

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Nikola J. Gligorijević

UTICAJ POSTTRANSLACIONIH
MODIFIKACIJA FIBRINOGENA NA NJEGOVU
REAKTIVNOST I FUNKCIJU

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Nikola J. Gligorijević

IMPLICATIONS OF POSTTRANSLATIONAL
CHANGES OF FIBRINOGEN ON ITS
REACTIVITY AND FUNCTION

doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

dr Zoran Vujčić, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Olgica Nedić, naučni savetnik

Institut za primenu nuklearne energije (INEP), Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Zoran Vujčić, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Olgica Nedić, naučni savetnik

Institut za primenu nuklearne energije (INEP), Univerzitet u Beogradu

dr Milica Popović, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova teza je urađena na Institutu za Primenu Nuklearne Energije (INEP), na odeljenju za metabolizam. Svojoj mentorki dr Olgici Nedić dugujem veliku zahvalnost na podršci prilikom izrade ove disertacije i velikoj pomoći u planiranju eksperimenata i tumačenju rezultata.

Mentoru, profesoru dr Zoranu Vujčiću sa Hemijskog fakulteta se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći prilikom tumačenja rezultata i korisnim sugestijama prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se docentu dr Milici Popvić na korisnim sugestijama prilikom pisanja disertacije.

Posebno se zahvaljujem mojim kolegama iz laboratorije, Dragani, Ani, Milošu i Goranu na lepom druženju, pomoći i podršci u svakom trenutku izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se i ostalim kolegama sa INEP-a i Hemijskog fakulteta na pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Na kraju posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i dragim prijateljima na neprocenjivoj podršci i razumevanju.

Lista skraćenica

A – apsorbancija

ADP – adenzin difosfat

AGE – napredni produkti neenzimske glikozilacije

AKT – proteinska kinaza B

ALS – subjedinica nestabilna u kiseline

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CD UV spektrometrija – cirkularni dihiroizam ultraljubičasta spektrometrija

DAG – diacilglicerol

DM2 – dijabetes melitus tip 2

DNA – dezoksiribonukleinska kiselina

ELISA – imunoenzimski test

ER α – estrogini receptor- α

F XII, XI, X, IX, VIII, VII i V – faktori koagulacije XII, XI, X, IX, VIII, VII i V

FAK – fokalna adhezijska kinaza

FpA – fibrinopeptid A

FpB – fibrinopeptid B

Fuc – fukoza

Gal – galaktoza

Glc – glukoza

GlcNAc – N-acetilglukozamin

GLUT 4 – glukozni transporter 4

GSH – redukovani glutation

GSSG – oksidovani glutation

HbA1c – neenzimski glikozilovani hemoglobin

HILIC – hromatografija hidrofilnih interakcija

HIV – virus humane imunodeficijencije

HPLC – visoko efikasna tečna hromatografija

HRP – peksohidraza iz rena

IGF – faktor rasta sličan insulinu

IGFBP – vezujući protein za faktore rasta slične insulinu

IGF-IR – receptor tip I za faktore rasta slične insulinu
IL-1 i -6 – interleukin-1 i -6
INF- γ – interferon- γ
IP3 – inozitol trifosfat
IRS – supstrat za insulinski receptor
Man – manoza
MAPK – proteinske kinaze aktivirane mitogenom
MGO – metilglioksal
mRNA – informaciona RNA
mTOR – rapamicinska meta
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PAI-2 – inhibitor plazminskog aktivatora-2
PAR – proteazom aktivirani receptor
PBS – fosfatom puferisani fiziološki rastvor
PEST – Pro-Glu-Ser-Thr sekvencija
PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza
RAF – proonkogeni serin/treoninska kinaza
RAGE – receptor za napredne produkte neenzimskog glikozilovanja
RGD – Arg-Gly-Asp sekvencija
rhIGFBP-1 – humani rekombinantni IGFBP-1
RNA – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne kiseonične vrste
RXR α – retinoični X receptor- α
SDS – natrijum-dodecil sulfat
SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija
Sia – sialinska kiselina
TF – tkivni faktor
TNF- α – faktor nekroze tumora- α
tPA – tkivni aktivator plazmina
VWF – Von Willebrandov faktor

Izvod

Fibrinogen je važan protein primarne i glavni protein sekundarne hemostaze. Nakon povrede, on se dejstvom trombina pretvara u nerastvorni fibrin koji se dalje umrežava, pri čemu nastaje fibrinska mreža koja ojačava krvni ugrušak na mestu povrede. Da bi fibrinogen obavljao svoju biohemijsku ulogu, bitni su određeni faktori, u koje spadaju njegove posttranslacione modifikacije i interakcije sa drugim proteinima. Posttranslacione modifikacije fibrinogena utiču na njegovu strukturu, strukturu fibrina i interakcije sa drugim proteinima. Fibrin nije pasivna mreža koja samo daje potporu krvnom ugrušku, već je aktivna struktura koja reguliše svoju sintezu i razgradnju interakcijom sa brojnim proteinima. Zato je važno otkriti nove proteine koji sa njim interaguju, a koji imaju uticaj na proces zarastanja povreda.

U okviru ove disertacije, optimizovana je procedura za izolovanje i analizu fibrinogena. Upotrebom dvostrukog taloženja etanolom dobijen je visoko prečišćen fibrinogen, pogodan za dalju karakterizaciju.

Kako je poznato da fibrinogen interaguje sa IGFBP-3 proteinom, postavilo se pitanje da li još neki protein iz grupe vezujućih proteina za IGF, pri fiziološkim uslovima, ima tu sposobnost. Upotrebom većeg broja afinitetnih metoda je pokazano da IGFBP-1 interaguje sa fibrinogenom i da je to opšta fiziološka pojava. Značaj ove interakcije treba sagledavati imajući u vidu da i IGFBP-1 podstiče zarastanje tkivnih povreda, samostalno i kao transporter IGF molekula.

Brojne patologije pri kojima se javljaju i koagulopatije, kao što su dijabetes melitus tipa 2 i ciroza jetre, karakteriše izmenjena koncentracija i struktura fibrinogena, što za posledicu ima stvaranje abnormalnog, trombogenog fibrina. Detaljno izučavanje pojedinačnih proteina uključenih u koagulopatiju može dati bližu sliku mehanizma odgovornog za ovu pojavu. Sa druge strane, promene na nivou posttranslacionih modifikacija i strukture fibrinogena sa starenjem mogu doprineti boljem razumevanju prisustva ili odsustva određenih patologija kod starijih ljudi.

Struktura fibrinogena sa starenjem se menja. Primenom lektinskog eseja uočeno je povećanje visoko-manoznih i/ili hibridnih N-glikana, tri-/tertaantenarnih kompleksnih glikana sa većim sadržajem Gal i GlcNAc. Spektrofluorimetrijska analiza je pokazala da kod zdravih ljudi preko 60 godina starosti, fibrinogen ima kompaktniju terciarnu

strukturu. Nije detektovano povećanje stepena karbonilovanja, kao ni prisustvo AGE produkata na fibrinogenu ovih ljudi, u odnosu na sredovečne. Rezultati funkcionalne analize su pokazali da starenje korelira sa smanjenjem vremena koagulacije, dok se brzina koagulacije, maksimalna optička gustina fibrinskog ugruška, debljina fibrinskih vlakana, poroznost i interakcija sa IGFBP-1 ne menjaju. Iz svega navedenog, može se pretpostaviti da promene na nivou glikozilovanja utiču kako na strukturu fibrinogena, tako i na vreme koagulacije.

Ciroza je bolest koja se javlja kao posledica raznih stanja. U naprednom stadijumu bolesti jetre, koagulacija krvi može biti značajno izmenjena. Rezultati analize N-glikozilovanja fibrinogena ukazuju da se kod ciroze povećava udeo tri-/tetraantenarnih struktura, Gal β -1,4 GlcNAc, terminalne α -2,3 Sia i α -1,3 Man. Takođe, dolazi do smanjenja α -1,6 Fuc vezane za manozno jezgro, kao i biantenarnih galaktozilovanih N-glikana sa umetnutim GlcNAc. A α lanac fibrinogena je najpodložniji karbonilovanju, a zatim B β lanac. U cirozi dolazi do povećanog karbonilovanja fibrinogena u odnosu na fibrinogen zdravih osoba. Takođe, dolazi do smanjenja udela α -heliksa i promena na nivou tercijarne strukture. Količina kompleksa fibrinogena sa IGFBP-1 u plazmi je značajno povećana u cirozi.

Kod osoba sa DM2, količina kompleksa fibrinogena i IGFBP-1 u plazmi nije značajno promenjena u odnosu na zdrave ljude, ali je značajno manja količina kompleksa fibrina i IGFBP-1 koji nastaju po izazivanju koagulacije. Ovi rezultati sugerišu da se prilikom formiranja fibrina kod dijabetičara oslobađa deo IGFBP-1, smanjujući svoje učešće u procesu oporavka tkiva. Takođe, *in vitro* modifikacijama fibrinogena glukozom i metilglioksalom je pokazano da gliko-oksidacija ima uticaja ne samo na strukturu fibrinogena, već i na smanjenje njegovog afiniteta prema IGFBP-1. Da bi se potvrdio fiziološki značaj interakcije fibrinogena i IGFBP-1, kao i da bi se spoznala tačna uloga IGFBP-1 u koagulaciji i hemostazi, potrebna su dalja istraživanja uticaja ove interakcije na procese koagulacije i zarastanja rana.

Ključne reči: fibrinogen, posttranslacione modifikacije proteina, struktura proteina, koagulacione osobine, starenje, ciroza, dijabetes melitus tipa 2, protein-protein interakcije, hemijske modifikacije proteina.

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina

UDK broj: 577,112

Abstract

Fibrinogen is an important protein of primary and main protein of secondary hemostasis. Upon injury, fibrinogen is converted to insoluble fibrin by the action of thrombin. Fibrin further cross-links and creates fibrin network which reinforces blood clotting at the site of injury. There is a significant contribution of posttranslational modifications as well as interactions with other proteins necessary for fulfillment of fibrinogen biochemical role. Posttranslational modifications of fibrinogen influence its structure, fibrin structure and interactions with other proteins. Fibrin is not only a passive network that supports blood clot, but also an active structure that regulates its synthesis and degradation by interacting with many different proteins. For this reason, it is important to identify new proteins which interact with fibrinogen and may also have a role in wound healing.

The procedure for isolation and analysis of fibrinogen was optimized in this dissertation. Application of double precipitation using ethanol resulted in highly purified fibrinogen, suitable for further characterisation.

Since it is known that fibrinogen interacts with IGFBP-3 protein, the question was raised whether some other protein from the family of the IGF-binding proteins has this ability under physiological conditions. By using several affinity methods, it was shown that IGFBP-1 interacts with fibrinogen and this is a general physiological event. The significance of this interaction should be evaluated taking into consideration that IGFBP-1 itself may have beneficial effect on tissue wound healing, alone and as a transporter of the IGF molecule.

Several pathologies accompanied by coagulopathies, such as diabetes mellitus type 2 and cirrhosis, are characterised by altered concentration and structure of fibrinogen, which in turn creates abnormal, thrombogenic fibrin. Detailed study of individual proteins included in coagulopathy may enable closer look at mechanisms responsible for this outcome. On the other hand, changes in posttranslational modifications and structure of fibrinogen with aging may lead to better understanding of presence or absence of certain pathologies associated with ageing.

The structure of fibrinogen alters with aging. An increase of high-mannose and/or hybrid N-glycans, tri-/tetraantennary complex glycans with greater amounts of

Gal and GlcNAc was detected by lectin array. Spectrofluorimetric analysis revealed that healthy individuals over 60 years of age have fibrinogen with a more compact structure. An increase in fibrinogen carbonylation and occurrence of AGE products was not detected in older individuals compared to middle-aged. The results of functional analysis indicated that aging correlates with reduction of coagulation time, while coagulation speed, maximal absorbance of fibrin clot, diameter of fibrin fibers, porosity and interaction with IGFBP-1 does not change. Taking into account all the results, it may be postulated that changes in glycosylation influence the structure and coagulation time of fibrinogen.

Cirrhosis is a disease which occurs as a consequence of many conditions. In the advanced stage of liver disease, blood coagulation may be significantly altered. The analysis of fibrinogen N-glycosylation demonstrated that cirrhosis leads to an increase in tri-/tetraantennary structures, Gal β -1,4 GlcNAc, terminal α -2,3 Sia and α -1,3 Man. Additionally, core α -1,6 Fuc and biantennary galactosylated N-glycans with bisecting GlcNAc are reduced. A α chain of fibrinogen is the most susceptible to carbonylation, followed by B β chain. Cirrhosis leads to greater carbonylation of fibrinogen compared to fibrinogen from healthy individuals, reduction in the content of α -helix and alteration of fibrinogen tertiary structure. The amount of complexes formed between fibrinogen and IGFBP-1 is significantly increased in cirrhosis.

The amount of complexes fibrinogen/IGFBP-1 in plasma is not significantly altered in people with diabetes mellitus type 2 compared to healthy persons, but there is a significant reduction of fibrin/IGFBP-1 complexes upon induction of coagulation. These results suggest that a portion of IGFBP-1 is released during fibrin formation in diabetic individuals, thus reducing its participation in tissue recovery. Also, *in vitro* modifications of fibrinogen with glucose and methylglyoxal indicated that glyco-oxidation does not affect only the structure of fibrinogen but it also reduces its affinity for IGFBP-1. Further research is needed in order to confirm the physiologic importance of the interaction between fibrinogen and IGFBP-1 and to discover the role of IGFBP-1 in the processes of coagulation and hemostasis.

Key words: fibrinogen, posttranslational modifications of protein, protein structure, coagulation properties, aging, cirrhosis, diabetes mellitus type 2, protein-protein interactions, chemical modifications of protein.

Scientific field: Chemistry

Subfield: Biochemistry

UDC number: 577,112

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo.....	3
2.1 Fibrinogen.....	3
2.1.1 Struktura i biosinteza fibrinogena	3
2.1.2 Posttranslacione modifikacije fibrinogena	6
2.1.3 Patološke posttranslacione modifikacije fibrinogena	8
2.2 Koagulacija i proces stvaranja fibrina	13
2.2.1 Primarna hemostaza.....	13
2.2.2 Sekundarna hemostaza	15
2.3 Interakcija fibrinogena sa drugim proteinima	18
2.4 Fibrinogen tokom procesa starenja.....	20
2.5 Hemostaza u cirozi jetre	20
2.6 Fibrinogen u dijabetesu tipa 2	21
2.7 IGF sistem	21
2.7.1 IGF-vezujući proteini (IGFBP)	24
2.7.2 IGF sistem u zarastanju rana i koagulaciji.....	28
2.7.3 IGFBP-1	29
3. Naši radovi.....	32
3.1 Izolovanje fibrinogena.....	32
3.2 Dobijanje fibrina.....	33
3.3 Interakcija fibrinogena sa IGFBP-1	34
3.4 Uticaj starenja na strukturu i rektivnost fibrinogena	38
3.4.1. Biohemijski parametri ispitanika.....	39

3.4.2	Analiza glikozilacije fibrinogena lektinima	40
3.4.3	Analiza tercijarne strukture fibrinogena	43
3.4.4	Koagulacione osobine fibrinogena	44
3.4.5	Sadržaj fibrinogen/IGFBP-1 kompleksa kod zdravih osoba do i preko 60 godina	47
3.5	Uticaj ciroze jetre na strukturu i reaktivnost fibrinogena	48
3.5.1	Biohemijski parametri osoba sa cirozom i zdravih (kontrolnih) ljudi	48
3.5.2	Analiza glikanskih struktura	49
3.5.3	Analiza karbonilovanja fibrinogena usled ciroze	51
3.5.4	Analiza promene sekundarne i tercijarne strukture fibrinogena kod osoba sa cirozom	52
3.5.5	Ispitivanje zastupljenosti fibrinogen/IGFBP-1 kompleksa kod osoba sa cirozom	54
3.6	Uticaj <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> gliko-oksidacije na interakciju fibrinogena sa IGFBP-1	56
3.6.1	Biohemijski parametri osoba sa dijabetes melitusom tipa 2 i zdravih (kontrolnih) ljudi	56
3.6.2	Zastupljenost kompleksa fibrina i fibrinogena sa IGFBP-1 kod osoba sa dijabetes melitusom tipa 2	56
3.6.3	<i>In vitro</i> ispitivanje uticaja modifikacije fibrinogena glukozom i metilglioksalom na komplekse fibrinogena sa IGFBP-1	58
3.6.4	Detekcija promene tercijarne strukture fibrinogena i prisustva modifikacija fibrinogena MGO-om	60
3.7	Zaključci	64
4.	Eksperimentalni deo	66
4.1	Supstancije	66
4.2	Oprema	68
4.3	Uzorci	69
4.4	Izolovanje fibrinogena	70
4.5	Određivanje koncentracije proteina	71

4.6 Nativna elektroforeza	72
4.7 Redukujuća SDS elektroforeza.....	73
4.8 Imunoblot analiza	74
4.9 Imunoprecipitacija kompleksa fibrinogena i IGFBP-1	77
4.10 Lektinska afinitetna hromatografija.....	77
4.11 Stvaranje i analiza fibrinskog monomera	78
4.12 Određivanje karbonila proteina plazme, izolovanog fibrinogena i analiza podložnosti lanaca fibrinogena na oksidaciju (karbonilovanje)	80
4.13 Analiza glikozilovanja fibrinogena metodom lektinskog mikroeseja	81
4.14 Test koagulacije	82
4.15 Određivanje poroznosti fibrina.....	83
4.16 Skenirajuća elektronska mikroskopija fibrina	83
4.17 Spektrofluorimetrijska analiza fibrinogena	84
4.18 CD spektrometrijska analiza fibrinogena	84
4.19 Modifikacija plazme i fibrinogena <i>in vitro</i> glukozom i metilglioksalom.....	85
4.20 Inkubiranje fibrinogena sa rekombinantnim humanim IGFBP-1	86
5. Reference	87

1. Uvod

Fibrinogen ili faktor I sistema koagulacije je glikoprotein molekulske mase od 340 kDa. Biohemijska uloga ovog proteina je izuzetno značajna u održavanju homeostaze organizma, jer stvaranje fibrinske mreže na mestu tkivne povrede sprečava nekontrolisani gubitak krvi. Brojna patološka stanja su praćena koagulopatijama, koje se ispoljavaju trombozom ili povećanim krvarenjem. Da bi se ove negativne pojave bolje razumele i efikasnije sprečile ili tretirale, bitno je upoznati faktore koji na njih utiču. Jedan od tih faktora je, pored koncentracije, struktura fibrinogena. Kako fibrinogen podleže brojnim posttranslacionim modifikacijama (glikozilovanje, oksidacija), njihovom karakterizacijom i analizom u patološkim stanjima, može se doprineti boljoj spoznaji njihovog uticaja na sekundarnu i tercijarnu strukturu fibrinogena, interakcije fibrinogena sa drugim proteinima, proces stvaranja i karakteristike fibrina. Određene modifikacije fibrinogena, kao što je (gliko)oksidacija, igraju važnu ulogu u razvoju koagulopatija. Glikozilovanje fibrinogena je važno za pravilno obavljanje njegove biološke uloge. Neglikozilovani fibrinogen stvara fibrinska vlakna drugačije strukture od glikozilovanog, a takođe je i brzina stvaranja fibrina povećana. Poznato je da se obrazac glikozilovanja proteina menja sa starenjem i u prisustvu raznih patologija. Već su nađene mutirane varijante fibrinogena sa promenjenim načinom glikozilovanja, što za posledicu ima izmenjeno ponašanje tokom koagulacije. Kako se životni vek čoveka produžava, a sa starenjem i broj ljudi koji imaju tzv. „bolesti povezane sa starenjem“ (u koje se ubrajaju metabolički sindrom i DM2), intenziviraju se ispitivanja koja se odnose na stariju populaciju. Dosadašnji koncept, da i u starenju treba težiti metaboličkoj homeostazi koja važi za srednje doba se preispituje, jer je konstatovano da je starenje, kao i dečije doba, fiziološki specifičan period života. Iz tog razloga se studije povezane sa aspektima starenja ohrabruju i podstiču svuda u svetu.

