37 do 1,64 %, a recovery vrednosti u opsegu od 98,09 do 100,56 %, što pokazuje da je određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu sa DTNB-om precizno i tačno.

Prisustvo pufera za izolovanje (0,02 M natrijum-fosfatni pH 7,2, 1,5 M NaCl) u rastvorima HSA, takođe, ne utiče na pouzdanost određivanja ukupnog sadržaja tiola u serumu sa DTNB-om. Dobijene RSD i recovery vrednosti (1,74 i 1,13 %; 98,6 i 102,2 %, resp.) ne razlikuju se od vrednosti dobijenih sa 0,1 M natrijum-fosfatnm puferom pH 7,4 (1,55 i 1,60 %; 98,62 i 102,56 %, resp.). Dakle, spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu sa DTNB-om je precizno i tačno. Molekuli i joni supstanci prisutnih

u serumu, kao ni pufer u kojem se nalazi izolovani HSA, nisu uzrok većeg doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu.

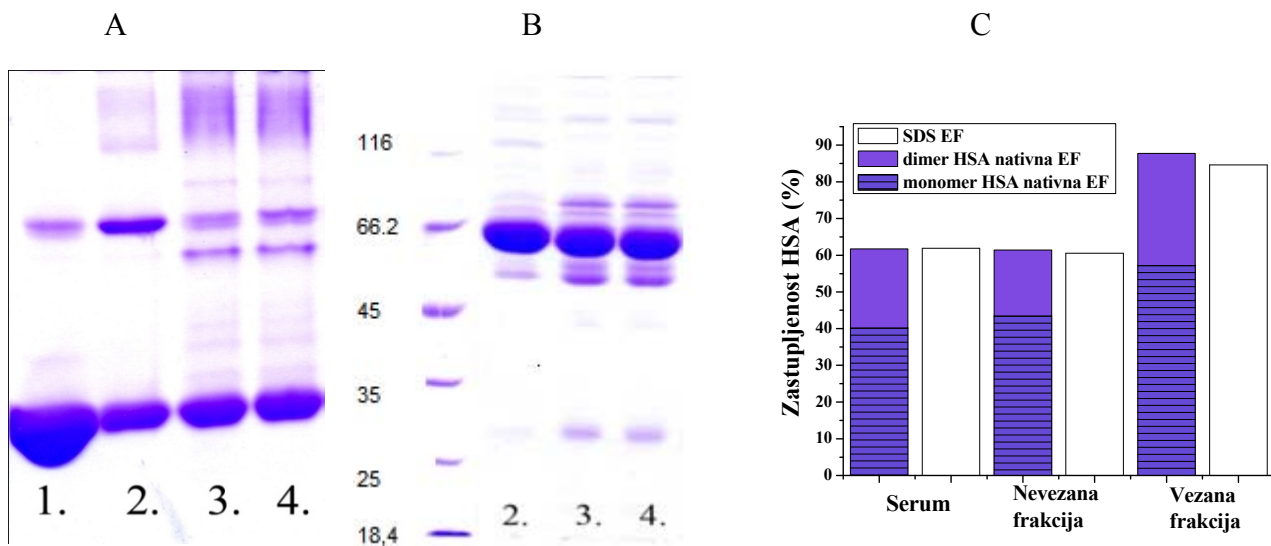
Tabela 10. Određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu (pool seruma koji sadrži 200 μM tiol-grupa koji potiču od HSA, malih tiola i drugih proteina): a) kome je dodat različit sadržaj tiol-grupa koje potiču od komercijalnog HSA rastvorenog u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferom pH 7,4 ili 0,02 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,2, 1,5 M NaCl; b) koji je razblažen 1,5 puta sa pomenutim puferima. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD za pet određivanja. Preciznost i tačnost određivanja izraženi su RSD i recovery vrednostima.

Sadržaj tiol-grupa serum+HSA u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,4 (μM)	Sadržaj tiol grupa (μM)		Srednja vrednost recovery (%)	RSD (%)
	Očekivani	Određeni		
200+105	305	300	98,62 \pm 1,53	1,55
		295		
		305		
		298		
		306		
200+190	390	384	100,56 \pm 1,64	1,64
		402		
		391		
		392		
		392		
200+250	450	433	98,09 \pm 1,35	1,37
		442		
		438		
		446		
		448		
Sadržaj tiol-grupa serum+HSA u 0,02 M Na-fosfatnom puferu pH 7,2, 1,5 M NaCl (μM)	Sadržaj tiol grupa (μM)		Srednja vrednost recovery (%)	RSD (%)
	Očekivani	Određeni		
200+115	315	305	98,60 \pm 1,72	1,74
		319		

Serum razblažen 1,5 puta sa puferom (μM)	Sadržaj tiol grupa (μM)		Srednja vrednost recovery (%)	RSD (%)
	Očekivani	Određeni		
0,1 M Na-fosfatnim puferom pH 7,4	200	312	102,56 \pm 1,64	1,60
		310		
		307		
		212		
		204		
0,02 M Na-fosfatnim puferom pH 7,2; 1,5 M NaCl	200	201	102,20 \pm 1,15	1,13
		207		
		204		
		202		
		205		
		206		
		202		

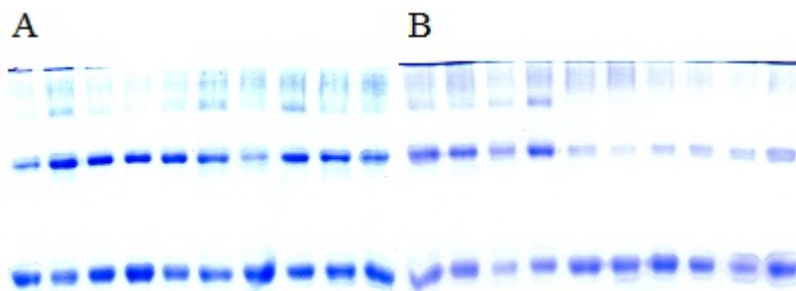
4.4.4. Stepen čistoće albumina izolovanog iz humanog seruma afinitetnom hromatografijom

Kako ukupnom sadržaju tiola u serumu pored HSA, doprinose i drugi proteini seruma i mali tioli u iznosu od 20 do 30 % (Prakash i Kumar, 2009), dobijena razlika između ukupnog sadržaja tiola u serumu i sadržaja HSA-SH grupa, ukazuje na još veću grešku pri izolovanju HSA afinitetnom hromatografijom. Cibacron Blue, pored HSA, vezuje i druge proteine seruma, kao što su γ -globulini (Zhang i Sun, 2001), fosfolipaza A₂ (Barden i sar., 1980), humani interferon α -2b (Bumeliene i sar., 2003), lizozim (He, 2002), laktat-dehidrogenaza (Bohacova i sar., 1998) i alkalna fosfataza (Kirchberger i sar., 1987). Oni se mogu eluirati sa kolone zajedno sa HSA, pa samim tim mogu smanjiti čistoću izolovanog HSA (Berglof i sar, 1983; Barsukov i sar., 2009), što može uticati na određivanje sadržaja HSA-SH grupa. Stoga su proteinski profili frakcije koja se vezala za Cibacron Blue boju (vezana frakcija), kao i frakcije koja se nije vezala (nevezana frakcija) ispitani nativnom i SDS PAG elektroforezom (Slika 23). Takođe je nativnom elektroforezom proverena čistoća HSA izolovanog afinitetnom hromatografijom iz seruma zdravih osoba (n=10) i dijabetičara (n=10) (Slika 24).



Slika 23. Nativna (A) i SDS (B) PAGE uzoraka: 1.- komercijalni HSA, 2.- frakcija vezana za Cibacron blue Sepharose, 3.-nevezana frakcija, 4.-serum.

Denzitometrijska analiza gelova (C) nakon nativne i SDS elektroforeze - procentualna zastupljenost HSA (monomera i dimera) u serumu, nevezanoj frakciji i frakciji vezanoj za Cibacron Blue-Sepharose.



Slika 24. Nativna PAGE izolovanog HSA afinitetnom hromatografijom iz 10 seruma zdravih osoba (A) i dijabetičara (B), na 9 % poliakrilamidnom gelu. Po traci je nanošeno 10 mg proteina koji su obojeni CBB-om.

Na Slici 23 (A i B) uočava se da proteinski profil (broj i intenzitet traka) u nevezanoj frakciji (linija 3) odgovara proteinskom profilu seruma (linija 4) iz koga se HSA izoluje. Ovo je očekivano jer se HSA izoluje iz 1 ml seruma u kome se nalazi količina HSA

koja premašuje kapacitet kolone. U vezanoj frakciji (linija 2) broj proteinskih traka je znatno manji. Pored dominantne HSA trake, u gornjem delu gela uočava se jedna traka koja je po intenzitetu jača od odgovarajuće trake iz seruma. Po pokretljivosti ona odgovara traci HSA- dimera iz komercijalnog HSA (linija 1, Slika 23A). Da se radi o dimeru potvrdila je denzitometrijska analiza (Slika 23C). Vidi se da postoji dobro slaganje između zbira procentualne zastupljenosti HSA monomera i dimera u nativnoj elektroforezi sa procentualnom zastupljenošću najintenzivnije trake u SDS elektroforezi u sve tri frakcije (serumu, nevezanoj i vezanoj frakciji) (razlika između određivanja iznosi od 0,2 do 3,6 %).

Elektroforegrami HSA, koji je izolovan iz seruma zdravih osoba i dijabetičara (Slika 24 A i B), pokazuju sličan obrazac prisustva proteinskih traka kao i u frakciji vezanoj za Cibacron Blue boju (Slika 23A, traka 2). Srednje vrednosti procentualnih zastupljenosti monomera i dimera u preparatima HSA izolovanim iz uzoraka zdravih osoba ($73,8 \pm 8,5$ %; $17,4 \pm 6,8$ %, resp.) statistički se ne razlikuju značajno od srednjih vrednosti dobijenih za HSA koji je izolovan iz uzoraka dijabetičara ($71,1 \pm 8,7$ %; $17,3 \pm 8,5$ %; resp.) (Tabela 11). Čistoća HSA koji je izolovan iz seruma zdravih osoba iznosila je $91,4 \pm 2,6$ %, a iz seruma dijabetičara $88,4 \pm 3,4$ %.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da afinitetna hromatografija sa Cibacron Blue kao ligandom nije pogodna metoda za izolovanje HSA zbog činjenica da:

- Cibacron Blue, pored HSA, vezuje i druge proteine koji mogu da dovedu do smanjenja čistoće izolovanog HSA;
- je odnos zastupljenosti HSA dimer / monomer u izolovanom HSA veći od ovog odnosa u serumu.

Nečistoće i povećanje zastupljenosti HSA-dimera u izolovanom preparatu HSA mogu dovesti do nesigurnosti pri određivanju sadržaja HSA-SH grupa, odnosno do nesigurnosti u proceni oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima.

Tabela 11. Procentualna zastupljenost HSA monomera i dimera, i čistoća preparata HSA, koji su izolovani afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue Sepharose-om iz seruma zdravih osoba i dijabetičara, dobijene na osnovu denzitometrijske analize gelova posle nativne PAGE.

	Zdrave osobe			Dijabetičari		
	Monomer (%)	Dimer (%)	Čistoća HSA (%)	Monomer (%)	Dimer (%)	Čistoća HSA (%)
1.	75,5	12,1	87,6	87,0	2,1	89,1
2.	69,3	20,8	90,1	63,6	21,5	85,1
3.	68,5	23,8	92,3	68,5	20,7	89,7
4.	74,7	19,0	93,7	82,0	11,7	93,7
5.	67,1	25,5	92,6	65,7	23,3	89,0
6.	78,0	17,0	95,0	65,9	24,0	89,9
7.	75,1	17,0	94,1	66,7	26,3	93,0
8.	67,0	24,3	91,3	73,6	9,6	83,2
9.	78,7	9,3	88,0	60,4	25,1	85,5
10.	81,8	3,0	84,8	77,8	8,4	86,2
X±σ	73,8±8,5	17,4±6,8	91,4±2,6	71,1±8,7	17,3±8,5	88,4±3,4

4.4.4.1. Uticaj proteina prisutnih u izolovanom HSA na određivanje sadržaja HSA-SH grupa

Da li prisustvo drugih proteina u HSA izolovanom iz seruma zdravih osoba i dijabetičara utiče na određivanje sadržaja HSA-SH grupa i tako dovodi do njihovog većeg doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu, provereno je nanošenjem na kolonu sa Cibacron Blue bojom komercijalnog HSA različitog sadržaja HSA-SH grupa (od 0,422 do 0,805 mol-SH/mol HSA). Komercijalni HSA je koršćen zbog sledećih razloga:

- čistoća 96 %, tako da je potencijalni doprinos prisutnih proteina na određivanje sadržaja HSA-SH grupa smanjen;

- izolovan je iz seruma zdravih osoba, pa bi po svojim karakteristikama (sadržajem Mk, jona i bilirubina) mogao biti sličan HSA izolovanom iz seruma zdravih osoba u ovome radu.

Na afinitetnu kolonu naneto je od 47 do 50,9 mg komercijalnog HSA, a sa kolone eluirano u vezanoj frakciji od 4,4 do 6,8 mg HSA (recovery izolovanog HSA je od 9 do 14 %) (Tabela 12). Količina HSA koja se vezala za kolonu je ispod kapaciteta kolone koju preporučuje proizvođač (za upotrebenu kolonu od 2 ml matriksa kapacitet vezivanja HSA iznosi od 9 do 12 mg). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim pri ispitivanju uticaja zapremine seruma, upotrebene za izolovanje HSA, na količinu HSA vezanog za kolonu (Tabela 8).

Tabela 12. Rezultati afinitetne hromatografije komercijalnog HSA, sa različitim sadržajem SH grupa na površini molekula.

HSA nanet na kolonu		HSA vezan za kolonu		Recovery (%)	
(mg)	(mol -SH/mol HSA)	(mg)	(mol -SH/mol HSA)	(mg)	(mol -SH/mol HSA)
48,0	0,422	5,8	0,575	12,1	136,3
49,1	0,522	4,4	0,682	9,0	130,6
47,0	0,631	6,6	0,667	14,0	105,7
50,9	0,805	6,8	0,922	13,4	114,5

Sadržaj HSA-SH grupa u izolovanom HSA (0,575, 0,682, 0,667, i 0,922 mol-SH/mol HSA) je u svim slučajevima veći u odnosu na sadržaj HSA-SH nanet na kolonu (0,422, 0,522, 0,631 i 0,805 mol -SH/mol HSA). Recovery vrednosti sadržaja HSA-SH grupa (od 105,7 do 136,6 %) premašuju sadržaj drugih proteina u komercijalnom HSA (koiji iznosi 4 %), a time i njihov potencijalni uticaj na određivanje sadržaja HSA-SH grupa. Na osnovu svega zaključeno je da:

- se afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue ligandom izoluju molekuli HSA koji imaju viši sadržaj HSA-SH grupa u odnosu na prosečni sadržaj HSA-SH grupa nanet na kolonu;

- proteini iz realnih uzoraka, prisutni u izolovanom HSA, nisu uzrok višeg sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA, jer se isti efekat dobija i sa komercijalnim HSA;
- svojstva nekih molekula HSA utiču na njihovu selekciju i vezivanje za Cibacron Blue boju i da su verovatno uzrok postojeće diskrepancije između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja ukupnih tiola u serumu.

4.5. Ispitivanje uticaja masnih kiselina vezanih za HSA na određivanje sadržaja HSA-SH grupa

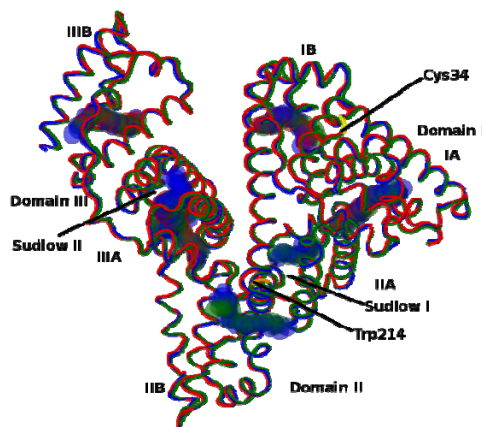
U prethodnom poglavlju zaključeno je da svojstva nekih molekula HSA utiču na njihovu selekciju i vezivanje za Cibacron Blue boju i da su verovatno uzrok postojeće diskrepancije između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja ukupnih tiola u serumu. HSA transportuje mnoge endogene ligande kao što su dugolančane Mk (C13 – C21), hem, bilirubin i tiroksin, koji se sa visokim afinitetom vezuju za HSA (Peters 1996). Pored ovih liganda HSA, takođe, vezuje i teške metale (Carter i Ho, 1994; Peters 1996; Vallee i Falchuk, 1993; Lau i Sarkar, 1979; Halliwell, 1988 Stewart 2003; Spector, 1986), kao i brojne egzogene ligande poput lekova (Kratochwil i sar., 2002). Kako je molekul HSA veoma fleksibilan i lako menja konformaciju, vezivanje jednog liganda može da utiče na vezivanje drugih liganda. S tim u vezi jedan od uzroka uočene diskrepancije mogao bi biti uticaj različitih molekula vezanih za HSA, a koje HSA transportuje, na konformacione promene molekula HSA i stoga na njegov afinitet za Cibacron Blue.

4.5.1. Uticaj vezivanja masnih kiselina za humani serum albumin na konformacione promene njegovih molekula

HSA je primarni transporter za dopremanje Mk do tkiva i poseduje najmanje sedam vezujućih mesta različitog afiniteta za Mk (Slika 25.) (Simard i sar., 2006). U realnim uzorcima, HSA vezuje različite Mk (u molarnom odnosu Mk/HSA od 0,1 do 6:1 (Spector, 1986; Bhattacharya i sar., 2000), koje mogu da dovedu do promene konformacije HSA molekula (Oettl i sar., 2008). Uticaj vezivanja različitih Mk za HSA na konformacione promene njegovih molekula ispitan je snimanjem fluorescentnog spektra komercijalnog HSA, koji je prethodno odmašćen (kontrola), i fluorescentnih spektara smeša odmašćenog

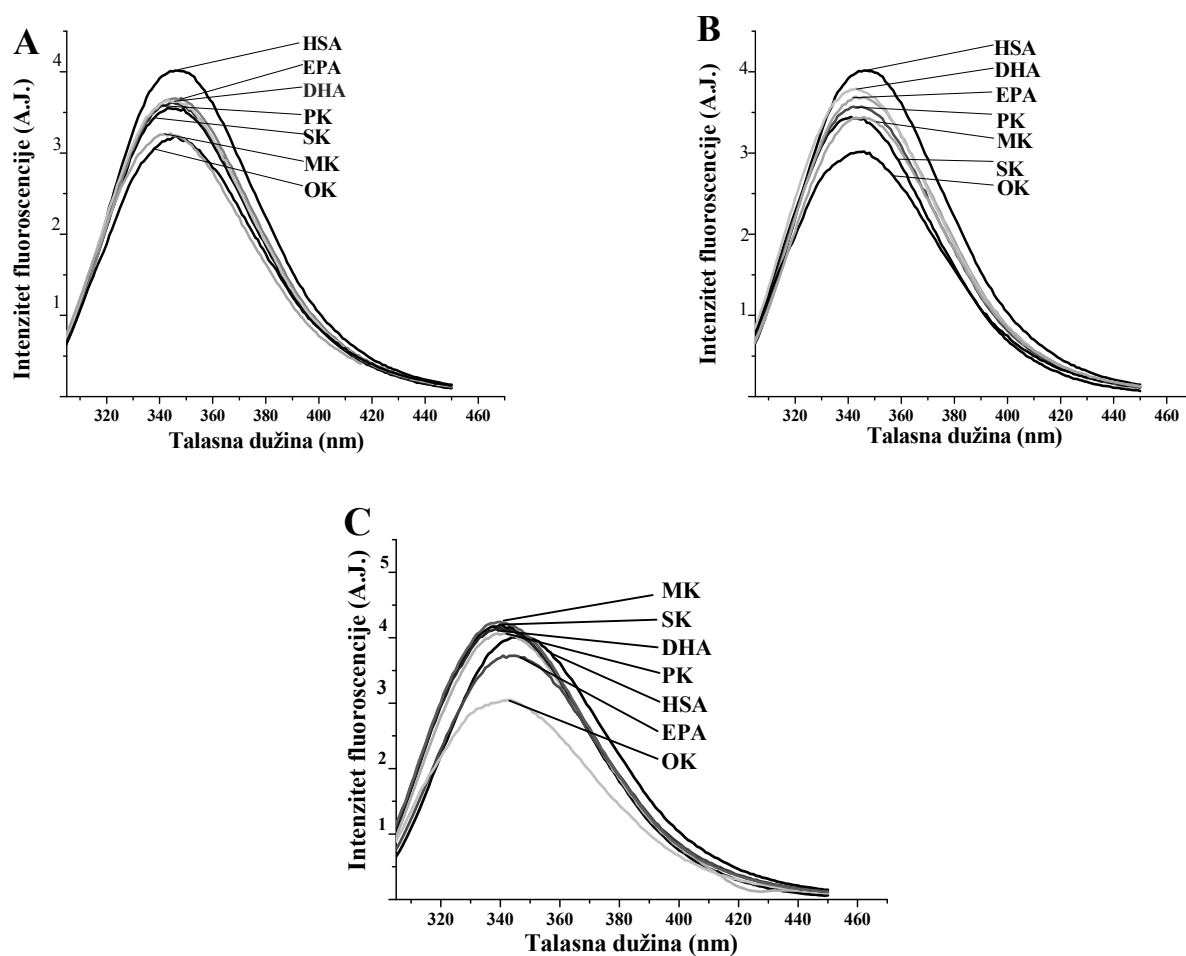
HSA i Mk (miristinske (MK), palmitinske (PK), stearinske (SK), oleinske (OK), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA)) pri odnosima 2:1; 4:1 i 6:1 (Slika 26).

Dobijeni emisijski fluorescentni spektri sa maksimumom emisije oko 350 nm su tipični za HSA (Gorinstein i sar., 2000) (Slika 26). Vezivanje svih ispitivanih Mk za HSA pri Mk/HSA odnosu 2:1 dovodi do smanjenja intenziteta pika u odnosu na odmašćeni HSA (Slika 26A). Najveći efekat na smanjenje intenziteta pika (oko 20 %) pokazuju miristinska i oleinska kiselina, dok stearinska, palmitinska, EPA i DHA dovode do smanjenja pika za samo 10%. Dalje povećanje Mk/HSA odnosa sa 2:1 na 4:1 (Slika 26B), takođe, dovodi do smanjenja intenziteta pika u odnosu na odmašćeni HSA pri vezivanju svih Mk za HSA. Efekat Mk na smanjenje maksimuma fluorescencije raste u nizu DHA, EPA, palmitinska, miristinska, stearinska kiselina i oleinska kiselina.



Slika 25. Preklopljene kristalne strukture HSA sa vezanim Mk: miristinskom (zelena), palmitinskom (crvena) i stearinskom kiselinom (plava). Slika je generisana u Jmol-u korišćenjem kristalnih struktura HSA-miristinske kiseline (PDB ID, 1bj5) (Curry i sar., 1999) HSA-palmitinske kiseline (PDB ID, 1e7h) (Bhattacharya i sar., 2000) i HSA-stearinske kiseline (PDB ID, 1e7i) (Bhattacharya i sar., 2000). Na slici su obeleženi domeni I, II i III sa odgovarajućim subdomenima (A i B).

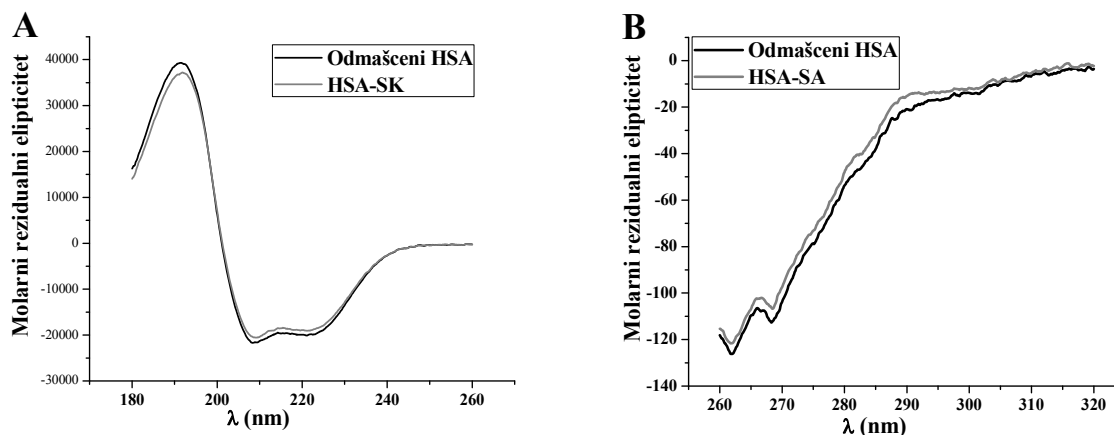
Pri Mk/HSA odnosu 6:1 dolazi do značajnih promena u izgledu fluorescentnih spektara (Slika 26C). Spektri HSA dobijeni posle vezivanja miristinske, stearinske, palmitinske i DHA se skoro preklapaju, sa intenzitetom pika koji je viši za oko 5 % u odnosu na odmašćeni HSA. EPA i oleinska kiselina dovode do smanjenja intenziteta pika u odnosu na odmašćeni HSA. Efekat EPA na smanjenje pika je potpuno isti pri sva tri odnosa Mk/HSA, dok je efekat oleinske kiseline pri odnosu 4:1 i 6:1 jednak i malo izraženiji u poređenju s odnosom 2:1.