Raniji eksperimenti su utvrdili da fibrinogen i fibrin mogu interagovati sa IGFBP-3. Pretpostavka je da ova interakcija doprinosi koncentrovanju IGF-I na mestu povrede, gde on stimulatorno deluje na proces zarastanja. Otkriće nove interakcije fibrinogena sa IGFBP-1 je zanimljivo, uzevši u obzir da sam IGFBP-1 stimuliše proces oporavka tkiva. Deo molekula IGFBP-1, poznat kao RGD sekvencija, omogućava njegovo vezivanje za integrin $\alpha 5\beta 1$ na površini ćelija, a taj integrin je nađan na površini

trombocita. Takođe, IGFBP-1 je supstrat za plazmin, glavni enzim fibrinolize. Proteolizom IGFBP-1 se oslobađa IGF-I, ali nastaju i bioaktivni peptidi koji ispoljavaju samostalni migratorni i proliferativni uticaj na humane dermalne fibroblaste. U jednoj od patologija koju karakteriše tromboza, abdominalnoj aortnoj aneurizmi, detektovano je povećano prisustvo IGFBP-1 u trombu, što je prepoznato kao negativna pojava. Protumačeno je, naime, da proteolitičko okruženje u nastalom trombu dovodi do intenzivirane proteolize IGFBP-1 i oslobađanja IGF-I, što zajedno dalje stimuliše aktivaciju krvnih pločica i stvaranje tromba. Ispitivanjem interakcija fibrinogena i fibrina sa IGFBP-1 u stanjima koja mogu uticati na koncentraciju i strukturu oba ova proteina (starenje, DM2, ciroza jetre), može se doprineti boljem razumevanju uzroka i faktora koji podstiču pojavu koagulopatija.

Iz svega navedenog se može zaključiti da postoji potreba za daljim istraživanjem procesa koagulacije, kako na nivou celog organizma, tako i na nivou pojedinačnih komponenti, od kojih je fibrinogen esencijalna. Ispitivanjem posttranslacionih modifikacija, sekundarne i tercijarne strukture, kao i funkcije fibrinogena, u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima koja utiču na koagulaciju, se može produbiti znanje o mehanizmima koji dovode do neželjenih promena u koagulaciji i o ulozi fibrinogena u njima. Takođe, ispitivanje posttranslacionih modifikacija fibrinogena kod dugovečnih zdravih ljudi može doprineti otkriću faktora odgovornih za dugovečnost na molekulskom nivou.

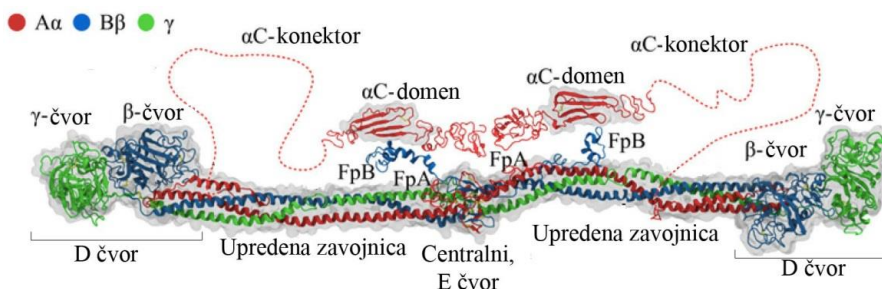
2. Opšti deo

2.1 Fibrinogen

Fibrinogen ili faktor I je ključni protein u procesu hemostaze. Ovaj protein je supstrat za trombin, čijom aktivnošću nastaju fibrinski monomeri, koji se udružuju, umrežavaju i time ojačavaju krvni ugrušak na mestu povrede. Pored toga, fibrinogen ima ulogu i u povezivanju aktiviranih krvnih pločica interagujući sa IIb/IIIa integrinima, koji se nalaze na površini aktiviranih pločica. Kod zdravih osoba, fibrinogen se u cirkulaciji nalazi u koncentraciji od 2 do 4 g/L. U slučaju akutne inflamacije, njegova koncentracija može preći i 7 g/L. U slučaju poremećene sinteze, koncentracija može biti manja od 1 g/L (Mosesson, 2005; Santacrose et al., 2006; Tennent et al., 2007).

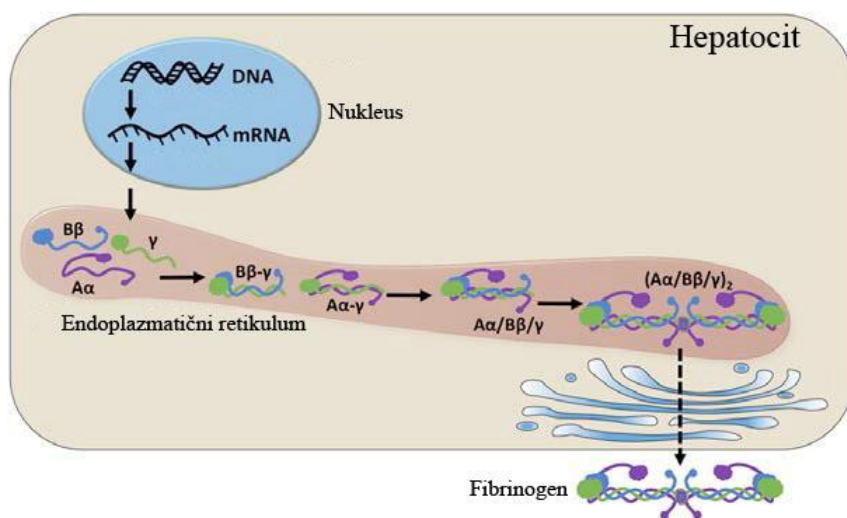
2.1.1 Struktura i biosinteza fibrinogena

Fibrinogen je homodimerni glikoprotein, molekulske mase 340 kDa, strukture $(A\alpha B\beta\gamma)_2$. Sadrži 29 disulfidnih veza. Svih šest fibrinogenских lanaca su spojeni tako da se njihovi N-terminalni krajevi nalaze u centralnom, E čvoru, a zatim prelaze u uvijene zavojnice. $B\beta$ i γ lanci se završavaju globularnim regionima, koji se nazivaju β i γ čvorovi. Zajedno, ova dva čvora čine takozvani D čvor. $A\alpha$ lanci su najduži. Na kraju uvijene zavojnice, $A\alpha$ lanci se nastavljaju fleksibilnim regionom, αC -konektorom, na koje se nadovezuju αC domeni. Na Slici 1 je prikazana struktura fibrinogena. Prilikom pretvaranja fibrinogena u fibrin u prisustvu trombina, dolazi do hidrolize FpA i FpB peptida (Kattula et al., 2017).



Slika 1. Struktura fibrinogena sa obeleženim regionima (modifikovano po Weisel i Litvinov, 2013).

Biosinteza fibrinogena se odvija u hepatocitima, nakon što se geni za sva tri lanca fibrinogena posebno eksprimiraju. Nastali pojedinačni lanci zatim prelaze u endoplazmatski retikulum, gde se spajaju. Prvo nastaju $A\alpha$ - γ i $B\beta$ - γ prekursori, koji se zatim udružuju u $A\alpha$ - $B\beta$ - γ polumolekule, da bi se na kraju formirao celi $(A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂ fibrinogen (Huang et al., 1993; Kattula et al., 2017). Ovako formirani protein prelazi iz endoplazmatskog retikuluma u Goldžijev aparat, a potom izlazi iz ćelije u cirkulaciju, Slika 2.



Slika 2. Biosinteza fibrinogena.

Fibrinogen ima jedno visoko afinitetno mesto u centralnom, E čvoru i dva u D čvorovima za vezivanje kalcijuma (Marguerie, 1977). Pored ovih, postoje i mesta manjeg afiniteta za kalcijum. U mesta niskog afiniteta za kalcijum kod fibrinogena se ubrajaju i sijalinske kiseline (Dang et al., 1989). Fibrinogen u plazmi čini heterogena populacija proteina, koja nastaje usled alternativne obrade mRNA lanaca fibrinogena, posttranslacione modifikacije i proteolitičke degradacije. $A\alpha$ lanac se nalazi u dominantnoj formi mase 67 kDa, koju čini 610 aminokiselina. Druga, duža forma, označena kao α_E , mase 110 kDa, od 847 aminokiselina čini 1-3 % ukupne količine fibrinogena. Ova forma se uvek udružuje kao α_E - α_E homodimer i na taj način nastaje molekul fibrinogena mase 420 kDa. Pored toga, u ovom fibrinogenu je duža varijanta α lanca N-glikozilovana, što nije slučaj sa dominantnom formom (Fu et al., 1998). Ova varijanta fibrinogena sporije stvara fibrinski ugrušak. Nastali ugrušak sadrži tanja

vlakna i razgranatiji je u odnosu na standardni fibrinogen. Sudeći po mestu gde se nalaze dodatni globularni regioni α_E lanca, označeni kao α_EC , verovatno je da njihovo prisustvo otežava bočnu agregaciju fibrinskih vlakana. Sa druge strane, prisustvo dodatnih regiona i njihov položaj mogu olakšati interakciju fibrina ovog tipa sa ćelijama, jer dodatni α_EC domeni sadrže mesto vezivanja za β_2 integrine (Mosesson et al., 2004). U cirkulaciji, C-terminalni kraj $A\alpha$ lanca je podložan proteolizi, koja je glavni razlog heterogenosti fibrinogena (de Maat i Verschuur, 2005). Oko 70 % ukupnog fibrinogena mase 340 kDa ima celi $A\alpha$ lanac. Oko 25 % fibrinogena se nalazi u formi mase 305 kDa, u kojoj je jedan $A\alpha$ razložen. Na kraju, jako mali deo cirkuliše u formi mase 270 kDa, kod koje su oba $A\alpha$ lanca razložena (de Maat i Verschuur, 2005). U novije vreme su se pojavili podaci da je $A\alpha$ lanac O-glikozilovan (Hoffmann et al., 2016). $B\beta$ lanac ima masu od 57 kDa, 461 aminokiselinu i N-glikozilovanje na mestu Asn^{364} (Watt et al., 1978).

γ lanci fibrinogena postoje u dve forme, dominantna γ_A , mase 47 kDa, od 411 aminokiselina i γ' varijanta, mase 57,5 kDa, od 427 aminokiselina. Ova druga forma postoji u oko 15 % fibrinogena u plazmi (Mosesson, 2005) i nalazi se pretežno kao heterodimer, γ_A/γ' . γ lanac fibrinogena je N-glikozilovan na mestu Asn^{52} (Nickerson i Fuller, 1981). Heterogena γ_A/γ' forma fibrinogena je najviše ispitivana. U početku se smatralo da njena povećana koncentracija doprinosi razvoju arterijske tromboze, ali se kasnije ustanovilo da, kada se koncentracija ove forme normalizuje prema ukupnoj koncentraciji fibrinogena, te zavisnosti nema. Sa druge strane, venska tromboza je povezana sa smanjenjem koncentracije γ_A/γ' fibrinogena, kao i sa smanjenjem odnosa γ' i ukupnog fibrinogena (de Willige et al., 2005), što sugeriše da ova varijanta štiti od venske tromboze. Pokazano je da se osobine fibrina nastalog od γ_A/γ' forme fibrinogena ne menjaju sa povećanjem koncentracije trombina. Dalje, kod ove molekulske vrste smanjeno je prisustvo protofibrila u rastućem fibrinu, manja je gustina i čvrstoća fibrina. Sve ove karakteristike ukazuju na jako značajnu ulogu γ_A/γ' fibrinogena u stvaranju fibrinskog ugruška (Domingues et al., 2016). Ova forma, takođe, ispoljava visoko afinitetno vezivanje za trombin (Fredenburgh et al., 2008). Vezivanjem trombina, inhibira se aktivacija krvnih pločica, smanjuje se otpuštanje fibrinopeptida B i aktivacija koagulacionih faktora VIII i V. Inhibicija rasta ugruška γ_A/γ' fibrinogenom je detektovana *in vitro* u modelu vena, ali ne i u arterijama, što znači da antitrombinsko

dejstvo zavisi od mesta nastanka tromba. Povećana ekspresija γ_A/γ' forme fibrinogena može imati uticaj na smanjenje protrombinske aktivnosti indukovane inflamacijom (Kattula et al., 2017).

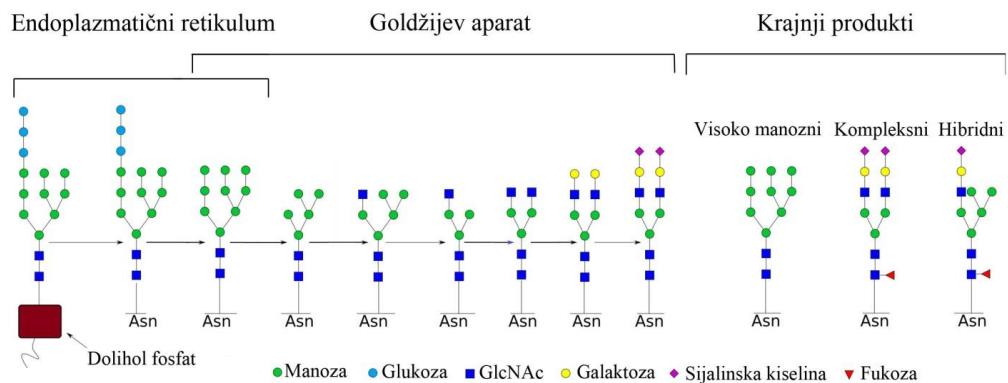
2.1.2 Posttranslacione modifikacije fibrinogena

Fibrinogen podleže brojnim posttranslacionim modifikacijama, pored navedene proteolitičke degradacije. $A\alpha$ lanac fibrinogena može biti fosforilovan. Nefosforilovani, mono- i difosforilovani oblici fibrinogena cirkulišu u krvi čoveka u odnosu 1:1:1 (Nagel i Meyer, 2014). Fosforilovanje utiče na osobine fibrinogena. Povećava afinitet fibrinogena za trombin, što za posledicu ima povećano otpuštanje fibrinopeptida A. Prilikom akutnog odgovora na inflamaciju, povećava se stepen fosforilovanja fibrinogena (Haglund et al., 2000), dovodeći do stvaranja fibrina sa debljim vlaknima i povećanom rezistencijom na plazminsku hidrolizu (Martin et al., 1992; Haglund et al., 2000). Ono što je interesantno je činjenica da *in vitro* fosforilovanje fibrinogena kazein kinazom II indukuje stvaranje debljih vlakana u odnosu na kontrolni uzorak (Martin et al., 1991). Kako se rezultati *in vitro* eksperimenata slažu sa rezultatima dobijenim *in vivo* u slučaju primene ove kinaze, moguće je da je upravo ova ili neka srodna kinaza odgovorna za *in vivo* fosforilovanje fibrinogena (Martin et al., 1992).

Kovalentno vezivanje saharida omogućava proteinima pravilno uvijanje, zaštitu od degradacije, povećava njihovu rastvorljivost i učestvuje u obavljanju njihovih funkcija (Lis i Sharon, 1993). Glikozilovanje je česta posttranslaciona promena proteina i smatra se da je oko 60 % svih proteina živih organizama glikozilovano (Apweiler et al., 1999). N-glikozilovanje proteina se obavlja vezivanjem saharida za Asn koji se nalazi u sekvenciji Asn-X-Ser/Thr, gde X može biti bilo koja aminokiselina osim Pro (Aebi, 2013). Prisustvo ove sekvencije nije jedino presudno za formiranje veze, već je nužno da protein bude i u odgovarajućoj konformaciji. Za Asn je kod N-glikozilovanja direktno vezan GlcNAc u β konformaciji. N-glikozilovanje se odigrava u endoplazmatičnom retikulumu i u Goldžijevom aparatu dejstvom dva tipa enzima, glikoziltransferaza i glikozidaza (Ohtsubo i Marth, 2006). Jedan od načina regulacije biosinteze glikana je i regulacija koncentracije ovih enzima (Foulquier et al., 2006). Na

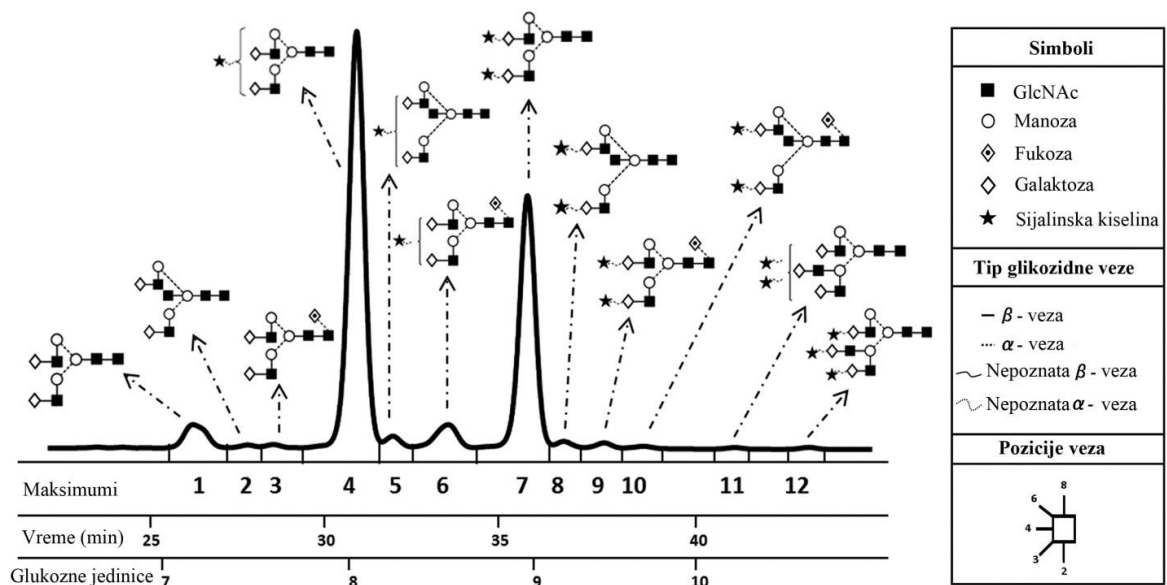
kraju procesa N-glikozilovanja, proteini mogu nositi tri tipa glikana: kompleksne, visoko manozne i hibridne (Nagae i Yamaguchi, 2012), Slika 3.

Promene proteina na nivou glikozilovanja se detektuju tokom starenja, razvoja tumora i usled prisustva određenih patologija (Krištić et al., 2014; Miura et al., 2015; Pinho i Reis, 2015; Connelly et al., 2016) i mogu značajno uticati na njihovu strukturu, stabilnost i funkciju, što je slučaj i sa fibrinogenom o čijem glikozilovanju će dalje biti reči.



Slika 3. Put biosinteze glikozilovanih proteina i tri tipa formiranih N-glikana.

Većina N-glikana fibrinogena su biantenarnog kompleksnog tipa, sa po jednom ili dve Sia na kraju. Pored ove dominantne strukture, HILIC-HPLC metodom su detektovane i druge glikoforme, koje su znatno manje zastupljene, Slika 4 (Adamczyk et al., 2013).



Slika 4. N-glikanske strukture fibrinogena (modifikovano po Adamczyk et al., 2013).

N-glikozilovanje fibrinogena igra važnu ulogu u formiranju fibrinskog ugruška. Poznavanje strukture glikana može biti važno u traganju za novim markerima bolesti (Nagel i Meyer, 2014). Pacijenti sa cirozom i drugim oboljenjima jetre imaju povećano prisustvo Sia na fibrinogenu (Martinez et al., 1983; Lisman i Ariëns, 2016), što za posledicu ima stvaranje fibrina sa tanjim vlaknima i sa mnogo mesta granjanja (Martinez et al., 1983). Tretiranjem fibrinogena neuraminidazom je dobijen fibrin sa debljim vlaknima, koji je ujedno i brže nastajao (Dang et al., 1989). Sa druge strane, neki eksperimenti ukazuju da se struktura fibrina kod osoba sa cirozom ne menja mnogo (Hugenholtz et al., 2016; Lisman i Ariëns, 2016), ali ipak dolazi do formiranja fibrina sa smanjenom permeabilnošću. Jedno od objašnjenja za ovu pojavu bi moglo biti postojanje većeg broja blagih strukturnih promena, koje zajedno mogu dovesti do značajnog smanjenja veličine pora mreže fibrina i ukupne permeabilnosti. Treba naglasiti da, pored strukturnih promena, na permeabilnost može uticati i promena naelektrisanja ugruška, do koje dolazi usled povećanog prisustva negativno naelektrisane Sia. Povećano prisustvo Sia, dalje može dovesti do povećanog vezivanja jona kalcijuma jer, kao što je već rečeno, Sia je nisko afinitetno vezujuće mesto za kalcijum (Dang et al., 1989; Lisman i Ariëns, 2016). Celokupno uklanjanje saharida podstiče lateralnu agregaciju vlakana i stvaranje fibrina sa masivnim vlaknima. Fibrin koji se stvara od neglikozilovanog fibrinogena nastaje brže i ima veću poroznost (Langer et al., 1988). Do sada su otkrivene brojne koagulopatije nastale kao posledica mutacija i, posledično, dodatnog N-glikozilovanja fibrinogena (Yamazumi et al., 1989; Maekawa et al., 1992; Sugo et al., 1999; Marchi et al., 2004) Pretpostavka je da promena glikozilovanja utiče i na smanjenje vremena koagulacije sa starenjem (Gligorijević et al., 2018a).