Slika 26. Fluorescentni spektri odmašćenog HSA (kontrola) i smeša odmašćenog HSA i Mk (miristinske (MK), palmitinske (PK), stearinske (SK), oleinske (OK), eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) pri odnosima 2:1 (A); 4:1 (B) i 6:1 (C). Trp je ekscitovan na 295 nm.

Pored toga, utvrđeno je da vezivanje svih Mk za HSA dovodi do pomeranja maksimuma fluorescencije ka manjim talasnim dužinama i taj efekat je izraženiji s porastom Mk/HSA odnosa.

Sa ciljem da se ispita uticaj vezivanja Mk za HSA na promenu njegove sekundarne strukture i asimetričnosti u okruženju ostataka aromatičnih aminokiselina snimljeni su CD spektri (u dalekoj i bliskoj UV oblasti) odmašćenog i zamašćenog HSA (smeša HSA i miristinske, stearinske i oleinske kiseline u odnosu 1:4). Na CD spektru HSA (u dalekoj UV oblasti) (Slika 27A) uočavaju se dva minimuma na 208 i 222 nm, što je tipično za proteine koji u svojoj sekundarnoj strukturi imaju α -heliks (Manavalan i Johnson, 1983), kao što je HSA. CD spektar smeše HSA i stearinske kiseline (1:4), kao i spektri smeša HSA i miristinske, i HSA i oleinske kiseline koji nisu prikazani, praktično su identični (razlike su u okviru eksperimentalne greške do 5%) sa spektrom dobijenim za odmašćeni HSA.



Slika 27. CD spektri u dalekoj (A) i bliskoj (B) UV oblasti odmašćenog HSA i zamašćenog HSA (smeša HSA i stearinske kiseline u odnosu 1:4).

Sa ciljem da se kvantifikuje sadržaj različitih sekundarnih struktura u odmašćenom i zamašćenom HSA, far-UV CD spektri su analizirani algoritmom CONTINLL koristeći referentnu proteinsku bazu SP37. Sadržaji α -heliksa, β -pločice i drugih struktura (β -okret i neuređene) u odmašćenom HSA iznosili su redom 62,6; 15,1 i 22,4, a u HSA zamašćenom sa stearinskom kiselinom 60,2; 17,1 i 22,7 %. Dakle, CD spektri u dalekoj UV oblasti

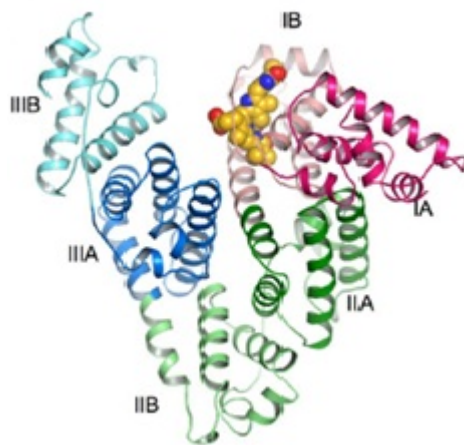
pokazuju da vezivanje Mk za HSA ne dovodi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi HSA.

Da bi se ispitala asimetrija okruženja oko bočnih ostataka aromatičnih aminokiselina, snimljeni su CD spektri u bliskoj UV oblasti odmašćenog i zamašćenog HSA (smeša HSA i stearinske kiseline, 1:4) (Slika 27B). Near-UV CD spektar odmašćenog HSA pokazuje karakteristične minimume na 262 i 268 nm sa dva maksimuma (“ramena”) oko 283 i 290 nm (Sjoholm i Ljungstedt, 1973). Na CD spektru smeše HSA i stearinske kiseline, uočava se povećanje intenziteta pika na 262 i 268 nm, kao i blaga promena položaja pikova u odnosu na spektar odmašćenog HSA. Vezivanje stearinske kiseline za HSA dovodi do potpunog izostanka “ramena” na 283 i 290 nm. Dakle, promene u near-UV CD spektrima HSA, do kojih dolazi pri vezivanju Mk za HSA, ukazuju da dolazi do promena u okruženju ostataka aromatičnih aminokiselina.

HSA ima najmanje sedam vezujućih mesta za Mk (Slika 25) (Reichenwallner i Hinderberger, 2013), koja su asimetrično raspoređena u okviru molekula HSA (Curry i sar., 1998). Prvo vezujuće mesto je smešteno u subdomenu IB, dok je drugo mesto smešteno između dodirnih površina subdomena IA i IIA. U okviru subdomena IIIA nalaze se dva vezujuća mesta (treće i četvrto), a peto mesto smešteno je u subdomenu IIIB. Šesto vezujuće mesto se nalazi između dodirnih površina subdomena IIA i IIB, dok je sedmo mesto smešteno u subdomenu IIA (Curry 2003). Vezujuća mesta za Mk na molekulu HSA se razlikuju po afinitetu. Peto vezujuće mesto ima najviši afinitet, a zatim mesta dva i četiri (Simard i sar., 2006). Jedini triptofanski ostatak (Trp214) u molekulu HSA doprinosi formiranju hidrofobnog vezujućeg mesta u okviru subdomena IIA kao i formiranju hidrofobnih interakcija između dodirnih površina subdomena IIA i IIIA (He i Carter, 1992; Peters, 1996). Uzimajući u obzir afinitet vezujućih mesta za Mk na molekulu HSA, poziciju ovih mesta u odnosu na Trp214 (od koga potiče fluorescencija) i dobijene fluorescentne spektre, može se zaključiti da vezivanje Mk za molekul HSA dovodi do konformacionih promena molekula HSA. Ove konformacione promene su određene tipom Mk i brojem molekula Mk vezanih za HSA, što je u saglasnosti sa nalazima Curry i sar. (Curry i sar., 1999).

4.5.2. Da li Mk vezane za HSA utiču na selektivnost Cibacron blue liganda prema molekulima HSA?

Određivanju sadržaja HSA-SH grupa, prethodi korak izolovanja HSA iz seruma afinitetnom hromatografijom, koja se zasniva na specifičnoj interakciji između kovalentno vezane triazinske boje Cibacron Blue i molekula HSA. Na osnovu strukturne sličnosti molekula Cibacron Blue boje i molekula bilirubina (Leatherbarrow i Dean, 1980) (koji se vezuje za mesto unutar subdomena IB molekula HSA) (Slika 28)(Zunszain i sar. 2008)), pretpostavljeno je da će se Cibacron Blue vezati za isto mesto. Promena konformacije molekula HSA usled vezivanja Mk za HSA u blizini subdomena IB ili vezivanje Mk za pomenuti subdomen (u kome se nalazi prvo vezujuće mesto za Mk) (Slika 25), može uticati na afinitet molekula HSA za boju u zavisnosti od vrste i broja molekula vezanih Mk. Drugim rečima, profil Mk vezanih za HSA mogao bi odrediti koji će se molekuli HSA iz seruma vezati za Cibacron Blue pri izolovanju.

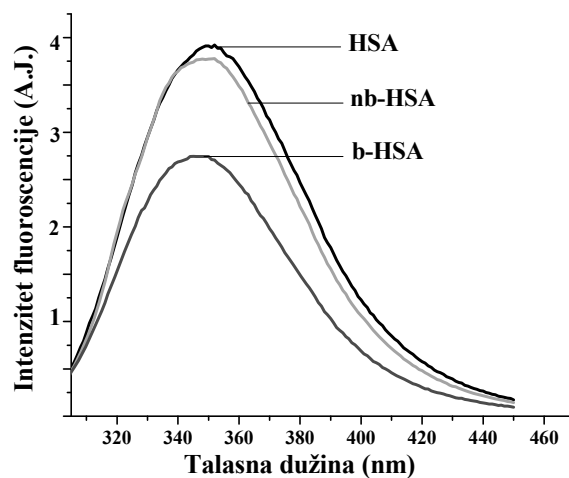


Slika 28. Kristalna struktura HSA u kompleksu sa 4Z,15E-bilirubinom IX α (PDB ID 2VUE) (Zunszain i sar. 2008).

S ciljem da proverimo da li postoji razlika u Mk profilu molekula HSA koji se vezuju za Cibacron Blue kolonu u odnosu na molekule HSA koji su naneti na kolonu, komercijalni HSA (prethodno ispran od kaprilata ultrafiltracijom, sa sadržajem HSA-SH grupa 0,421 mol -SH/mol HSA i koncentracije 0,772 mmol/) podvrgnut je afinitetnoj hromatografiji. Snimljeni su fluorescentni emisijski spektri komercijalnog HSA, nevezane i

vezane frakcije HSA za Cibacron Blue (Slika 29). Zatim je u pomenutim frakcijama, gasnom hromatografijom analiziran profil vezanih Mk za HSA nakon njihove ekstrakcije organskim rastvaračima (Materijali i metode 3.10.). Na osnovu retencionih vremena i površine pikova identifikovane su pojedinačne masne kiseline i određena je njihova procentualna zastupljenost (Tabela 29). Sva tri uzorka analizirana su i nativnom elektroforezom.

Intenzitet fluorescencije nevezane HSA frakcije na maksimumu emisije je skoro jednak intenzitetu fluorescencije nanetog HSA (Slika 29). Emisioni spektar vezane HSA frakcije pokazuje hipsokromni pomak sa redukcijom intenziteta fluorescencije od 30 % u odnosu na spektar komercijalnog HSA nanetog na kolonu. Može se zaključiti da je Trp214 u vezanoj frakciji više izložen okolnom rastvaraču u odnosu na ovaj ostatak u nevezanoj frakciji. Dakle, postoji razlika u konformaciji molekula HSA u vezanoj i nevezanoj frakciji, i ta razlika dovodi do selekcije HSA molekula koji će se vezati za Cibacron Blue boju.



Slika 29. Fluoroscentni spektri komercijalnog HSA nanetog na kolonu sa Cibacron Blue bojom, nevezane HSA frakcije (nb-HSA) i frakcije vezane za boju (b-HSA). Spektri 2 μ M rastvora HSA su snimljeni ekscitovanjem Trp na 295 nm.

Masnokiselinski profil komercijalnog HSA nanetog na kolonu pokazuje da su palmitinska, stearinska, oleinska i linolenska kiselina zastupljene sa više od 90 % (Tabela 13). Poređenjem masnokiselinskih profila nevezane HSA frakcije i HSA frakcije vezane za

kolonu, kao i na kolonu nanetog HSA, uočava se značajna razlika između sve tri HSA frakcije. Procentualna zastupljenost ukupnih zasićenih Mk (palmitinske (16:0) i stearinske (18:0) kiseline) u vezanoj HSA frakciji (58.83 %) je viša nego u nevezanoj frakciji (47.35 %). Zastupljenost mononezasićene oleinske kiseline je skoro ista u obe frakcije (19.39 i 17.51 %), dok je procentualna zastupljenost ukupnih polinezasićenih Mk značajno niža u vezanoj frakciji u odnosu na nevezanu frakciju (19.44; 35.56 %, resp.).

Tabela 13. Masnokiselinski profili komercijalnog HSA, nevezane i vezane HSA frakcije za kolonu sa Cibacron Blue bojom, određeni gasnom hromatografijom. Rezultati su izraženi kao % od ukupnih Mk vezanih za HSA i predstavljeni su kao srednja vrednost od dva eksperimenta.

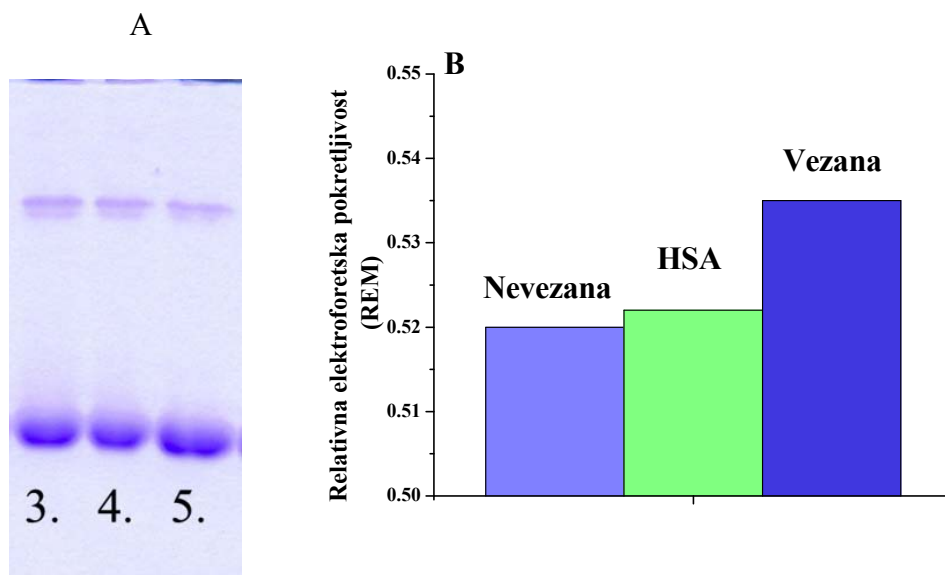
FA	HSA (%)	vezana-HSA (%)	nevezana-HSA (%)
16:0	46.37	37.07	29.57
16:1 n-7	0.84	1.44	1.1
18:0	15.09	21.76	17.78
18:1n-9	18.26	19.39	17.51
18:1n-7	1.68	1.81	1.83
18:2n-6	12.80	12.84	27.37
18:3n-3	1.14	1.29	1.51
20:3n-6	1.18	0.86	1.64
20:4n-6	0.84	1.62	1.77
20:5n-7	0.89	0.44	1.44
22:4n-6	0.89	0.58	-

Od polinezasićenih Mk, linolna kiselina (18:2n-6) ima najveći uticaj na dobijenu razliku u Mk-HSA sadržaju između vezane i nevezane HSA frakcije. Stoga je zaključeno da:

- veći sadržaj nezasićenih Mk, posebno polinezasićenih Mk, vezanih za HSA dovodi do konformacionih promena HSA molekula tako da se oni slabije vezuju za Cibacron blue boju;

tokom izolovanja HSA iz seruma, afinitetna boja selektuje molekule HSA prema konformaciji, koja zavisi od vrste i zasićenja lanaca Mk vezanih za HSA.

Rezultati nativne PAG elektroforeze HSA nanetog na kolonu sa Cibacron Blue, vezane i nevezane HSA frakcija, prikazani su na Slici 30A. U sva tri uzorka uočava se, pored glavne monomerne HSA trake, jedna do dve trake slabog intenziteta u gornjem delu gela. Relativna elektroforetska pokretljivost (REM) monomerne HSA trake u vezanoj HSA frakciji je veća od pokretljivosti odgovarajuće trake u uzorku HSA nanetog na kolonu i nevezane HSA frakcije (Slika 30B). Povećanje pokretljivosti monomerne trake HSA u vezanoj frakciji može biti posledica povećanja negativnog naelektrisanja molekula HSA, do koga dolazi usled vezivanja većeg broja molekula Mk za HSA.



Slika 30. Nativna PAGE (A) i relativna elektroforetska pokretljivost (B) komercijalnog HSA (traka 4), vezane (traka 5) i nevezane HSA frakcije (traka 3) za kolonu napunjenu sa Cibacron Blue.

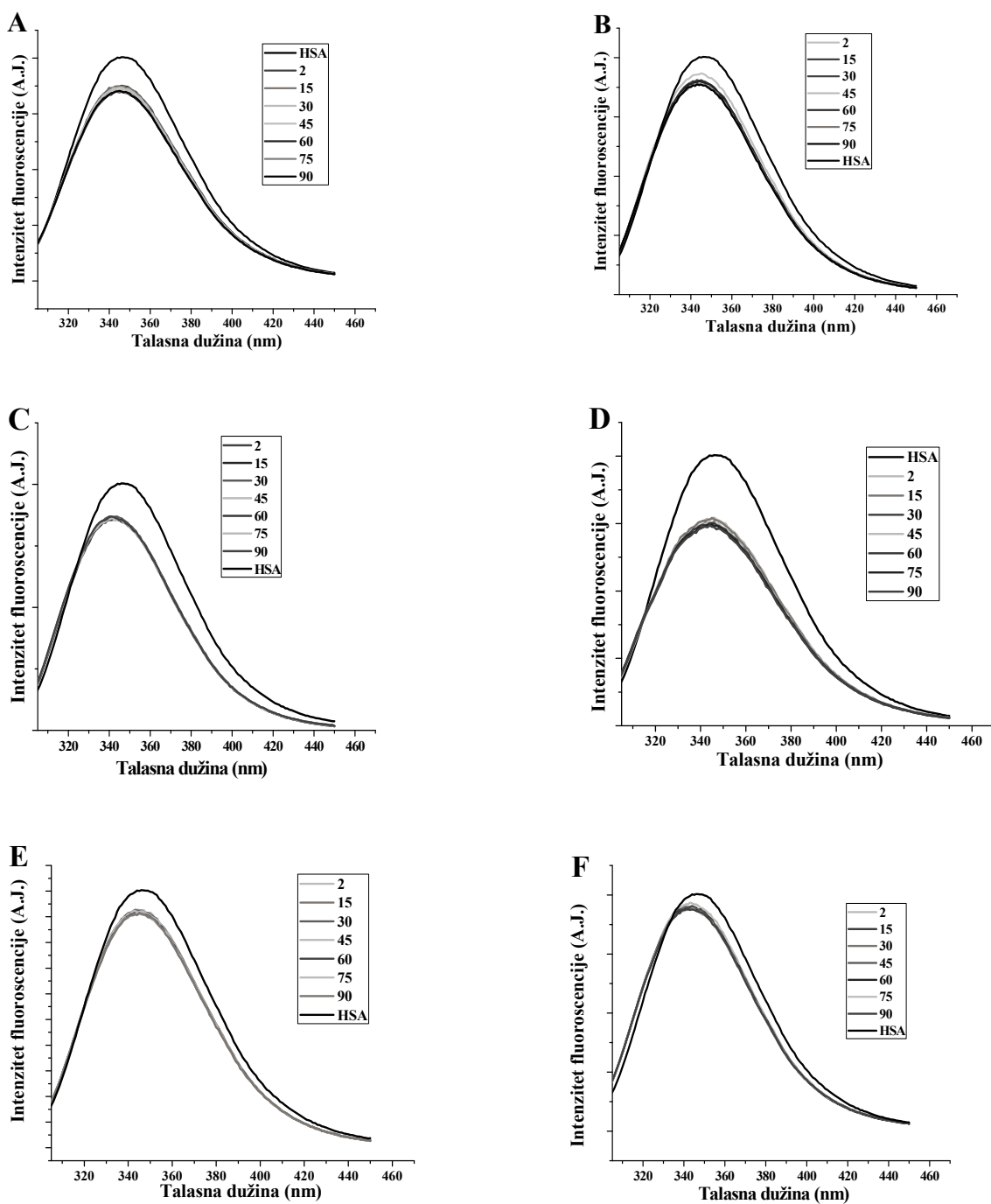
4.5.3. Uticaj Mk vezanih za HSA na reaktivnost i/ili dostupnost HSA-SH grupe

Konformacione promene HSA, koje se dešavaju kao posledica vezivanja Mk za HSA, utiču na intenzitet fluorescencije triptofanskog ostatka (Trp214) koji je smešten u subdomenu II. Ovaj subdomen je u kontaktu sa subdomenom I, gde je smešten Cys34, tako da konformacione promene HSA molekula mogu uticati na reaktivnost ili dostupnost HSA-

SH grupa za različite reakcije. U patološkim stanjima kao što su dijabetes, oboljenja jetre i kardiovaskularnog sistema (Peters, 1996, Cistola, 1991) sadržaj Mk u serumu raste. Kako su neka od ovih patoloških stanja istovremeno praćena povećanim oksidativnim i/ili karbonilnim stresom, povećan Mk-HSA sadržaj mogao bi doprineti da HSA-SH grupa bude podložnija modifikaciji sa oksidativnim i/ili karbonilnim vrstama. Stoga je ispitano da li vezivanje Mk za HSA utiče na reaktivnost i/ili dostupnost HSA-SH grupe.

Uticaj vezivanja različitih Mk za HSA na reaktivnost HSA-SH grupe ispitan je određivanjem konstante brzine pseudo prvog reda (k) za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB. U ovom eksperimentu upotrebljeni su komercijalni HSA (koncentracije 0,25 mmol/l i sadržaja HSA-SH grupa 0,421 mol -SH/mol HSA) koji je prethodno odmašćen (kontrola) i smeše odmašćenog HSA i Mk (miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske, EPA i DHA kiseline, u odnosima od 1:1 do 1:4 (Tabela 14). U literaturi je za kontrolisano zamašćivanje HSA primenjivano inkubiranje smeša Mk i HSA u periodu od jednog do dva sata (Spector i sar., 1969). Snimanjem fluorescentnih spektara smeša odmašćenog HSA i različitih Mk (u odnosu 1:4, Slika 31), u vremenskom periodu od 2 do 90 minuta, utvrđeno je da sve ispitivane Mk dovode do pada intenziteta fluorescencije HSA već posle dva minuta od mešanja. Intenzitet maksimuma fluorescencije ne menja se u narednih 90 minuta. Dakle, vezivanje Mk za HSA je brzo, promena konformacije molekula HSA dešava se odmah po vezivanju Mk i ne menja se s vremenom. Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima o postojanju dve konformacije molekula HSA, konformacija odmašćenog HSA i konformacija HSA sa vezanim Mk (Otagiri i Chuang, 2009, Wilting i sar., 1980; Yamasaki i sar., 1999; Fasano i sar., 2001). Sa Slike 31 se, takođe, vidi da Mk imaju različit efekat na smanjenje intenziteta fluorescencije Trp ostatka. Najizraženiji efekat pokazuju oleinska i stearinska kiselina. Konformacione promene molekula HSA zavise od dužine i stepena nezasićenja lanaca vezanih Mk.

Pre određivanja konstante brzine reakcije pseudo prvog reda tiol-grupe s DTNB (molarni odnos HSA-SH i DTNB, 1:50), smeše različitih Mk i odmašćenog HSA u odnosima od 1:1 do 4:1 inkubirane su 30 minuta na 37 °C. Vrednosti konstanti brzina reakcije (od 11.47 do 27.4 $\times 10^{-3}$ s⁻¹), dobijene za Cys34-SH grupu, kada je za HSA vezana bilo koja od ispitivanih Mk (u svim odnosima), bile su veće u odnosu na vrednost konstante dobijenu za odmašćeni HSA (3.75 $\times 10^{-3}$ s⁻¹) (Tabela 14).



Slika 31. Fluorescentni spektri komercijalnog odmašćenog HSA i smeša odmašćenog HSA i miristinske (A), palmitinske (B), stearinske (C), oleinske (D), EPA (E) i DHA (F), pri odnosu HSA:Mk 1:4, u vremenu od 2 do 90 minuta. Spektri su snimljeni sa 2 μ M rastvorima HSA, ekscitovanjem Trp na 295 nm.

Dakle, vezivanje Mk za HSA dovodi do povećanja brzine reakcije (reaktivnosti) HSA-SH grupe sa DTNB. Povećanje odnosa Mk:HSA u smešama, od 1:1 do 4:1, dovodi do postepenog porasta vrednosti konstanti brzina reakcija za sve Mk, osim za miristinsku kiselinu. Vezivanje miristinske kiseline za HSA ima najveći efekat na brzinu reakcije Cys34-SH grupe. Zasićene stearinska i palmitinska kiselina pri svim Mk/HSA odnosima imaju manji uticaj na povećanje vrednosti konstante brzine u odnosu na nezasićene kiseline oleinsku i DHA (Slika 32). Rezultati dobijeni za zasićene Mk su u sagladnosti sa rezultatima Takabayashi i sar. (Takabayashi i sar., 1983), koji su našli da efekat Mk vezanih za BSA na reaktivnost BSA-SH grupe raste u nizu stearinska, palmitinska, miristinska i laurinska kiselina pri odnosima Mk/BSA od 1:1 do 4:1. Gryzunov i sar. (2003) su pokazali da sa povećanjem broja vezanih molekula oleinske i linolne kiseline za HSA raste reaktivnost HSA-SH grupa prema DTNB.

Table 14. Konstante brzina pseudo prvog reda (k) za reakciju DTNB sa HSA-SH grupom, dobijene sa smešama Mk (miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske, EPA i DHA) i odmašćenog HSA, u odnosima od 1:1 do 4:1. Svako određivanje je rađeno u duplikatu.

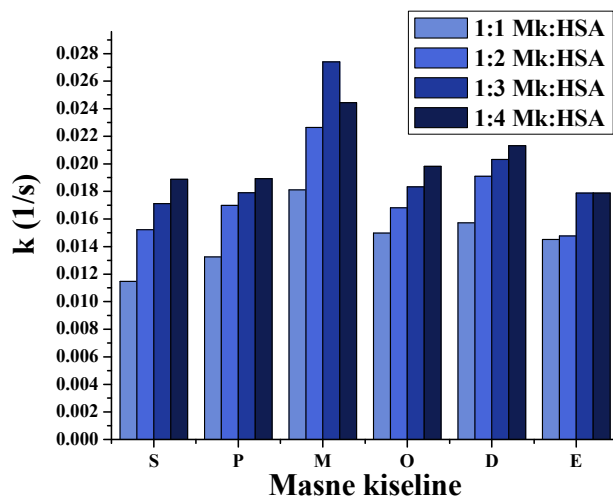
Mk	1:1	2:1	3:1	4:1
	$k \times 10^{-3} (s^{-1})$			
Miristinska	18,11±0,56	22,65±0,59	27,40±0,13	24,44±2,05
Palmitinska	13,25±1,14	16,99±0,27	17,90±0,45	18,92±0,08
Stearinska	11,47±0,49	15,22±0,08	17,11±0,90	18,87±0,53
Oleinska	14,99±0,74	16,82±1,12	18,34±0,16	19,83±0,87
EPA	14,53±0,39	14,78±0,51	17,77±0,81	18,87±1,30
DHA	15,73±0,34	19,11±0,42	20,32±0,69	21,33±0,83

Sigmoidalnim fitovanjem vrednosti konstanti brzina reakcija sa Mk/HSA odnosima za svaku ispitivanu Mk (miristinsku, stearinsku, palmitinsku, oleinsku, EPA i DHA) dobijeni su koeficijenti korelacije redom: 0,918; 0,994; 0,996; 0,954; 0,852 i 0,994.