Tyr⁴¹⁸ i Tyr⁴²² γ' lanaca fibrinogena podležu sulfataciji. Ova modifikacija je odgovorna za povećanje afiniteta γ' lanca fibrinogena za trombin (Meh et al., 2001).

2.1.3 Patološke posttranslacione modifikacije fibrinogena

Pored pomenutih posttraslacionih modifikacija koje se dešavaju na fibrinogenu u redovnim fiziološkim uslovima i koje su važne za pravilno obavljanje njegove biohemijske uloge, postoje i one koje se dešavaju u određenim patološkim uslovima, a

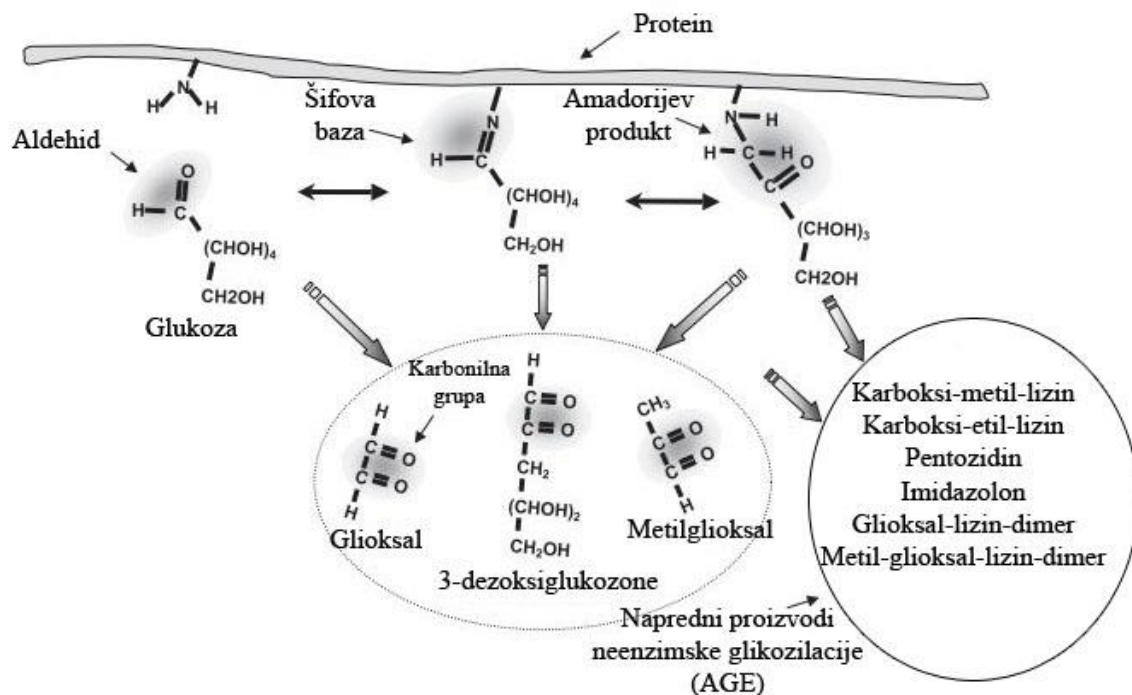
koje takođe bitno utiču na funkciju. U ovom poglavlju će biti reči o oksidaciji, kojoj je fibrinogen veoma podložan (Shacter et al., 1994).

Oksidativni stres nastaje kada je poremećen balans između antioksidanata i reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS), bilo zbog prekomerne potrošnje antioksidanata ili povećanog stvaranja ROS. Kada oksidativni stres nastane, ćelije pokušavaju da se odupru oksidativnim efektima i da povrate redoks balans aktiviranjem i utišavanjem gena koji kodiraju odbrambene enzime, transkripcione faktore i strukturne proteine (Dalton et al., 1999; Scandalios, 2004). Odnos između oksidovanog i redukovanog glutationa (2GSH/GSSG) je važan pokazatelj redoks stanja u organizmu. Povećana proizvodnja ROS može izmeniti strukturu DNA, proteina, lipida, dalje može izazvati aktivaciju transkripcionih faktora indukovanih stresom, stvaranje pro- i anti-inflamatornih citokina (Birben et al., 2012). ROS vrste odgovorne za modifikaciju navedenih molekula su superoksid anjon ($\cdot\text{O}_2^-$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$). Pored toga, reaktivni molekuli sa azotom se mogu formirati reakcijom između azot-monoksida (NO) i $\cdot\text{O}_2^-$, stvarajući peroksinitrit (ONOO^-) koji, takođe, može modifikovati biomolekule i oštećivati ćelije (Le Lay et al., 2014). Glavni proizvođači ovih reaktivnih vrsta (i u nepatološkom stanju) su mitohondrije. ROS vrste nastaju usled „curenja“ elektrona iz transportnog lanca elektrona. Procena je da je pod normalnim uslovima do 1 % elektrona iz transportnog lanca odgovorno za nastanak superoksid anjona, koji je prekursor za ostale ROS. Daljom redukcijom nastalog anjona se dobija vodonik peroksid. Ova dva molekula, $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 , mogu dalje zajedno reagovati (Haber-Weiss-ova reakcija) ili sam H_2O_2 može reagovati sa Fe^{2+} ili Cu^+ (Fentonova reakcija), pri čemu nastaje toksični hidroksil radikal. Pod fiziološkim okolnostima, ROS imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije, signalne transdukcije i kontrole kvaliteta sintetisanih proteina. Dejstvo enzima je još jedan izvor ROS, kao što je to slučaj sa NADPH oksidazom u fagocitima (Dalle-Donne et al., 2003; Fedorova et al., 2013).

Kao što je već rečeno, pri oksidativnom stresu u organizmu dolazi do povećanog nastanka ROS. Konstatna proizvodnja ovih molekula dovodi do trajnog oštećenja ćelija. Obim štete zavisi od same ćelije, vrste prisutnih ROS, njihove koncentracije i poluživota, lokacije i dužine trajanja njihove povećane proizvodnje, kao i od zaštitnog kapaciteta koji obezbeđuju anti-oksidativni sistemi. Oksidacija biomolekula menja

njihovu strukturu stvarajući nove funkcionalne grupe na njima, što direktno utiče na njihovu funkciju.

Među širokim spektrom modifikacija usled dejstva ROS, karbonilovanje biomolekula predstavlja glavno obeležje oksidativnog stresa (Yao i Rahman, 2011). Karbonilne reaktivne grupe, kao što su aldehidi, ketoni i laktami, su detektovane na lipidima, nukleinskim kiselinama i proteinima (Dalle-Donne et al., 2003). Dejstvom ROS mogu nastati brojni proizvodi, uključujući karbonile velike molekulske mase (kao što su, na primer, karbonilovani proteini) i karbonili male molekulske mase, koji nastaju u reakcijama oksidativnog raskidanja veza (na primer, gliko-oksidacija i peroksidacija lipida). Nakupljanje karbonilnih grupa dovodi do disfunkcije biomolekula i, na kraju, do ćelijske apoptoze (Curtis et al., 2012). Karbonilovanje je ireverzibilna modifikacija proteina. Postoji nekoliko izvora ROS koji dovode do proteinskog karbonilovanja. Oksidacija proteina katalizovana metalima se dešava usled Fentonove reakcije, u kojoj se slobodni jon metala redukuje u prisustvu vodonik peroksida, dajući visoko reaktivni hidroksil radikal. Nastali hidroksil radikal dalje može oksidovati ostatke aminokiselina. Oksidacijom Pro i Arg se dobija polualdehid Glu, oksidacijom Lys se dobija polualdehid aminoadipinske kiseline, dok se od Thr dobija 2-amino-3-ketobuterna kiselina. Trp može dati bar sedam oksidovanih proizvoda, među kojima su kinurenin i N-formil kinurenin. Poseban način dobijanja proteinskih karbonila je u reakciji sa proizvodima lipidne peroksidacije, kao što su akrolein i malonaldehid, koji nastaju usled oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Proizvodi lipidne peroksidacije reaguju sa aminokiselinama Lys, Cys i His (Dalle-Donne et al., 2003; Fedorova et al., 2013). Na kraju, još jedan jako važan proces koji dovodi do karbonilovanja proteina je gliko-oksidacija, slika 5. Ovaj proces je izražen u patologiji dijabetesa i nastaje kao posledica neenzimski katalizovane interakcije proteina sa glukozom, pri čemu aldehidna ili ketonska grupa redukujućeg šećera reaguje sa slobodnom amino grupom proteina, dajući imin, odnosno Šifovu bazu. Šifova baza se dalje može transformisati u Amadorijev proizvod. Amadorijev proizvod je nestabilan i raspada se na veći broj reaktivnih karbonilnih jedinjenja, kao što su 3-dezoksi-glukozon, glioksal i metilglioksal. Ovi proizvodi raspada dalje mogu reagovati sa proteinima i oksidovati ih. Glioksal i metilglioksal, osim ovim putem, mogu nastati i direktnom oksidacijom glukoze (Baig et al., 2017).



Slika 5. Shema nastanka naprednih proizvoda neenzimske glikozilacije

Svi navedeni proizvodi dalje postepeno podležu hemijskim procesima stvarajući tzv. napredne proizvode neenzimske glikozilacije (AGE), koji imaju tendenciju stvaranja novih ROS molekula i interaguju sa specifičnim ćelijskim receptorima (RAGE). Primeri AGE molekula su pentozidin, piralin, N-ε-karboksi-metil-lizin, N-ε-karboksi-etil-lizin, imidazon, argpirimidin i drugi. Vezivanjem AGE proizvoda za RAGE na ćelijama dolazi do indukcije proizvodnje ROS, koji dalje mogu aktivirati transkripcioni faktor NF-κB, izazivajući ekspresiju pro-inflamatornih faktora kao što su TNF-α i β, IFN-γ, IL-1 i 6 (Singh et al., 2001; Stitt., 2001; Basta et al., 2004). Sve je više dokaza da su AGE proizvodi uključeni u sekundarne komplikacije kod dijabetičara, kao što su neuropatija, nefropatija, retinopatija, poremećaj sočiva, promena krvnih sudova i drugo. Osim kod pacijenata sa dijabetesom, povećano prisustvo AGE proizvoda je izmereno i kod zdrave, starije populacije ljudi (Singh et al., 2001).

U fiziološkim uslovima, karbonilovanje ima korisnu ulogu u kontroli kvaliteta proteina. Pogrešno uvijeni proteini bivaju brzo karbonilovani i dalje usmereni ka proteaznom sistemu u ćeliji (proteazom). Pored toga, proteini koji su oštećeni tokom vremena takođe se karboniluju i uklanjaju u proteazomu. Sa druge strane, patološki povećano karbonilovanje proteina dovodi do stvaranja proteinskih agregata, koji

inhibiraju proteazni sistem, što za posledicu ima nakupljanje i eventualno, taloženje „loših“ proteina (Nyström, 2005). Ne treba zaboraviti da svaki strukturno izmenjeni protein može biti prepoznat kao „novi“ u organizmu (neoantigen), indukujući klasični imunski odgovor (Griffiths, 2008).

Oksidativni stres (u etiologiji ili kao posledica primarnog stanja) je povezan sa brojnim patologijama kao što su bolesti jetre, Alchajmerova bolest, mišićna distrofija, dijabetes, razvoj tumora, endotelna disfunkcija, ateroskleroza, bolesti oka i druge (Fedorova et al., 2013; Cichoż-Lach i Michalak, 2014; Li et al., 2015). Povećana oksidacija ima uticaj i na koagulacioni sistem. Prvo, oksidativni stres utiče na reaktivnost krvnih pločica, jer superoksid anjon povećava oslobađanje kalcijuma unutar pločica, pojačavajući njihovu agregaciju. Drugo, u fiziološkim uslovima endotel proizvodi azot-monoksid koji inhibira aktivaciju pločica dok endotelna disfunkcija smanjuje njegovu proizvodnju i doprinosi reaktivnosti pločica. Dodatno, usled endotelne disfunkcije i inflamacije, povećavaju se količine aktivatora krvnih pločica, kao što je Fcγ-RIIA receptor (Kakouros et al., 2011).

Sam fibrinogen podleže (gliko)oksidaciji i ova hemijska modifikacija se smatra odgovornom za njegovo izmenjeno ponašanje. *In vitro* oksidacija fibrinogena inhibira stvaranje fibrina i dovodi do formiranja fibrina sa tanjim vlaknima (Piryazev et al., 2009; Štiraková et al., 2013). Takođe, *in vitro* modifikacija fibrinogena peroksinitritom ima za posledicu inhibiranje stvaranja fibrina (Lupidi et al., 1999). Kod oksidativno modifikovanog fibrinogena kod pacijenata sa infarktom je nađena izmenjena struktura, produženo vreme koagulacije i stvaranje gušćeg fibrina sa tanjim vlaknima, što sve zajedno doprinosi rezistenciji na hidrolizu plazminom (Becatti et al., 2014).

Kod osoba sa cirozom je povećan stepen karbonilovanja fibrinogena povezan sa promenom njegove konformacije, smanjenjem vremena i brzine koagulacije. Od takvog fibrinogena nastaje fibrin koji nema značajnu strukturnu razliku u odnosu na fibrin zdravih osoba, ali ipak ima smanjenu poroznost, koja ga čini rezistentnijim na dejstvo plazmina. Pretpostavka je da su za smanjenje poroznosti, pored eventualno male strukturne promene koja se ne može detektovati standardnim metodama, odgovorne i hemijske modifikacije fibrinogena među kojima je i karbonilovanje. Mesta karbonilovanja na fibrinogenu formiraju hidrofobno okruženje, što može uticati na smanjenje poroznosti fibrina (Hugenholtz et al., 2016; Lisman i Ariëns, 2016).

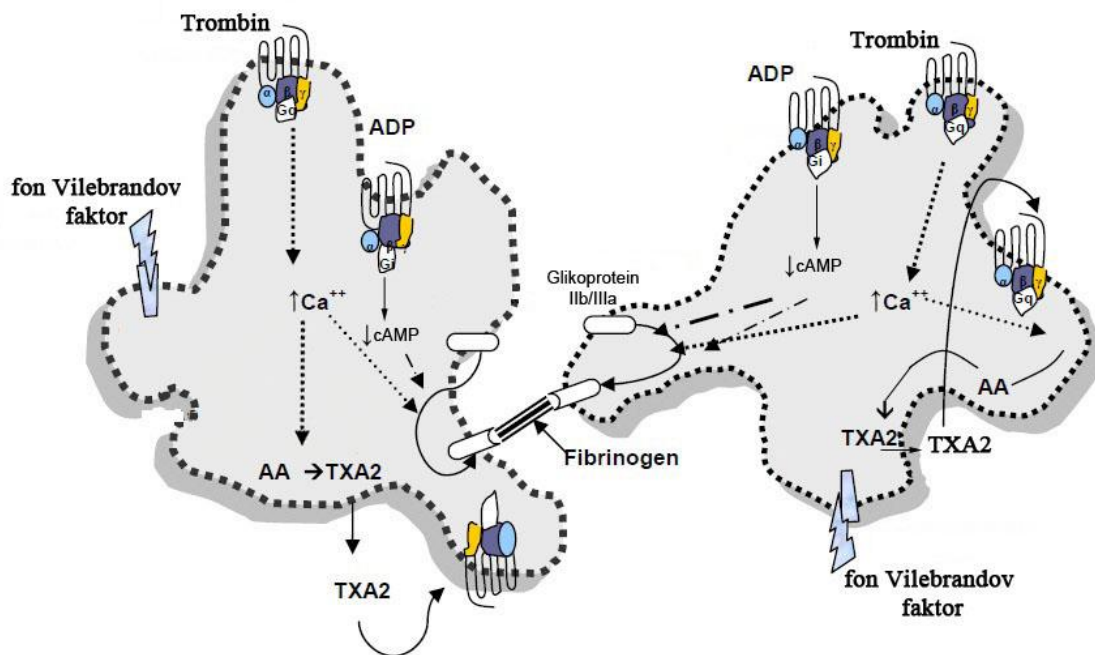
Stepen gliko-oksidacije fibrinogena kod dijabetičara korelira sa smanjenjem poroznosti i bržim stvaranjem fibrina, povećanjem granjanja i gustine fibrinske mreže (Dunn et al., 2005). Fibrin dijabetičara je rezistentniji na dejstvo plazmina i usled smanjene aktivacije plazminogena na njegovoj površini, što je posledica smanjenog vezivanja plazminogena i tkivnog aktivatora plazmina (tPA) (Dunn et al., 2006). Tercijarna struktura fibrinogena izolovanog iz plazme dijabetičara je promenjena, a takođe su detektovane i specifične modifikacije usled interakcije sa metilglioksalom (Gligorijević et al., 2017).

2.2 Koagulacija i proces stvaranja fibrina

Koagulacija i tromboliza su dva povezana i strogo regulisana procesa, koja imaju za cilj održavanje hemostaze (Bhattacharjee i Bhattacharyya, 2014; Palta et al., 2014). Ravnoteža između ova dva procesa zavisi od više faktora, kao što su faktori koagulacije, krvne pločice i endotel. Celokupan proces koagulacije se može podeliti u dva dela, primarna i sekundarna hemostaza. Primarna hemostaza podrazumeva stvaranje primarnog krvnog ugruška na mestu povrede od strane krvnih pločica, a sekundarna koagulacionu kaskadu koja dovodi do nastanka fibrinske mreže, čija je funkcija ojačavanje primarnog ugruška.

2.2.1 Primarna hemostaza

Subendotelne komponente, kao što su kolagen, fibronektin, laminin i fon Vilebrandov faktor (VWF), bivaju izložene krvnim pločicama na mestu povrede (Sharathkumar i Shapiro, 2008). VWF učestvuje u početnoj adheziji krvnih pločica na mestu povrede, preko glikoproteinskog kompleksa Ib/IX/V. Daljim interakcijama pločice se zadržavaju na mestu povrede. Interakcija kolagena sa glikoproteinom IV indukuje aktivaciju IIb/IIIa i Ia/IIa integrina na površini pločica. Sa ovim integrinima, kolagen i VWF ostvaruju jake nekovalentne veze. Angažovanje dodatnih pločica se ostvaruje preko njihovih međusobnih interakcija, uz vezivanje fibrinogena za IIb/IIIa integrine. Nakon dolaska na mesto povrede, pločice se dalje aktiviraju delovanjem agonista kao što su ADP, trombin i tromboksan, Slika 6.



Slika 6. Aktivacija i međusobna interakcija pločica (modifikovano po Sharathkumar i Shapiro, 2008).

Tromboksan A₂ se sintetiše u pločicama od arahidonske kiseline preko ciklooksigenaznog puta. Kada se stvori, tromboksan difunduje kroz membranu i aktivira druge pločice. Kod pločica su receptori za tromboksan kuplovani sa G-proteinima (G_q i G₁₂ ili G₁₃). Svi oni zajedno aktiviraju fosfolipazu C. Ovaj enzim razlaže membranske fosfoinozotide (kao što je fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat), oslobađajući IP₃ i DAG. DAG aktivira protein kinazu C koja fosforiluje proteine. Oslobađanje IP₃ povećava koncentraciju Ca²⁺, koji se otpušta iz endoplazmatičnog retikuluma. ADP se oslobađa iz krvnih pločica i eritrocita. Krvne pločice ekspiriraju dva receptora za ADP, P₂Y₁ i P₂Y₁₂, koji se kupluju sa G_q i G_i. Aktivacija P₂Y₁₂ inhibira adenilat ciklazu i smanjuje količinu cAMP, dok aktivacija P₂Y₁ povećava unutarćelijsku koncentraciju kalcijuma. Trombin brzo nastaje na mestu povrede od protrombina i, pored uloge u stvaranju fibrina, je ujedno i najpotentniji aktivator pločica. Odgovor pločica na trombin ide preko G-protein-povezanih proteazno-aktiviranih receptora (PAR). Krvne pločice ekspiriraju PAR1 i PAR4. Aktivacija dovodi do agregacije pločica preko promene ligand vezujućih osobina glikoproteina IIb/IIIa, koji postaje sposoban da veže fibrinogen i VWF. Otpuštanje ADP i tromboksana A₂ indukuje aktiviranje drugih pločica i njihovo agregiranje (Sharathkumar i Shapiro, 2008). Kao posledica aktivacije,

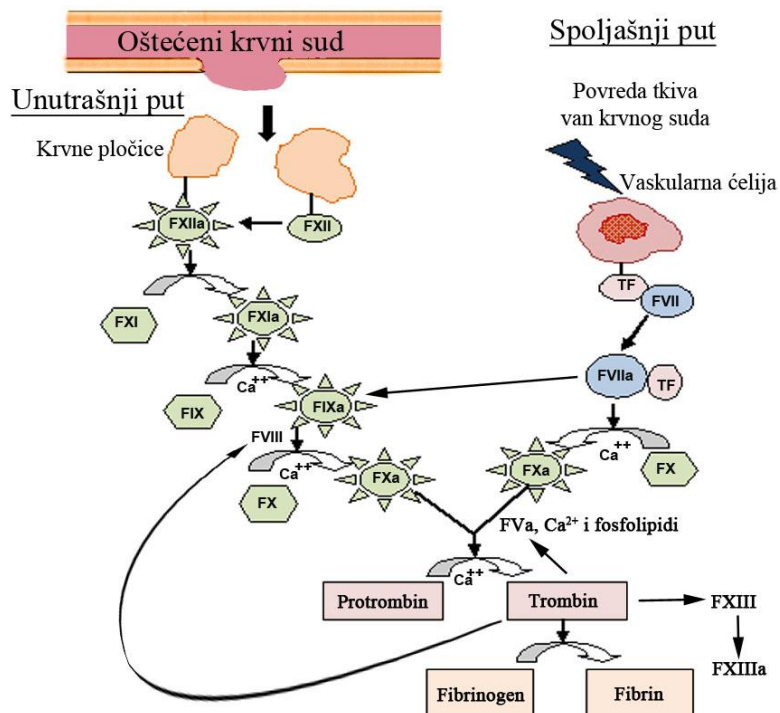
pločice menjaju oblik i otpuštaju sadržaj svojih gustih i α -granula, samim tim dalje doprinoseći procesu zarastanja povređenog mesta (Whiteheart, 2011; Gremmel et al., 2016).

2.2.2 Sekundarna hemostaza

Pod normalnim fiziološkim uslovima, tkivni faktor se ne eksprimira od strane ćelija koje su u direktnom kontaktu sa krvi. Prilikom povrede krvnog suda, tkivni faktor dospeva u krvotok, vezuje se za faktor VII i otpočinje koagulacionu kaskadu koja se sastoji iz dva puta, unutrašnjeg i spoljašnjeg (Slika 7), koji se dalje udružuju u zajednički put sa ciljem aktiviranja protrombina (faktora IIa) posredstvom faktora Xa.

Unutrašnji put otpočinje faktorom XII, koji se prvo vezuje za polifosfate krvnih pločica i vanćelijsku RNA na mestu povrede. Kompleks prekalikreina i kininogena velike molekulske mase, takođe, interaguje sa površinom pločica u blizini faktora XII, aktivirajući ga. Faktor XII se aktivira tako što se hidrolizuje na dva polipeptidna lanca, od 50 i 28 kDa. Lakši lanac ima aktivno mesto i naziva se faktor XIIa. Aktivirani faktor XIIa dalje može aktivirati prekalikrein dajući kalikrein. Kalikrein može, zauzvrat, aktivirati faktor XII, što dovodi do amplifikacije interakcija u procesu koagulacije. Dalji put ide aktivacijom faktora XI od strane faktora XIIa. Nastali faktor Xia aktivira faktor IX koji, zajedno sa faktorom VIII, stvara kompleks sa fosfolipidima i aktivira faktor X.

Spoljašnji put, sa druge strane, otpočinje vezivanjem i aktivacijom faktora VII. Aktivirani faktor VIIa, u prisustvu kalcijuma i fosfolipida, aktivira faktor X. Po aktiviranju faktora X, sledi zajednički put koji se ogleda u stvaranju protrombinaznog kompleksa koga čine, pored aktiviranog faktora Xa, faktor Va, kalcijum i fosfolipidi krvnih pločica. Ovaj kompleks prevodi protrombin u trombin, koji dalje pretvara fibrinogen u fibrin. Dva navedena puta koagulacije su međusobno povezana i imaju sposobnost samostalne amplifikacije. Faktor VIIa je u stanju da aktivira i faktor IX unutrašnjeg puta. Trombin može aktivirati faktore V i VIII, a takođe ubrzava aktivaciju protrombina od strane faktora Xa, kao i aktivaciju faktora X od strane faktora IXa. Trombin aktivira i faktor XIIIa, čija je uloga da kovalentno poveže fibrin u nastalim fibrinskim nitima (Bhattacharjee i Bhattacharyya, 2014; Palta et al., 2014).



Slika 7. Unutrašnji i spoljašnji put koagulacione kaskade (modifikovano po Bhattacharjee i Bhattacharyya, 2014).

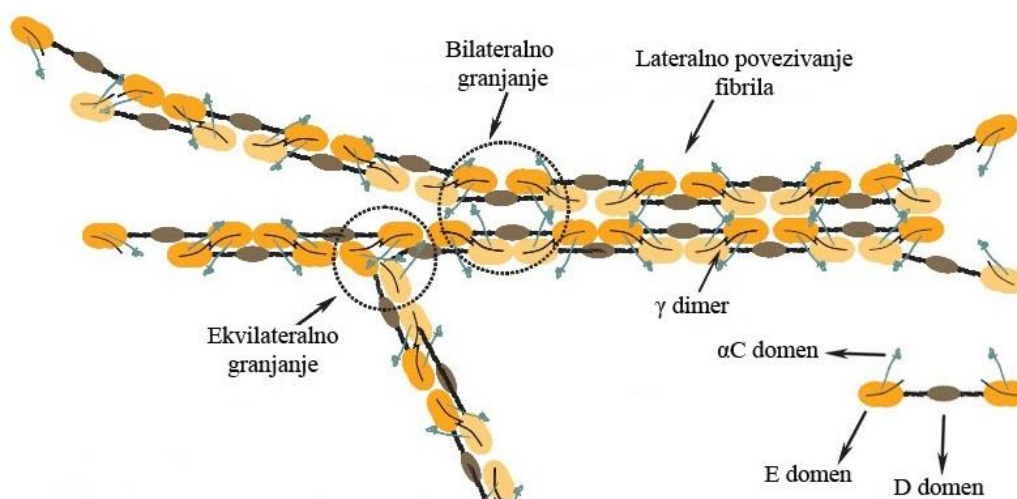
Za proces koagulacije je jako važan vitamin K. On je neophodan za aktivnost karboksilaze, koja karboksiluje ostatke Glu. Ova modifikacija je nužna za aktivaciju protrombina, faktora VII, IX i X. γ - karboksilacijom Glu se obezbeđuje da navedeni faktori vežu kalcijum, što je neophodno za njihovu dalju aktivnost (Dowd et al., 1995).

Hemofilija je poremećaj zgrušavanja krvi. U zavisnosti od faktora koagulacije koji nedostaje, razlikuju se tri tipa, tip A gde nedostaje faktor VIII, tip B gde nedostaje faktor IX i tip C gde nedostaje faktor XI (Butenas et al., 2007).

Svaki $A\alpha$ lanac sadrži fibrinopeptid A, čijom hidrolizom od strane trombina započinje proces udruživanja niti fibrina (Mosesson et al., 2005), Slika 8. Ovom hidrolizom se oslobađa mesto polimerizacije na središnjem, E čvoru. Jedan domen mesta polimerizacije se nalazi na N-terminalu α lanca i čini ga skevencija Gly-Pro-Arg-Val, dok se drugi domen nalazi na β lancu između aminokiselina 15 i 42. Svako mesto polimerizacije na jednoj fibrinskoj niti se povezuje sa komplementarnim vezujućim mestom u D čvoru susedne fibrinske niti, koje se nalazi na γ lancu između aminokiselina 337 i 379. Spajanje ova dva mesta obezbeđuje da se fibrini udružuju, tako da se preklapaju krajnji i središnji deo molekula. Na taj način nastaju dvolančane

uvijajuće niti - fibrili. Lateralno spajanje fibrila se, takođe, dešava i na taj način nastaju višelančani fibrili.

U rastućem fibrinskom ugrušku se sreću dva tipa granjanja. Prvi tip je bilateralni, koji nastaje udruživanjem dva dvolančana fibrila u četvorolančani. Drugi tip je ekvilateralni, koji nastaje spajanjem tri molekula fibrina u tri dvolančana fibrila. Drugi tip granjanja nastaje češće ukoliko se hidroliza fibrinopeptida odvija sporo, a rezultat je manje porozna fibrinska mreža. Odvajanje fibrinopeptida B je sporije od odvajanja fibrinopeptida A, a tim odvajanjem se oslobađa drugo mesto polimerizacije, koje započinje sekvencom Gly-His-Arg-Pro i interaguje sa komplementarnim mestom β lanca u D čvoru. Ta interakcija doprinosi lateralnoj asocijaciji fibrila. Takozvani α C region u fibrinogenu se nalazi nekovalentno vezan za centralni, E čvor. Prilikom hidrolize fibrinopeptida B, on se oslobađa i postaje slobodan da interaguje sa drugim α C domenom, doprinoseći lateralnom spajanju fibrila. Na γ lancu se nalaze dva samopovezujuća mesta. Jedno omogućava kovalentno povezivanje fibrina i faktora XIII i ima oznaku γ_{XL} , a drugo služi za pravilno pozicioniranje krajeva fibrinskih monomera (tipa kraj-kraj). C-terminali γ lanca sadrže mesto samoumrežavanja, a faktor XIII, katalizuje stvaranje γ dimera. Kovalentna veza nastaje između Lys⁴⁰⁶ jednog i Gln^{398/399} drugog γ lanca (Brown et al., 2000; Mosesson et al., 2005; Martinez et al., 2013; Weisel i Litvinov, 2013;).



Slika 7. Proces stvaranja fibrinske mreže (modifikovano po Mosesson et al., 2005).

Kalcijum koji se vezuje za fibrinogen ubrzava proces polimerizacije fibrinskih monomera i samim tim skraćuje vreme potrebno za formiranje fibrinske mreže (Brass et al., 1978).

2.3 Interakcija fibrinogena sa drugim proteinima

Da bi ostvario svoju fiziološku funkciju, fibrinogen interaguje sa mnogim proteinima, kao što su fibronektin, albumin, trombospondin, VWF, trombin, faktor XIII, plazmin(ogen), tPA, PAI-2 i α_2 -antiplazmin. Vezivanje fibrinogena za trombin i faktor XIII za posledicu ima stvaranje i stabilizaciju fibrina, dok vezivanje za plazmin(ogen), tPA, PAI-2 i α_2 -antiplazmin inicira i reguliše fibrinolizu. Vezivanje trombina za fibrinogen ima, zapravo, dvostruku ulogu. Prva je prevođenje fibrinogena u fibrin, a druga je „anti-trombinska“, i ogleda se u zarobljavanju trombina u formirajućem fibrinskom ugrušku (Cappelletti, 2012).

Kao što je već napomenuto, da bi fibrin nastao potrebno je vezivanje trombina za fibrinogen, nakon čega sledi hidroliza fibrinopeptida A i B. Sa druge strane, nastali fibrin može vezati trombin, inhibirajući njegovo dejstvo. Fibrin ima dva mesta za vezivanje trombina. Jedno, niskoafinitetno, se nalazi na E čvoru i ostatak je mesta vezivanja trombina za fibrinogen. Drugo, već pomenuto, visokoafinitetno mesto se nalazi na γ' lancu fibrinogena, između amonikiselina 414 i 427 (Mosesson, 2005).

Faktor XIII se u cirkulaciji nalazi kao A_2B_2 tetramer i vezan je preko svoje B subjedinice za γ' lanac fibrinogena. Ovaj tip fibrinogena, $\gamma A/\gamma'$, služi ne samo kao nosač faktora XIII, već i kao njegov regulator. $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen se kovalentno umrežava znatno sporije od „normalnog“, $\gamma A/\gamma A$ fibrinogena. Za regulaciju faktora XIII, pored tipa fibrinogena, od značaja može biti i prisustvo njegovih B subjedinica, jer u većoj koncentraciji one sprečavaju aktivaciju faktora XIII trombinom (Polgár et al., 1990), čime se odlaže početak kovalentnog umrežavanja fibrina (Siebenlist et al., 2001).

Pored proteina koji su uključeni u stvaranje fibrina, za fibrinogen i fibrin se vezuju i proteini uključeni u fibrinolizu, regulišući je. Fibrinogen i fibrin vezuju plazminogen (Bok i Mangel, 1985) i tPA, preko svojih αC regiona (Tsurupa i Medved, 2001). Aktivacija plazmina pomoću tPA se ubrzava u prisustvu fibrina, ali ne i u prisustvu fibrinogena (Hoylaerts et al., 1982). Ovaj nalaz sugerise da je za aktivaciju

plazminogena neophodno formiranje tercijarnog kompleksa između fibrina, plazminogena i tPA. Po aktivaciji, plazmin hidrolizuje fibrin, stvarajući dodatna mesta za vezivanje plazminogena, što ubrzava proces fibrinolize (Suenson et al., 1984). Za interakciju i aktivaciju su neophodna dva mesta na fibrinu, $A\alpha$ 148-160 i γ 312-324, a oba se otkrivaju tek nakon povezivanja fibrina. $A\alpha$ 148-160 mesto istim afinitetom može vezati plazminogen i tPA, ali *in vivo* prevashodno vezuje plazminogen, jer se on nalazi u većoj koncentraciji od tPA (Yakovlev et al., 2000). Sa druge strane, γ 312-324 mesto vezuje isključivo tPA (Yonekawa et al., 1992).

Faktor XIII, pored umrežavanja fibrina može kovalentno vezati i α_2 -antiplazmin za fibrin na $A\alpha$ 303 mestu, čime se povećava fibrinolitička rezistencija fibrina (Sakata i Aoki, 1982). Faktor XIII je u stanju da kovalentno poveže i inhibitor aktivatora plazminogena-2, koji inhibira aktivaciju plazminogena od strane tPA, takođe za $A\alpha$ lanac, dodatno povećavajući fibrinolitičku rezistenciju (Ritchie et al., 2000). Za αC region fibrin(ogena) se može vezati i lipoprotein (a), na isto mesto gde i plazminogen, posredstvom faktora XIII, inhibirajući fibrinolizu (Romanic et al., 1998).

Protein bogat histidinom je protein koji se specifično vezuje za fibrinogen i fibrin (Leung, 1986). *In vitro* je pokazano da on sprečava vezivanje plazminogena za fibrin(ogen) i otežava fibrinolizu (Lijnen et al., 1980). *In vivo* efekat ovog proteina se dovodi u pitanje, ali je ipak pokazano da su i velike i male njegove koncentracije u plazmi povezane sa trombofilijom (Mosesson, 2005).

Pored navedenih proteina, za fibrinogen se mogu vezati faktori rasta i citokini. Fibroblasni faktor rasta-2 (FGF-2) i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) se vezuju za fibrinogen, čime potenciraju proliferaciju endotelnih ćelija. Citokin interleukin-1 β , vezan za fibrin(ogen) ispoljava jače stimulatorno dejstvo na ćelije endotela (Mosesson, 2005). Posredno, preko interakcije sa IGF-vezujućim proteinima, fibrin(ogen) je povezan i sa IGF sistemom. Pokazano je da se IGFBP-3 može vezati za fibrin(ogen) u *in vitro* uslovima, uz zadržavanje sposobnosti vezavanja IGF-I. Pretpostavka je da ova interakcija pomaže dopremanju IGF-I do mesta povrede (Campbell et al., 1999). Otkrivena je i interakcija fibrinogena sa IGFBP-1 u fiziološkim uslovima (Gligorijević i Nedić, 2016). O potencijalnoj ulozi ovog kompleksa će u daljem tekstu biti više reči.

Iz svega navedenog se zaključuje da fibrin nije pasivna mreža koja samo obezbeđuje stabilnost krvnog ugruška, već je aktivna tvorevina, čije su stvaranje i

razlaganje strogo kontrolisani i složeni procesi, a za njihovo odigravanje je jako bitna interakcija sa brojnim drugim proteinima krvi.

2.4 Fibrinogen tokom procesa starenja

Proces starenja je povezan sa promenama na nivou koagulacije (Nobukata et al., 2000; Mari et al., 2008a; Favaloro et al., 2014; Franchini, 2014). Koncentracija fibrinogena se najčešće povećava (Tracy et al., 1992; Tofler et al., 2005). Nije razjašnjeno da li fibrinogen direktno utiče na trombozu, tako što predstavlja supstrat za rast tromba, ili je samo pokazatelj prisustva inflamatornog stanja, koje je redovni pratilac starenja, a dovodi do patologije (Tracy, 2002). Kakava god da je njegova uloga, fibrinogen u povećanoj koncentraciji se smatra faktorom rizika za trombozu (Wilhelmsen et al., 1984; Stone and Thorp, 1985; Kannel et al., 1987). Interesantno je da se stanje hiperkoagulacije javlja kod starih ljudi i u odsustvu konkretnih problema (Mari et al., 1995; 2008a; 2008b).

2.5 Hemostaza u cirozi jetre

Ciroza jetre je bolest koja nastaje kao posledica raznih faktora, kao što su virusna infekcija, konzumiranje veće količine alkohola, metabolički poremećaj, autoimunost, nasledne bolesti, ali etiologija bolesti može biti i nepoznata (Arakawa et al., 2004). Faktori rizika za cirozu su redovno konzumiranje alkohola, starost preko 50 godina i metabolički sindrom (Schuppan and Afdhal, 2008). Poznato je da ciroza može značajno uticati na koagulaciju. Koncentracije pro- i anti-koagulacionih faktora, koji nastaju u jetri, se mogu smanjiti usled redukovanog sintetskog kapaciteta jetre. Disbalans faktora koagulacije, portalna hipertenzija i lokalni vaskularni poremećaji mogu dovesti do povećanog krvarenja ili do razvoja tromboze (Lisman i Porte, 2010; Tripodi and Mannucci, 2011). Uobičajena klinička manifestacija kod ciroze jetre je krvarenje usled smanjene proizvodnje krvnih pločica i faktora koagulacije. Sa druge strane, izostanak kontrole nad trombolitičkim enzimima može dovesti do povećane sklonosti ka stvaranju tromba. Klinički su dijagnostikovane situacije hiperkoagulabilnog stanja na jednom mestu u organizmu, nastale usled lokalne endotelne disfunkcije koja dovodi do

tromboze, iako je na nivou celog organizma dijagnostikovana hipokoagulacija, odnosno dolazi do spontanog krvarenja (Northup et al., 2008). Oksidativni stres ima ulogu i u inicijaciji i u progresiji bolesti jetre (Li et al., 2015). Fibrinogen je daleko više podložan oksidaciji od ostalih glavnih proteina plazme, kao što su albumin, transferin i imunoglobulini (Shacter et al., 1994). Stepem karbonilovanja proteina se povećava kod ciroze jetre (Natarajan et al., 2006) i utiče na strukturu i funkciju fibrinogena (Martinez et al., 2013). Nedavno publikovani rezultati su ukazali da modifikacije fibrinogena koje nastaju usled ciroze jetre mogu imati ulogu u razvoju tromboze (Hugenholtz et al., 2016). Ciroza je, takođe, praćena promenom glikozilovanja proteina. Uobičajene zajedničke promene na nivou glikana kod bolesti jetre su povećano prisustvo Fuc, intenzivnije granjanje kompleksnih glikana i povećan udeo umetnutog GlcNAc (Blomme et al., 2009).