Dobijene visoke vrednosti koeficijenta korelacije za stearinsku, palmitinsku i DHA (0,994 i 0,996) ukazuju na postojanje alosternog efekta između vezivanja ovih Mk i reaktivnosti HSA-SH grupa. Ascenzi i sar. Su našli da vezivanje Mk za HSA pokazuje alosterni efekat na vezivanje lekova za HSA (Ascenzi i sar., 2006).

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da:

- se vezivanjem Mk za HSA povećava reaktivnost HSA-SH grupa i da je ovaj efekat izraženiji sa porastom Mk/HSA odnosa;
- između vezivanja Mk i reaktivnosti HSA-SH postoji alosterni efekat.



Slika 32. Konstante brzine pseudo prvog reda (k) za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB, određene sa smešama Mk (stearinske-S, palmitinske-P, miristinske-M, oleinske-O, eikozapentaenske-EPA i dokozaheksaenske-DHA) i odmašćenog HSA, u odnosima od 1:1 do 4:1.

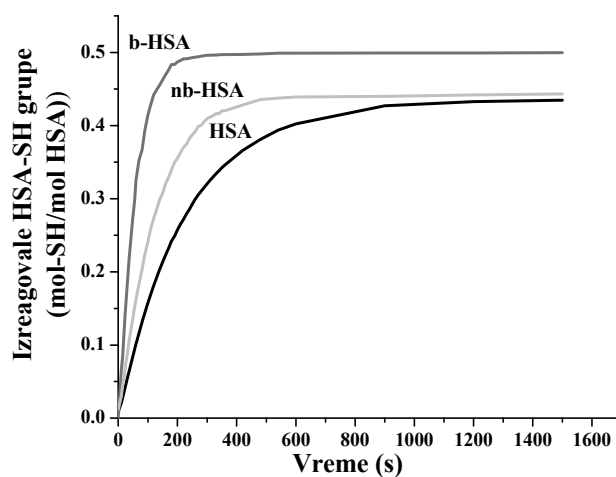
Reaktivnost HSA Cys34 SH grupe u frakcijama dobijenim afinitetnom hromatografijom

Kinetika reakcije tiol-grupe s DTNB određena je za komercijalni HSA pre nanošenja na kolonu sa Cibacron Blue bojom, kao i za nevezanu i vezanu HSA frakciju (opisane u poglavlju 4.5.2) (Slika 33). Dobijene vrednosti konstanti brzina bile su redom: $4.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $11.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ i $21.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 15). Ukupan sadržaj MK (određen

korišćenjem internog standarda Mk 13:0) u vezanoj HSA frakciji iznosi 1.08 mol Mk/mol HSA, a u nevezanoj 0,74 mol Mk/mol HSA. Kako se i masnokiselinski profil vezane HSA frakcije (Tabela 13) razlikuje u odnosu na HSA nanet na kolonu i nevezanu HSA frakciju, može se zaključiti da je dobijeno značajno povećanje reaktivnosti HSA-SH grupa u vezanoj HSA frakciji ($21.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) posledica prirode i broja molekula Mk vezanih za HSA i nastalih konformacionih promena molekula HSA.

Tabela 15. Sadržaji HSA-SH grupa i konstante brzina pseudo prvog reda (k) za reakciju Cys34-SH grupe sa DTNB, dobijeni za komercijalni HSA, nevezanu i vezanu HSA frakciju za Cibacron Blue. Sva određivanja su rađena u triplikatu.

	Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH / mol HSA)	$k \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$
HSA	$0,423 \pm 0,011$	$4,8 \pm 0,2$
vezana-HSA frakcija	$0,500 \pm 0,012$	$21,6 \pm 0,4$
nevezana-HSA frakcija	$0,447 \pm 0,016$	$11,2 \pm 0,4$

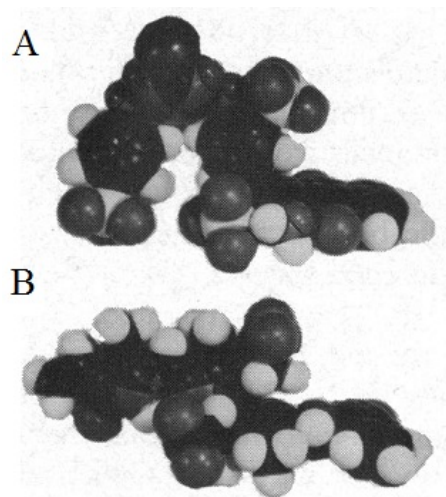


Slika 33. Reakcione krive dobijene za reakciju HSA Cys34-SH grupe sa DTNB za komercijalni HSA, nevezanu i vezanu HSA frakciju za kolonu sa Cibacron Blue.

Sa druge strane, povećanja sadržaja Cys34-SH grupa u vezanoj HSA frakciji (18.2 % u poređenju sa nanetim na kolonu, 11,8 % u odnosu na nevezanu frakciju, Tabela 11), dobijeni nakon 30 minuta inkubiranja (vreme za koje se određuje sadržaj HSA-SH grupa) su statistički značajna ($p < 0.05$). Ovo ukazuje na povećanje dostupnosti Cys34-SH grupe (koja se nalazi u hidrofobnom džepu) za reakciju sa DTNB. Dakle, selekcija (vezivanje) HSA molekula od strane Cibacron Blue boje dovodi do povećanja sadržaja HSA-SH grupa i stoga do njihovog povećanog doprinosa sadržaju ukupnih tiola seruma (napred opisana diskrepancija).

Povećanje dostupnosti Cys34-SH grupe u uzorcima HSA koji su izolovani afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue može se objasniti činjenicom da postoji strukturna sličnost između molekula Cibacron Blue boje i molekula bilirubina (Slika 34.) (Leatherbarrow i Dean 1979), za koji je kristalografskom analizom utvrđeno da se vezuje u okviru subdomena IB molekula HSA (Zunszaini sar. 2008). Zbog strukturne sličnosti ova dva molekula, može se pretpostaviti da će se Cibacron Blue boja vezati u okviru subdomena IB, u kome je smešten i ostatak Cys34, ali i prvo vezujuće mesto za Mk. Modifikacija HSA-SH grupe malim tiolima ili reaktivnim oksidativnim i/ili karbonilnim vrstama, kao i vezana Mk u prvom vezujućem mestu u molekulu HSA mogle bi smanjiti afinitet Cibacron blue boje za ovakve molekule HSA, usled prostornog ograničenja u okviru subdomena IB. Metcalf i sar. (Metcalf i sar. 1981) su ustanovili da afinitet HSA za Cibacron Blue zavisi od vrste i broja molekula Mk vezanih za HSA. Dobili su da je konstanta disocijacije odmašćenog molekula HSA i Cibacron Blue boje tri puta manja u odnosu na konstantu disocijacije dobijenu za HSA sa vezanom palmitinskom kiselinom (odnos palmitinska kiselina/HSA 7:1, zauzeto i prvo vezujuće mesto za Mk u molekulu HSA).

Sa druge strane, vezivanje Mk za druga vezujuća mesta na molekulu HSA (peto, drugo i četvrto koja su sa najvišim afinitetom za Mk, a koja se nalaze u okruženju subdomena IB) dovodi do promene konformacije molekula HSA, što dalje može da modifikuju afinitet Cibacron Blue boje za molekule HSA. Na ovaj bi način vezane Mk za HSA direktno i indirektno, preko modifikovanja afiniteta vezivanja Cibacron Blue boje u blizini ostatka Cys34, kao i sama modifikacija HSA-SH grupe mogle da utiču na povećanje dostupnosti HSA-SH grupe.



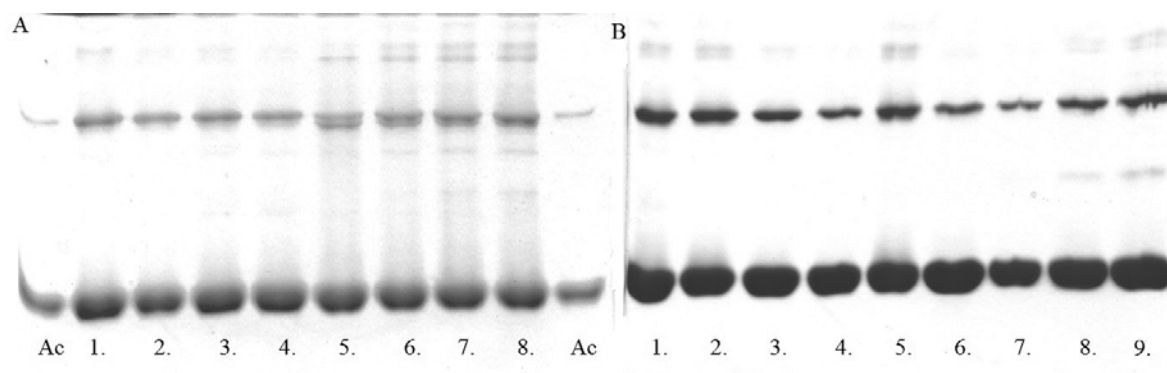
Slika 34. Modeli molekula Cibacron Blue (a) (Cori-Pauling-Koltun) i bilirubina (b) (Leatherbarrow i Dean 1979).

4.5.4. Uticaj odmašćivanja uzorka HSA na sadržaj HSA Cys34-SH grupa u frakciji vezanoj za kolonu sa Cibacron Blue

Pretpostavka da Mk vezane za HSA modifikuju afinitet vezivanja Cibacron Blue za HSA iz prethodnog eksperimenta proverena je eksperimentom u kojem su uzorci (n=4) komercijalnog odmašćenog HSA, i HSA koji je kontrolisano zamašćen sa stearinskom kiselinom (Mk/HSA odnos 4:1) (n=4), podvrgnuti afinitetnoj hromatografiji. Sadržaj HSA-SH grupa u uzorcima je bio od 0,4 do 0,8 mol -SH/mol HSA.

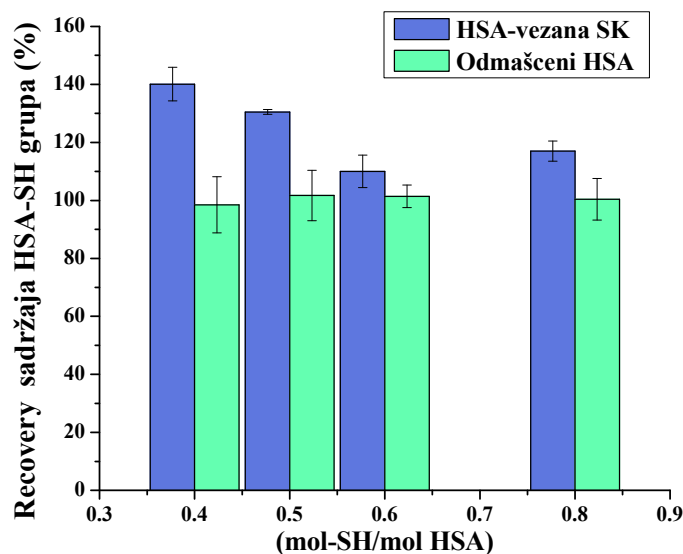
Od 54 do 55,8 mg odmašćenog HSA nanetog na kolonu sa Cibacron blue, u vezanoj frakciji eluirano je od 15,5 do 21,9 % nanete mase HSA. U slučaju HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom, od nanete mase HSA (od 49,9 do 54,2 mg) u vezanoj frakciji bilo je samo 7,6 do 11,8 %. Može se zaključiti da odmašćeni HSA ima jači afinitet vezivanja za Cibacron Blue kolonu u odnosu na HSA sa vezanim Mk, što su potvrdili Metcalf i sar. (Metcalf i sar. 1981). Od svih ispitivanih kompleksa Cibacron Blue i HSA zasićenim Mk (C4-C16) kompleks u kome je za HSA vezana stearinska kiselina (pri Mk/HSA odnosu 7:1), ima najveću vrednost konstante disocijacije, pa samim tim i najslabiji afinitet za Cibacron Blue ligand.

Rezultati native PAG elektroforeze uzoraka odmašćenog HSA i HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom nanetih na kolonu, kao i vezanih HSA frakcija, prikazani su na Slici 15. Proteinske trake uzoraka odmašćenog i zamašćenog HSA značajno se razlikuju (Slika 15A). Pored dominantne trake monomera HSA i manje intenzivne trake dimera HSA, koja je prisutna u oba uzorka, kod zamašćenog HSA uočava se u gornjem delu gela nekoliko traka molekulskih masa većih od dimera i jedna do dve trake koje se po molekulskoj masi nalaze između mase dimera i monomera HSA. Denzitometrijskom analizom gela dobijena je zastupljenost dimera u odmašćenom HSA oko 20 %, a u zamašćenom HSA oko 23 %. Zastupljenost monomerne trake u zamašćenom HSA se smanjuje (od 11 do 19 %) u korist zastupljenosti drugih prisutnih traka sa većom i manjom pokretljivošću u odnosu na dimernu traku HSA. S druge strane, u frakcijama HSA vezanim za Cibacron Blue (Slika 15 B), i odmašćenog i zamašćenog HSA dominiraju samo trake monomera i dimera HSA, sa ukupnom zastupljnošću od 96,2 do 100 %. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se za Cibacron Blue kolonu vezuju skoro isključivo monomerni i dimerni oblici HSA.



Slika 35. Nativna PAG elektroforeza (A) uzoraka odmašćenog HSA (trake od 1 do 4) i HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom (trake od 5 do 8) sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,4 do 0,8 mol -SH/mol HSA, i (B) HSA frakcija vezanih za kolonu sa Cibacron Blue. Traka Ac-komercijalni albumin. Bojenje proteina s CBB.

Dobijene recovery vrednosti sadržaja Cys34-SH grupa u vezanim frakcijama HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom bile su od 100 do 140 % (srednja vrednost $124,4 \pm 13,5$ %), dok su za odmašćeni HSA iznosile od 98,5 do 101,7 % ($100,5 \pm 1,4$ %) (Slika 36). Ovim je direktno potvrđeno da Mk vezane za HSA utiču na određivanje sadržaja tiol-grupa sa DTNB, tako da je sadržaj HSA-SH veći od sadržaja ukupnih serum tiola.



Slika 36. Recovery vrednosti sadržaja HSA-SH grupa u frakcijama HSA vezanim za kolonu sa Cibacron Blue Sepharose, u odnosu na početni (naneti) sadržaj HSA-SH grupa (od 0,4 do 0,8 mol-SH/mol HSA), u odmašćenom HSA i HSA zamašćenom stearinskom kiselinom (SK).

Na osnovu svega može se zaključiti da izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue imobilizovanim ligandom nije pogodna metoda za praćenje promene sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima koja su praćena oksidativnim i/ili karbonilnim stresom, poput dijabetesa, uremije, hroničnih bolesti bubrega i hemodijalize.

4.6. Izolovanje HSA taloženjem sa amonijum-sulfatom

Uzimajući u obzir činjenicu da je zbog efekta koje Mk vezane za HSA imaju na određivanje sadržaja HSA-SH grupa, kada se HSA izoluje afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue bojom, bilo je potrebno naći metodu pogodniju za izolovanje HSA u cilju povećanja čistoće izolovanog HSA, odnosno postizanja veće sigurnosti u izvođenju zaključaka o promenama sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima. Uprkos brojnim predloženim metodama za izolovanje HSA, u kojima se najčešće kombinuju koraci izolovanja koji se baziraju na različitoj rastvorljivosti HSA i drugih proteina plazme ili na specifičnoj interakciji između HSA i različitih liganada, nijedna od njih, zbog tehničkih ili vremenskih zahteva, nije našla široku primenu u kliničkoj praksi. Polazeći od činjenica da:

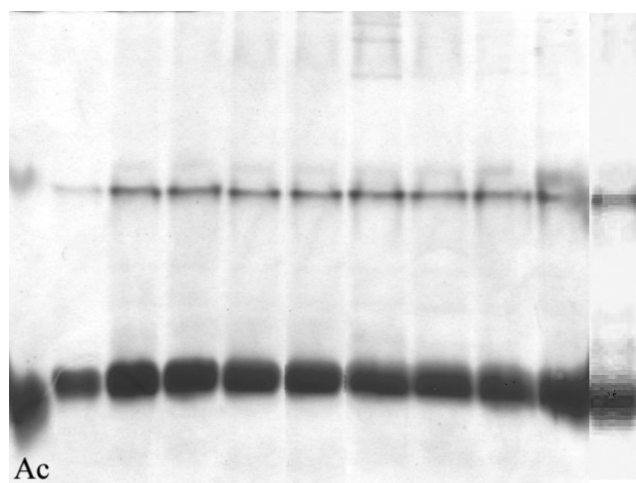
- je serum smeša HSA i globulina, koji se međusobno značajno razlikuju po rastvorljivosti u rastvorima različitih koncentracija amonijum-sulfata (AS) (HSA je rastvoran u poluzasićenim rastvorima AS, dok se globulini u njima talože);
- postoje podaci o zasićenju AS-om pri kome se gama-globulinska frakcija uspešno izdvaja od ostalih proteina seruma (Hebert, 1974);
- je metoda taloženja sa AS jednostavna i brza, što je važno za kliničku praksu;

ispitana je mogućnosti izolovanja HSA iz seruma taloženjem sa AS i primene izolovanog HSA za određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

U preliminarnom eksperimentu, cilj je bio da se proverí čistoća izolovanog HSA, koji se dobija kada se u prvom koraku pri zasićenju od 50 % AS istaloži globulinska frakcija, a u drugom koraku se iz zaostalog supernatanta pri zasićenju od 65 % AS istaloži HSA (dvostepeno taloženje). Na ovaj način HSA je izolovan iz istih 10 uzoraka seruma zdravih osoba iz kojih je prethodno izolovan afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue (Poglavlje 3.4.2.). Čistoća izolovanog HSA proverena je nativnom elektroforezom i denzitometrijskom analizom.

Na elektroforegramu se pored dominantne HSA frakcije, u gornjem delu gela uočava jedna manje intenzivna traka, koja je prisutna u svih deset uzoraka i koja se po pokretljivosti malo razlikuje u odnosu na dimernu traku komercijalnog HSA (linija Ac) i veći broj traka, koje se jedva naziru (uzorci od 4 do 7), a koje po pokretljivosti odgovaraju globulinima seruma (Slika 37). Procentualna zastupljenost monomera HSA, određena

denzitometrijskom analizom, bila je u opsegu od 70,9 do 91,9 % (Tabela 16). Srednja vrednost zastupljenosti monomera HSA iznosi $83,4 \pm 5,9$ %, i statistički je značajno ($p < 0,05$) veća od zastupljenosti monomera u HSA izolovanom afinitetnom hromatografijom ($73,8 \pm 8,5$ %) (Tabela 11).



Slika 37. Nativna PAGE (9% gel) HSA izolovanog dvostepenim taloženjem sa AS (prvi korak do zasićenja od 50 %, drugi korak do zasićenja od 65 % AS) iz 10 seruma zdravih osoba i komercijalnog HSA (Ac). Po traci je nanošeno 10 μ g proteina koji su obojeni CBB-om.

Tabela 16. Denzitometrijska analiza zastupljenosti monomera HSA u preparatima izolovanim taloženjem sa AS iz 10 seruma zdravih osoba.

Uzorak seruma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Monomer HSA (%)	83,5	70,9	91,9	79,7	84,9	83,4	78,8	84,6	88,2	87,8
X \pm σ	$83,4 \pm 5,9$ %									

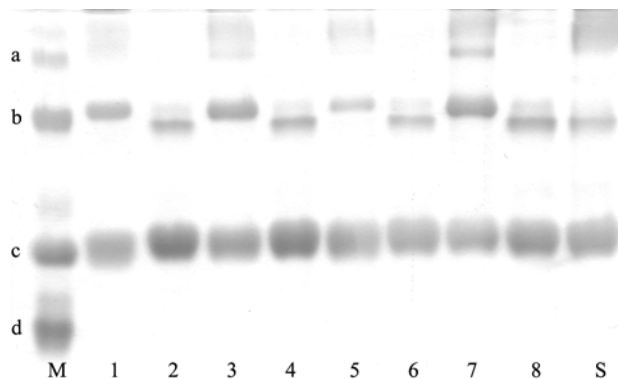
Radi poređenja preparata HSA izolovanih sa obe metode, afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue i dvostepenim taloženjem sa AS, urađena je nativna elektroforeza izolovanih HSA, pri čemu je naneta ista masa proteina (15 μ g). Na elektroforegramu se jasno uočava razlika između čistoća izolovanih preparata HSA (Slika

38). Prisustvo kontaminirajućih traka u uzorcima HSA koji su izolovani afinitetnom hromatografijom (linije 1, 3, 5 i 7), koje po pokretljivosti odgovaraju gama-globulinima (traka S), je veoma izraženo, što je u saglasnosti s navodima iz literature da Cibacron Blue pored HSA vezuje gama-globuline kao i druge proteine seruma (Zhang i Sun, 2001; Bumeliene i sar., 2003; He, 2002; Barsukov i sar., 2009). Nativna elektroforeza preparata HSA izolovanih taloženjem sa AS (linije 2, 4, 6 i 8) pokazuje da je broj i intenzitet nealbuminskih traka smanjen. Gama-globulinska traka u preparatima HSA, izolovanim taloženjem sa AS, je skoro potpuno izostala. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da se gama-globulini talože iz seruma pri zasićenju od 50% AS (Hebert, 1974). U uzorcima izolovanog HSA taloženjem sa AS-om, pored trake koja odgovara monomeru HSA, u gornjem delu gela uočavaju se dve trake, traka manjeg intenziteta koja po pokretljivosti odgovara dimeru HSA i intenzivnija traka, koja je odsutna u uzorcima HSA izolovanog afinitetnom hromatografijom. Intenzivnija traka je, takođe, detektovana u serumu (linija S). Prisustvo ove kontaminirajuće trake, čija je zastupljenost oko 10%, nametnulo je sledeća pitanja:

- Da li bi se daljom optimizacijom uslova taloženja AS postigla veća čistoća i prinos izolovanog HSA, i na taj način povećala pouzdanost određivanja sadržaja HSA-SH grupa?
- Kojem proteinu iz seruma odgovara ova traka?
- Da li dati protein ima slobodne -SH grupe koje bi mogle ometati određivanje sadržaja HSA-SH grupa?

Navedeno, kao i činjenica da u istaloženom HSA zaostaje dosta AS, koji može uticati na određivanja sadržaja HSA-SH grupa, dovelo je do potrebe da se:

- ispita uticaj AS, prisutnog u izolovanom HSA, na određivanja sadržaja HSA-SH grupa;
- optimizuju uslovi izolovanja HSA taloženjem sa AS-om;
- okarakterišu kontaminirajući proteini;
- uradi validacija metode izolovanja HSA taloženjem sa AS-om.



Slika 38. Nativna PAGE HSA izolovanog iz seruma pomoću: afinitetne hromatografije sa Cibacron Blue F3-G–Sepharose (linije 1, 3, 5 i 7) i dvostepenim taloženjem sa AS do zasićenja od 50 odnosno 65 % (linije 2, 4, 6 i 8). Traka M predstavlja proteinske markere: a) ureaza, b) BSA dimer, c) BSA monomer i d) albumin iz kokošijeg jajeta, a traka S predstavlja pool uzoraka seruma. Elektroforeza je urađena na 9 % poliakrilamidnom gelu. Po liniji je naneto 15 µg proteina. Bojenje gela urađeno je s CBB.

4.7. Uticaj amonijum-sulfata na čistoću izolovanog HSA i određivanje sadržaja tiol-grupa

Pri uslovima izolovanja HSA taloženjem sa AS-om u izolovanom HSA zaostaje znatna količina AS, koji može uticati na sve korake od izolovanja HSA do određivanja sadržaja HSA-SH grupa i na taj način uticati na sigurnost u izvođenju zaključaka o promenama sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima. Iz navedenog razloga ispitan je uticaj AS na čistoću izolovanog HSA, na određivanje koncentracije proteina Biuretskim reagensom i na određivanje sadržaja tiol-grupa sa DTNB.

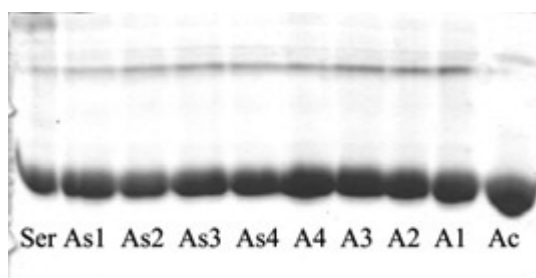
Uticaj AS na čistoću izolovanog HSA

U laboratorijskoj praksi primenjuju se različite tehnike za uklanjanje malih jona i molekula iz rastvora proteina (dijaliza, gel hromatografija, ultrafiltracija). Budući da postupak izolovanja HSA iz seruma vremenski treba da bude što kraći (da bi se izbegla oksidaciju HSA-SH grupa tokom izolovanja), za uklanjanje AS izabran je postupak

ultrafiltracije kroz centrikone (cut off 30,000, Amicon Ultra-15, Millipore, Carrigtwohill, Ireland), pri čemu se postiže recovery HSA od 96,2 %.

HSA je izolovan iz seruma 15 zdravih osoba u dva koraka taloženjem sa AS-om na gore opisan način. Podeljen je u dva dela, iz jednog dela uklonjen je AS ultrafiltracijom. Zastupljenost monomera HSA u dobijenim preparatima određena je denzitometrijskom analizom gelova nakon nativne elektroforeze.