2.6 Fibrinogen u dijabetesu tipa 2

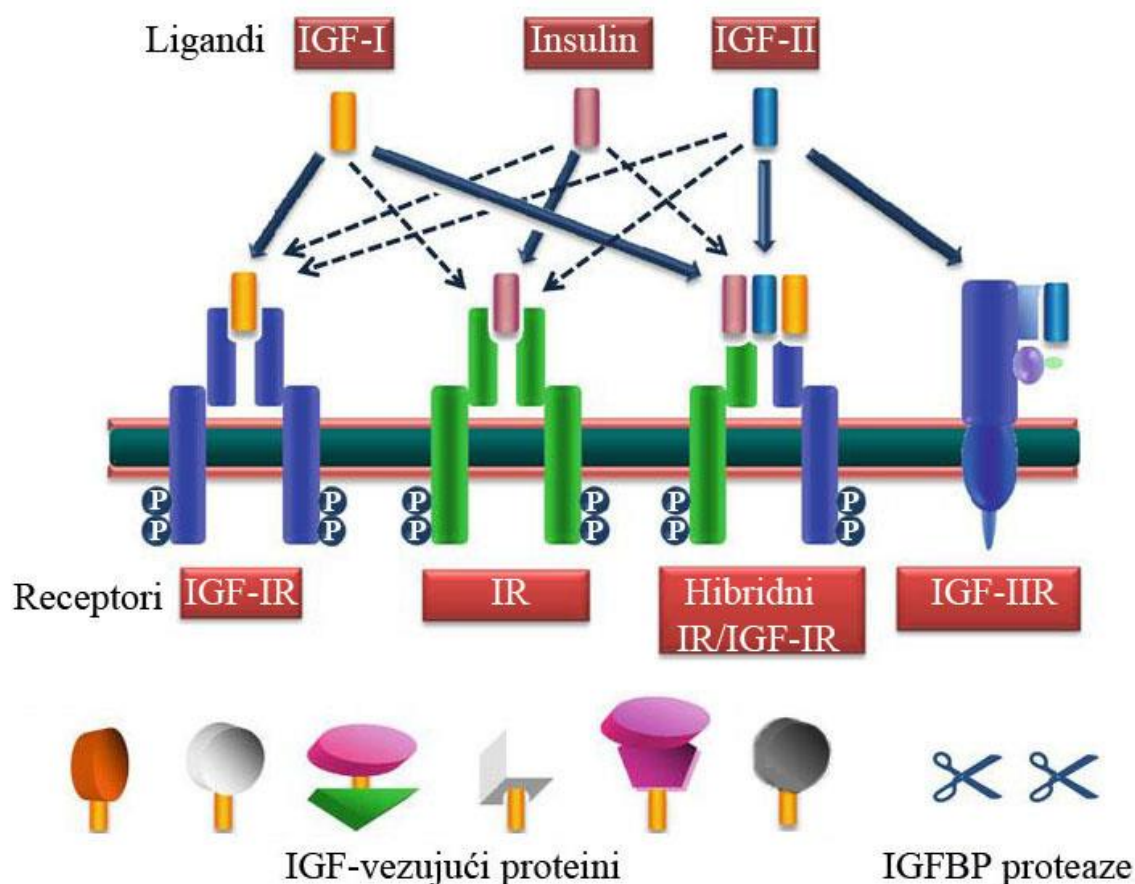
Fibrinogen je protein koji podleže neenzimskom glikozilovanju kod osoba sa nekontrolisanim dijabetesom (Pieters et al., 2007). Dalje, kako je već rečeno, jako je osetljiv na oksidaciju (Lee i Shacter, 1995; Becatti et al., 2014), koja mu menja strukturu i funkciju. Pored hiperglikemije, kod nekontrolisanog dijabetesa se javlja i oksidativni stres (Baynes i Thorpe, 1999), koji može promeniti strukturu fibrinogena i fibrinskog ugruška (Shacter et al., 1995; Dunn et al., 2005). Fibrinogen/fibrin je odgovoran (mada ne jedini) za hiperkoagulaciju kod osoba sa DM2, zbog stvaranja gušćeg fibrinskog ugruška, smanjenog vezivanja tkivnog aktivatora plazmina i plazminogena za fibrin, povećanog prisustva plazminskog inhibitora na fibrinu i smanjenog stvaranja plazmina na površini fibrina (Dunn et al., 2005; 2006).

2.7 IGF sistem

IGF sistem čini familija peptida i proteina koji su uključeni u metabolizam, rast i razvoj sisara, kao i u ćelijske procese proliferacije, preživljavanja, migracije i diferencijacije. Familija uključuje tri liganda: IGF-I, IGF-II i insulin, četiri tipa receptora: IGF-IR, manoza-6-fosfat/IGF-II receptor, insulinski receptor (IR) i hibridni

IR/IGF-IR, osam IGF-vezujućih proteina i njihove proteaze (Federici et al., 1997; Le Roith, 2003; Annunziata et al., 2011). Takođe, u širem smislu, obuhvata i proteine uključene u unutarćelijsku transdukciju signala nakon aktivacije IGF-IR, kao što su IRS familija i AKT. Na Slici 9 su prikazani glavni učesnici IGF sistema.

IGF-I ima funkciju hormona i tkivnog faktora rasta. Najveći udeo IGF-I peptida u cirkulaciji je poreklom iz jetre. Glavnu ulogu u regulaciji proizvodnje IGF-I u jetri ima hormon rasta, koji podstiče njegovu ekspresiju. Pored jetre, IGF-I proizvode i drugi organi gde ovaj peptid ima autokrino i parakrino dejstvo (Annunziata et al., 2011). Zreli IGF-I se sastoji iz jednog polipeptidnog lanca od 70 aminokiselina, molekule mase 7,5 kDa. Sadrži tri disulfidne veze. IGF-I ima visoki stepen homologije sa insulinom; imaju 48 % sličnosti u aminokiselinskoj sekvenciji, identične disulfidne veze i sličnu tercijarnu strukturu. Glavna strukturna razlika između ova dva proteina potiče od prisustva C-peptida kod IGF-I, koji se odseca kod proinsulina (Blundell et al., 1978; Klapper et al., 1983). Druga bitna razlika je postojanje specifičnih aminokiselina na pozicijama 3, 4, 15 i 16 kod IGF-I, koje nisu prisutne kod insulina i koje obezbeđuju vezivanje IGF-I za IGF-vezujuće proteine (IGFBP). Dok insulin cirkuliše u slobodnoj formi, najveći deo IGF-I je vezan za svoje vezujuće proteine, među kojima je IGFBP-3 najzastupljeniji. Oko 75 % IGF-I je vezano za njega (Baxter i Martin, 1989; Clemmons, 1997).



Slika 9. IGF sistem; pune strelice pokazuju vezivanja liganada za receptore sa visokim, a isprekidane strelice sa niskim afinitetom (modifikovano po Annunziata et al., 2011).

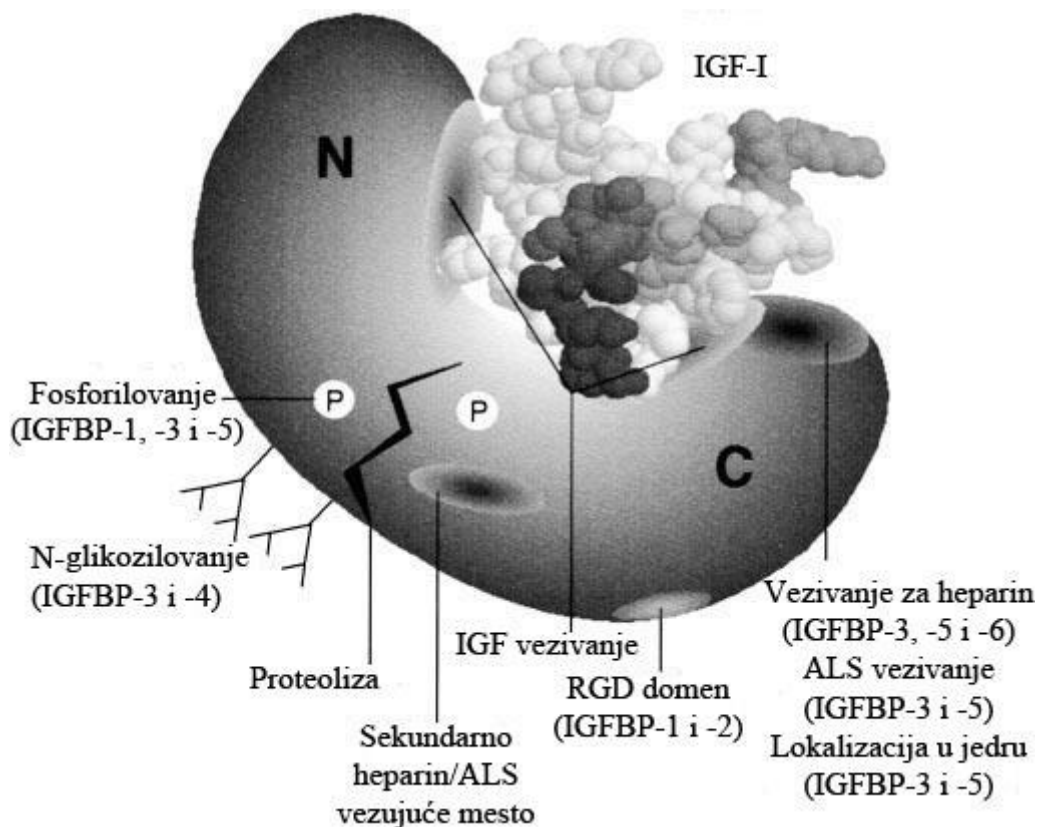
Svoje fiziološko dejstvo IGF-I ostvaruje pretežno vezivanjem za visoko afinitetni IGF-I receptor. Ovaj receptor može vezati i IGF-II, sa šest puta manjim afinitetom, i insulin, sa sto puta manjim afinitetom (Le Roith, 2003). Prisustvo IGF-IR kod ljudi je nađeno u skoro svim tkivima i tipovima ćelija (Le Roith et al., 2001). IGF-IR pripada familiji tirozin kinaza čija je nativna strukturalna karakteristika postojanje u formi tetramera sa dve α i dve β subjedinice, kovalentno vezane disulfidnim vezama, dok većina receptora tirozin kinaza dimerizuje ili oligomerizuje tek nakon vezivanja liganda (Heldin i Ostman, 1996). IGF-IR gen kodira prekursor od 1367 aminokiselina. Daljom obradom ovog prekursora, glikozilovanjem i proteolizom, nastaje zreli $\alpha_2\beta_2$ receptor. Dve vanćelijske α subjedinice sadrže IGF vezujuća mesta, dok β subjedinice, koje imaju transmembranski i unutarćelijski deo, poseduju i tirozin kinazni domen (Steele-Perkins et al., 1988). Nakon vezivanja IGF-I za receptor, unutarćelijski tirozin kinazni domen

autofosforiluje specifične Tyr ostatke, koji su mesta vezivanja za signalne proteine, kao što je IRS familija proteina. Ovi proteini dalje aktiviraju druge proteine, što dovodi do šire aktivacije različitih signalnih kaskada, uključujući PI3K-AKT-TOR i RAF-MAPK, u cilju stimulisanja ćelijske proliferacije i preživljavanja (Sasaki et al., 1985; Le Roith, 2003).

Kako je već napomenuto, IGF-I ima anti-apoptotsko dejstvo na ćelije. Na primer, kod odraslih, IGF-I ima ključnu ulogu u regeneraciji skeletnih mišića (Clemmons, 2009). Takođe, bitan je za preživljavanje neuronskih ćelija (Torres-Aleman, 2010). IGF peptidi imaju protektivno dejstvo i u srcu. Male koncentracije IGF-I u krvi su povezane sa povećanim rizikom za nastanak koronarnih arterijskih bolesti i srčanog udara (Colao, 2008). Sa druge strane, povećane koncentracije IGF-I dovode do povećanog rizika za nastanak tumora. Rast ćelija tumora koje eksprimiraju IGF-IR se može pospešiti prisustvom IGF-I iz cirkulacije (endokrino), autokrino ili parakrino, lokalno sintetisanim IGF-I (Annunziata et al., 2011). IGF-II ima značajniju ulogu od IGF-I u neonatalnom periodu rasta organizma, dok se još uvek ne zna njegova osnovna funkcija u odraslom dobu.

2.7.1 IGF-vezujući proteini (IGFBP)

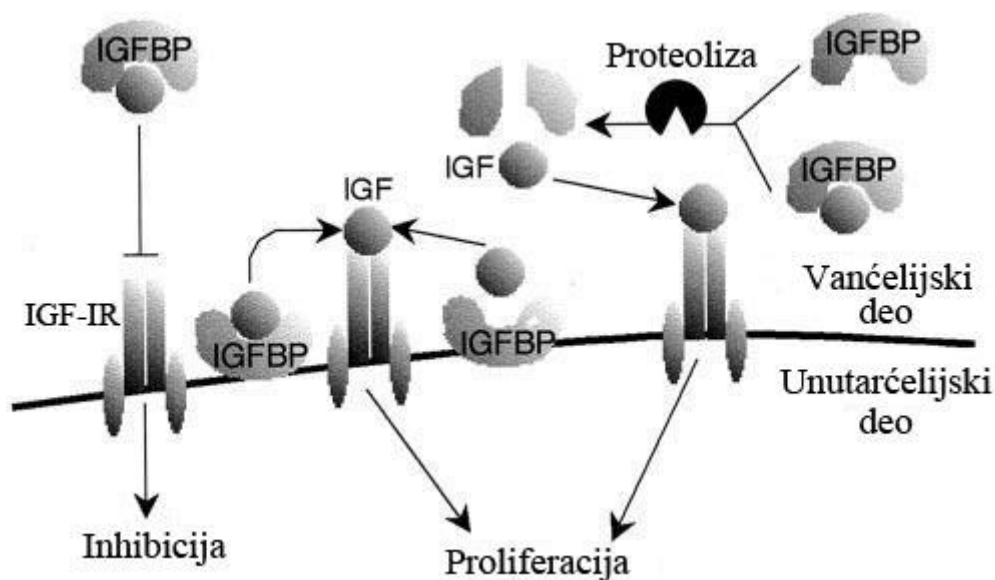
Familija IGF-vezujućih proteina se sastoji iz osam proteina. Šest proteina (IGFBP-1 do -6) ima visoki afinitet za IGF peptide, dok ostali koji se ubrajaju u ovu grupu imaju mali afinitet (Kim et al., 1997). U fokusu će dalje biti proteini sa visokim afinitetom za IGF. Svih šest proteina su vanćelijski i ispoljavaju veliki stepen homologije u strukturi, koja se sastoji iz tri domena sličnih veličina, N-, C- i centralnog. IGFBP molekuli sadrže subdomene, koji su odgovorni za različite uloge. Zreli IGFBP proteini imaju između 216 i 289 aminokiselina, što peptidnom delu daje masu između 22,8 i 31,3 kDa. Opšta struktura IGFBP je prikazana na Slici 10.



Slika 10. Šematski prikaz strukture i mesta interakcije IGFBP (modifikovano po Firth i Baxter, 2002).

Dok su N- i C-domeni konzervisani između različitih IGFBP, centralni region nije i on doprinosi raličitosti IGFBP, što je i pokazano na Slici 9 (Duan i Xu, 2005). Tu su mesta N-glikozilovanja, proteolize i fosforilovanja (Firth i Baxter, 2002). Ranije se smatralo da su IGFBP samo pasivni transporteri IGF peptida, ali danas se zna da oni imaju i svoje specifične uloge u cirkulaciji, vanćelijskom i unutarćelijskom prostoru. Glavnu ulogu u transportu IGF ima IGFBP-3. On je najzastupljeniji IGFBP u cirkulaciji i to u formi terciarnog kompleksa koga čine još IGF i ALS. Svih šest IGFBP se nalazi u cirkulaciji u slobodnoj i u vezanoj formi sa IGF peptidima. U slobodnoj i binarnoj formi sa IGF peptidom, IGFBP mogu brzo napustiti cirkulaciju, dok su terciarni kompleksi (zbog svoje veličine) zadržani u krvnim sudovima (Young et al., 1992; Firth i Baxter, 2002). IGFBP iz krvi stižu do različitih tkiva, što zavisi od njihove primarne strukture i posttranslacionih modifikacija, a i sintetišu se lokalno, ispoljavajući parakrino i autokrino dejstvo. Osim transporta IGF i posredno, utiča na aktivaciju IGF-IR, IGFBP

direktno regulišu i mobilnost, adheziju, apoptozu i preživljavanje ćelija (Rajah et al., 1997; Perks et al., 1999). Njihovi ćelijski efekti zavise od posttranslacionih modifikacija: glikozilovanje utiče na ćelijske interakcije (Firth i Baxter, 1999), fosforilovanje na afinitet za IGF (Jones et al., 1991), a proteoliza na IGF zavisne i IGF nezavisne puteve (Durham et al., 1994; Salahifar et al., 2000). Kada se govori o IGF zavisnom načinu delovanja, treba reći da IGFBP mogu imati IGF stimulatorno ili inhibitorno dejstvo, u zavisnosti od tkiva i vezujućeg proteina. Još uvek nije u potpunosti definisan mehanizam koji objašnjava ova dva suprotstavljena načina delovanja. Na Slici 11 su šematski prikazani IGF zavisni putevi delovanja IGFBP.



Slika 11. Šematski prikaz IGF zavisnih puteva delovanja IGFBP na ćelije (modifikovano po Firth i Baxter, 2002).

Vezivanje IGF peptida za IGFBP onemogućava njihovo vezivanje za IGF-IR. Proteoliza IGFBP smanjuje afinitet prema IGF, što dovodi do njihovog otpuštanja, omogućavajući slobodnim IGF peptidima da ispolje svoje dejstvo vezujući se za receptore. Ukoliko se i sami IGFBP vežu za ćelije ili vanćelijski matriks, posledice mogu biti izražene kao stimulatorna ili inhibitorna IGF dejstva (Clemmons, 2016). Stimulatorno IGF dejstvo se ispoljava usled smanjenja afiniteta IGFBP za IGF zbog interakcije IGFBP sa drugim tkivnim komponentama. Takođe, i samim vezivanjem

IGFBP za određeno tkivo, lokalno se povećava koncentracija IGF peptida i slobodna forma oslobađa daljom proteolizom (Duan i Xu, 2005).

Pored IGF zavisnog načina delovanja, IGFBP mogu ispoljiti fiziološku aktivnost i IGF nezavisnim putem, bilo u odsustvu IGF peptida ili u njihovom prisustvu, ali bez aktiviranja IGF-IR. Ove efekte mogu ispoljiti celi proteini ili njihovi fragmenti. Pretpostavka je da domeni koji nisu uključeni u IGF vezivanje igraju ulogu u drugom slučaju. Zna se da IGFBP-1, -2, -3 i -5 ispoljavaju IGF nezavisna dejstva, dok je uloga IGFBP-4 i -6 vezana isključivo za IGF (Firth i Baxter, 2002). O IGFBP-1 proteinu će biti reči u posebnom delu (poglavlje 2.4.3). On svoj IGF nezavisni efekat ostvaruje preko RGD (Arg-Gly-Asp) sekvencije, koja mu omogućava vezivanje za $\alpha_5\beta_1$ integrin (Shimasaki i Ling, 1991). U zavisnosti od ćelija sa kojima interaguje, IGFBP-2 može imati IGF nezavisno stimulatorno ili inhibitorno dejstvo (Hoeflich et al., 2001). Kako i sam poseduje RGD sekvenciju, svoje dejstvo ostvaruje pretežno kao i IGFBP-1 (Frommer et al., 2006). IGFBP-3 ima pro-apoptotsko dejstvo na ćelije u odsustvu IGF (Kim et al., 1997; Butt i Williams, 2001). Mnogi faktori koji inhibiraju rast, kao što su p53, retinoična kiselina i TNF- α , indukuju ekspresiju IGFBP-3 (Butt i Williams, 2001). Isti efekat ima i mutirana forma IGFBP-3, koja ne može vezati IGF (Hong et al., 2002). Jedan od mehanizama kojim IGFBP-3 samostalno ostvaruje pro-apoptotsko dejstvo obuhvata interakciju sa receptorom RXR α u jedru (Liu et al., 2000). IGFBP-5 ispoljava samostalno mitogeno dejstvo na humane ćelije osteoblasta nakon vezivanja za membranski protein mase 420 kDa (Andress, 1995), čiji identitet je i dalje nepoznat (Duan i Xu, 2005). Takođe, ovaj protein ima i migratorno dejstvo na glatkomišićne ćelije (Hsieh et al., 2003). U ovim ćelijama se IGFBP-5 može naći u jedru, gde ima transaktivatorsku aktivnost (Xu et al., 2004).

Spektar mogućih uloga IGFBP se proširuje njihovim interakcijama sa drugim proteinima. Već je napomenuo da IGFBP-3 i -5 u cirkulaciji grade tercijarne komplekse sa IGF i ALS, što obezbeđuje „skladište“ IGF u krvi (Annunziata et al., 2011). Ova dva proteina mogu interagovati sa heparinom i vitronektinom, molekulima vanćelijskog matriksa (Beattie et al., 2005). IGFBP-3 interaguje sa transferinom (Weinzimer et al., 2001; Miljuš et al., 2012), IGFBP-2 sa α_2 -makroglobulinom (Šunderić et al., 2013), a IGFBP-1 sa α_2 -makroglobulinom (Westwood et al., 2001) i fibrinogenom (Gligorijević i Nedić, 2016).

2.7.2 IGF sistem u zarastanju rana i koagulaciji

IGF-I stimuliše migraciju i formiranje krvnog suda od strane vaskularnih endotelnih ćelija, a stimuliše i angiogenezu aorte kod pacova (Delafontaine, 1995). Nekoliko studija je pokazalo da IGF-I može sam (Suh et al., 1992) ili u sadejstvu sa nekim od svojih IGFBP da podstiče zarastanje rana (Tsuboi et al., 1995). Iako sistemsko dopremanje IGF-I do mesta povrede ima pozitivno dejstvo na zarastanje rana, treba imati na umu i negativne sporedne efekte, kao što su hipoglikemija, edem i disbalans elektrolita. Eksperimentalno se istražuju efekti lokalno dodatog egzogenog IGF-I. Njegov dodatak na mestu povrede povećava reepitelizaciju, angiogenezu i stvaranje kolagena (Edmondson et al., 2003). Kod veštački izazvanih opekotina na miševima, pokazano je da dodatak egzogenog IGF-I pospešuje zarastanje, stimuliše proizvodnju proteina i povećava elastičnost zarastajućeg tkiva (Koshizuka et al., 1997). Smatra se da je uloga IGF-I u otežanom procesu zarastanja rana kod dijabetičara jako bitna. Kod dijabetičnih miševa je pokazano da je signalni put IGF-I preko IGF-IR vrlo važan i da poremećaj na tom putu doprinosi otežanoj angiogenezi (Aghdam et al., 2012). *In vitro* studije su pokazale da IGF-I, takođe, podstiče proliferaciju i migraciju keratinocita i fibroblasta (Telasky et al., 1998; Haase., 2003). Zanimljivo je da epidermalne T ćelije proizvode IGF-I prilikom povrede i na taj način pospešuju proces zarastanja, a te iste ćelije izolovane sa mesta hronične povrede nisu u stanju da proizvode IGF-I *in vitro* (Toulon et al., 2009). Ovaj nalaz upućuje na pretpostavku da je neophodno sinergističko dejstvo IGF-I sa drugim faktorima, da bi se ispoljila funkcija zarastanja.

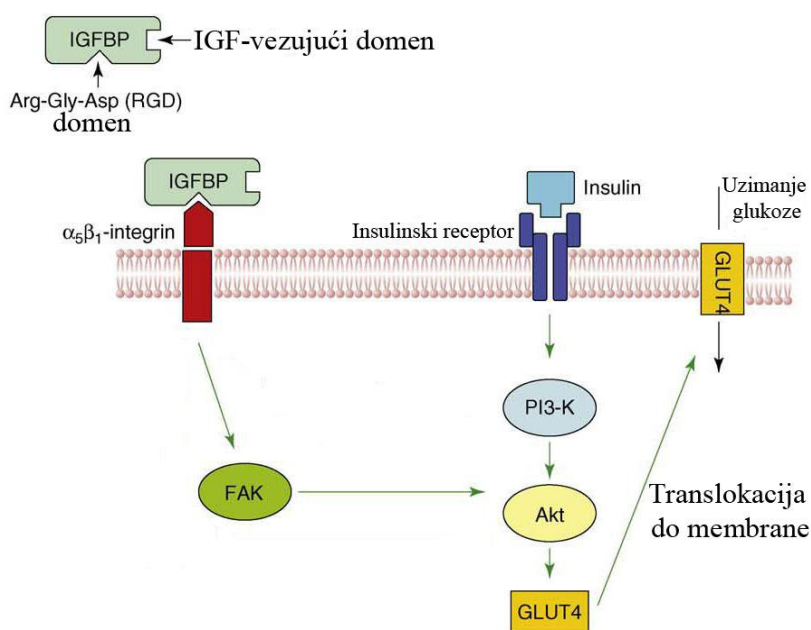
IGF-I je u stanju da kompenzuje manjak estrogena, koji se javlja kod starijih žena u menopauzi i koji doprinosi otežanom zarastanju rana na koži. Pokazano je da kod miševa bez receptora za estrogen, IGF-I nije u stanju da podstakne proces zarastanja, što govori o uzajamnoj vezi IGF-IR i ER α receptora (Emmerson et al., 2012). Dalje, IGF-I i IGFBP-3 zajedno deluju u procesu zarastanja povreda rožnjače (Izumi et al., 2006). IGF-I može preko IGF-IR da pojača odgovor krvnih pločica na prisustvo njegovih agonista, a da pri tome sam nije u stanju da izazove aktivaciju (Hers, 2007). Takođe, na krvnim pločicama postoji specifični receptor za IGFBP-3. Smatra se da je ovaj receptor odgovoran za preuzimanje IGFBP-3 od strane megakariocita, koji se dalje prenosi do α granula u procesu nastajanja krvnih pločica (Taylor i Spencer, 2001).

2.7.3 IGFBP-1

Prva biohemijska karakterizacija IGFBP-1 je urađena 1980. godine. Humani IGFBP-1 se sastoji od 234 aminokiseline i ima molekulsku masu od 25-30 kDa, u zavisnosti od stepena fosforilovanja. Kao i kod ostalih IGFBP, i kod ovog se uočavaju tri domena u njegovoj strukturi, N- i C-domeni bogati Cys i središnji, povezujući domen. N-domen se sastoji od 79 aminokiselina i odgovoran je za vezivanje IGF-I. Središnji domen, koji sadrži aminokiseline od 80. do 145., je karakterističan po tome što se u njemu nalazi PEST sekvencija (Pro-Glu-Ser-Thr), tipična za proteine koji imaju kratko vreme poluživota (Lee et al., 1997). Pored pomenute PEST sekvencije, ovaj region sadrži i mesta fosforilovanja IGFBP-1. Fosforilovanje povećava afinitet IGFBP-1 za IGF-I i smanjuje njegovu biodostupnost. Mesta fosforilovanja IGFBP-1 su Ser⁹⁵, Ser⁹⁸, Ser¹⁰¹, Ser¹¹⁹ i Ser¹⁶⁹. U krvi, dominantna forma IGFBP-1 je visoko fosforilovana, dok se u amnionskoj tečnosti nalaze dominantno manje fosforilovane forme (Gupta, 2015). C-terminalni region, od 146. do 124. aminokiseline, takođe učestvuje u vezivanju IGF-I. U ovom regionu se nalazi RGD domen, između 221. i 223. aminokiseline (Hoeflich and Russo, 2015). RGD domen, kao što je već rečeno, omogućava IGFBP-1 proteinu vezivanje za $\alpha_5\beta_1$ integrin. Potvrđene su brojne fiziološke posledice ove interakcije, kao što su migracija ćelija (Gleeson et al., 2001), stimulacija lučenja hormona (Haywood et al., 2017), unutarćelijski transport glukoze (Wheatcroft i Kearney, 2009) i zarastanje rana (Galiano et al., 1996). Glavna mesta sinteze IGFBP-1 su jetra i endometrijum tokom trudnoće. Ekspresija IGFBP-1 je detektovana i u humanim osteoblastima, a pretpostavka je da ovaj protein posredno reguliše formiranje kostiju preko vezivanja i transporta IGF-I (Conover et al., 1996).

Brojne studije su pokazale da osobe sa patologijama insulinske rezistencije, kao što su gojaznost, dijabetes i metabolički sindrom, imaju smanjenu koncentraciju IGFBP-1. Negativna korelacija koncentracije IGFBP-1 i insulina je nađena kod zdravih mladih i starih osoba, kao i kod osoba u početnoj fazi DM2 (Heald et al, 2001; Maddux et al., 2006; Rajpathak et al., 2008). Odnos koncentracije IGFBP-1 i insulina se može objasniti inhibitornim efektom hiperinsulinemije na sintezu IGFBP-1 od strane hepatocita. Hepatična transkripcija IGFBP-1 gena je osetljiva na insulin, ukoliko nema poremećaja insulinske osetljivosti. Ovo, međutim, nije slučaj kod smanjene insulinske

osetljivosti, kada koncentracije insulina i IGFBP-1 mogu zajedno da rastu, što se događa tokom razvoja DM2. Situacija, međutim, nije tako jednostavna jer, bez obzira na antagonističku promenu koncentracija IGFBP-1 i insulina, neki eksperimentalni rezultati potvrđuju da IGFBP-1 podstiče unutarćelijski transpot glukoze koji je uslovljen aktivnošću insulina. Još uvek nema dokaza da li i kako IGFBP-1 utiče na insulinsku osetljivost (Wheatcroft i Kearney, 2009), Slika 12.



Slika 12. Šematski prikaz IGF nezavisnog delovanja IGFBP-1 (modifikovano po Wheatcroft i Kearney, 2009).

Pokazano je da IGFBP-1, po vezivanju za $\alpha_5\beta_1$ integrin, ne samo da pospešuje preuzimanje glukoze od strane skeletnih mišića u prisustvu insulina, već je u stanju i da stimuliše proizvodnju insulina od strane β -ćelija pankreasa (Haywood et al., 2017). Vezivanjem IGFBP-1 za integrin aktivira se FAK kinaza, čiji metabolički put se ukršta sa insulinskim signalnim putem, što za posledicu ima translokaciju GLUT 4 proteina na površinu ćelija. Očigledno je da se o sprezi IGFBP-1/insulin i dalje nedovoljno zna i da se od novih istraživanja očekuje tumačenje njihove uzajamne povezanosti.

Koncentracija IGFBP-1 je u negativnoj korelaciji sa pojavom ateroskleroze, što znači da IGFBP-1 ima protektivno dejstvo kod kardiovaskularnih bolesti (Ezzat et al.,

2008). Kardiovaskularni fenotip kod miševa koji prekomerno eksprimiraju IGFBP-1 je pokazao da oni imaju niži krvni pritisak i povećanu proizvodnju azot-monoksida (NO) (Wheatcroft et al., 2003). Tačni mehanizam dejstva IGFBP-1 se na zna. Moguće je da IGFBP-1 doprema IGF do endotelnih ćelija (Bar et al., 1990) ili da, opet, svoju funkciju obavlja preko RGD sekvencije i interakcije sa $\alpha_5\beta_1$ integrinom. Hiperprodukcija IGFBP-1 sprečava nastanak hipertenzije i endotelne disfunkcije kod gojaznih miševa (Wheatcroft i Kearney, 2009). Treba imati na umu da dejstvo IGFBP-1 može biti i negativno, jer vaskularne ćelije glatke muskulature sadrže $\alpha_5\beta_1$ integrin, a njegova je ekspresija povećana kod ateroskleroze (Al-Fakhri et al., 2003; Mehta et al., 2012). Jedno od objašnjenja bi moglo biti da inhibicija IGF-I od strane IGFBP-1 ima veći uticaj na migraciju ovih ćelija nego sam IGFBP-1.

Iz svega navedenog proizilazi da se o ulozi, načinu dejstva i mehanizmima kontrole IGFBP-1 nedovoljno zna i na ovom polju se očekuju dalji eksperimenti i tumačenja. Mogući efekat IGFBP-1 na proces hemostaze i njegova interakcija sa fibrinogenom će biti razmatrani u okviru ove doktorske disertacije.

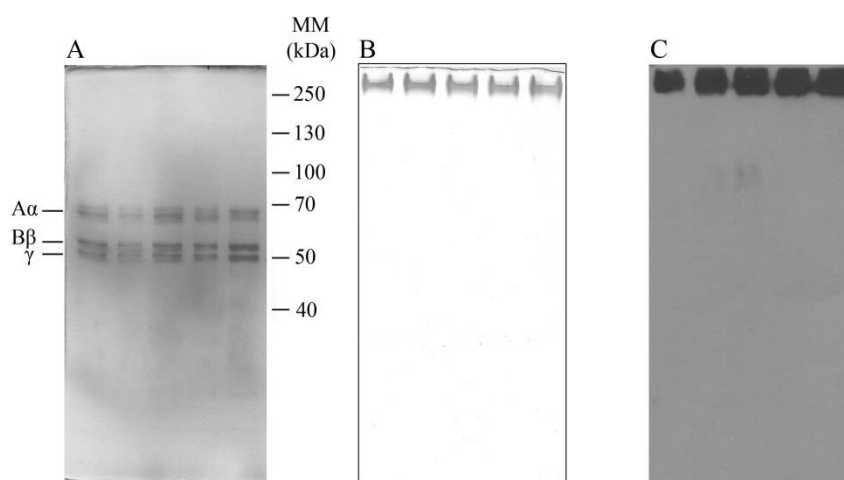
Ciljevi ove disertacije su bili:

- Izolovati što čistiji fibrinogen za dalje analize,
- Dobiti fibrinski monomer za imunoblot analize,
- Ispitati da li fibrinogen iz plazme interaguje sa nekim proteinom iz IGF familije vezujućih proteina i kako se ova interakcija menja pri starenju i patologijama ciroze i dijabetes melitusa tipa 2,
- Ispitati strukturne promene fibrinogena kao i njegove promene na nivou posttranslacionih modifikacija glikozilovanja i oksidacije usled starenja i patologija ciroze i dijabetes melitusa tipa 2,
- Ispitati da li i koliko su glukoza i metilglioksal uključeni u promene afiniteta fibrinogena i fibrina prema IGFBP-1.

3. Naši radovi

3.1 Izolovanje fibrinogena

Za izolovanje fibrinogena se koristila publikovana metoda (Cohn et al., 1946), prema kojoj se taloži fibrinogena etanolom pri pH vrednosti od $7,2 \pm 0,2$. Finalna koncentracija etanola u plazmi, kojom se taloži fibrinogen na ovaj način, iznosi 8 %. Za podešavanje pH vrednosti prilikom taloženja se dodaje acetatni pufer, pH 4 u finalnoj koncentraciji od 8 mM. Nakon elektroforetske analize dobijenog preparata jednim taloženjem, ustanovljeno je da su u preparatu prisutne, pored fibrinogena, i primese drugih proteina, pre svega albumina. Stoga je nakon prvog taloženja, dobijeni fibrinogen rastvoren i ponovo taložen na isti način. Nakon drugog taloženja dobio se visoko prečišćen fibrinogen, Slika 13. Pored toga što fibrinogen u redukujućoj SDS elektroforezi daje tri karakteristične trake, koje potiču od tri lanca (Slika 13A), njegovo prisustvo je potvrđeno i imunoblotom nakon native elektroforeze, Slika 13B i C.



Slika 13. Provera čistoće izolovanog fibrinogena taloženjem etanolom u pet reprezentativnih uzoraka. Gel bojen CBB-om nakon redukujuće SDS elektroforeze (A), gel bojen CBB-om nakon native elektroforeze (B) i imunoblot analiza izolovanog fibrinogena korišćenjem anti-fibrinogenog antitela nakon native elektroforeze (C).

Treba napomenuti da se fibrinogen na ovaj način skoro kvantitativno taložio iz plazmi dobijenih iz zdravih osoba različitih godišta. Takođe, pol donora plazmi nije

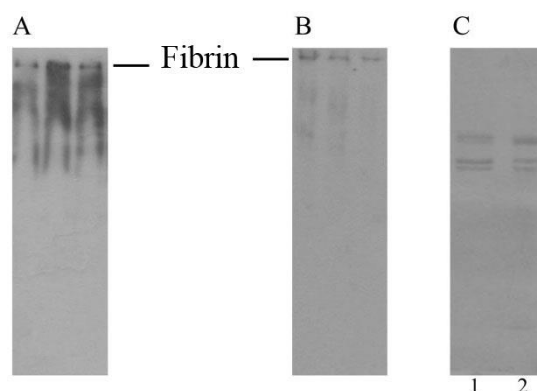
uticao na efikasnost izolovanja. Prisustvo patologije, sa druge strane, može biti od uticaja. Povećana koncentracija glukoze kod osoba sa DM2, kao i ciroza jetre, utiču na biohemijski status plazme, što za posledicu ima otežano taloženje fibrinogena. Kod osoba sa ovim bolestima prinosi fibrinogena su, u proseku, bili manji. Fibrinogen izolovan dvostrukim taloženjem etanolom je zadržao svoju funkciju i prilikom dodavanja trombina stvarao fibrin, što se moglo lako uočiti kao geliranje reakcione smeše.

3.2 Dobijanje fibrina

Primenjena su dva pristupa za dobijanje fibrina. Prva metoda, koja se koristila u analizi fibrina izolovanog iz plazmi pacijenata sa DM2, se zasnivala na uklanjanju antikoagulansa iz plazme (čije je prisustvo neophodno za uzorkovanje) dijalizom u fiziološkom rastvoru, kome je dodat kalcijum u fiziološkoj koncentraciji. Ova metodom se pokušalo bez trombina doći do fibrinskog monomera. Na ovaj način se fibrin stvarao direktno iz plazme u crevu za dijalizu, a usled aktivnosti faktora XIII postajao je nerastvoran i u prisustvu reagenasa kao što su urea, hlorovodonična kiselina, natrijum karbonat (Lorand, 2005) i sirćetna kiselina (Iino et al, 1995). Dobijeni fibrin je korišćen za detekciju i relativnu kvantitaciju kompleksa formiranih između fibrinogena i IGFBP-1 metodom native elektroforeze praćene imunoblotom, kod zdravih osoba i pacijenata sa DM2. Pre elektroforeze, fibrin je razložen, ali ne enzimskom, već fizičkohemijskom metodom. Upotreba plazmina u cilju degradacije fibrina se nije primenila, jer je pored fibrina i sam IGFBP-1 njegov supstrat (Mañes et al., 1997). Centrifugiranjem preparata, koji je prethodno podvrgnut razlaganju u teflonskom homogenizatoru, dobijen je uzorak koji je, nakon native elektroforeze, dao proteinsku traku koja je bila imunoreaktivna sa anti-fibrinogenim antitelom. Kako fibrinogen i fibrin imaju sličnu molekulska masu (Kolev et al., 2003), detektovana traka mogla je poticati od monomera fibrina i/ili njegovih kompleksa, Slika 14A. Analizom ovako dobijenog fibrina redukujućom elektroforezom i bojenjem sa CBB je dobijeno puno traka, koje potiču od njegovih fragmenata (rezultat nije prikazan).

Drugi pristup u dobijanju fibrina se sastojao u indukovanju stvaranja fibrinskog gela iz izolovanog fibrinogena dodatkom humanog trombina. Puffer u kome se odvijala

reakcija je sadržao jodoacetamid, inhibitor faktora XIII (Iino et al., 1995). Pošto je faktor XIII ostao inhibiran u smeši, nastali fibrin se, nakon intenzivnog ispiranja, mogao rastvoriti srićetnom kiselinom. Fibrin, formiran i rastvoren na opisani način, dao je jasnije definisane proteinske trake nakon native elektroforeze, uz odsustvo velikog broja fragmenata, što je bio slučaj u prethodnom postupku stvaranja fibrina, Slika 14B. Enzimaska metoda formiranja fibrina je korišćena za analizu uticaja starenja na proces nastajanja fibrina, njegove karakteristike i reaktivnost prema IGFBP-1. Redukujućom SDS PAGE i bojenjem proteina sa CBB, Slika 14C, potvrđeno je da se α , β i γ lanci fibrinogena poklapaju sa lancima fibrina.

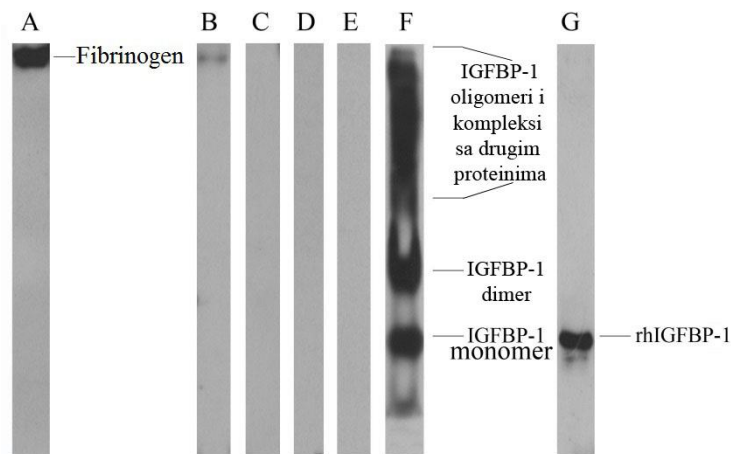


Slika 14. Analiza fibrina dobijenog dijalizom plazme (A) ili dejstvom trombina (B) iz tri reprezentativna uzorka, metodom native elektroforeze i imunoblota sa anti-fibrinogenkim antitelom; analiza fibrina (C1) i fibrinogena (C2) redukujućom SDS-PAGE i bojenjem sa CBB-om (C).