Na elektroforegramu se ne uočavaju značajne razlike u broju i intenzitetu traka kod preparata HSA, dobijenih sa i bez uklanjanja AS (Slika 39). Pored dominantne trake monomera HSA, u gornjem delu gela uočava se jedna manje intenzivna traka (koja je prisutna i u serumu) i veći broj traka koje se jedva naziru. Zastupljenost monomera HSA u preparatima izolovanim bez uklanjanja AS ($86,3 \pm 4,5$ %) gotovo je jednaka zastupljenosti u preparatima iz kojih je AS uklonjen ($86,7 \pm 5,1$ %) (Tabela 17). Pair sample t test je, takođe, pokazao da ne postoji statistički značajna razlika između procentualne zastupljenosti monomera HSA u pojedinačnim uzorcima (bez i sa uklanjanjem AS). Dakle, uklanjanje AS u postupku izolovanja HSA, sa aspekta dobijanja veće čistoće izolovanog preparata, nije neophodno. Pored toga, ovim je još jednom potvrđeno da se dvostepenim taloženjem sa AS-om dobija veća čistoća izolovanog HSA ($86,3 \pm 4,5$ %) nego kad se on izoluje afinitetnom hromatografijom ($73,8 \pm 8,5$ %).



Slika 39. Nativna elektroforeza 4 uzorka HSA izolovanog taloženjem AS od 50 do 65 %, bez (linije As 1-4) i sa uklanjanjem AS (linije A 1-4) ultrafiltracijom. Traka Ac potiče od uzorka komercijalnog HSA, a traka Ser predstavlja serum jednog uzorka. Elektroforeza je urađena sa 10 % poliakrilamidnim gelom.

U toku postupka ultrafiltracije ne dolazi do porasta procentualne zastupljenosti kontaminirajućih proteina (koji imaju veću molekulsku masu u odnosu na monomer HSA) u preparatu HSA zato što korišćena membrana za ultrafiltraciju (cut off 30 000 Da), koja sa većom efikasnošću zadržava proteine većih molekulskih masa u odnosu na HSA (recovery za HSA 96,2 %).

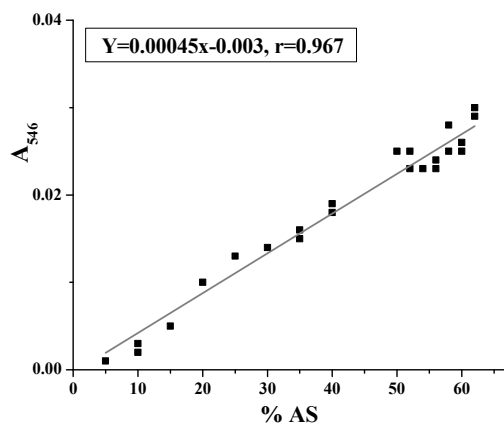
Tabela 17. Procentualna zastupljenost monomera HSA u preparatima izolovanim taloženjem sa AS-om (bez i sa uklanjanjem AS ultrafiltracijom) iz 15 seruma zdravih osoba, određena denzitometrijskom analizom gelova nakon native elektroforeze.

Uzorak seruma	Zastupljenost monomera HSA (%) u izolovanim preparatima	
	bez uklanjanja AS	sa uklanjanjem AS
1.	86,9	84,6
2.	85,6	85,7
3.	77,8	79,3
4.	83,6	87,0
5.	87,9	88,0
6.	83,5	83,2
7.	77,6	77,9
8.	87,2	84,5
9.	85,3	82,0
10.	92,5	93,0
11.	90,2	90,7
12.	90,9	90,0
13.	92,2	89,9
14.	85,1	86,7
15.	89,0	97,2
X ± σ	86,3 ± 4,5	86,7 ± 5,1

Uticaj amonijum-sulfata na određivanje koncentracije proteina u izolovanim HSA preparatima

Da bi se odredio sadržaj HSA-SH grupa (mmol –SH/mmol HSA) u izolovanim preparatima HSA, potrebno je odrediti koncentraciju HSA (mmol/l) i koncentraciju tiol-grupa. Pre optimizacije uslova izolovanja HSA taloženjem sa AS, sa ciljem dobijanja što veće čistoće i prinosa izolovanog HSA, bilo je potrebno proveriti uticaj AS prisutnog u izolovanom preparatima na određivanje koncentracije proteina i tiol-grupa.

Relativno visoke koncentracije proteina u izolovanom HSA i prisustvo kontaminirajućih proteina izdvojili su biuretsku metodu kao pogodnu za određivanje koncentracije proteina u izolovanom HSA. Uticaj AS u izolovanom HSA (nakon centrifugiranja staloženi HSA je rastvaran u natrijum-fosfatnom pufer pH 7,4) na apsorbancu uzorka ispitan je merenjem apsorbance biuretskog reagensa u prisustvu različitih zasićenja AS (od 5 do 65 % u natrijum-fosfatnom pufer pH 7,4) u odnosu na slepu probu (biuretski reagens sa natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 40. Može se videti da postoji linearna zavisnost između sadržaja AS u reagensu i apsorbance biuretskog reagensa na 546 nm ($y=0,00045x+0,003$; $r=0,967$).



Slika 40. Doprinos AS apsorbanci biuretskog reagensa na 546 nm, pri različitim zasićenjima AS (od 5 do 65 % u natrijum-fosfatnom pufer pH 7,4).

Doprinos AS apsorbanaciji reagensa se kreće u opsegu od 0,001 do 0,034, pri porastu zasićenja AS od 5 do 65 %. Pošto se za sva izolovanja HSA iz seruma (taloženjem sa AS-om) u drugom koraku taloženja upotrebljava zasićenje AS od 65 %, doprinos AS u izolovanom HSA na apsorbanču biuretskog reagensa je jednak za sve uzorke. Međutim, uzorci izolovanog HSA se međusobno razlikuju po koncentraciji proteina, što je uslovljeno razlikama u koncentraciji proteina u serumu iz koga se HSA izoluje. Koliki je uticaj prisutnog AS u izolovanom HSA na određivanje koncentracije proteina, provereno je izolovanjem HSA iz 15 uzoraka seruma zdravih osoba i određivanjem koncentracija proteina biuretskim reagensom, bez i sa primenom korekcije apsorbančije uzorka za apsorbanču koja potiče od prisustva AS u biuretskom reagensu (Tabela 18).

Tabela 18. Koncentracija proteina u preparatima HSA, koji su izolovani taloženjem sa AS-om iz seruma 15 zdravih osoba, određena biuretskim reagensom. Apsoibanča bojenog proizvoda uzorka korigovana je za apsoibanču koja potiče od prisustva AS u biuretskom reagensu.

Uzorak	Koncentracija proteina (g/l)		Greška (%)
	bez korekcije	sa korekcijom	
1.	37,8	36,2	4,2
2.	24,9	23,3	6,4
3.	20,4	18,8	7,8
4.	36,8	35,2	4,3
5.	33,2	31,7	4,8
6.	34,6	33,1	4,6
7.	26,1	24,5	6,1
8.	29,5	27,9	5,4
9.	30,5	28,9	5,2
10.	24,5	22,9	6,4
11.	29,5	27,9	5,4
12.	23,1	21,6	6,8
13.	26,7	25,1	5,9
14.	27,7	25,7	7,1
15.	28,1	26,5	5,6
X ± σ	28,9 ± 5	27,3 ± 5	5,7 ± 1

Iz tabele 18. se vidi da su određene vrednosti koncentracije proteina u izolovanom HSA bez korekcije apsorbanije uzorka veće za 4,2 do 7,8 % ($5,7 \pm 1$ %) u odnosu na korigovane vrednosti. Kako ova razlika može da bude veća od dozvoljene analitičke greške, prisustvo AS u izolovanom HSA može da utiče na tačnost određivanja koncentracije proteina biuretskim reagensom, što dalje može da dovede do smanjenja pouzdanosti određivanja sadržaja HSA-SH grupa. Da bi se izbegao uticaj AS u izolovanom HSA na određivanje koncentracije proteina u njemu, potrebno je ukloniti AS ili korigovati apsorbanu uzorka za apsorbanu koja potiče od prisustva AS u biuretskom reagensu.

Pouzdanost određivanja koncentracije tiol-grupe u izolovanim HSA preparatima

Određivanje koncentracije tiol-grupa (mmol/l) u izolovanom HSA je treći korak u postupku određivanja sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA. Da li prisustvo AS u izolovanom HSA utiče na određivanje koncentracije tiol-grupa sa DTNB? Pouzdanost određivanja koncentracije tiol-grupa u izolovanom HSA proverena je metodom standardnog dodatka. Komercijalni HSA (200 g/l, 96 % čistoće) razblažen je sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 tako da sadrži 205 μ M tiol-grupa. U ovaj rastvor dodavane su različite količine tiol-grupa koje potiču od komercijalnog HSA, koji je razblažen sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 i u kome je zasićenje AS bilo 65 %.

Vrednosti dobijene za RSD bile su opsegu od 2,89 do 3,49 %, a recovery vrednosti od 98,1 do 100,6 % (Tabela 19), što ukazuje da je određivanje koncentracije HSA-SH grupa sa DTNB-om precizno i tačno. AS prisutan u izolovanom HSA ne utiče na pouzdanost određivanja koncentracije Cys34-SH grupe u izolovanom HSA.

Tabela 19. Preciznost i tačnost određivanja koncentracije tiol-grupa u izolovanom HSA. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD za pet određivanja.

Odmerena koncentracija tiol-grupa (μ M)	Koncentracija tiol-grupa (μ M)		Recovery (%)	RSD (%)
	Očekivana	Određena		
205*+110**	315	308	98,9 \pm 2,9	2,89
		321		
		303		
		305		
		322		
205+210	415	393	98,1 \pm 3,4	3,49
		408		
		416		
		399		
		429		
205+285	490	483	100,5 \pm 3,3	3,25
		488		
		485		
		485		
		521		

*Komercijalni HSA koji sadrži 205 μ M tiol-grupa

** Komercijalni HSA, koji je razblažen sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 i u kome je zasićenje AS bilo 65 %

4.8. Uticaj načina taloženja sa AS-om (čvrst ili zasićeni rastvor) na čistoću izolovanog HSA

Taloženje proteina sa AS-om se može izvesti sa čvrstim ili zasićenim rastvorom AS-a (ZAS) (Scopes, 1994). U napred opisanim eksperimentima izolovanja HSA iz seruma taloženjem sa AS-om korišćen je ZAS, kome je pH podešeno na 7,4. Male zapremine uzorka (do 1 ml), dužina trajanja i jednostavnost taloženja (ZAS se ukapava u serum uz neprestano mešanje) su bili kriterijumi koji su odredili taloženje sa ZAS. Mada je taloženje proteina sa ZAS-om brže i jednostavnije u odnosu na taloženje sa čvrstim AS-om, u nekim eksperimentima bilo je potrebno izolovati veće količine HSA iz pool-a seruma. U tom slučaju, jednostavnije je taložiti proteine sa čvrstim AS-om, jer se na taj način izbegava rad sa velikim zapreminama. AS je kiselina čijim rastvaranjem se smanjuje pH rastvora, što

može uticati na postupak izolovanja HSA zbog činjenice da je on najkiseliji protein seruma (pI oko 5) (Peters, 1996), čija rastvorljivost opada smanjenjem pH (Peters, 1996). Veći stepen taloženja HSA na pH vrednostima nižim od pH 7,4 (usled taloženja čvrstim AS-om) može da utiče na čistoću i prinos izolovanog HSA.

Da li način taloženja AS-om (čvrst ili zasićen rastvor) utiče na čistoću izolovanog preparata HSA provereno je paralelnim eksperimentima taloženja HSA iz 7 seruma zdravih osoba. Procentualna zastupljenost monomera HSA u izolovanom preparatima određena je denzitometrijskom analizom gelova nakon native elektroforeze (Tabela 20).

Ako se uporede dobijene vrednosti procentualne zastupljenosti monomera HSA u izolovanom HSA za pojedinačne uzorke, može se videti da se vrednosti razlikuju od 0,1 do 13,3 %. Za sve uzorke, osim za uzorak broj 5, procentualna zastupljenost monomera HSA u izolovanom HSA pri taloženju čvrstim AS-om je viša u odnosu na taloženje ZAS-om. Razlika između srednje vrednosti procentualne zastupljenosti monomera HSA u preparatu izolovanom taloženjem sa čvrstim AS-om ($84,5 \pm 4,1$ %) i srednje vrednosti dobijene taloženjem sa ZAS-om ($84,1 \pm 7,0$ %) nije statistički značajna, kao ni razlike između pojedinačnih uzoraka.

Tabela 20. Procentualna zastupljenost monomera HSA u preparatima HSA koji su izolovani taloženjem sa AS (čvrstim ili zasićenim rastvorom) iz 7 seruma zdravih osoba, određena denzitometrijskom analizom gelova nakon native elektroforeze.

Uzorak seruma	Zastupljenost (%) monomera u HSA izolovanom taloženjem sa	
	Čvrstim AS	Zasićenim rastvorom AS
1.	83,5	83,4
2.	87,5	83,9
3.	91,9	90,4
4.	84,9	83,8
5.	81,4	94,7
6.	79,5	72,9
7.	82,7	79,8
X±σ	84,5±4,1	84,1±7,0

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da način taloženja HSA, sa čvrstim AS-om ili ZAS-om, značajno ne utiče na čistoću izolovanog HSA. Za izolovanje HSA iz malih zapremina seruma pogodnije je koristiti zasićeni rastvor AS, jer se na taj način znatno olakšava postupak izolovanja HSA, dok se za izolovanje HSA iz većih zapremina seruma može koristiti čvrst AS.

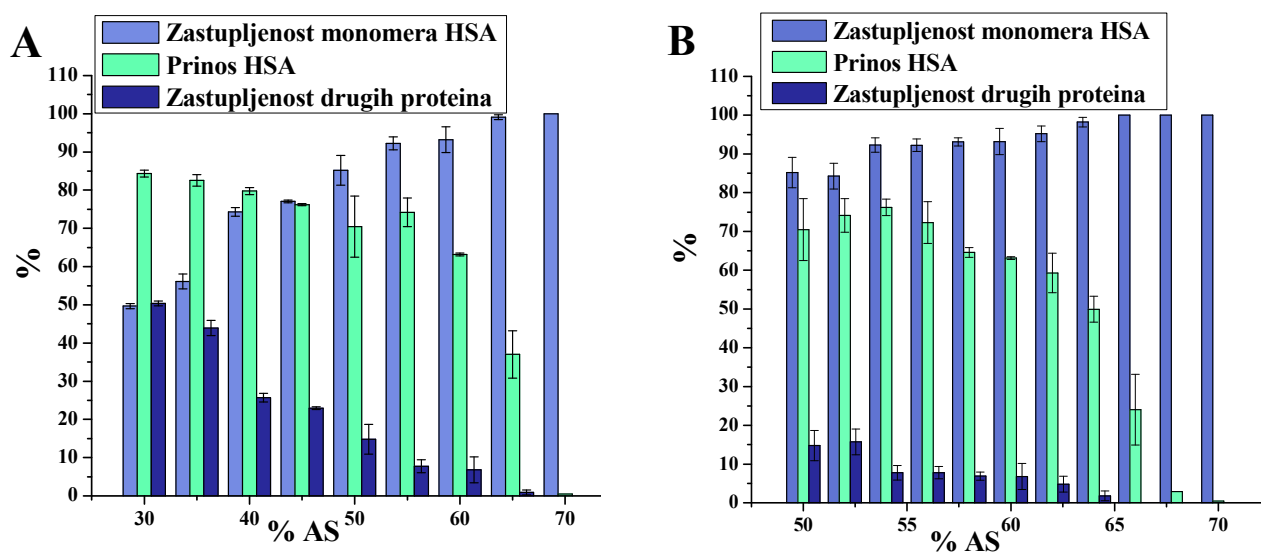
4.9. Optimizacija uslova za izolovanje HSA iz seruma taloženjem s amonijum-sulfatom

Uticao zasićenja AS na čistoću i prinos izolovanog HSA

Preliminarni eksperimenti izolovanja HSA iz seruma taloženjem sa AS-om su pokazali da je čistoća izolovanog HSA značajno veća od čistoće HSA izolovanog afinitetnom hromatografijom, i da bi se daljom optimizacijom uslova taloženja sa AS-om mogla postići još veća čistoća i prinos preparata. Stoga je ispitan uticaj zasićenja AS u oba koraka taloženja (u prvom koraku za taloženje globulina, a potom u drugom za taloženje HSA) na čistoću i prinos izolovanog HSA. Na osnovu činjenice da se globulini potpuno talože iz poluzasićenog rastvora AS, dok HSA ostaje rastvoren u njemu (Hebert, 1974), prvo je provereno koliko globulinske frakcije i HSA zaostaje u supernatantu pri različitim zasićenjima AS (od 35 do 70 %) u prvom koraku taloženja. Za taloženje je upotrebljen pool seruma zdravih osoba, a zastupljenost drugih proteina i monomera HSA u supernatantu (%) određena je denzitometrijskom analizom gelova nakon native elektroforeze. Prinos HSA (%) u supernatantu izražen je kao procenat količine monomera HSA u supernatantu, u odnosu na početnu količinu HSA u zapremini seruma uzetoj za izolovanje HSA.

Nakon uklanjanja proteina, koji se talože pri zasićenjima AS od 30 i 35 %, u supernatantu pored HSA zaostaju značajne količine drugih proteina sa procentualnom zastupljenošću od 44 do 50 % (Slika 41A), što je saglasno sa literaturnim podacima da se globulinska frakcija taloži tek pri zasićenju AS oko 50 % (Hebert, 1974). Pri zasićenju AS od 50 % u supernatantu zaostaje $14,8 \pm 3,9$ % drugih proteina i dalje povećanje zasićenja AS na 55% dovodi do dodatnog pada procentualne zastupljenosti drugih proteina u supernatantu za 7 %, tako da čistoća monomera HSA u supernatantu dostiže vrednost od $92,2 \pm 1,7$ %. Ova vrednost čistoće monomera HSA je reda veličine čistoće komercijalnih

preparata HSA namenjenih za kliničke svrhe, i bila bi zadovoljavajuća što se tiče određivanja sadržaja HSA-SH grupa i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu. Ako se posmatra prinos HSA u supernatantu, vidi se da postepenim porastom zasićenja od 30 do 70 %, prinos monomera HSA opada od 84,3 do 0,5 %, jer pri porastu zasićenja AS dolazi do sve većeg taloženja HSA zajedno s globulinima. Pri promeni zasićenja od 50 do 55 % dolazi do blagog skoka u prinosu HSA od $70,4 \pm 8 \%$ do $74,2 \pm 3,7 \%$. Daljim porastom zasićenja AS dolazi do sve značajnijeg smanjenja prinosa HSA. Sa druge strane, pri zasićenju AS od 65% u supernatantu zaostaje samo 0,9 % početne količine HSA, a pri zasićenju od 70 % samo 0,5 %, što ukazuje da bi zasićenje AS u drugom koraku taloženja trebalo da bude veće od 65 % (Slika 41A).



Slika 41. Procentualna zastupljenost monomera HSA i drugih proteina i prinos HSA (%) u supernatantima koji zaostaju nakon prvog koraka taloženja sa AS-om (pri zasićenjima od: 30 do 70 % (A) i 50 do 70 % (B)).

Dakle, prvi korak taloženja (zasićenje AS pri kojem se talože globulini) je ključan za čistoću i prinos izolovanog HSA, a drugi korak (koncentracija AS sa kojom će se istaložiti HSA), značajan je za prinos ovog proteina. Promene prinosa HSA u oblasti zasićenja od 50-55% (Slika 21A) ukazale su na potrebu za detaljnijim ispitivanjem opsega

zasićenja AS od 50 do 70 % u prvom koraku taloženja, u cilju iznalaženja zasićenja pri kojem će se dobiti najbolji odnos zastupljenosti i prinosa HSA. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 41B i u Tabeli 21.

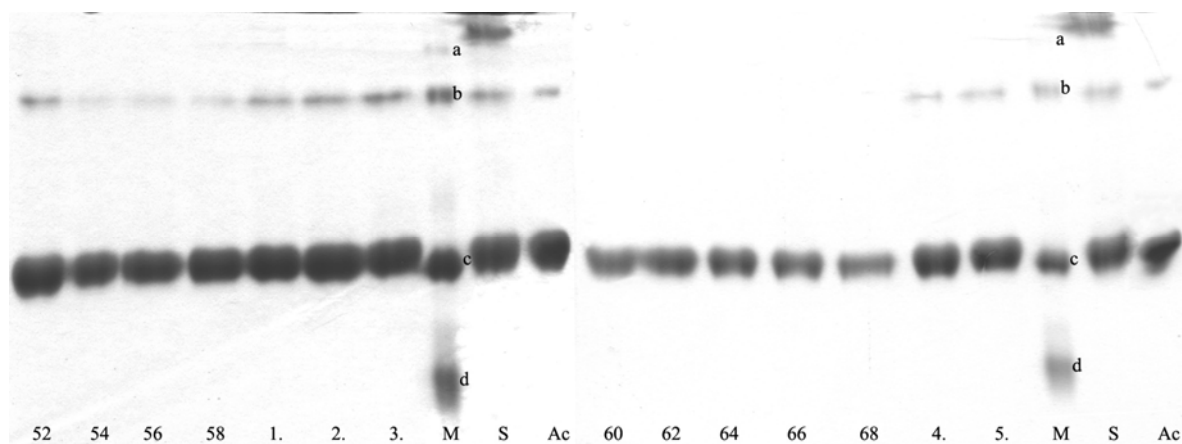
Postepeni porast zasićenja AS od 50 do 70 % dovodi do povećanja procentualne zastupljenosti HSA u supernatantima od 85,2 do 100 %, uz istovremeno smanjenje zastupljenosti drugih proteina. Sa druge strane, pri porastu zasićenja AS od 50 do 54 % dolazi do povećanja prinosa HSA od 70,4 do 76,2 %, dalje povećanje zasićenja AS dovodi do postepenog pada prinosa HSA. Pri zasićenju AS od 54 % dobijen je najbolji odnos procentualne zastupljenosti HSA i globulina ($92,3 \pm 1,9$ % vs. $7,7 \pm 1,9$ %) uz najveći prinos HSA ($76,2 \pm 2,1$ %, Tabela 21). Dalje povećanje zasićenja AS do 60 % ne dovodi do značajnog povećanja procentualne zastupljenosti HSA u supernatantu (samo za 1%), dok se prinos HSA značajno smanjuje (za 13,5 %). Dakle, optimalno zasićenje AS:

- u prvom koraku taloženja iznosi 54 %, jer se postiže najbolje odvajanje HSA i drugih proteina, uz najbolji prinos HSA;
- u drugom koraku taloženja iznosi 70 %, jer tada u supernatantu zaostaje samo 0,5 % početne količine HSA.

Tabela 21. Zastupljenost monomera HSA i drugih proteina i prinos HSA (%) u supernatantima koji zaostaju nakon prvog koraka taloženja sa AS (pri zasićenjima od 50 do 70 %). Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD za dva ponovljena eksperimenta.

AS (%)	Zastupljenost monomera HSA (%)	Prinos HSA (%)	Zastupljenost drugih proteina (%)
50	85.2 ± 3.9	70.4 ± 8	14.8 ± 3.9
52	84.3 ± 3.3	74.1 ± 4.3	15.7 ± 3.3
54	92.3 ± 1.9	76.2 ± 2.1	7.7 ± 1.9
56	92.2 ± 1.6	72.3 ± 5.4	7.8 ± 1.6
58	93.1 ± 1.0	64.6 ± 1.3	6.9 ± 1.0
60	93.2 ± 3.4	63.1 ± 0.4	6.8 ± 3.4

Na Slici 42. prikazana je nativna elektroforeza supernatanata, koji zaostaju nakon prvog koraka taloženja sa zasićenjima AS od 52 do 68 %, i izolovanog HSA dvostepenim taloženjem sa AS-om iz pet seruma zdravih osoba.



Slika 42. Nativna PAGE supernatanata koji zaostaju nakon prvog koraka taloženja sa različitim zasićenjima AS (od 52 do 68 %) iz pool-a seruma (linije 52-68) i HSA izolovanog dvostepenim taloženjem sa AS-om (prvo taloženje sa 54 % zasićenjem, i drugo (iz supernatanta) sa 70 % zasićenjem) iz seruma 5 zdravih osoba (linije 1-5). Linija M predstavlja proteinske markere a) ureazu, b) BSA dimer, c) BSA monomer and d) albumin iz kokošijeg jajeta. Linija S predstavlja uzorak pool-a seruma, a linija Ac komercijalni HSA. Elektroforeza je izvedena na 9 % poliakrilamidnom gelu, a proteini su obojeni CBB-om.

Pri porastu zasićenja AS od 52 do 68 %, broj kontaminirajućih traka i intenzitet najobilnije kontaminirajuće trake u supernatantima opada u odnosu na broj traka i njihov intenzitet u izolovanom HSA pri 50 % zasićenju AS (Slika 37). U uzorcima izolovanog HSA (Slika 42, linije 1 do 5) pored dominantne trake, koja po pokretljivosti odgovara monomeru HSA, uočava se i prisustvo druge proteinske trake sa procentualnom zastupljenošću oko 10 %, a koja po pokretljivosti odgovara dimeru BSA. Uzimajući u obzir da ova traka, takođe, postoji u komercijalnom HSA (traka Ac) i u serumu i da je u serumu nađena slična procentualna zastupljenost monomera i dimera HSA (Mera i sar., 2005), pretpostavljeno je da ova traka odgovara dimeru HSA. U slučaju da se radi o nekom

drugom proteinu, neophodno je ustanoviti da li dati protein ima slobodne -SH grupe, koje bi moglo uticati na određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

Primenom dvostepenog postupka taloženja HSA sa AS-om (prvo taloženje sa 54 % zasićenjem i drugo (iz supernatanta) sa 70 % zasićenjem), iz pet seruma izolovan je HSA sa srednjom vrednošću procentualne zastupljenosti monomera HSA od $91,9 \pm 3,6$ % i prinosom od $69,7 \pm 4,4$ %.

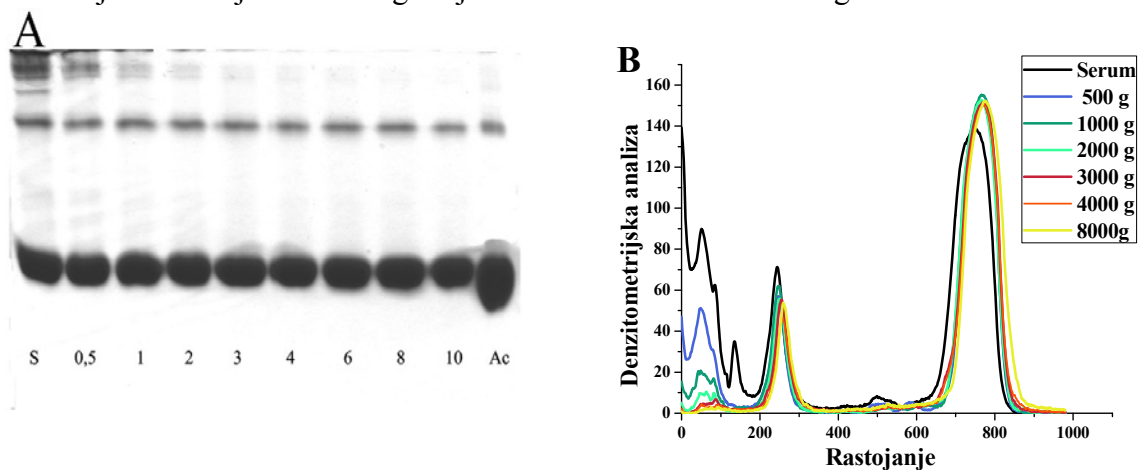
Uticao relativne centrifugalne sile na čistoću izolovanog HSA

U preliminarnim eksperimentima izolovanja HSA, nakon prvog koraka taloženja sa 50 % zasićenjem AS, staloženi proteini (pored globulina taloži se i deo HSA) su uklonjeni centrifugiranjem u toku 5 minuta na 3 500 g. Iz zaostalog supernatanta, HSA je taložen sa 65 % zasićenjem AS, a zatim izdvojen centrifugiranjem u toku 5 minuta na 6 000 g. U ovom eksperimentu ispitano je da li relativna centrifugalna sila (RCF), primenjena za uklanjanje staloženih proteina, nakon prvog koraka taloženja može uticati na čistoću izolovanog HSA.

U pool-a seruma dodat je ZAS do 50 % zasićenja, a zatim su iz alikvota (zapremine 1,5 ml), uklanjani istaloženi proteini centrifugiranjem u toku 5 minuta primenom različitih RCF od 500 do 10 000 g. Iz zaostalih supernatanta HSA je taložen sa 65 % zasićenjem AS, a zatim je izdvojen centrifugiranjem u toku 5 minuta pri RCF od 6 000 g. Čistoća izolovanog HSA određena je denzitometrijskom analizom gelova nakon native elektroforeze (Slika 43). Ceo eksperiment je urađen u triplikatu.

Sa Slike 43. vidi se da postepenim porastom primenjene RCF od 500 do 10000 g za uklanjanje proteina nakon prvog koraka taloženja, dolazi do smanjenja broja i zastupljenosti kontaminirajućih traka u izolovanom HSA. Upotrebom RCF od 500 do 2000g u gornjem delu gela zaostaju niz traka slabog intenziteta koje po pokretljivosti odgovaraju globulinima iz seruma. Zastupljenost ovih traka opada od $16,7 \pm 1,5$ % do $0,6 \pm 0,07$ % pri porastu RCF od 500 g od 10 000 g. Primenom RCF od 3500 g (uslov pri kojem je do sada centrifugirano nakon prvog koraka taloženja) dobija se procentualna zastupljenost monomera HSA u izolovanom HSA od $83,5 \pm 2,1$ %, što je saglasno sa dobijenom srednjom vrednošću zastupljenosti monomera u HSA izolovanom iz 10 seruma zdravih osoba ($83,4 \pm 5,9$ %) (Tabela 16). Sa Slike 43B vidi se da primenom RCF od 4000

g u prvom koraku centrifugiranja dolazi do skoro potpunog gubitka globulinske trake sa početka gela. Primenom RCF većih od 4000 g dobija se talog čije rastvaranje je značajno otežano. Zbog toga, kao i potrebe kliničke prakse da se skрати vreme izolovanja HSA, u svim narednim eksperimentima izolovanja HSA, proteini istaloženi nakon prvog koraka taloženja su uklanjani centrifugiranjem u toku 5 minuta na 4000 g.



Slika 43. Nativna PAG elektroforeza (A) i denzitometrijska analiza (B) uzoraka izolovanog HSA taloženjem sa AS-om u dva koraka (prvi korak taloženja sa 50 % zasićenjem AS i centrifugiranje u toku 5 minuta pri relativnim centrifugalnim silama od 500 (linija 0,5) do 10 000 g (linija 10), i drugi korak taloženja sa 65 % zasićenjem AS i centrifugiranje u toku 5 minuta na 6 000 g) . Linija S predstavlja uzorak pool-a seruma, a linija Ac komercijalni HSA. Elektroforeza je izvedena na 9 % poliakrilamidnom gelu, a proteini su obojeni CBB-om.

Koncentracije proteina, određene u izolovanim preparatima HSA (prvo centrifugiranje od 4000 do 10000 g, a dugo na 6000 g), bile su od 26,2 do 27,1 g/l (razlike između pojedinačnih određenih vrednosti koncentracija proteina bile su u okviru analitičke greške). Kako je zastupljenost monomera HSA relativno konstantna u svim uzorcima $87,5 \pm 2,2$ %, može se zaključiti da primena RCF više od 6000 g za drugo centrifugiranje ne dovodi do povećanja čistoće i prinosa izolovanog HSA, ali značajno otežava rastvaranje taloga HSA. Dakle, primenjeni uslovi centrifugiranja u drugom koraku izolovanja HSA

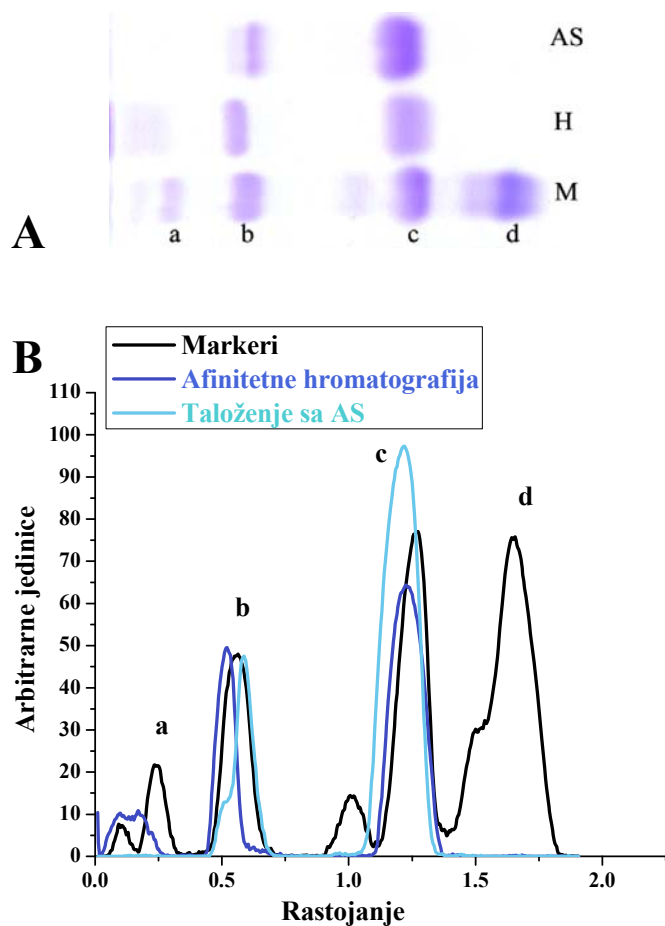
taloženjem sa AS-om (5 minuta na 6000 g) su odgovarajući, pa su primenjeni za sva naredna izolovanja HSA.

Nativna elektroforeza pokazuje da je u svim uzorcima izolovanog HSA, pored dominantne trake monomera HSA, prisutna i druga traka sa zastupljenošću od $13,5 \pm 0,8$ %. Uzimajući u obzir da ova traka postoji u serumu sa skoro identičnom procentualnom zastupljenošću ($13,2 \pm 0,6$ %), i da po pokretljivosti odgovara traci prisutnoj u komercijalnom HSA i dimeru BSA, to je još jednom ukazalo na mogućnost da se radi o dimeru HSA.

4.10. Da li je kontaminirajuća traka, prisutna u HSA izolovanom iz seruma, dimer albumina?

U eksperimentu u kojem je poređena čistoća preparata HSA izolovanih iz istih seruma afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue i taloženjem sa AS (Poglavlje 4.6., Slika 38), uočena je razlika u pokretljivosti najintenzivnije kontaminirajuće trake prisutne u gornjem delu gela nakon native PAG elektroforeze (Slike 38. i 44A). Međutim, ako se uradi denzitometrijska analiza gela (Slika 44B) uočava se da postoji preklapanje pokretljivosti kontaminirajuće trake u preparatima HSA izolovanim primenom obe metode sa trakom koja potiče od dimera BSA (traka b). Denzitometrijska analiza gela nakon SDS PAG elektroforeze HSA izolovanog afinitetnom hromatografijom (Slika 23 B i C) pokazala je da se radi o dimeru HSA. Da bi se proverilo, da li glavna kontaminirajuća traka u HSA izolovanom taloženjem potiče od dimera HSA, urađena je nativna i redukujuća SDS PAG elektroforeza i imunoblot HSA izolovanog taloženjem sa AS-om iz tri seruma.

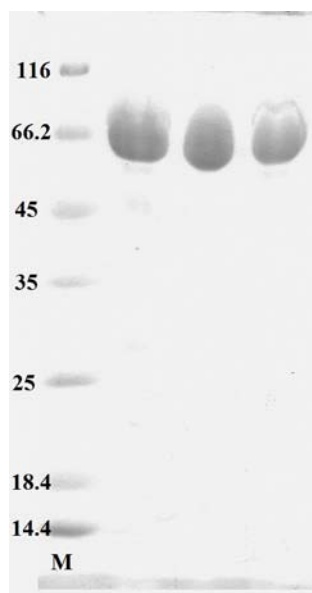
SDS PAG elektroforezom (Slika 45) HSA, izolovanog iz sva tri uzorka seruma, utvrđeno je prisustvo samo jedne trake, koja po masi odgovara masi monomera BSA (66,2 kDa). Dakle, kontaminirajuća traka u HSA izolovanom dvostepenim taloženjem sa AS, potiče od dimera HSA. Ovaj zaključak je potvrđen imunoblot-om sa antitelima prema HSA, istih uzoraka nakon native i SDS elektroforeze.



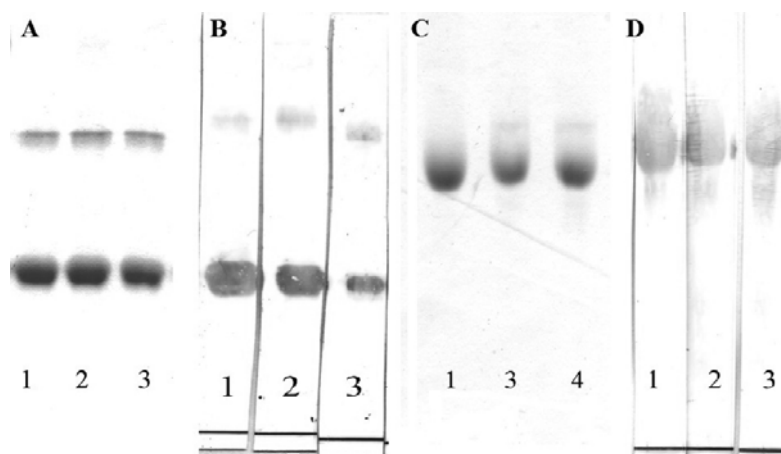
Slika 44. Elektroforetska pokretljivost proteinskih traka u preparatima HSA izolovanim iz istog seruma afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue (linija H) i taloženjem sa AS-om (linija AS) na gelu nakon native PAG elektroforeze (A) i denzitometrijska analize gela (B). Linija M -proteinski markeri: a) ureaza, b) BSA dimer, c) BSA monomer i d) albumin iz kokošijeg jajeta.

Imunoblot preparata HSA izolovanih taloženjem sa AS-om pokazuje prisustvo dve trake nakon native, odnosno jedne trake nakon SDS PAG elektroforeze (Slika 46). Ovi rezultati potvrđuju prethodni zaključak da kontaminirajuća proteinska traka, dobijena nativnom elektroforezom izolovanog HSA, potiče od dimera HSA. Uočena razlika u pokretljivosti dimerskih traka HSA, dobijenih prilikom izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom i taloženjem sa AS-om, mogla bi se objasniti postojanjem male razlike u

naelektrisanju dimera HSA, do koje dolazi usled selekcije molekula HSA (po vrsti i broju vezanih molekula Mk za HSA) od strane Cibacron Blue kolone.



Slika 45. SDS PAGE HSA izolovanog taloženjem sa AS-om iz tri seruma zdravih osoba. Linija M predstavlja proteinske markere. Elektroforeza je izvedena na 12 % gelu, 15 μ g proteina je naneto po traci i proteini su obojeni CBB-om.



Slika 46. Nativna (A) i SDS (C) PAG elektroforeza i imunoblot (B i D) HSA izolovanog iz tri seruma zdravih osoba taloženjem sa AS-om.

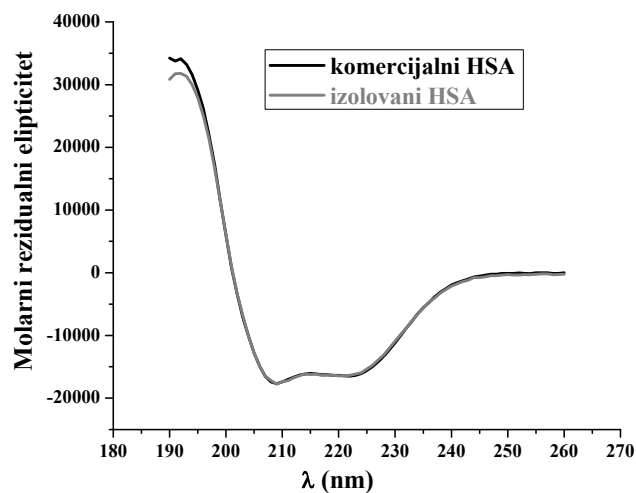
Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da kontaminirajuća proteinska traka u HSA izolovanom taloženjem sa AS potiče od dimera HSA. Zbog istog odnosa monomera i dimera u izolovanom HSA i serumu, prisustvo dimera u izolovanom HSA neće uticati na određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

Primenom navedenih uslova taloženja (u prvom koraku zasićenje AS 54 % i u drugom koraku 70 %) izoluje se HSA čistoće 100 %. Metoda izolovanja HSA iz seruma je jednostavna i brza, što je važno za kliničku praksu.

4.11. Karakterizacija HSA izolovanog taloženjem sa amonijum-sulfatom

Predloženim postupkom izolovanja HSA dvostepenim taloženjem sa AS-om (koji se zasniva na reverzibilnom taloženju proteina) dobija se čist HSA. U Poglavljima 4.5 dokazano je da Mk vezane za HSA mogu da izazovu pored promene konformacije molekula HSA, i blagu promenu naelektrisanja molekula HSA. Ako se uzme u obzir da HSA pored Mk vezuje i transportuje brojne endogene i egzogene ligande (bilirubin, lekovi, jone metala, ksenobiotici), koji mogu biti naelektrisani, čije vezivanje može dovesti ne samo do promene konformacije već i neto naelektrisanja molekula HSA, potrebno je proveriti da li pomenute promene mogu imati efekta na izolovanje i određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

Upoređivanjem far-UV CD spektra HSA izolovanog taloženjem sa AS-om iz seruma zdrave osobe sa spektrom komercijalnog HSA (koji je izolovan iz seruma zdravih osoba), proverena je očuvanost sekundarne strukture molekula HSA. Far-UV CD spektri HSA izolovanog iz seruma i komercijalnog HSA su praktično identični (Slika 47). Uočavaju se dva minimuma na 208 i 222 nm, što je tipično za proteine koji u sekundarnoj strukturi sadrže samo α -heliks (Manavalan i Johnson, 1983). Kvantifikacijom sadržaja različitih tipova sekundarne strukture u izolovanom i komercijalnom HSA (analiza far-UV CD spektara algoritmom CONTINLL koristeći referentnu bazu proteina SP37) dobijene su procentualne zastupljenosti α -heliksa, β -pločice, β -okreta i neuređene strukture (Tabela 22) Sadržaji α -heliksa u izolovanom HSA (50,92 %) i u komercijalnom HSA (51,64 %) su skoro identični. Dobro slaganje dobijeno je i za ostale strukture. Zaključeno je da se predloženim postupkom izolovanja izoluje HSA u kome je očuvana sekundarna struktura.



Slika 47. Far-UV CD spektri HSA izolovanog iz seruma zdrave osobe i komercijalnog HSA

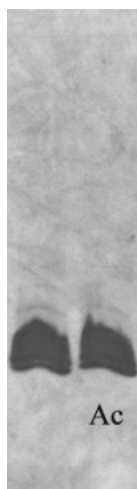
Tabela 22. Procentualna zastupljenost sekundarnih struktura, β -okreta i neuređene strukture u HSA izolovanom taloženjem sa AS-om iz seruma zdrave osobe i u komercijalnom HSA, određena analizom far-UV CD spektara algoritmom CONTINLL.

Struktura	Zastupljenost struktura (%)	
	Izolovani HSA	Komercijalni HSA
α - heliks	50,92	51,64
β - pločica	8,42	8,46
β -okret	16,2	15,08
neuređena	24,55	24,78

Izoelektrofokusanjem preparata HSA izolovanog taloženjem iz seruma zdrave osobe i komercijalnog HSA (Slika 48) dobijene su trake koje se potpuno poklapaju po pokretljivosti, a koje se nalaze u oblasti gela kojoj odgovara pH vrednost od 4,5 do 5,08. Dobijene vrednosti pI za izolovani i komercijalni HSA su u saglasnosti sa literaturnim

vrednostima pI (od 4,7 do 5,16) dobijenim za zamašćeni HSA (Peters, 1996). Da vezani ligandi za HSA, poput Mk mogu da utiču na neto naelektrisanje molekula HSA najbolje pokazuje pI vrednost dobijena za odmašćeni HSA (pI 5,8) (Peters, 1996), koja je viša u odnosu na pI vrednost zamašćenog HSA (od 4,7 do 5,16). U predloženom postupku izolovanja HSA taloženjem sa AS-om, visoka jonska sila zbog prisustva jona AS ne dovodi do disocijacije kompleksa Mk-HSA, jer bi u izolovanom HSA izoelektrofokusanjem dobili profil sa višim vrednostima pI. Na osnovu rezultata ovog eksperimenta zaključeno je da:

- se predloženim postupkom izolovanja HSA taloženjem sa AS-om ne vrši selekcija molekula HSA prema naelektrisanju;
- primenjena visoka jonska sila usled prisustva jona soli AS ne dovodi do disocijacije kompleksa Mk-HSA, što omogućava primenu postupka izolovanja HSA taloženjem sa AS na određivanje vrste i količine vezanih Mk za HSA u različitim patološkim stanjima.



Slika 48. Izoelektrofokusanje HSA koji je izolovan taloženjem sa AS-om iz seruma zdrave osobe i komercijalnog HSA (traka Ac).

4.12. Određivanje sadržaja Cys34-SH grupa u HSA izdvojenom iz seruma nakon prvog, odnosno drugog koraka izolovanja

U eksperimentima u kojima su ispitivani uzroci koji mogu da dovedu do smanjenja pouzdanosti određivanja sadržaja HSA-SH grupa u HSA izolovanom afinitetnom

hromatografijom, pokazano je da postoji selekcija molekula HSA koji će se vezati za afinitetnu kolonu. Kako HSA:

- vezuje i transportuje različite endogene i egzogene ligande (Mk, jone metala, bilirubin, hormone, lekove, ksenobiotike) (Curry i Brick,1999; Petitpas i sar., 2001);
- može biti izmenjen u reakcijama neenzimskog glikozilovanja, karbonilovanja i oksidovanja u različitim patološkim stanjima (Turell i sar., 2009; Acimović i sar.,2010);
- gradi u različitom stepenu mešovite disulfide sa fiziološkim tiolima (cisteinom, homocisteinom, glutationom i cisteinilglicinom (Peters, 1996),

navedene promene strukture molekula HSA mogle bi uticati na postupak izolovanja HSA taloženjem sa AS-om. Sa druge strane, kada se izolovanje HSA vrši taloženjem sa AS-om prema predloženom postupku, u prvom koraku taloženja (pri zasićenju AS od 54 %) taloži se oko 25% molekula HSA. Na osnovu ovih činjenica nameće se pitanje da li sadržaj HSA-SH grupa, određen u izolovanim molekulima HSA, predstavlja realni sadržaj HSA-SH grupa u serumu? Stoga je sadržaj HSA-SH grupa određivan u frakcijima koje se talože nakon prvog, odnosno drugog koraka izolovanja.

Iz sedam seruma zdravih osoba, iz taloga koji je dobijen nakon prvog koraka taloženja (zasićenje AS 54 %), HSA je ekstrahovan sa 45% rastvorom AS. Nakon centrifugiranja i uklanjanja nerastvorenih globulina, HSA je iz rastvora izolovan predloženim postupkom taloženja sa AS, a sadržaj -SH grupa određen je sa DTNB (Tabela 23).

Srednja vrednost sadržaja -SH grupa, u frakciji HSA koja se taloži nakon prvog koraka izolovanja ($0,615 \pm 0,058$ mol-SH/mol HSA), je skoro jednaka dobijenoj srednjoj vrednosti u frakciji HSA koja se taloži nakon drugog koraka ($0,600 \pm 0,036$ mol-SH/mol HSA). Statistička analiza je pokazala odsustvo značajnosti razlike između srednjih vrednosti, kao i između pojedinačnih uzoraka u obe frakcije HSA. Dakle, sadržaj HSA-SH grupa određen u preparatu, koji je izolovan predloženom metodom taloženja sa AS, predstavlja realni sadržaj HSA-SH grupa u serumu.

Tabela 23. Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) u frakciji HSA koja se taloži pri zasićenju AS od 54 % (prvi korak) i pri zasićenju od 70 % (drugi korak izolovanja iz seruma).

Uzorak seruma	Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH grupa/mol HSA)	
	Prvi korak taloženja	Drugi korak taloženja
1.	0,585	0,603
2.	0,617	0,574
3.	0,731	0,672
4.	0,629	0,570
5.	0,572	0,616
6.	0,552	0,590
7.	0,617	0,577
X±σ	0,615 ± 0,058	0,600 ± 0,036

4.13. Validacija metode određivanja sadržaja Cys34-SH grupa u preparatima HSA izolovanim taloženjem sa amonijum-sulfatom

U okviru validacije metode određivanja sadržaja –SH grupa u preparatima HSA izolovanim taloženjem s AS ispitana je preciznost, tačnost i pouzdanosti metode.

4.13.1. Ispitivanje preciznosti metode

Preciznost metode/metoda, od izolovanja HSA do određivanja sadržaja HSA-SH grupa, ispitana je u eksperimentu u kojem je iz pool-a seruma u pentaplikatu urađeno izolovanje HSA taloženjem sa AS i u izolovanim preparatima određen je sadržaj tiol-grupa s DTNB kao reagensom. Sadržaj HSA-SH grupa je bio u opsegu od 0,430 do 0,463 mol -SH/mol HSA, a srednja vrednost je iznosila $0,444 \pm 0,014$ mol -SH/mol HSA (Tabela 24). Vrednost dobijena za RSD (3,2 %) pokazuje da je metoda/metode (od izolovanja HSA do određivanja tiol-grupa) precizna.

Tabela 24. Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA) u preparatima HSA koji su izolovani taloženjem sa AS-om iz pool-a seruma. Izolovanje i određivanje je urađeno u pentaplikati.

	Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA)	RSD (%)
1.	0,463	
2.	0,438	
3.	0,430	3,2
4.	0,455	
5.	0,433	
X ± σ	0,444 ± 0,014	

4.13.2. Ispitivanje tačnosti metode

Tačnost metode/metoda, od izolovanja HSA do određivanja sadržaja HSA-SH grupa, proverena je metodom standardnog dodatka. Za izolovanje HSA uzeta su dva pool-a seruma s različitim sadržajem HSA-SH grupa. U prvom eksperimentu u pool-a seruma sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,577 mol-SH/mol HSA (i koncentracije HSA od 46,8 g/l), dodavan je komercijalni HSA sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,430 mol -SH/mol HSA (i koncentracije HSA od 46,1 g/l), u zapreminskim odnosima 3:1; 1:1 i 1:3. Iz svake pripremljene smeše izolovan je HSA u triplikatu (taloženjem sa AS-om) i određen je sadržaj HSA-SH grupa (Tabela 25).

U drugom eksperimentu, od komercijalnog HSA (koncentracije 45,4 g/l i sadržaja HSA grupa 0,43 mol -SH/mol HSA) i HSA izolovanog taloženjem sa AS-om iz drugog pool-a seruma (koncentracije 72,1 g/l i sadržaja HSA grupa 0,607 mol-SH/mol HSA) pripremljene su tri smeše u zapreminskim odnosima 3:1; 1:1 i 1:3. Iz svake smeše je izolovan HSA u triplikatu (taloženjem sa AS-om) i određen je sadržaj HSA-SH grupa (Tabela 26).