3.3 Interakcija fibrinogena sa IGFBP-1

Pošto je pokazano da fibrinogen može da interaguje sa IGFBP-3 u *in vitro* uslovima (Campbell et al., 1999), jedan od zadataka ove disertacije je bio da utvrdi da li se taj tip interakcije događa *in vivo* i koji IGFBP stupaju u tu interakciju. Primenom native elektroforeze i imunoblota sa anti-IGFBP-1, -2, -3 i -4 antitelima je detektovano eventualno postojanje kompleksa fibrinogen/IGFBP. Rezultati su pokazali da je preparat fibrinogena izolovan iz plazme bio imunoreaktivan jedino sa anti-IGFBP-1 antitelom (Slika 15), što upućuje na zaključak da ova dva proteina asosuju pod fiziološkim

uslovima (Gligorijević i Nedić, 2016). Dalji zaključak koji se nametao je da primenjena metoda taloženja fibrinogena izoluje istovremeno i njegove komplekse sa IGFBP-1.



Slika 15. Detekcija fibrinogen/IGFBP kompleksa u preparatu izolovanog fibrinogena iz plazme imunoblotom nakon native elektroforeze sa anti-fibrinogenkim (A), anti-IGFBP-1 (B), anti-IGFBP-2 (C), anti-IGFBP-3 (D) i anti-IGFBP-4 antitelom (E). Imunoblot uzorka plazme (F) i rhIGFBP-1 (G) sa anti-IGFBP-1 antitelom.

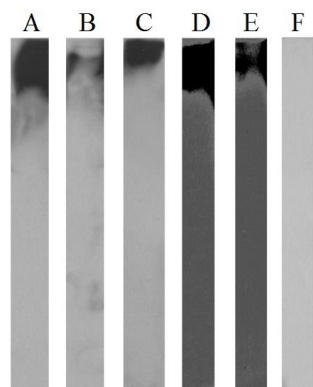
Ono što se moglo očekivati, detekcija IGFBP-3 signala na mestu izolovanog fibrinogena, se nije dogodilo. Prilikom tumačenja dobijenog rezultata, treba uzeti u obzir nekoliko činjenica. Prvo, u publikovanim studijama u kojima je detektovana navedena interakcija (Campbell et al., 1999; Martino et al., 2013), korišćeni su komercijalni preparati fibrinogena i rhIGFBP-3. Poznato je da poreklo fibrinogena utiče na njegove osobine i da se izolovani, komercijalni i rekombinantni proteini razlikuju u stvaranju fibrina (Huang and Lord, 2013). Moguće je da se razlike manifestuju i na drugi način, na primer u njegovoj reaktivnosti prema drugim proteinima, ali to nije detaljno ispitivano. U jednom od eksperimenata, takođe *in vitro*, je pokazano da rhIGFBP-1 pri većim (μM) koncentracijama, može kompetitivno da smanji udeo vezanog rhIGFBP-3 za fibrinogen (Campbell et al., 1999). Sa druge strane, ne treba izgubiti iz vida da se u cirkulaciji IGFBP-3 pretežno nalazi u terciarnom kompleksu sa IGF i ALS (Annunziata et al., 2011), što može biti ograničenje za njegovu interakciju sa fibrinogenom. Na kraju, sposobnost fibrinogena da veže IGFBP-3 može biti ipak relevantan podatak, jer se IGFBP-3 nalazi u krvnim pločicama i to u svojoj slobodnoj

formi, pa bi kao takav možda mogao interagovati sa fibrinogenom po aktiviranju pločica. Navedene pretpostavke treba dalje ispitati.

Sledeći bitni faktor za analizu interakcija je poreklo IGFBP. Ovi proteini podležu posttranslacionim modifikacijama koje mogu uticati na njihovu reaktivnost (Hwa et al., 1999; Baxter, 2000). Rekombinadni proteini često nisu modifikovani na isti način kao u organizmu, što može uticati na razlike u interakcijama. IGFBP-1, kao što je već rečeno, može biti fosforilovan na više različitih mesta i u različitom stepenu, te je izvor ovog proteina vrlo važan. U krvi se pretežno nalazi visoko fosforilovani oblik, dok se u amnijskoj tečnosti nalazi pretežno nefosforilovan i u malom stepenu fosforilovan protein (Gupta et al., 2015). Rekombinadni IGFBP-1 iz *E. coli* i CHO ćelija je fosforilovan, ali ne u istoj meri kao u cirkulaciji (Jones et al., 1993). Ostaje pitanje da li i koliko fosforilovanje IGFBP-1 utiče na njegov afinitet za fibrinogen. Kako je za navedene eksperimente plazma bila početni uzorak, može se reći da fibrinogen sigurno interaguje sa fosforilovanim IGFBP-1.

Da bi se dokazalo postojanje kompleksa fibrinogen/IGFBP-1, dalji eksperimenti su rađeni u cilju njihove potvrde. Prvo su urađene dve zasebne imunoprecipitacije upotrebom imobilizovanog anti-fibrinogenog ili anti-IGFBP-1 antitela. Uzorak je bio preparat izolovanog fibrinogena rastvoren u 150 mM citratnom puferu. Preparati dobijeni imunoprecipitacijom sa jednim antitelom su testirani imunoblotom sa drugim antitelom. Na ovaj način se potvrdilo da se u izolatu fibrinogena nalazi IGFBP-1 imunoreaktivni protein i da se u izolatu IGFBP-1 nalazi protein reaktivan sa anti-fibrinogenim antitelom, Slika 16A, B i C.

Kako IGFBP-1 nije glikozilovan (Rajaram et al., 1997), kao jedan od dokaza za interakciju sa fibrinogenom je postojanje IGFBP-1 imunoreaktivne trake u izolatu fibrinogena podvrgnutog lektinskoj afinitetnoj hromatografiji sa imobilizovanim konkanavalinom A. Fibrinogen, budući da je glikozilovan na četiri mesta (Adamczyk et al., 2013; Zauner et al., 2013) se vezao i eluirao sa lektinske kolone, a eluat je bio imunoreaktivan sa anti-fibrinogenim i anti-IGFBP-1 antitelom, potvrđujući interakciju ova dva proteina, Slika 16D i E.



Slika 16. Potvrda interakcije fibrinogena i IGFBP-1 imunoblotom nakon imunoprecipitacije (A, B i C) ili lektinske afinitetne hromatografije sa konkanavalinom A (D i E), kao i potvrda odsustva α_2 -makroglobulina u preparatu izolovanog fibrinogena (F). Za imunoblot u eksperimentima A, C i D su korišćena anti-fibrinogenska antitela, u eksperimentima B i E anti-IGFBP-1 antitela, a u eksperimentu F antitela spram α_2 -makroglobulina.

Još jedan eksperiment je urađen da isključi postojanje drugih IGFBP-1 kompleksa u preparatu izolovanog fibrinogena. Poznato je, naime, da α_2 -makroglobulin interaguje sa IGFBP-1 (Westwood et al., 2001; Šunderić et al., 2015). Ovaj protein se u fiziološkim uslovima nalazi pretežno u formi tetramera molekulske mase od 720 kDa (Thieme et al., 2015). Podložan je raspadu na svoju dimernu formu tokom pripreme uzorka za elektroforezu (Wyatt et al., 2015), čime se masom približava masi fibrinogena. Trake koje potiču od dimera α_2 -makroglobulina i fibrinogena su na istim položajima u gelu nakon native elektroforeze (rezultati nisu prikazani). Imunoblot preparata fibrinogena sa antitelom spram α_2 -makroglobulina nije dao signal, Slika 16F, potvrđujući da se sa fibrinogenom ne izoluje α_2 -makroglobulin i da prisustvo IGFBP-1 u preparatu fibrinogena potiče samo od interakcije ova dva proteina.

Kako IGFBP-1 postoji u ljudskom organizmu u obliku monomera, dimera i oligomera (Sakai et al., 2001; Masnikosa et al., 2009; Shibuya et al., 2011), dalje je ispitano da li detektovani signal sa anti-IGFBP-1 antitelom ne potiče, delimično, i od oligomerne forme IGFBP-1 koja se eventualno taloži pri istim uslovima kao i fibrinogen. Kao početni uzorak se koristio serum i sa njim je postupano na isti način kao i pri taloženju fibrinogena iz plazme. Vidljivog taloga iz seruma nije bilo, tečnost je uklonjena iz epruvete i dalje je imitiran postupak rastvaranja fibrinogena u

odgovarajućem puferu. Uzorak je analiziran nativnom elektroforezom i imunoblotom. Nije bilo signala sa anti-IGFBP-1 antitelom (rezultat nije prikazan), čime je potvrđeno da se postupkom za izolovanje fibrinogena ne izoluju oligomeri IGFBP-1.

Fiziološka uloga kompleksa fibrinogena i IGFBP-1 je nepoznata. Campbell i saradnici (1999) su pretpostavili, na osnovu svojih *in vitro* eksperimenata, da IGFBP-3 zahvaljujući svojoj interakciji sa fibrinogenom doprema IGF-I do mesta povrede, gde ovaj peptid ispoljava proliferaciono, migraciono i anti-apoptotsko dejstvo na ćelije (LeRoith and Roberts, 2003). Možda je to slučaj i sa IGFBP-1, koji je u cirkulaciji visoko fosforilovan i ima veliki afinitet za IGF-I (Lee et al., 1993; Sakai et al., 2001; Firth and Baxter, 2002). Plazmin, fibrinolitički enzim koagulacionog sistema, kao što je već rečeno, može da hidrolizuje i IGFBP-1 (Mañes et al., 1997). Posledica ove hidrolize može biti otpuštanje bioaktivnog IGF-I, ali i stvaranje peptida od IGFBP-1 za koje je pokazano da, takođe, imaju stimulatorno dejstvo na migraciju i proliferaciju dermalnih fibroblasta (Brandt et al., 2015). IGFBP-1 fragmenti nastali degradacijom plazminom mogu, možda na isti način, uticati i na ćelije endotela, što svakako treba ispitati. Svim ovim tumačenjima povezanosti IGFBP-1 sa procesom koagulacije treba dodati i IGF nezavisno dejstvo IGFBP-1, koje se ispoljava preko RGD sekvencije, po njenom prepoznavanju od strane $\alpha_5\beta_1$ integrina. Zahvaljujući ovoj interakciji, IGFBP-1 pospešuje zarastanje rana (Tsuboi et al., 1995; Galiano et al., 1996). Krvne pločice su jedan tip ćelija koje poseduju ovaj integrin (McCarty et al., 2004), mada nije dokazano da se IGFBP-1 vezuju za njih.

Fibrinogen i IGFBP-1, bez dileme, imaju važne uloge prilikom povrede. Postojanje kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 navodi na pomisao da bi te uloge, ili bar u nekoj meri, mogle biti povezane. U nastavku ove disertacije će biti razmatrane promene kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 sa starenjem i pojavom patoloških stanja praćenih poremećajem u koagulaciji.

3.4 Uticaj starenja na strukturu i rektivnost fibrinogena

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio ispitivanje promena na molekulskom nivou samog fibrinogena, koje se dešavaju tokom starenja, a koje bi mogle bliže objasniti njegov doprinos hiperkoagulaciji kod starijih, zdravih osoba. Paralelno su ispitani i

kompleksi fibrinogena sa IGFBP-1, čija koncentracija, također, raste tokom starenja (Rutanen et al., 1993; Benbassat et al., 1997), a sam IGFBP-1 bi mogao imati ulogu u trombozi (Ramos-Mozo et al., 2012).

3.4.1. Biohemijski parametri ispitanika

U preliminarnim ispitivanjima analizirane su grupe zdravih ljudi u intervalu od 20 godina starosti (20-40, 41-60, 61-80 i >80). Uočeni su pravci promena, ali najčešće nisu nađene statistički značajne razlike između grupa. Iako ne postoji jasno definisana granica između sredovečnih i starih osoba, 60 godina je uzeto u ovoj studiji za granicu i u najvećem broju eksperimenata upoređivani su rezultati za osobe do i preko 60 godina starosti. U Tabeli 1 su date koncentracije ukupnih proteina, fibrinogena, IGFBP-1, kao i jona kalcijuma i proteinskih karbonila u plazmi zdravih osoba dve starosne dobi, do i preko 60 godina. Za određivanje proteinskih karbonila je korišćena publikovana metoda, koja je podrazumevala derivatizaciju proteina sa dinitrofenil hidrazinom (Levine et al., 1990).

Tabela 1. Koncentracije biohemijskih parametara u uzorcima plazme zdravih osoba različite starosti

Koncentracija	Godine ≤ 60 n = 45	Godine > 60 n = 25
Ukupni proteini, g/L	74,5 ± 3,83	67 ± 6,93*
Fibrinogen, g/L	3,1 ± 0,69	3,6 ± 0,54
Ukupni kalcijum, mmol/L	2,23 ± 0,131	2,20 ± 0,144
Slobodni kalcijum, mmol/L	1,00 ± 0,070	1,01 ± 0,061
IGFBP-1, µg/L	9,0 ± 6,60	18,0 ± 15,10*
Proteinski karbonili, µmol/g proteina	0,5 ± 0,15	0,6 ± 0,28

*Statistički značajna razlika (p < 0,05)

U plazmi ispitanika starijih od 60 godina je bila značajno niža koncentracija ukupnih proteina i značajno viša koncentracija IGFBP-1 u odnosu na mlađu grupu. Koncentracija fibrinogena je bila viša u starijoj grupi, ali razlika nije bila statistički značajna. Koncentracije slobodnog i ukupnog jona kalcijuma, koje mogu uticati na proces koagulacije, su bile iste u obe grupe. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa

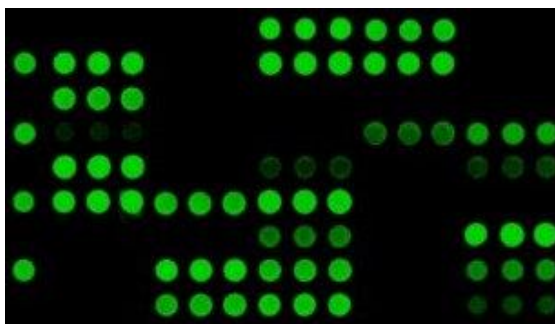
literaturnim (Rutanen et al., 1993; Mari et al., 1995; Benbassat et al., 1997; Gil et al., 2006; Šunderić et al., 2014). Iako starenje može biti praćeno povećanom oksidacijom proteina, koncentracija proteinskih karbonila (kao pokazatelja stepena oksidacije) u starijoj grupi nije bila značajno povišena u odnosu na mlađu grupu, što se takođe slaže sa publikovanim podacima za zdrave starije osobe (Gil et al., 2006).

3.4.2 Analiza glikozilacije fibrinogena lektinima

Analiza N-glikana fibrinogena je pokazala da su β i γ lanci glikozilovani i da su dominantne strukture na njima biantenarni, digalaktozilovani, mono- i disijalinizovani N-glikani. Oko 85 % glikanskih struktura fibrinogena je navedenog tipa (Adamczyk et al., 2013). U ovoj disertaciji je analizirana razlika u glikanima fibrinogena izolovanih iz plazmi osoba različite starosti primenom lektinske mikroesej tehnike sa detekcijom fluorescentnih signala. U analizi glikozilacije fibrinogena su korišćeni lektini prikazani u Tabeli 2 gde je data i njihova specifičnost. Na Slici 17 je dat primer izgleda rezultata dobijenih ovom tehnikom.

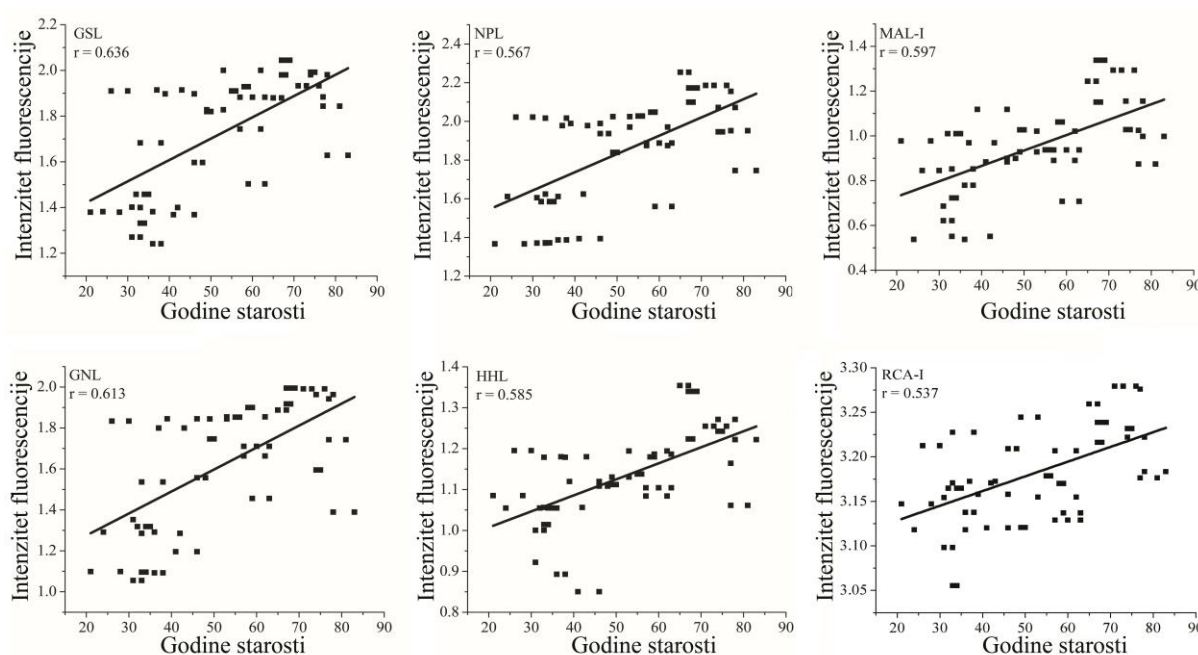
Tabela 2. Lektini korišćeni u metodi lektinskog mikroeseja i njihova saharidna specifičnost

Lektin	Saharidna specifičnost
<i>Griffonia simplicifolia</i> lektin-II (GSL-II)	Agalaktozilovani tri/tetraantenarni N-glikani
<i>Galanthus nivalis</i> lektin (GNL)	Visoko-manozni N-glikani, Man α 1,3 Man
<i>Maackia amurensis</i> lektin-I (MAL-I)	Gal (β -1,4) GlcNAc
<i>Hippeastrum hybrid</i> lektin (HHL)	Visoko-manozni N-glikani, Man α 1,3 Man, Man α 1,6 Man
<i>Narcissus Pseudonarcissus</i> lektin (NPL)	Polimanozne strukture koje sadrže (α -1,6) veze
<i>Ricinus communis</i> agglutinin-I (RCA-I)	Gal β 1,4GlcNAc
<i>Lens culinaris</i> aglutinin (LCA)	α -D-Glc, α -D-Man u N-glikanima sa Fuc α 1,6 GlcNAc
<i>Aleuria aurantia</i> lektin (AAL)	Fuc α 1,6 GlcNAc, Fuc α 1,3 (Gal β 1,4) GlcNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i> leukoagglutinin (PHA-L)	Tri-/tetraantenarni kompleksni N-glikani
Konkanavalin A (ConA)	Visoko-manozni N-glikani, Man α 1,6 (Man α 1,3) Man
<i>Pholiota squarrosa</i> lektin (PhoSL)	α 1,6-Fukozilovani N-glikani u jezgru
<i>Sambucus nigra</i> aglutinin (SNA)	Terminalna α 2,6 Sia vezana za Gal ili GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i> eritroagglutinin (PHA-E)	Bi/triantenarni kompleksni N-glikani sa terminalnom Gal i umetnutim GlcNAc
Aglutinin iz pšeničnih klica (WGA)	GlcNAc β 1,4 GlcNAc
<i>Maackia amurensis</i> lektin-II (MAL-II)	Terminalna α 2,3 Sia vezana za Gal 1,4 GlcNAc



Slika 17. Opšti primer izgleda rezultata dobijenih lektinskim mikroesejem

Fibrinogen je bio reaktivan sa svih 15 primenjenih lektina. Značajna pozitivna korelacija između jačine lektinskog signala i godina života (\leq ili $>$ 60 godina) je detektovana kod svih lektina osim MAL-II, Tabela 3 (rezultati su prikazani kao medijana, uz 2,5 i 97,5 percentile, pošto distribucija rezultata nije bila normalna). Najveća korelacija (izražena preko Pirsonovog koeficijenta) je nađena u testovima sa GNL, GSL-II, HHL, MAL-I, NPL i RCA-I lektinima, Tabela 3. Na Slici 18 prikazana je postepenost promene reaktivnosti fibrinogena sa lektinima tokom starenja. Osnovna karakteristika starenja je opšte povećanje stepena glikozilovanja fibrinogena.