Tabela 25. Ispitivanje tačnosti metode, od izolovanja HSA dvostepenim taloženjem s AS do određivanja sadržaja tiol-grupa s DTNB. HSA je izolovan iz pool-a seruma (sadržaj HSA-SH grupa od 0,577 mol -SH/mol HSA) kome je dodat rastvor komercijalnog HSA (0.430 mol -SH/mol HSA) u zapreminskim odnosima 3:1; 1:1 i 1:3. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD za tri ponovljena eksperimenta.

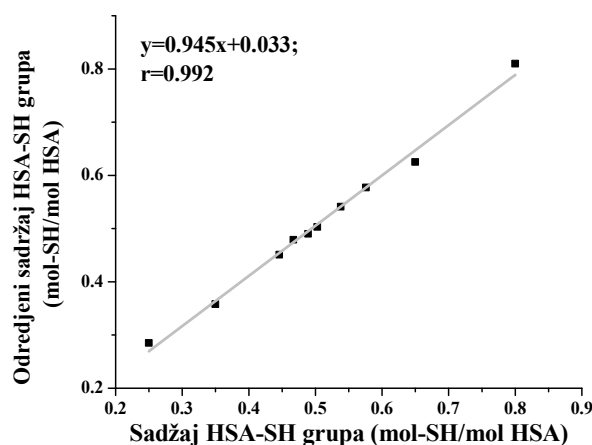
Pool seruma- komercijalni HSA (v/v)	Sadržaj HSA-SH (mol-SH/mol HSA)		Recovery (%)
	Očekivani	Određeni	
3:1	0,540	0,536 \pm 0,015	99,20 \pm 2,79
1:1	0,503	0,517 \pm 0,023	102,80 \pm 4,67
1:3	0,467	0,479 \pm 0,004	102,57 \pm 0,9

Tabela 26. Ispitivanje tačnosti metode, od izolovanja HSA dvostepenim taloženjem s AS do određivanja sadržaja tiol-grupa s DTNB. HSA je izolovan iz pool-a seruma (sadržaj HSA-SH grupa od 0,607 mol -SH/mol HSA) kome je dodat rastvor komercijalnog HSA (0.430 mol -SH/mol HSA) u zapreminskim odnosima 3:1; 1:1 i 1:3. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD za tri ponovljena eksperimenta.

Pool seruma/- komercijalni HSA (v/v)	Sadržaj HSA-SH (mol-SH/mol HSA)		Recovery (%)
	Očekivani	Određeni	
3:1	0,489	0,507 \pm 0,015	103,7 \pm 3,1
1:1	0,538	0,537 \pm 0,008	99,7 \pm 1,6
1:3	0,576	0,582 \pm 0,010	99,3 \pm 2,0

Recovery vrednosti dobijene u prvom eksperimentu izose od 99,2 do 102,8 %, a u drugom od 99,3 do 103,7 %. Srednja vrednost recovery za oba eksperimenta iznosi $101,2 \pm 2,0$ %, što ukazuje da je predložena metoda od izolovanja HSA do određivanja sadržaja HSA-SH grupa tačna.

Tačnost metode proverena je izolovanjem HSA iz komercijalnih rastvora HSA različitih sadržaja HSA-SH grupa (od 0,25 do 0,9 mol -SH/mol HSA), i određivanjem sadržaja tiol-grupa u izolovanim preparatima. Sa Slike 49. se vidi da postoji linearna zavisnost između sadržaja HSA-SH određenog u izolovanim preparatima sa sadržajem u odmerenim uzorcima komercijalnog HSA, sa visokom vrednošću koeficijenta korelacije ($r=0,992$). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je metoda tačna u opsegu fizioloških vrednosti sadržaja HSA-SH grupa (od 0,25 do 0,75 mol-SH/mol HSA).



Slika 49. Ispitivanje tačnosti metode, od izolovanja HSA iz komercijalnih rastvora različitih sadržaja -SH grupa (od 0,2 do 0,9 mol-SH/mol HSA) do određivanja sadržaja tiol-grupa s DTNB.

4.13.3. Provera pouzdanosti metode

Pouzdanost metode proverena je određivanjem doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu, nakon izolovanja HSA dvostepenim taloženjem sa AS-om iz seruma zdravih osoba ($n=10$). Da bi se pouzdanost metode ispitala za što širi opseg sadržaja

ukupnih tiola u serumu, odabrana je grupa zdravih osoba različite starosne dobi i pola. Pouzdanost metode (od izolovanja do kvantifikacije) proverena je određivanjem ukupnog sadržaja tiola u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA (mol -SH/mol HSA) i njihovog doprinosa ukupnom sadržaju tiola u serumu. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 27.

Tabela 27. Rezultati određivanja ukupnog sadržaja tiola u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa u HSA, koji je izolovan dvostepenim taloženjem sa AS-om (mol -SH/mol HSA) i njihovog doprinosa (%) ukupnom sadržaju tiola u serumu deset zdravih osoba.

	Serum HSA ^a		Ukupan sadržaj tiola u serumu (mmol/l)	Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA)	Doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu	
	(g/l)	(mmol/l)			(mmol/l) ^b	(%)
1	53,5	0,705	0,328	0,403	0,284	86
2	48,7	0,733	0,305	0,373	0,273	89,5
3	47,5	0,714	0,391	0,424	0,303	77,5
4	33	0,496	0,303	0,475	0,236	77,8
5	35	0,527	0,335	0,539	0,283	84,5
6	34,2	0,514	0,252	0,359	0,185	73,3
7	36,7	0,552	0,335	0,515	0,284	84,9
8	37,7	0,567	0,303	0,446	0,253	83,5
9	56,6	0,851	0,463	0,472	0,402	86,7
10	51,8	0,779	0,405	0,460	0,358	88,4
X±σ			0,342 ± 0,061	0,447 ± 0,058	0,281 ± 0,06	83,2±5,3

^aZa određivanje koncentracije HSA u serumu (mmol/l) korišćena je Mr HSA 66468 Da.

^bDoprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu izračunat je po sledećoj formuli: mol-SH/mol HSA * serum HSA (mmol/l)

Koncentracija HSA u serumu zdravih osoba bila je u opsegu od 33 do 56,6 g/l, sadržaj ukupnih tiola u serumu bio je od 0,252 do 0,463 mmol/l, a sadržaj HSA-SH grupa u izolovanom HSA od 0,185 do 0,402 mol-SH/mol HSA. Kada se izračunaju doprinosi HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu, dobijaju se vrednosti od 73,3 do 89,5 %, što je za 10,5 do 26,6 % manje od sadržaja ukupnih tiola u serumu. Ova razlika odgovara sadržaju ostalih tiola (tiol-grupe proteina i tioli male molekulske mase) u serumu (Quinlan i sar., 2005; Prakash i Kumar, 2009).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da predložena metoda izolovanja HSA taloženjem sa AS-om omogućava pouzdanije određivanje sadržaja HSA-SH grupa u izolovanom HSA u odnosu na metodu izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue. Stoga rezultati određivanja sadržaja Cys34-SH grupe dobijeni primenom ove metode omogućavaju i pouzdanu procenu antioksidativne sposobnosti HSA molekula u različitim patološkim stanjima.

4.14. Izolovanje HSA iz plazme dvostepenim taloženjem sa amonijum-sulfatom

Osim seruma, u nekim slučajevima plazma može biti pogodniji biološki materijal za procenu parametara oksidativnog stresa (Nielsen i sar., 1998). Stajanjem, HSA-SH grupe se polako oksiduju usled reakcija disulfidne izmene sa prisutnim malim tiolima (cisteinom, homocisteinom, glutationom i cisteinilglicinom), što može da dovede do smanjenje sadržaja ukupnih tiola u serumu i HSA-SH grupa (Roche i sar., 2008). Kako je za izdvajanje seruma potrebno izvesno vreme, napred opisana metoda je primenjena za izolovanje HSA iz plazmi i seruma (radi poređenja) deset zdravih osoba, određen je sadržaj HSA-SH grupa, kao i sadržaja ukupnih tiola (Tabela 28.).

Srednje vrednosti ukupnog sadržaja tiola u plazmi ($0,400 \pm 0,015$ mmol/l) i u serumu ($0,390 \pm 0,019$ mmol/l) se nisu statistički značajno razlikovale ($p < 0,05$). Sadržaji Cys34-SH grupa u HSA izolovanom iz plazme su bili u opsegu od 0,530 do 0,608 mol-SH/mol HSA, a u HSA izolovanom iz seruma od 0,517 do 0,622 mol -SH/mol HSA. Dobijene srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupa ($0,574 \pm 0,026$; $0,570 \pm 0,028$ mol-SH/mol HSA, resp.) se nisu statistički značajno razlikovale. Zaključeno je da:

- vreme utrošeno za izdvajanje seruma ne dovodi do statistički značajnog smanjenja ukupnih tiola i sadržaja Cys34-SH grupa u HSA izolovanom iz seruma u odnosu na plazmu;
- je dvostepena metoda taloženja sa AS-om pogodna ne samo za izolovanje HSA iz seruma, već i iz plazme, tako da oba biološka materijala mogu biti ravnopravno korišćena za izolovanje HSA i određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

Tabela 28. Ukupan sadržaj tiola, sadržaj Cys34-SH grupa u HSA izolovanom dvostepenim taloženjem sa AS-om iz seruma i plazmi deset zdravih osoba.

Uzorak	Plazma		Serum	
	Ukupni tioli (mmol/l)	Sadržaj HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA)	Ukupni tioli (mmol/l)	Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA)
1.	0,402	0,608	0,372	0,574
2.	0,418	0,593	0,384	0,622
3.	0,409	0,538	0,379	0,517
4.	0,368	0,530	0,372	0,559
5.	0,391	0,580	0,391	0,550
6.	0,397	0,574	0,406	0,559
7.	0,413	0,590	0,414	0,575
8.	0,394	0,596	0,404	0,596
9.	0,415	0,581	0,414	0,578
10.	0,394	0,553	0,360	0,571
X±σ	0,400±0,015	0,574 ± 0,026	0,390±0,019	0,570 ± 0,028

4. 15. Mogućnosti primene određivanja sadržaja HSA-SH grupa kao markera u kliničkoj praksi

U brojnim patološkim stanjima, kao što su bolesti jetre i bubrega (Oettl i sar., 2008; Matsuyama i sar., 2009; Sebekova i sar., 2012), uremiji (Wratten i sar., 2001), diabetes mellitus-u (Rasheed, 2006; Guerin-Dubourg i sar., 2012), apnei (Faure i sar., 2008), anemiji i aterosklerozi (Thornalley, 2008) dolazi do oksidativnog i/ili karbonilnog stresa u kojem dolazi do modifikacije proteina. Proteini podležu neenzimskim posttranslacionim modifikacijama, zbog prisustva amino-, guanidino-, tiol-grupa na površini molekula proteina, koje mogu da reaguju sa reaktivnim aldehydima (glukozom, fruktozom, glioksalom, metilglioksalom i 3-deoksiglukozonom) i/ili reaktivnim oksidativnim vrstama (Rondeau i Bourdon, 2011; Aćimović i sar., 2010). Primarni proizvod reakcije između tiol - (ili amino -grupe) jednog molekula proteina i reaktivnih α -okso aldehyda može, u sledećem koraku, reagovati sa tiol- (ili amino-grupom) grupom drugog molekula proteina, što dovodi do umrežavanja proteina i nastajanja krajnjih proizvoda glikozilovanja (Zeng i Davies, 2006). Proteini sa dužim poluživotom, većom zastupljenošću i sa prisutnom slobodnom tiol-grupom na površini proteina (poput HSA) mogu pretrpeti veći stepen modifikovanja u odnosu na proteine koji nemaju slobodnu tiol-grupu, jer se tiol-grupa zbog jače nukleofilnosti u odnosu na amino- i guanidino-grupe ponaša se kao efikasniji hvatač reaktivnih dikarbonila. Iz navedenih razloga sadržaj HSA-SH grupa se smanjuje u stanjima karbonilnog i/ili oksidativnog stresa, tako da određivanje sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima može biti potencijalni marker procene karbonilnog i/ili oksidativnog stresa.

4.15.1. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa kod osoba obolelih od dijabetesa

Dijabetes mellitus je jedno od patoloških stanja praćeno sa jedne strane, povećanjem fluksa redukujućih šećera i reaktivnih dikarbonilnih jedinjenja (glioksala, metilglioksala, 3-deoksiglukozona) koji mogu dovesti do karbonilnog stresa, a sa druge strane, povećanjem fluksa reaktivnih kiseoničnih radikala koji mogu dovesti do oksidativnog stresa. U

uslovima povećanog oksidativnog i karbonilnog stresa, kao što je slučaj u dijabetesu, očekuje se smanjenje sadržaja HSA-SH grupa.

U cilju sagledavanja mogućnosti primene predložene metode za određivanje sadržaja Cys34-SH grupa kao parametra za procenu karbonilnog i/ili oksidativnog stresa u kliničkoj praksi, HSA je izolovan iz seruma obolelih sa tipom 2 dijabetesa (n=23) i zdravih osoba (kontrolna grupa, n=17). Da bismo bili sigurni da je kod pacijenata prisutan karbonilni stres, kriterijum za izbor obolelih bio je sadržaj HbA_{1c} veći od 8. U nekoliko radova (Rasheed, 2006; Guerin-Dubourg i sar., 2012), u kojima je kao merilo oksidativnog stresa određivan sadržaj HSA-SH grupa, primenjivana je afinitetna hromatografija za izolovanje HSA, a potom je određivan sadržaj HSA-SH grupa. Da bi se napravio uporedni pregled primenjivosti metoda izolovanja HSA (taloženje sa AS-om i afinitetna hromatografija) u svrhu određivanja sadržaja HSA-SH grupa u patološkim stanjima, HSA je izolovan iz uzoraka seruma primenom obe metode. Zbog praćenja promene ukupnog antioksidativnog kapaciteta, sadržaj ukupnih tiola (proteinskih i neproteinskih) u serumu je, takođe, određen u obe grupe. U tabeli 29. su date kliničke i biohemijske karakteristike kontrolne grupe i grupe dijabetičara. Određene srednje vrednosti glukoze u krvi i HbA_{1c} frakcije bile su statistički značajno više ($p < 0,05$) u grupi dijabetičara ($10,2 \pm 3,5$ mmol/l; $9,8 \pm 1$ %, resp.) u odnosu na kontrolnu grupu ($4,8 \pm 0,8$ mmol/l; $4,6 \pm 0,6$ %). Dobijena visoka vrednost HbA_{1c} > 10,2 u grupi dijabetičara ukazuje na prisustvo karbonilnog stresa.

Srednja vrednost sadržaja ukupnih tiola u serumu dijabetičara (0.366 ± 0.047 mmol/l) je statistički značajno ($p < 0,05$) niža u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolnu grupu (0.447 ± 0.039 mmol/l) (Slika 50). Srednja vrednost sadržaja Cys34-SH grupa u HSA izolovanom taloženjem iz seruma dijabetičara (0.483 ± 0.067 mol-SH/mol HSA) je, takođe, statistički značajno niža ($p < 0,05$) u odnosu na dobijenu vrednost za kontrolnu grupu (0.561 ± 0.054 mol HSA-SH /mol HSA). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je kod osoba obolelih od dijabetesa evidentiran karbonilni i/ili oksidativni stres, što je u saglasnosti sa rezultatima Rasheed i Ali (2006) i Guerin-Dubourg i sar. (2012).

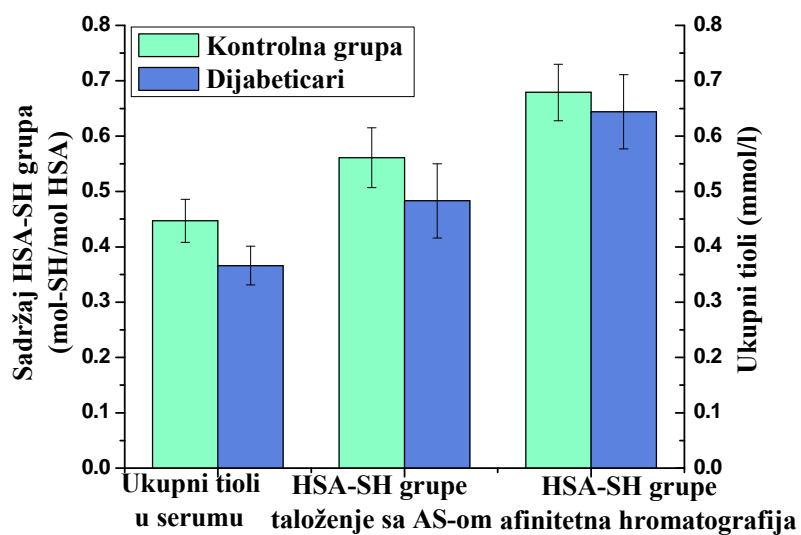
Tabela 29. Vrednosti kliničkih i biohemijskih parametara, i sadržaj ukupnih tiola (mmol/l), HSA-Cys34 grupa (mol-SH/mol HSA), Mk vezanih za HSA (mol Mk/mol HSA) i konstanta brzine pseudo prvog reda (k)(za reakciju HSA-SH grupe s DTNB) kod kontrolne grupe (n=17) i osoba obolelih od dijabetesa (n=23). Rezultati su dati kao srednja vrednost ± SD.

	Dijabetičari	Kontrolna grupa
M/Ž	9/14	8/9
Trajanje dijabetesa (godine)	11,9 ± 3,5	-
Glc (mmol/l)	10,2±3,5*	4,8±0,8
HbA1c (%)	9,8±1,2*	4,6±0,6
Proteini (g/l)	73,6±6,4	76,6±3,2
HSA (g/l)	47,9±5,3	54,1±3,0
Ukupni tioli (mmol/l)	0,366±0,047*	0,447±0,039
Trigliceridi(mmol/l)	2.4 ± 0.7*	1.3± 0.4
Mk/HSA (mol Mk/mol HSA)	1.3 ± 0.6*	0.7±0.2
Konstanta brzine (x10⁻³ s⁻¹)	20.9± 4.4*	12.9 ±2.6

* p<0.05 u odnosu na kontrolu

Srednje vrednosti sadržaja Cys34-SH grupa, dobijene primenom afinitetne hromatografije za izolovanje HSA, i u grupi dijabetičara (0.644 ± 0.067 mol-SH/mol HSA) i u kontrolnoj grupi (0.678 ± 0.051 mol HSA-SH /mol HSA), su statistički značajno više (p<0.05) u odnosu na vrednosti dobijene za HSA koji je izolovan taloženjem sa AS-om. Sa druge strane, smanjenje sadržaja HSA-SH grupa u grupi dijabetičara u odnosu na kontrolnu grupu (dobijeno ovom metodom) nije statistički značajno. To se može objasniti ranije opisanim dokazima, da se u toku izolovanja HSA afinitetnom hromatografijom dešava selekcija molekula HSA prema vrsti i broju molekula Mk vezanih za HSA. Koliki uticaj selekcija molekula HSA (sa višim sadržajem vezanih Mk) može imati na rezultate određivanja sadržaja HSA-SH grupa, pokazuju rezultati poređenja sadržaja HSA-SH grupa koji su dobijeni primenom obe metode. Kod dijabetičara je sadržaj HSA-SH grupa u preparatima HSA koji su izolovani afinitetnom hromatografijom za 33,3% viši u odnosu na sadržaj dobijen pri izolovanju HSA taloženjem sa AS-om, dok ta razlika u kontrolnoj grupi

iznosi 20,8 %. Veća vrednost razlike dobijene za grupu dijabetičara je posledica statistički značajno ($p < 0.05$) povećanog sadržaja triglicerida u serumu dijabetičara i sadržaja Mk vezanih za HSA (koji je izolovan afinitetnom hromatografijom) u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 29). Ovim su potvrđeni rezultati prethodnih eksperimenata (Poglavlja 4.5.3. i 4.5.4., Slike 32 i 36) da povećan sadržaj Mk vezanih za HSA (što je slučaj u grupi dijabetičara u odnosu na kontrolnu grupu) dovodi do selekcije molekula HSA pri vezivanju za Cibacron Blue boju i do povećanja reaktivnosti/dostupnosti HSA-SH grupa za reakciju s DTNB.



Slika 50. Sadržaj ukupnih slobodnih tiola u serumu (mmol/l), sadržaj Cys34-SH grupa (mol - SH/mol HSA) određen u preparatima HSA koji su iz seruma kontrolne grupe i grupe obolelih od dijabetesa izolovani dvostepenim taloženjem s AS i afinitetnom hromatografijom.

4.15.2. Određivanje sadržaja HSA Cys34-SH grupa kod trudnica sa preeklampsijom

Preeklampsija je patološko stanje, koje se javlja samo u trudnoći, i koje je praćeno hipertenzijom (krvni pritisak veći od 140/90 mmHg) i proteinurijom (može da bude veća od 5 g dnevno). Tačna etiologija nastanka preeklampsije nije poznata. Oksidativni stres

(narušena ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata) se navodi kao glavni uzrok nastanka ovog patološkog stanja (Mehendale i sar., 2008).

Mogućnost primene određivanja sadržaja Cys34-SH grupa kao parametra antioksidativnog kapaciteta u kliničkoj praksi, proverena je izolovanjem HSA dvostepenim taloženjem iz seruma trudnica bez (kontrolna grupa, n=15) i sa preeklampsijom (n=15). U tabeli 30 date su kliničke i biohemijske karakteristike trudnica sa i bez preeklampsije.

Tabela 30. Vrednosti kliničkih i biohemijskih parametara, i sadržaj ukupnih tiola (mmol/l), HSA-Cys34 grupa (mol-SH/mol HSA), Mk vezanih za HSA (mol Mk/mol HSA) i konstanta brzine pseudo prvog reda (k)(za reakciju HSA-SH grupe s DTNB) kod trudnica bez (n=15) i sa preeklampsijom (n=15). Rezultati su dati kao srednja vrednost ± SD.

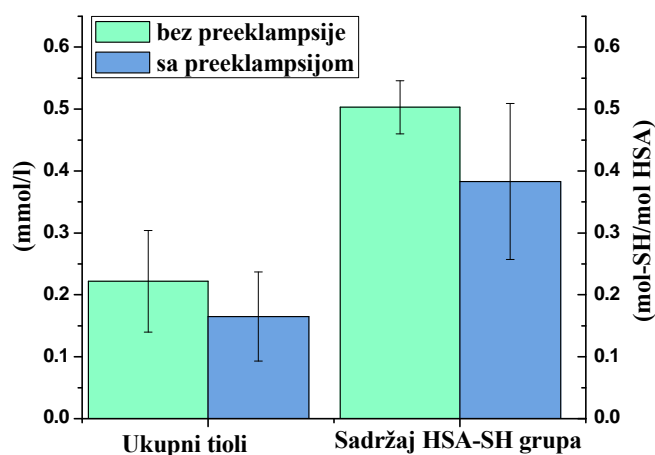
	Trudnice	
	bez preeklampsije	sa preeklampsijom
Starost (godina)	27±4	29±4
Sistolni krvni pritisak (mm Hg)	122±13	172±18*
Dijastolni krvni pritisak (mm Hg)	79±8	110±8*
Glukoza (mmol/l)	4,8±0,6	4,3±0,6
Proteini (g/l)	62,3±9,4	54,6±6,4*
HSA (g/l)	35,4±1,2	29,8±3,7*
Trigliceridi(mmol/l)	3,1 ± 1,1	3,6 ± 1,6
Ukupni tioli (mmol/l)	0,222 ± 0,082	0,165 ± 0,072*
HSA-SH (mol-SH/mol HSA)	0,503 ± 0,043	0,383 ± 0,126*
k (x 10⁻³ s⁻¹)	61 ± 6	73±9 *
Mk/HSA (mol Mk/mol HSA)	3,3 ± 1,2	4,8 ± 0,8

*p <0.05 u odnosu na grupu bez preeklampsije

Srednje vrednosti krvnog pritiska (sistolnog i dijastolnog) su statistički značajno više (p <0.05) kod trudnica sa preeklampsijom, dok su vrednosti sadržaja ukupnih proteina

i HSA u serumu statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 30), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Mehendale i sar., 2008). Sadržaj glukoze u obe grupe trudnica bio je u granicama referentnih vrednosti za zdrave osobe. U grupi sa preeklampsijom dobijeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sadržaja ukupnih tiola ($0,165 \pm 0,072$ mmol/l) u serumu i HSA-SH grupa ($0,383 \pm 0,126$ mol-SH/mol HSA) u odnosu na kontrolnu grupu ($0,222 \pm 0,082$ mmol/l; $0,503 \pm 0,043$ mol-SH/mol HSA, resp.)(Slika 51), što može biti posledica oksidativnog stresa koji prati ovo patološko stanje (Mehendale i sar., 2008).

Dakle, određivanje sadržaja tiolne grupe Cys34 HSA može biti koristan marker za procenu stepena oksidativnog stresa u preeklampsiji, i/ili parametar za procenu antioksidativnog kapaciteta HSA-SH grupa. Ovaj zaključak svakako treba potvrditi u studiji koja bi obuhvatala veći broj pacijenata, u kojoj bi pored određivanja sadržaja HSA-SH grupa, trebalo odrediti parametre oksidativnog stresa.



Slika 51. Sadržaj ukupnih slobodnih tiola u serumu (mmol/l) i sadržaj Cys34-SH grupa (mol -SH/mol HSA) u preparatima HSA, koji su iz seruma trudnica bez preeklampsije (kontrolna grupa) i sa preeklampsijom izolovani dvostepenim taloženjem s AS.

Reaktivnost HSA-SH grupa, u izolovanim preparatima HSA ispitana je određivanjem konstante brzine pseudo prvog reda za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB-om. Srednja vrednost konstante brzine u grupi sa preeklampsijom ($73 \pm 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) bila je statistički značajno viša ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu ($61 \pm 6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Veća reaktivnost HSA-SH grupa u grupi sa preeklampsijom može biti posledica višeg sadržaja Mk vezanih za HSA (Tabela 30.), što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Poglavlju 4.5.3., gde je pokazano da reaktivnost HSA-SH grupa raste sa porastom Mk/HSA odnosa.

4.15.3. Uticaj Mk vezanih za HSA na reaktivnost Cys34-SH grupe u patološkim stanjima

Da bi se sagledao uticaj Mk vezanih za HSA na reaktivnost Cys34-SH grupa *in vivo*, dat je pregled vrednosti dobijenih za konstantu brzine pseudo prvog reda za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB-om i za sadržaj Mk/HSA kod obležih od dijabetesa, u kontrolnoj grupi, i u grupama trudnica sa i bez preeklampsije (Tabela 31.)

Tabela 31. Sadržaj Mk vezanih za HSA (mol Mk/mol HSA) i konstanta brzine pseudo prvog reda (k)(za reakciju HSA-SH grupe s DTNB) kod dijabetičara i kontrolne grupe, i kod trudnice sa i bez preeklampsije.

	Mk/HSA (mol Mk/mol HSA)	k ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)
Kontrola	0.7±0.2	12.9± 2.6
Dijabetičari	1.3 ± 0.6*	20.9 ± 4.4*
Trudnice bez preeklampsije	3.3 ± 1.2* ⁺	61 ± 6* ⁺
Trudnice sa preeklampsijom	4.8 ± 0.8* ⁺	73±9 * ⁺

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu; + $p < 0,05$ u odnosu na dijabetičare

U svim grupama pacijenata dobijeno je statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) sadržaja Mk/HSA i reaktivnosti HSA-SH grupa u odnosu na kontrolnu grupu (zdrave osobe). Statistički značajno povećanje reaktivnosti HSA-SH grupa u grupama trudnica u

odnosu na kontrolnu grupu i dijabetičare moglo bi biti posledica znatno većeg sadržaja Mk/HSA. Ovaj zaključak potvrđuje visoka pozitivna korelacija ($r=0,959$, $p<0,05$) između srednjih vrednosti sadržaja Mk/HSA i konstanti brzina za sve četiri grupe. Može se zaključiti da bi povećanje reaktivnosti HSA-SH grupa pod uticajem vezanih Mk mogao biti deo mehanizma kojim se reguliše antioksidativni kapacitet HSA, posebno u patološkim stanjima, koja su istovremeno praćena povećanjem sadržaja slobodnih Mk u cirkulaciji i oksidativnima/ili karbinilnim stresom.

5. ZAKLJUČCI

HSA ima više fizioloških funkcija, jedna od njih je odbrana organizma od oksidativnog i/ili karbonilnog stresa. Razlog tome je prisustvo jedne slobodne tiol-grupe (Cys34) na površini njegovih molekula. Određivanje sadržaja HSA-SH grupa je od značaja jer omogućava procenu stepena oksidativnog i/ili karbonilnog stresa u različitim patološkim stanjima, kao što su dijabetes, bolesti bubrega i jetre, anemija i uremija. U ovoj tezi ispitivane su mogućnosti i značaj određivanja HSA-SH grupa u kliničkoj praksi. Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata, formulisani su sledeći zaključci:

Određivanju sadržaja HSA-SH grupa prethodi korak izolovanja HSA. Primenom afinitetne hromatografije sa Cibacron Blue Sepharose-om za izolovanje HSA iz seruma izoluje se od 15 do 25 % od početne količine nanetog HSA. Pouzdanost metode (od izolovanja do kvantifikacije) proverena je određivanjem ukupnog sadržaja tiola (proteinskih i neproteinskih) u serumu (mmol/l), sadržaja HSA-SH grupa (mol -SH/mol HSA) i njihovog doprinosa (%) ukupnom sadržaju tiola seruma zdravih osoba i dijabetičara. Sadržaj HSA-SH grupa bio je veći za 6 - 28 % kod zdravih osoba, odnosno za 11 - 33 % kod dijabetičara od ukupnog sadržaja tiola u svim uzorcima u obe grupe, što ukazuje da metoda nije pouzdana. Sa druge strane, više puta ponovljenim izolovanjem HSA iz rastvora komercijalnog HSA, sa poznatim sadržajem HSA-SH grupa, ustanovljeno je da je metoda precizna (RSD od 4,31 do 5,90 %), ali da nije tačna (srednje recovery vrednosti sadržaja HSA-SH grupa bile su od $113,6 \pm 6,7\%$ do $130,1 \pm 6,4\%$). Ispitivanje uzroka koji bi mogli da dovedu do utvrđene diskrepancije pokazalo je da povećanje doprinosa HSA-SH grupa ukupnom sadržaju tiola u serumu nije posledica:

- ☞ uslova izolovanja, zapremina seruma nanetih na kolonu (od 0,1 do 1 ml), karakteristika matriksa (umreženost), protoka kroz kolonu, i vremena potrebnog za izolovanje HSA i određivanje sadržaja SH grupa. Bez obzira na količinu HSA nanetu na kolonu sa Cibacron Blue bojom izoluje se samo od 10 do 30 % HSA molekula usled postojanja selekcije molekula koji se za kolonu vezuju.
- ☞ uticaja pufera za izolovanje (0,02 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,4, 1,5 M NaCl), prisutnog u rastvorima HSA, na određivanje koncentracije HSA sa BKZ reagensom, odnosno na određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

☞ uticaja proteina, malih molekula i jona prisutnih u serumu, kao i pufera za izolovanje (0,02 M natrijum-fosfatni pH 7,2, 1,5 M NaCl) u rastvorima izolovanog HSA, na pouzdanost određivanja sadržaja ukupnih tiola spektrofotometrijskom metodom s DTNB-om. Dobijene vrednosti za RSD bile su u opsegu od 1,13 do 1,74 %, a recovery vrednosti kretale su se od 98,09 do 102,56 %. Dakle, određivanje sadržaja ukupnih tiola u serumu i izolovanom HSA sa DTNB-om je precizno i tačno.

Nativnom i SDS PAG elektroforezom proverena je čistoća HSA izolovanog afinitetnom hromatografijom. Sadržaj HSA dimera u izolovanom HSA je veći u odnosu na njegov sadržaj u serumu. Ustanovljeno je da Cibacron Blue, pored HSA, vezuje i druge proteine. Čistoća HSA izolovanog iz seruma zdravih osoba iznosi $91,4 \pm 2,6$ %, a iz seruma obolelih od dijabetesa $88,4 \pm 3,4$ %. Proteini prisutni u izolovanom HSA nisu uzrok povećanog sadržaja HSA-SH grupa, jer je isti efekat dobijen nakon nanošenja komercijalnog HSA, čistoće 96 % i sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,4 do 0,8 mol-SH/mol HSA, na afinitetnu kolonu. Budući da je sadržaj HSA-SH grupa u izolovanom HSA veći u odnosu na prosečni sadržaj HSA-SH nanet na kolonu, zaključeno je da:

☞ svojstva (konformacija) nekih molekula HSA utiču na njihovu selekciju i vezivanje za Cibacron Blue boju i da su verovatno uzrok postojeće diskrepancije između sadržaja HSA-SH grupa i sadržaja ukupnih tiola u serumu.

Budući da HSA ima važnu funkciju u transportu različitih endogenih i egzogenih liganada, njihovo vezivanje može da dovede do promena konformacije HSA. Zato je ispitan uticaj vezivanja masnih kiselina za HSA na izolovanje i određivanje HSA-SH grupa. Uzimajući u obzir različit afinitet vezujućih mesta za Mk na molekulu HSA i položaj ovih mesta u odnosu na Trp214 (od koga potiče fluorescencija), emisione fluorescentne spektre i CD spektre odmašćenog HSA i HSA zamašćenog sa miristinskom, palmitinskom, stearinskom, oleinskom, EPA i DHA (u različitim odnosima), rezultate GC analize masnokiselinskih profila HSA, nevezane i vezane frakcije HSA za Cibacron Blue utvrđeno je da:

☞ vezivanje Mk dovodi do konformacionih promena molekula HSA i da ove promene zavise od vrste Mk i broja molekula Mk vezanih za HSA. Vezivanje Mk ne dovodi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi HSA, ali dovodi do promene u

okruženju ostataka aromatičnih aminokiselina (razlike u CD spektrima u bliskoj UV oblasti odmašćenog i zamašćenog HSA).

- ☞ povećan sadržaj nezasićenih Mk, posebno polinezasićenih Mk, vezanih za HSA dovodi do konformacionih promena njegovih molekula, tako da se oni slabije vezuju za Cibacron blue boju;
- ☞ tokom izolovanja HSA iz seruma, afinitetna boja selektuje molekule HSA prema konformaciji, koja zavisi od vrste i zasićenja Mk vezanih za HSA.

Pored uticaja na vezivanje molekula HSA za Cibacron Blue boju, vezane masne kiseline utiču i na reaktivnost HSA Cys34-SH grupe. Vrednosti konstanti brzina reakcije pseudo prvog reda (u opsegu od 11.47 do $27.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB, dobijene za Cys34-SH grupu kada je za HSA vezana bilo koja od ispitivanih Mk (miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske, EPA i DHA kiseline), bile su veće u odnosu na vrednost konstante dobijenu za odmašćeni HSA ($3.75 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Dakle,

- ☞ reaktivnost Cys34-SH grupe raste sa vezivanjem masnih kiselina za HSA i taj porast je izraženiji sa povećanjem broja molekula Mk vezanih za HSA. Ustanovljena veza se može direktno odraziti na antioksidativnu funkciju HSA, što je od naročitog značaja u patološkim stanjima (dijabetesu i bolestima srca i jetre) koja su istovremeno praćena povećanjem sadržaja slobodnih Mk u serumu i reaktivnih karbonilnih i/ili oksidativnih vrsta.

Značajno povećanje reaktivnosti Cys34-SH grupa u HSA frakciji vezanoj za Cibacron Blue boju (konstanta brzine reakcije pseudo prvog reda, $21.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) u odnosu na nevezanu HSA frakciju ($11,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), kao i povećanja sadržaja Cys34-SH grupa u vezanoj HSA frakciji (18.2 % u poređenju sa nanetim na kolonu, 11,8 % u odnosu na nevezanu frakciju, $p < 0.05$) posledica su:

- ☞ prirode (veća zastupljenost zasićenih Mk u vezanoj HSA frakciji u odnosu na nevezanu HSA frakciju) i broja (sadržaj Mk/HSA oko 1,5 puta viši u odnosu na nevezanu HSA frakciju) molekula Mk vezanih za HSA i nastalih konformacionih promena molekula HSA.
- ☞ povećanja dostupnosti Cys34-SH grupe (koja se nalazi u hidrofobnom džepu) za reakciju sa DTNB.

Dobijene recovery vrednosti sadržaja Cys34-SH grupa u vezanim frakcijama HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom bile su od 100 do 140 %, dok su za odmašćeni HSA iznosile od 98,5 do 101,7 %. Ovim je direktno potvrđeno da Mk vezane za HSA utiču na određivanje sadržaja tiol-grupa sa DTNB, tako da je sadržaj HSA-SH veći od sadržaja ukupnih serum tiola. Iz svega izloženog zaključeno je da:

- ☞ izolovanje HSA afinitetnom hromatografijom sa Cibacron Blue imobilizovanim ligandom nije pogodna metoda za praćenje promena sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima, koja su praćena oksidativnim i/ili karbonilnim stresom, poput dijabetesa, uremije, hroničnih bolesti bubrega i hemodijalize.

U cilju postizanja veće pouzdanosti i tačnosti u izvođenju zaključaka o promenama sadržaja HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima ispitana je mogućnosti izolovanja HSA iz seruma taloženjem sa amonijum-sulfatom i primene izolovanog HSA za određivanje sadržaja HSA-SH grupa. Primenjenom metodom dvostepenog taloženja sa AS-om (zasićenje AS od 50 % u prvom i 65 % u drugom koraku) dobijeni su preparati sa sadržajem HSA monomera ($83,4 \pm 5,9$ %) značajno ($p < 0,05$) većim u odnosu na preparate dobijen afinitetnom hromatografijom ($73,8 \pm 8,5$ %). Način taloženja HSA iz seruma, sa čvrstim AS-om ili zasićenim rastvorom AS-a, ne utiče značajno na čistoću izolovanog HSA. Uklanjanjem AS-a zaostalog u preparatu ne povećava se čistoća HSA preparata. Zaostali AS ne utiče na tačnost i preciznost određivanja sadržaja HSA Cys34-SH grupa sa DTNB, RSD vrednosti se nalaze u opsegu od 2,89 do 3,49 %, a recovery od 98,1 do 100,6 %. Optimizacijom uslova taloženja HSA sa AS-om u cilju dobijanja maksimalne čistoće i prinosa HSA utvrđeno je da:

- ☞ se sa 54 % zasićenjem AS, u prvom koraku taloženja, postiže najbolje odvajanje HSA od drugih proteina seruma, uz najbolji prinos HSA. Potpuno uklanjanje drugih proteina postiže se centrifugiranjem u toku 5 minuta sa RCF od 4000 g.
- ☞ pri 70 % zasićenju AS, u drugom koraku taloženja, u supernatantu zaostaje samo 0,5 % početne količine HSA. Za izdvajanje istaloženog HSA dovoljno je primeniti RCF od 6 000 g, jer primena viših RCF (od 6 000 do 10 000 g) ne dovodi do povećanja čistoće i prinosa izolovanog HSA, ali značajno otežava rastvaranje taloga HSA.

☞ se primenom navedenih uslova u dvostepenom postupku izolovanja HSA taloženjem sa AS-om izoluje HSA sa zastupljenošću monomera od $91,9 \pm 3,6 \%$ i sa prinosom oko $69,7 \pm 4,4 \%$.

Primenom navedenih uslova dvostepenog taloženja dobija se preparat HSA koji pri nativnoj elektroforezi daje dve trake, intenzivna koja potiče od monomera HSA i druga kontaminirajuća traka sa zastupljenošću od oko 10 %. Primenom SDS PAG elektroforeze i imunoblota gelova nakon nativne i SDS PAG elektroforeze zaključeno je da kontaminirajuća traka potiče od dimera HSA. Zbog istog odnosa monomera i dimera u izolovanom HSA i serumu, prisustvo dimera ne utiče na određivanje sadržaja HSA-SH grupa. Dakle, pri navedenim uslovima taloženja izoluje se HSA čistoće oko 100 %. Karakterizacija izolovanog HSA (CD spektroskopijom i izoelektrofokusiranjem) je pokazala da se u predloženom postupku izolovanja:

- ☞ dobija HSA u kome je očuvana sekundarna struktura,
- ☞ visoka jonska sila (u toku izolovanja) ne dovodi do disocijacije kompleksa Mk-HSA, što omogućava primenu ovog postupka izolovanja u ispitivanjima vezivanja Mk (vrste i količine) za HSA u različitim patološkim stanjima.

Metoda izolovanja HSA iz seruma taloženjem s AS je jednostavna, brza i jeftina, što je važno za kliničku praksu. Validacija metode/metoda (od izolovanja HSA dvostepenim taloženjem s AS do određivanja sadržaja HSA-SH grupa) pokazala je da je metoda precizna (RSD 3,2 %) i tačna (recovery vrednost $101,2 \pm 2,0 \%$, dobijena metodom standardnog dodatka) u opsegu fizioloških vrednosti sadržaja HSA-SH grupa (od 0,25 do 0,75 mol-SH/mol HSA).

- ☞ Određivanje sadržaja HSA-Cys-34 tiol-grupa primenom ove metode je pouzdano (doprinos ukupnom sadržaju tiola u serumu kod zdravih osoba iznosi $83,2 \pm 5,3\%$), što omogućava pouzdanu procenu antioksidativne sposobnosti HSA molekula u različitim patološkim stanjima.
- ☞ Srednje vrednosti sadržaja Cys34-SH grupa dobijene za HSA izolovan iz plazme i seruma (0.574 ± 0.026 ; 0.570 ± 0.028 mol-SH/mol HSA, resp.) nisu se statistički značajno razlikovale. Oba biološka materijala mogu biti ravnopravno korišćena za izolovanje HSA i određivanje sadržaja HSA-SH grupa.

Mogućnost i značaj određivanja sadržaja HSA Cys34-SH grupa u kliničke svrhe, odnosno kao markera za procenu karbonilnog stresa, ispitana je sa grupom obolelih od dijabetesa tipa 2 (n=23), sa vrednostima HbA1c većim od 8, i sa grupom zdravih osoba (kontrolna grupa, n=17). Srednja vrednost sadržaja HSA Cys34-SH grupa (0.483 ± 0.067 mol-SH/mol HSA) u serumu dijabetičara je statistički značajno ($p < 0.05$) niža u odnosu na vrednost dobijenu za kontrolnu grupu (0.561 ± 0.054 mol HSA-SH /mol HSA), kao i srednja vrednost sadržaja ukupnih tiola seruma (0.366 ± 0.047 mmol/l; 0.447 ± 0.039 mmol/l, resp.). Zaključeno je da se određivanje sadržaja HSA Cys34-SH grupa u serumu može primenjivati kao marker karbonilnog stresa u dijabetesu.

Mogućnost primene određivanja sadržaja Cys34-SH grupa, kao parametra antioksidativnog kapaciteta HSA, u kliničkoj praksi, proverena je izolovanjem HSA dvostepenim taloženjem iz seruma trudnica bez (kontrolna grupa, n=15) i sa preeklampsijom (n=15). U grupi sa preeklampsijom dobijeno je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sadržaja ukupnih tiola ($0,165 \pm 0,072$ mmol/l) u serumu i HSA-SH grupa ($0,383 \pm 0,126$ mol-SH/mol HSA) u odnosu na kontrolnu grupu ($0,222 \pm 0,082$ mmol/l; $0,503 \pm 0,043$ mol-SH/mol HSA, resp). Dakle, određivanje sadržaja tiolne grupe Cys34 HSA može biti koristan marker za procenu stepena oksidativnog stresa u preeklampsiji, i/ili parametar za procenu antioksidativnog kapaciteta HSA-SH grupa.

Pored navedenog, po prvi put je pokazano de je reaktivnost tiolne grupe Cys34 ostatka u dijabetesu i u trudnoći (sa i bez preeklampsije) povećana u odnosu na kontrolnu grupu (konstante brzine $20.9 \pm 4.4 \times 10^{-3}$, $61 \pm 6 \times 10^{-3}$, $73 \pm 9 \times 10^{-3}$, $12.9 \pm 2.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, resp.), da je reaktivnost ove grupe povezana sa sadržajem Mk vezanih za HSA (1.3 ± 0.6 , 3.3 ± 1.2 , 4.8 ± 0.8 , 0.7 ± 0.2 mol Mk/mol HSA, resp.) što ima važne implikacije na mogućnost modulacije reaktivnosti (antioksidativnog kapaciteta) tiolne grupe pomoću suplemenata (na primer. masnih kiselina).

6. LITERATURA

- Acimovic JM, Stanimirovic BD, Todorovic N, Jovanovic VB, and Mandic LM. 2010. Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.* 188 (1): 21-30.
- Allison WS, Benitez LV, and Johnson CL. 1973. The formation of a protein sulfenamide during the inactivation of the acyl phosphatase activity of oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by benzylamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52 (4): 1403-1409.
- Alt N, Carson JA, Alderson NL, Wang Y, Nagai R, Henle T, Thorpe SR, and Baynes JW. 2004. Chemical modification of muscle protein in diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 425 (2): 200-206.
- Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, and Otagiri M. 2001. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm. Res.* 18 (5): 632-639.
- Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Menegatti E, and Fasano M. 2005. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2): 481-486.
- Barden RE, Darke PL, Deems RA, and Dennis EA. 1980. Interaction of phospholipase A2 from cobra venom with Cibacron Blue F3GA. *Biochemistry* 19 (8): 1621-1625.
- Baroni S, Mattu M, Vannini A, Cipollone R, Aime S, Ascenzi P, and Fasano M. 2001. Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin. A spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.* 268 (23): 6214-6220.
- Barsukov AK, Barmin AV, Kuznetsov AI, Nesterova OI, Ushnurtseva SA, Panin AN, Smolenskii VI, Ulasov VI, Sviderskii VL, and Khovanskikh AE. 2009. [Design of experimental approaches on the base of standard proteins for testing blood biopreparations and immunoperoxidase conjugates specific to human and animal immunoglobulines G]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 45 (4): 487-492.

- Beckett GJ, Armstrong P, and Percy-Robb IW. 1981. A comparison of bile salt binding to lymph and plasma albumin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 664 (3): 602-610.
- Behrens PQ, Spiekerman AM and Brown JR 1975. Structure of human serum albumin. *Fed Proc*: 34, 591.
- Belanger L, Roy S, and Allard D. 1994. New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus. *J. Biol. Chem.* 269 (8): 5481-5484.
- Berglof JH, Eriksson S, and Curling JM. 1983. Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma. *J. Appl. Biochem.* 5 (4-5): 282-292.
- Berlett BS, and Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272 (33): 20313-20316.
- Berner RA, Vandenbrooks JM, and Ward PD. 2007. Evolution. Oxygen and evolution. *Science* 316 (5824): 557-558.
- Bhattacharya AA, Grune T, and Curry S. 2000. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 303 (5): 721-732.
- Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, and Haddad JG. 1986. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 63 (4): 954-959.
- Bocedi A, Notari S, Menegatti E, Fanali G, Fasano M, and Ascenzi P. 2005. Allosteric modulation of anti-HIV drug and ferric heme binding to human serum albumin. *FEBS J.* 272 (24): 6287-6296.
- Bohacova V, Docolomansky P, Breier A, Gemeiner P, and Ziegelhoffer A. 1998. Interaction of lactate dehydrogenase with anthraquinone dyes: characterization of ligands for dye-ligand chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715 (1): 273-281.

- Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, and Bablok L. 2006. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27 (1-2): 277-280.
- Bonnett R, Davies JE, and Hursthouse MB. 1976. Structure of bilirubin. *Nature* 262 (5566): 327-328.
- Bourdon E, and Blache D. 2001. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid. Redox. Signal.* 3 (2): 293-311.
- Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, and Blache D. 2005. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic. Res.* 39 (1): 15-20.
- Bradshaw RA, and Peters T, Jr. 1969. The amino acid sequence of peptide (1-24) of rat and human serum albumins. *J. Biol. Chem.* 244 (20): 5582-5589.
- Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, and Pedersen AO. 1990. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur. J. Biochem.* 189 (2): 343-349.
- Brownlee M, Vlassara H, and Cerami A. 1984. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.* 101 (4): 527-537.
- Bumeliene Z, Sereikaite I, Bumelis VA, Smirnovas V, Gedminiene G, Braziunaite L, Bajorunaite E. 2003. Determination of the dissociation constant and stoichiometry of a complex of the protein interferon α -2b with Cibacron Blue F3G-A. *J Anal Chem.* 58:1038-1041
- Candiano G, Petretto A, Bruschi M, Santucci L, Dimuccio V, Prunotto M, Gusmano R, Urbani A, and Ghiggeri GM. 2009. The oxido-redox potential of albumin methodological approach and relevance to human diseases. *J. Proteomics.* 73 (2): 188-195.
- Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, and Miller TY. 1989. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244 (4909): 1195-1198.

- Carter DC, and Ho JX. 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45: 153-203.
- Chen RF. 1967. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242 (2): 173-181.
- Chuang VT, and Otagiri M. 2002. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? *Pharm. Res.* 19 (10): 1458-1464.
- Cistola DP, Small DM, and Hamilton JA. 1987. Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. II. Electrostatic interactions in individual fatty acid binding sites. *J. Biol. Chem.* 262 (23): 10980-10985.
- Cistola DP, Small DM, and Hamilton JA. 1987. Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites. *J. Biol. Chem.* 262 (23): 10971-10979.
- Cistola DP, and Small DM. 1991. Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest* 87 (4): 1431-1441.
- Cohn EJ, Strong LE, and . 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-475.
- Colmenarejo G. 2003. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Med. Res. Rev.* 23 (3): 275-301.
- 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.
- Curry S, Brick P, and Franks NP. 1999. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1441 (2-3): 131-140.
- Curry S. 2003. Plasma albumin as a fatty acid carrier. *Adv Mol Cell Biol* : 33:29-46

- de LM, Salen P, Defaye P, and Rabaeus M. 2013. Recent findings on the health effects of omega-3 fatty acids and statins, and their interactions: do statins inhibit omega-3? *BMC. Med.* 11: 5.
- Degenhardt TP, Thorpe SR, and Baynes JW. 1998. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 44 (7): 1139-1145.
- Desai KM, Chang T, Wang H, Banigesh A, Dhar A, Liu J, Untereiner A, and Wu L. 2010. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J. Physiol Pharmacol.* 88 (3): 273-284.
- Devasagayam TP, and Kamat JP. 2002. Biological significance of singlet oxygen. *Indian J. Exp. Biol.* 40 (6): 680-692.
- Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, and Edwards R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (3): 258-266.
- Droge W. 2002. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res. Rev.* 1 (2): 257-278.
- Ellis RJ, and van der Vies SM. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, and Sogami M. 1995. Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1247 (1): 12-16.
- Erstad BL, Gales BJ, and Rappaport WD. 1991. The use of albumin in clinical practice. *Arch. Intern. Med.* 151 (5): 901-911.
- Fanali G, Fesce R, Agrati C, Ascenzi P, and Fasano M. 2005. Allosteric modulation of myristate and Mn(III)heme binding to human serum albumin. Optical and NMR spectroscopy characterization. *FEBS J.* 272 (18): 4672-4683.
- Farruggia B, and Pico G. 1993. The identity of the binding sites of bile salts on bovine serum albumin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80 (2): 234-240.

- Fasano M, Baroni S, Vannini A, Ascenzi P, and Aime S. 2001. Relaxometric characterization of human hemalbumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (5-6): 650-658.
- Fasano M, Mattu M, Coletta M, and Ascenzi P. 2002. The heme-iron geometry of ferrous nitrosylated heme-serum lipoproteins, hemopexin, and albumin: a comparative EPR study. *J. Inorg. Biochem.* 91 (3): 487-490.
- 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.
- Faure P, Tamisier R, Baguet JP, Favier A, Halimi S, Levy P, and Pepin JL. 2008. Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur. Respir. J.* 31 (5): 1046-1053.
- Faure P, Wiernsperger N, Polge C, Favier A, and Halimi S. 2008. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin. Sci. (Lond)* 114 (3): 251-256.
- Feldhoff RC, Taylor JM, and Jefferson LS. 1977. Synthesis and secretion of rat albumin in vivo, in perfused liver, and in isolated hepatocytes. Effects of hypophysectomy and growth hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 252 (11): 3611-3616.
- Fischer MJ, Bos OJ, van der Linden RF, Wilting J, and Janssen LH. 1993. Steroid binding to human serum albumin and fragments thereof. Role of protein conformation and fatty acid content. *Biochem. Pharmacol.* 45 (12): 2411-2416.
- Frohnert BI, Jacobs DR, Jr., Steinberger J, Moran A, Steffen LM, and Sinaiko AR. 2013. Relation between Serum Free Fatty Acids and Adiposity, Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors from Adolescence to Adulthood. *Diabetes.*
- Garman JH, Mulrone S, Manigrasso M, Flynn E, and Maric C. 2009. Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 296 (2): F306-F316.

- Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, and Curry S. 2005. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 353 (1): 38-52.
- Gianazza E, and Arnaud P. 1982. A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron blue F3-GA. *Biochem. J.* 201 (1): 129-136.
- Giroux E, and Schoun J. 1981. Copper and zinc ion binding by bovine, dog, and rat serum albumins. *J. Inorg. Biochem.* 14 (4): 359-362.
- Glennon JD, and Sarkar B. 1982. Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine. *Biochem. J.* 203 (1): 15-23.
- Goodman DS, and Gordon RS, Jr. 1958. The metabolism of plasma unesterified fatty acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 6 (6): 669-680.
- Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A, Libman I, Lerner HT, Trakhtenberg S, and Martin-Belloso O. 2000. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J. Protein Chem.* 19 (8): 637-642.
- Grisham, MB. 1992. Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen in Biology and Medicine. RG Landes Co., Austin.
- Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, Gandley RE, Vladimirov YA, Taylor RN, and Kagan VE. 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, and Rondeau P. 2012. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab* 38 (2): 171-178.
- Hage DS. 1999. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clin. Chem.* 45 (5): 593-615.

- Halliwell B. 1988. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 37 (4): 569-571.
- Halliwell B, and Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2): 231-255.
- Harper ME, and Dugaiczky A. 1983. Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. *Am. J. Hum. Genet.* 35 (4): 565-572.
- He XM, and Carter DC. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358 (6383): 209-215.
- Hebert GA. 1974. Ammonium sulfate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken, and cattle. *Appl. Microbiol.* 27 (2): 389-393.
- Himmelfarb J, and McMonagle E. 2001. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 60 (1): 358-363.
- Hink JH, Jr., Hidalgo J, Seeberg VP, and Johnson FF. 1957. Preparation and properties of a heat-treated human plasma protein fraction. *Vox Sang.* 2 (3): 174-186.
- Huang L, Harvie G, Feitelson JS, Gramatikoff K, Herold DA, Allen DL, Amunngama R, Hagler RA, Pisano MR, Zhang WW, and Fang X. 2005. Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics.* 5 (13): 3314-3328.
- Imai H, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K, Tajima T, Koda Y, Suda K, and Era S. 2002. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn. J. Physiol* 52 (2): 135-140.
- Inoue Y, and Kimura A. 1995. Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol* 37: 177-227.

- Ivanov. A. I. Zhabankov R. G. et al. Effect of the condition of isolation on the physicochemical properties of human serum albumin in the norm and with pathology. *Journal of Applied Spectroscopy*, Vol. 64, No. I (1997)
- Iwata T, Iwata H, and Holland JF. 1968. Isolation of albumin from human serum by means of trichloroacetic acid and ethanol. A comparison of methods. *Clin. Chem.* 14 (1): 22-30.
- Jacobs R, Demmelmair H, Rittler P, Kellermann J, Koletzko B, Krick M, Jauch KW, and Hartl WH. 2005. Isolation of plasma albumin by ethanol extraction is inappropriate for isotope ratio measurements during the acute phase response. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 817 (2): 145-151.
- Johansson G. et al. Protein-ligand interactions studied on bovine serum albumin with free and polymer-bound Cibacron Blue F3-GA as ligand with reference to affinity partitioning. *Journal of Chromatography A - J Chromatogr A*, vol. 537, pp. 219-233 (1991)
- Jovanovic VB, Penezic-Romanjuk AZ, Pavicevic ID, Acimovic JM, and Mandic LM. 2013. Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination. *Anal. Biochem.* 439 (1): 17-22.
- Jovanović V. 2008. N-acetil- β -D-glukozaminidaza u dijabetesu. Magistarska teza.
- Karlstrom BE, Jarvi AE, Byberg L, Berglund LG, and Vessby BO. 2011. Fatty fish in the diet of patients with type 2 diabetes: comparison of the metabolic effects of foods rich in n-3 and n-6 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 94 (1): 26-33.
- Karpe F, Dickmann JR, and Frayn KN. 2011. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 60 (10): 2441-2449.
- Kirchberger J, Seidel H, and Kopperschlager G. 1987. Interaction of procion red HE-3B and other reactive dyes with alkaline phosphatase: a study by means of kinetic,

- difference spectroscopic and chromatographic methods. *Biomed. Biochim. Acta* 46 (10): 653-663.
- Kistler P, and Nitschmann H. 1962. Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. *Vox Sang.* 7: 414-424.
- Koga M, and Kasayama S. 2010. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr. J.* 57 (9): 751-762.
- Kragh-Hansen U, Donaldson D, and Jensen PH. 2001. The glycan structure of albumin Redhill, a glycosylated variant of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1550 (1): 20-26.
- Kratochwil NA, Huber W, Muller F, Kansy M, and Gerber PR. 2002. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem. Pharmacol.* 64 (9): 1355-1374.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Lagercrantz C, and Larsson T. 1983. Comparative studies of the binding of some ligands to human serum albumin non-covalently attached to immobilized Cibacron Blue, or covalently immobilized on Sepharose, by column affinity chromatography. *Biochem. J.* 213 (2): 387-390.
- Lau S, and Sarkar B. 1979. Inorganic mercury(II)-binding components in normal human blood serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 5 (5): 907-916.
- Laussac JP, and Sarkar B. 1984. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 23 (12): 2832-2838.
- Leatherbarrow RJ, and Dean PD. 1980. Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochem. J.* 189 (1): 27-34.

- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, and Stadtman ER. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (26): 15036-15040.
- Lingappa VR. 1989. Intracellular traffic of newly synthesized proteins. Current understanding and future prospects. *J. Clin. Invest* 83 (3): 739-751.
- Liu L, Li Y, Guan C, Li K, Wang C, Feng R, and Sun C. 2010. Free fatty acid metabolic profile and biomarkers of isolated post-challenge diabetes and type 2 diabetes mellitus based on GC-MS and multivariate statistical analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (28): 2817-2825.
- Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, and Thornalley PJ. 1994. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 269 (51): 32299-32305.
- Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, and Glatz JF. 1997. Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J. Lipid Res.* 38 (4): 745-758.
- Ma Q. 2010. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 125 (3): 376-393.
- Maddipati KR, and Marnett LJ. 1987. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 262 (36): 17398-17403.
- Malavolti M, Fromm H, Ceryak S, and Shehan KL. 1989. Interaction of potentially toxic bile acids with human plasma proteins: binding of lithocholic (3 alpha-hydroxy-5 beta-cholan-24-oic) acid to lipoproteins and albumin. *Lipids* 24 (7): 673-676.
- Manavalan P, Johnson Jr.WC, Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* 1983; 305:831-832.
- Martin NH. 1949. Preparation and properties of serum and plasma proteins; interactions with bilirubin. *J. Am. Chem. Soc.* 71 (4): 1230-1232.

- Masuoka J, Hegenauer J, Van Dyke BR, and Saltman P. 1993. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin. *J. Biol. Chem.* 268 (29): 21533-21537.
- Matejtschuk P, Dash CH, and Gascoigne EW. 2000. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *Br. J. Anaesth.* 85 (6): 887-895.
- Matsuyama Y, Terawaki H, Terada T, and Era S. 2009. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 13 (4): 308-315.
- Mattu M, Vannin A, Coletta M, Fasano M, and Ascenzi P. 2001. Effect of bezafibrate and clofibrate on the heme-iron geometry of ferrous nitrosylated heme-human serum albumin: an EPR study. *J. Inorg. Biochem.* 84 (3-4): 293-296.
- Mayer TK, and Freedman ZR. 1983. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta* 127 (2): 147-184.
- Meloun B, Moravek L, and Kostka V. 1975. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* 58 (1): 134-137.
- Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, and Otagiri M. 2005. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (4): 1322-1328.
- Metcalf EC, Crow B, and Dean PD. 1981. The effect of ligand presaturation on the interaction of serum albumins with an immobilized Cibacron Blue 3G-A studied by affinity gel electrophoresis. *Biochem. J.* 199 (3): 465-472.
- Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, Dennison OE, Hawkins JW, Beattie WG, and Dugaiczky A. 1986. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J. Biol. Chem.* 261 (15): 6747-6757.

- Mostafa AA, Randell EW, Vasdev SC, Gill VD, Han Y, Gadag V, Raouf AA, and El SH. 2007. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol. Cell Biochem.* 302 (1-2): 35-42.
- Moslen, MT. 1994. Free Radicals in Diagnostic Medicine, D. Armstrong, ed., Plenum Press, New York.
- Neuzil J, and Stocker R. 1993. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 331 (3): 281-284.
- Neuzil J, and 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 (24): 16712-16719.
- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, and Grandjean P. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* 43 (7): 1209-1214.
- Nothwehr SF, Hoeltzli SD, Allen KL, Lively MO, and Gordon JI. 1990. Residues flanking the COOH-terminal C-region of a model eukaryotic signal peptide influence the site of its cleavage by signal peptidase and the extent of coupling of its co-translational translocation and proteolytic processing in vitro. *J. Biol. Chem.* 265 (35): 21797-21803.
- Oettl K, and Stauber RE. 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.
- Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallstrom S, Lackner C, and Stauber RE. 2008. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (7-8): 469-473.
- Otagiri M, and Chuang VT. 2009. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 32 (4): 527-534.

- Palade G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189 (4206): 867.
- Papatheodorou L, and Weiss N. 2007. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid. Redox. Signal.* 9 (11): 1941-1958.
- Peters T: All about albumin, Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, NY, 1996.
- Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Feix JB, and Bhagavan NV. 2000. A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 275 (28): 20985-20995.
- Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, and Curry S. 2001. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.* 276 (25): 22804-22809.
- Prakash M, Shetty M. S. et al. Total thiols: Biomedical importance and their alteration in various disorders. *OJHAS* Vol. 8, Issue 2: (2009 Apr-Jun)
- Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* Vol. 79, No. 12, pp. 2325–2338 (2007)
- Quinlan GJ, Martin GS, and Evans TW. 2005. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41 (6): 1211-1219.
- Rapoport TA. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258 (5084): 931-936.
- Rase, J. The determination of blood proteins by acid acetone. *Biochem. j.* 26, 157 (1932)
- Rasheed Z, and Ali R. 2006. Reactive oxygen species damaged human serum albumin in patients with type 1 diabetes mellitus: biochemical and immunological studies. *Life Sci.* 79 (24): 2320-2328.

- Reed RG, Feldhoff RC, Clute OL, and Peters T, Jr. 1975. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. *Biochemistry* 14 (21): 4578-4583.
- Reichenwallner J, and Hinderberger D. 2013. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (12): 5382-5393.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, and Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582 (13): 1783-1787.
- Rodkey FL 1965. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.* 11: 478-487.
- Rodkey FL. 1965. Separation and determination of the total globulins of human serum. *Clin. Chem.* 11: 488-494.
- Rondeau P, and Bourdon E. 2011. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 93 (4): 645-658.
- Sadler PJ, Tucker A, and Viles JH. 1994. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. *Eur. J. Biochem.* 220 (1): 193-200.
- Sakai T, Yamasaki K, Sako T, Kragh-Hansen U, Suenaga A, and Otagiri M. 2001. Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin. *Pharm. Res.* 18 (4): 520-524.
- Saucan L, and Palade GE. 1994. Membrane and secretory proteins are transported from the Golgi complex to the sinusoidal plasmalemma of hepatocytes by distinct vesicular carriers. *J. Cell Biol.* 125 (4): 733-741.
- Schnitzer JE, and Oh P. 1994. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* 269 (8): 6072-6082.

- Sebekova K, Klenovicsova K, Ferenczova J, Hedvig J, Podracka L, and Heidland A. 2012. Advanced oxidation protein products and advanced glycation end products in children and adolescents with chronic renal insufficiency. *J. Ren Nutr.* 22 (1): 143-148.
- Sereikaite J, Bumeliene Z and Bumelis V. A. Bovine serum albumin-dye binding. *Acta Chromatographica*, NO. 15 (2005)
- Sharma KK, and Santhoshkumar P. 2009. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (10): 1095-1108.
- Schumaker, Verne N. 1994. Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press: 153-96.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91 (3C): 31S-38S.
- Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, and Curry S. 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.
- Sjodin T, Hansson R, and Sjöholm I. 1977. Isolation and identification of a trypsin-resistant fragment of human serum albumin with bilirubin- and drug-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 494 (1): 61-75.
- Sjöholm I, and Ljungstedt I. 1973. Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements. *J. Biol. Chem.* 248 (24): 8434-8441.
- Spector AA, John K, and Fletcher JE. 1969. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. *J. Lipid Res.* 10 (1): 56-67.
- Spector AA. 1986. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzymol.* 128: 320-339.

- Stadtman ER. 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11 (9): 1105-1112.
- Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, and Sadler PJ. 2003. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (7): 3701-3706.
- Sudlow G, Birkett DJ, and Wade DN. 1975. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 11 (6): 824-832.
- Sudlow G, Birkett DJ, and Wade DN. 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 12 (6): 1052-1061.
- Sugae KI, and Jirgensons B. 1964. Amino Acid Sequence next to tryptophan in human and bovine serum albumin. *J. Biochem.* 56: 457-464.
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, and Kobayashi K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng* 12 (6): 439-446.
- Sun LB, Zhang Y, Wang Q, Zhang H, Xu W, Zhang J, Xiang J, Li QG, Xiang Y, Wang DJ, and Zhang CY. 2011. Serum palmitic acid-oleic acid ratio and the risk of coronary artery disease: a case-control study. *J. Nutr. Biochem.* 22 (4): 311-317.
- Suzuki K, Koh YH, Mizuno H, Hamaoka R, and Taniguchi N. 1998. Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *J. Biochem.* 123 (2): 353-357.
- Swaney JB, and Klotz IM. 1970. Amino acid sequence adjoining the lone tryptophan of human serum albumin. A binding site of the protein. *Biochemistry* 9 (13): 2570-2574.
- Takabayashi K, Imada T, Saito Y, and Inada Y. 1983. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 136 (2): 291-295.
- Tamaoki T, Thomas K, and Schindler I. 1974. Cell-free studies of developmental changes in synthesis of alpha-foetoprotein and albumin in the mouse liver. *Nature* 249 (454): 269-271.

- Tanaka. K, Sawatani E. et al. Isolation of bovine plasma albumin by liquid chromatography and its polymerization for use in immunohematology. *Brazilian Journal of Medical and biological Research* 34: 907-983 (2001)
- Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, and Era S. 2004. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int.* 66 (5): 1988-1993.
- Thompson EO. 1954. The N-terminal sequence of serum albumins; observations on the thiohydantoin method. *J. Biol. Chem.* 208 (2): 565-572.
- Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, and Banaszak L. 1997. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J. Biol. Chem.* 272 (11): 7140-7150.
- Thompson ST, Cass KH, and Stellwagen E. 1975. Blue dextran-sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72 (2): 669-672.
- Thornalley PJ. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269 (1): 1-11.
- Thornalley PJ: Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043:111
- Thornalley PJ: 2008. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23 (1-2): 125-150.
- Thornalley PJ, and Rabbani N. 2013. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry - A user's perspective. *Biochim. Biophys. Acta.*

- Thorpe SR, and Baynes JW. 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino. Acids* 25 (3-4): 275-281.
- Tonggard JH, and Meredith SC. 1991. Characterization of the binding sites for dicarboxylic acids on bovine serum albumin. *Biochem. J.* 276 (Pt 3): 569-575.
- Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D, and Pannell R. 1976. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem. J.* 157 (2): 301-306.
- Tsai AL, Hsu MJ, Patsch W, and Wu KK. 1991. Regulation of PGI₂ activity by serum proteins: serum albumin but not high density lipoprotein is the PGI₂ binding and stabilizing protein in human blood. *Biochim. Biophys. Acta* 1115 (2): 131-140.
- Turell L, Carballal S, Botti H, Radi R, and Alvarez B. 2009. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (4): 305-311.
- Turell L, Botti H, Carballal S, Radi R, and Alvarez B. 2009. Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (28): 3384-3392.
- Uchida K, Kato Y, and Kawakishi S. 1990. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 (1): 265-271.
- Urano Y, Sakai M, Watanabe K, and Tamaoki T. 1984. Tandem arrangement of the albumin and alpha-fetoprotein genes in the human genome. *Gene* 32 (3): 255-261.
- Wallace, KB: Free Radical Toxicology, 1st Ed., CRC 1997.
- Vallee BL, and Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73 (1): 79-118.
- van der Vusse GJ. 2009. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet.* 24 (4): 300-307.

- van Eijk HM, Rooyackers DR, van Acker BA, Soeters PB, and Deutz NE. 1999. Automated isolation of high-purity plasma albumin for isotope ratio measurements. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 731 (2): 199-205.
- van Wijk JP, Halkes CJ, Erkelens DW, and Castro CM. 2003. Fasting and daylong triglycerides in obesity with and without type 2 diabetes. *Metabolism* 52 (8): 1043-1049.
- Wang CJ, Zhang ZJ, Sun J, Zhang XB, Mou XD, Zhang XR, Shang XF, and Zhang TQ. 2006. Serum free Fatty acids and glucose metabolism, insulin resistance in schizophrenia with chronic antipsychotics. *Biol. Psychiatry* 60 (12): 1309-1313.
- Watanabe S, Tani T, Watanabe S, and Seno M. 1991. Transport of steroid hormones facilitated by serum proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1073 (2): 275-284.
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320 (6): 365-376.
- Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, and Baynes JW. 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.
- White WF, Shields J and Robbins KC. 1955. C-Terminal sequence of crystalline bovine and human serum albumins: Relationship of C-terminus to antigenic determinants of bovine serum albumin. *J Am Chem Soc*; 77, 1267 – 1269.
- Wilting J, van der Giesen WF, Janssen LH, Weideman MM, Otagiri M, and Perrin JH. 1980. The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis. *J. Biol. Chem.* 255 (7): 3032-3037.
- Wiseman H, and Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313 (Pt 1): 17-29.

- Witter A, and Tuppy H. 1960. N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)maleimide: a coloured sulfhydryl reagent. Isolation and investigation of cysteine-containing peptides from human and bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 45: 429-442.
- Wolin SL, and Walter P. 1993. Discrete nascent chain lengths are required for the insertion of presecretory proteins into microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 121 (6): 1211-1219.
- Wooley PV, III, and Hunter MJ. 1970. Binding and circular dichroism data on bilirubin-albumin in the presence of oleate and salicylate. *Arch. Biochem. Biophys.* 140 (1): 197-209.
- Wratten ML, Sereni L, and Tetta C. 2001. Oxidation of albumin is enhanced in the presence of uremic toxins. *Ren Fail.* 23 (3-4): 563-571.
- Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, Tsutsumi Y, Narazaki R, Fukuhara A, Kragh-Hansen U, and Otagiri M. 1999. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1432 (2): 313-323.
- Yi B, and Li XJ. 2004. [Determination of the concentration of serum free fatty acids in type 2 diabetic]. *Zhong. Nan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.* 29 (2): 212-214.
- Zeng J, and Davies MJ. 2005. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 18 (8): 1232-1241.
- Zeng J, and Davies MJ. 2006. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (12): 1668-1676.
- Zhang S, and Sun Y. 2001. Further studies on the contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to protein adsorption on dye-ligand adsorbents. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (6): 710-717.

Zhao T, Li G, Huang H, Li X, and Zhou G. 2000. [Relationship between the changes of serum free fatty acids and insulin resistance in type 2 diabetics]. *Hua Xi. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* 31 (2): 236-238.

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

Biografija

Vesna Jovanović rođena je 29.8.1970. godine u Livnu. Srednju školu završila je 1989. u Arandjelovcu i iste godine upisala Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija. Diplomirala je 1995. godine sa srednjom ocenom 9.44 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Od aprila 1996. godine do aprila 1997. godine radi u Biohemijskoj laboratoriji Doma zdravlja Mladenovac.

Poslediplomske studije na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta upisala je 1998. godine. Magistarsku tezu pod naslovom "Izoenzimski oblici N-acetil- β -D-glukozaminidaze u dijabetesu" odbranila je 22.5.2008., sa prosečnom ocenom 10 tokom poslediplomskih studija. Od juna 1998. godine, angažovana je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, najpre preko tržišta rada kao pripravnik na istraživačkim poslovima, od 2003. do 2008. godine kao asistent-pripravnik, a od 2008. godine kao asistent, sve na Katedri za biohemiju.

U proteklom periodu bila je angažovana na više naučno-istraživačkih projekata finansiranim od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije: "Molekulske osnove biohemijskih procesa i njihova promena u bolesti ili pod dejstvom spoljnih faktora"(1802) (2002-2005.); "Ispitivanje strukture i funkcije biološki važnih makromolekula u fiziološkim i patološkim stanjima"(142020) (2006-2010.); "Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj" (172049) (period 2011-).

U periodu od 2010-2013 bila je angažovana na međunarodnom projektu OP7-REGPOT-2009-1 finansiranom od strane Evropske unije: FCUB-ERA "Reinforcement of the Faculty of Chemistry, University of Belgrade, towards becoming a centre of excellence in the region of WB for molecular biotechnology and food research" (period 2010-2013.)

Član je Srpskog hemijskog društva, član je Biohemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Весна Јовановић

број уписа

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Тиолна група Cys34 хуманог серум-албумина: могућности и значај одређивања у клиничкој пракси"

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

Потпис докторанта



У Београду, 02.12.2013.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Весна Јовановић**

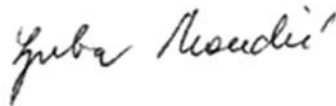
Број уписа _____

Студијски програм **Биохемија**

Наслов рада **"Тиолна група Cys34 хуманог серум-албумина: могућности и
значај одређивања у клиничкој пракси"**

Ментор **др Љуба Мандић**

Потписани



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

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

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

Потпис докторанта



У Београду, 02.12.2013.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

"Тиолна група Cys34 хуманог серум-албумина: могућности и значај одређивања у клиничкој пракси"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

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

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

Потпис докторанта



У Београду, 02.12.2013.

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

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

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

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

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

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

OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DISERTACIJE

Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu (M₂₁)

1. V.B. Jovanović, A.Z. Penezić-Romanjuk, I.D. Pavićević, J.M. Aćimović, Lj.M. Mandić: Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination, *Analytical Biochemistry* 439 17–22 (2013) (IF 2.996 za 2011, Kategorija Analitička hemija 19/73) M21
2. Vesna B. Jovanović, Ivan D. Pavićević, Marija Takić, Ana Z. Penezić-Romanjuk, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić: The influence of fatty acids on determination of human serum albumin thiol group, *Analytical Biochemistry*, (IF 2.996 za 2011, Kategorija Analitička hemija 19/73) M21
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.030>

Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M₃₄)

1. V.B Jovanović, J. M. Aćimović, A. Z. Penezić, Lj. M. Mandić. Determination of human serum albumin thiol group. 16th European Conference on Analytical Chemistry, Beograd 2011, BC15
2. Jelena M. Acimović, Bojana D. Stanimirović, Nina Todorović, Vesna B. Jovanović, Ljuba M. Mandić. Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and protein on the reaction with methylglyoxal. EuroFoodChem XVI, Gdansk 2011, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 61 (Suppl.1), 130, 2011
3. J.M. Aćimović, V.B. Jovanović, I.D. Pavićević, Lj.M.Mandić. The spectrophotometric method for monitoring of protein guanidine group changes during carbonylation. 16th European Conference on Analytical Chemistry, Beograd 2011, BC16
4. A. Z. Penezić-Romanjuk, I.D. Pavićević, J.M. Aćimović, V.B. Jovanović, Lj.M. Mandić. The role of copper(II) ions in oxidative stress induced by glycation of human serum albumin with methylglyoxal. 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 FEBS Journal Vol 280, Issue Supplement s1 p293-294

Saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampana u izvodu (M₆₄)

1. Ivan D. Pavićević, Vesna B. Jovanović, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. Uticaj masnih kiselina vezanih za humani serum albumin na reaktivnost slobodne tiol-grupe albumina. Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2012. Knjiga izvoda radova. BH P10

2. A.Z. Penezić., J.M. Aćimović, V.B. Jovanović, Lj.M. Mandić. The influence of binding of copper (II) ions to HSA on Cys 34 thiol group content. Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2012. Knjiga izvoda radova.