Slika 18. Korelacija jačine lektinskih signala nakon interakcije lektina sa izolovanim fibrinogenom sa godinama života.

Tabela 3. Reaktivnost izolovanog fibrinogena sa lektinima kod zdravih osoba starosti do i preko 60 godina (intenzitet fluorescencije).

Korišćeni lektini	Godine ≤ 60 (n = 45)	Godine > 60 (n = 25)	Koef. korel.
GSL-II	1,59 (1,244 – 1,931)	1,93 (1,572 – 2,041)*	0,636*
GNL	1,54 (1,060 – 1,892)	1,90 (1,391 – 1,991)*	0,613*
MAL-I	0,89 (0,543 – 1,114)	1,09 (0,801 – 1,344)*	0,597*
HHL	1,10 (0,853 – 1,190)	1,23 (1,061 – 1,352)*	0,585*
NPL	1,84 (1,373 – 2,054)	2,08 (1,675 – 2,251)*	0,567*
RCA-I	3,16 (3,064 – 3,243)	3,23 (3,132 – 3,282)*	0,537*
LCA	2,21 (1,951 – 2,403)	2,41 (2,120 – 2,591)*	0,458*
AAL	2,08 (1,891 – 2,322)	2,42 (2,060 – 2,526)*	0,435*
PHA-L	1,43 (1,133 – 1,711)	1,67 (1,351 – 1,794)*	0,430*
ConA	3,07 (2,993 – 3,152)	3,13 (3,060 – 3,195)*	0,401*
PhoSL	2,35 (2,276 – 2,421)	2,37 (2,337 – 2,453)*	0,353*
SNA	3,05 (3,000 – 3,080)	3,08 (3,026 – 3,114)*	0,340*
PHA-E	2,53 (2,386 – 2,672)	2,63 (2,462 – 2,734)*	0,333*
WGA	2,21 (2,043 – 2,395)	2,38 (2,081 – 2,613)*	0,308*
MAL-II	1,66 (1,545 – 1,921)	1,80 (1,524 – 2,051)*	0,249

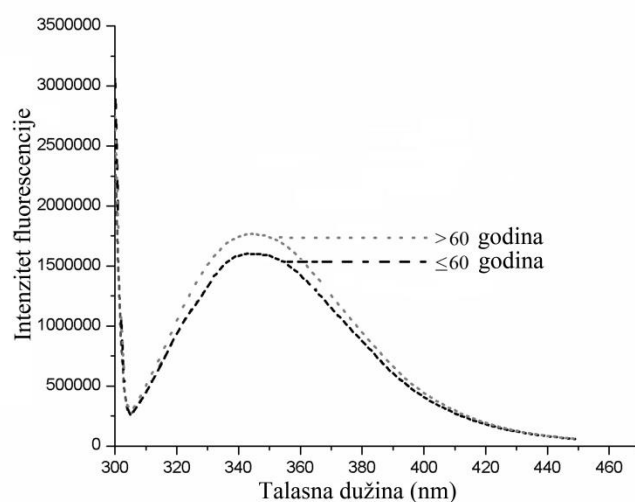
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

Kako kod nemutirane forme fibrinogena nema mesta za dodatno N-glikozilovanje i kako su sva četiri postojeća mesta već zauzeta glikanima (Zauner et al., 2012), povećanje reaktivnosti fibrinogena sa lektinima može biti posledica jedino strukturnih promena postojećih N-glikana. Sudeći po dobijenim rezultatima, starenje prati povećanje visoko-manoznih i hibridnih N-glikana, tri/tetraantenarnih kompleksnih N-glikana, kao i veći sadržaj Gal i GlcNAc. Porast triantenarnih glikana na proteinima tokom starenja je potvrđeno i od strane drugih istraživača (Knežević et al., 2010; Itakura et al., 2016). Takođe, ustanovljeno je i povećanje visoko-manoznih glikana na proteinima u ljudskom mozgu tokom starenja (Brunngraber and Webster, 1986). U većini objavljenih radova, promena N-glikana tokom starenja je analizirana na nivou celog seruma ili plazme (Knežević et al., 2010; Vanhooren et al., 2010; Vanhooren et al., 2007), a retki su radovi koji se bave analizom glikana na izolovanim proteinima, kao što je IgG (Parekh et al., 1988). Zajedničko otkriće studija koje su koristile serum ili plazmu je smanjenje Gal tokom starenja. Ovo nije bio slučaj kod fibrinogena, pa se može pretpostaviti da se glikozilovanje različitih proteina drugačije reguliše i da može zavisiti od tkivnog porekla.

3.4.3 Analiza tercijarne strukture fibrinogena

Kako su detektovane promene fibrinogena na nivou glikozilacije, dalje se ispitalo da li dolazi i do promena fibrinogena na nivou tercijarne strukture.

Promena tercijarne strukture fibrinogena sa starenjem je praćena spektrofotometrijski. Kako su razlike u individualnim uzorcima bile male, pojedinačni fibrinogeni su grupisani u dva zbirna uzorka, poreklom iz osoba do i preko 60 godina starosti. Ovakvim formiranjem zbirnih uzoraka su dobijene jasne razlike između dve grupe ispitanika, Slika 19. Ekscitacija Trp je rađena na 295 nm (Ghisaidoobe and Chung, 2014), dok je za detekciju AGE produkta, argpirimidina, korišćena ekscitacija na 330 nm (Shipanova et al., 1997). Iako detektovane razlike nisu bile velike, ukazale su na postojanje strukturnih promena fibrinogena sa starenjem.



Slika 19. Spektrofotometrijska analiza dva zbirna uzorka fibrinogena, izolovanih iz plazmi osoba do i preko 60 godina starosti. Emisioni spektri su snimljeni u opsegu talasne dužine 300-450 nm nakon Trp ekscitacije na 295 nm.

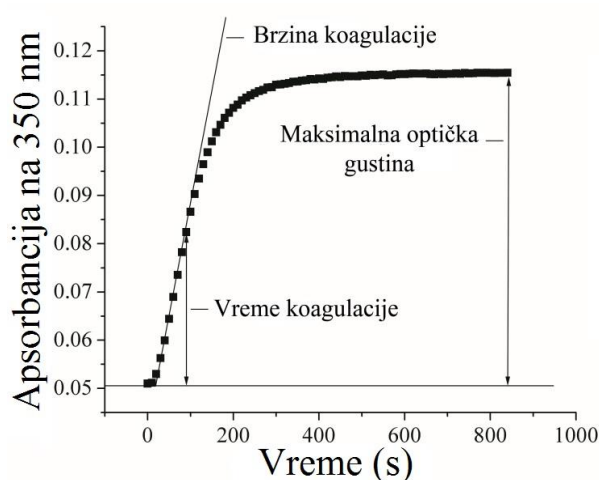
Malo povećanje Trp emisionog signala je uočeno kod starije grupe ispitanika i može se objasniti strukturnom promenom fibrinogena koja dovodi do pomeranja Trp ka hidrofobnijoj sredini (Zhou and Rosen 1997; Gorinstein et al., 2000). Prilikom snimanja spektara nakon ekscitacije na 330 nm u cilju detekcije argpirimidina (AGE produkta reakcije Arg i MGO), nije uočena razlika između dve starosne grupe (rezultat nije

prikazan). Iako je starenje, generalno, praćeno povećanjem koncentracije AGE (DeGroot et al., 2004; Haus et al., 2007), ova modifikacija nije postala izražajna na fibrinogenu kod starije populacije. Dobijeni spektrofluorimetrijski podatak se slaže sa izmerenim sadržajem proteinskih karbonila, Tabela 1, i oni zajedno potvrđuju da zdravi stariji ljudi (uključeni u ovu studiju) nisu bili pod povećanim oksidativnim stresom. Uzimajući u obzir sve dobijene rezultate koji se odnose na strukturu fibrinogena, može se pretpostaviti da male strukturne promene (ili bar u nekoj meri), uočene spektrofluorimetrijski, mogu poticati od izmenjenog glikozilovanja do koga dolazi sa starenjem organizma. Značajne oksidativne promene fibrinogena u toku zdravog starenja nisu detektovane (Gligorijević et al., 2018a).

3.4.4 Koagulacione osobine fibrinogena

Kako su konstatovane promene u glikozilovanju i tercijarnoj strukturi fibrinogena sa godinama života, dalje je ispitivano da li i u kojoj meri one utiču na njegove koagulacione osobine. Parametri koagulacije fibrinogena (vreme koagulacije, brzina koagulacije i maksimalna promena apsorbancije) su određeni prema publikovanim procedurama (Hugenholtz et al, 2016; Scott et al., 2011). Fibrinogenu je pre dodavanja trombina, dijalizom izmenjen osnovni pufer puferom za koagulaciju (Iino et al., 1995).

Vreme koagulacije, brzina i maksimalna apsorbancija fibrinskog gela su određivani koristeći zavisnost prikazanu na Slici 20, (Tilley et al., 2011).



Slika 20. Reprezentativni grafik polimerizacije fibrinogena

Poroznost fibrinskog ugruška je određena po opisanim procedurama (Mills et al., 2002; Hugenholtz et al., 2016), merenjem Darsijeve konstante koja je proporcionalna poroznosti medijuma.

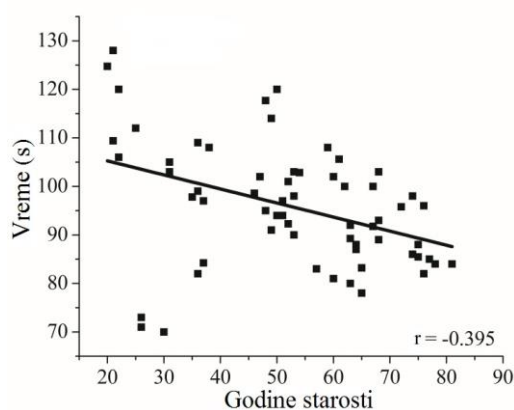
Rezultati su pokazali da starenje, a najverovatnije strukturne promene fibrinogena, utiču na vreme koagulacije, dok se brzina koagulacije, maksimalna apsorbancija, debljina fibrila i poroznost fibrinskog gela ne menjaju (Tabela 4, Slike 21 i 22). U Tabeli 4 su prikazani rezultati za dve starosne grupe, do i preko 60 godina, na Slici 21 je prikazana korelacija vremena koagulacije sa postepenim povećanjem godina starosti i na Slici 22 su dati SEM rezultati za dve definisane starosne grupe ispitanika.

Tabela 4. Koagulacione karakteristike fibrinogena kod zdravih osoba starosti do i preko 60 godina.

Koagulacione karakteristike	Godine ≤ 60 (n = 45)	Godine > 60 (n = 25)	Koef. korel.
Vreme koagulacije (s)	100 (71,1 – 125,0)	88 (79,1 – 104,1)*	-0,395*
Brzina koagulacije ($\Delta A/s$)	0,05 (0,013 – 0,084)	0,05 (0,022 – 0,099)	0,012
Maksimalna A fibrinskog gela na 350 nm	0,2 (0,11 – 0,23)	0,2 (0,10 – 0,23)	-0,073
Prečnik fibrinskih vlakana (nm)	66,4 (44,82 – 108,13)	69,3 (50,12 – 107,61)	0,028
Darsijeva konstanta (cm^2)	6,0E-10 (1,12E-10 – 2,93E-09)	6,3E-10 (2,91E-10 – 3,42E-09)	0,120

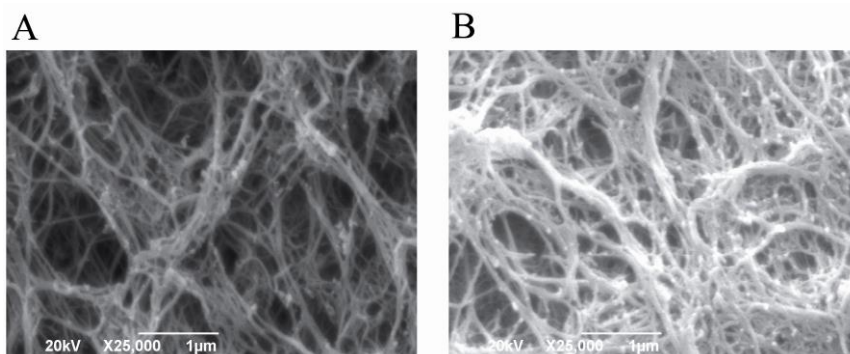
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

Vreme koagulacije je bilo u značajnoj negativnoj korelaciji sa godinama starosti, što znači da se sa starenjem fibinski ugrušak brže formira, Slika 21.



Slika 21. Korelacija vremena koagulacije sa starenjem, izražena preko Pirsonov-og koeficijenta.

Ovaj nalaz je u skladu sa stavom da je starenje praćeno hiperkoagulacionim stanjem, a vrlo je verovatno da je strukturna promena fibrinogena jedan od uzroka hiperkoagulabilnosti (Mari et al., 1995; 2008a).



Slika 22. Analiza fibrinskih ugrušaka metodom SEM osoba do 60 (A) i preko 60 godina starosti (B), prikazani su reprezentativni uzorci.

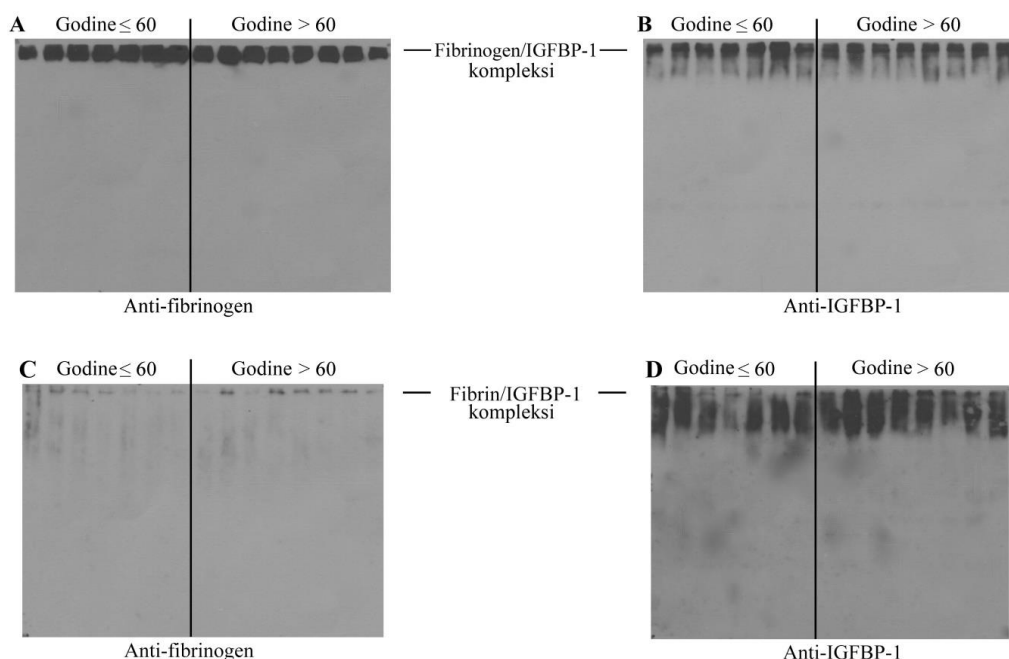
Rezultati određivanja maksimalne apsorpcije fibrina, prečnika fibrinskih fibrila i poroznosti međusobno potvrđuju jedan drugog. Poroznost fibrinskog ugruška je jako bitna karakteristika. U slučaju manje poroznosti, fibrinski ugrušak postaje rezistentniji na plazminsku degradaciju, jer enzim tada u manjoj meri može prodreti u ugrušak. Smanjena poroznost je u korelaciji sa nekim komplikacijama koje su posledica koagulacije (Hugenholtz et al., 2016). Sagledavajući sveobuhvatno dobijene rezultate, može se zaključiti da promenjeno glikozilovanje i mala promena u terciarnoj strukturi fibrinogena usled starenja, mogu uticati na vreme koagulacije. Pošto su eksperimenti rađeni sa izolovanim fibrinogenom i komercijalnim trombinom, promena u vremenu koagulacije sa starenjem je bila najverovatnije posledica promene strukture fibrinogena, jer ni jedan drugi faktor iz krvi koji utiče na koagulaciju nije bio prisutan u testu koagulacije.

Sijalinska kiselina, negativno naelektrisan saharid i nisko-afinitetno vezujuće mesto za kalcijum, može uticati na funkciju fibrinogena (Martinez et al., 1983; Langer et al., 1988), smanjenjem brzine polimerizacije (Dang et al., 1989). Sudeći po podacima dobijenim u lektinskoj mikroesej analizi, Tabela 3, količina Sia na fibrinogenu se povećava sa godinama, što je u saglasnosti sa publikovanim rezultatima o ukupnoj zastupljenosti Sia u krvi (Hager et al., 1994). Iako je povećanje značajno (detektovano

SNA lektinom), u slaboj je korelaciji sa starenjem, što sugerira da starenje ipak nema odlučujući uticaj na udeo Sia na fibrinogenu. Ovo malo povećanje Sia, verovatno, nije imalo uticaja na ponašanje fibrinogena u testiranim uzorcima, jer je brzina koagulacije ostala ista, a vreme koagulacije se smanjilo sa povećanjem godina.

3.4.5 Sadržaj fibrinogen/IGFBP-1 kompleksa kod zdravih osoba do i preko 60 godina

Pošto je konstatovano da starenje utiče na strukturu fibrinogena i neke osobine važne za proces koagulacije, dalje je ispitano da li starenje utiče na njegovu interakciju sa IGFBP-1. Iako je koncentracija IGFBP-1 bila dvostruko viša u grupi osoba starijih od 60 godina (Tabela 1), shodno tome je i relativni odnos koncentracija IGFBP-1 i fibrinogena bio znatno veći kod starije populacije, udeo IGFBP-1 koji je formirao komplekse sa fibrinogenom se nije promenio usled starenja, Tabela 5, Slika 23 (Nedić et al., 2017; Gligorijević et al., 2018a).



Slika 23. Reprezentativni imunoblotovi kompleksa fibrinogena, (A i B) i fibrina (C i D) sa IGFBP-1 u individualnim uzorcima ispitanika do i preko 60 godina starosti (fibrin je dobijen metodom sa trombinom). Proteini na membrani su detektovani korišćenjem anti-fibrinogenskog (A i C) ili anti-IGFBP-1 antitela (B i D).

Tabela 5. Sadržaj IGFBP-1 u kompleksu sa fibrinogenom/fibrinom (odnos denzitometrijskih signala) kod zdravih osoba starosti do i preko 60 godina.

Kompleksi	Godine ≤ 60 (n = 45)	Godine > 60 (n = 25)	Odnos
IGFBP-1/fibrinogen	0,7 (0,41 – 1,12)	0,8 (0,61 – 0,85)	0,150
IGFBP-1/fibrin	4,5 (3,12 – 5,63)	4,8 (3,52 – 5,13)	0,110

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

Usled povećanja koncentracije IGFBP-1, moglo se očekivati povećanje udela njegovih kompleksa sa fibrinogenom, ali ovo nije bio slučaj. Promenjena struktura fibrinogena je mogla uticati na smanjenje njegovog afiniteta za IGFBP-1, ali za ovu interakciju su mogli biti važni i neki drugi faktori, za sad nepoznati, koji regulišu stvaranje kompleksa.

3.5 Uticaj ciroze jetre na strukturu i reaktivnost fibrinogena

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio ispitivanje moguće promene glikozilovanja fibrinogena u cirozi jetre, stepena karbonilovanja pojedinačnih lanaca fibrinogena, eventualne promene sekundarne i tercijarne strukture molekula, kao i reaktivnost fibrinogena prema IGFBP-1.

3.5.1 Biohemijski parametri osoba sa cirozom i zdravih (kontrolnih) ljudi

Za ovo istraživanje korišćene su plazme i izolovani fibrinogen zdravih sredovečnih osoba i pacijenata kod kojih je klinički dijagnostikovao napredovali stadijum ciroze jetre. Koncentracija ukupnih proteina plazme je bila značajno smanjena kod pacijenata sa cirozom, koncentracija fibrinogena je bila slična kao kod zdravih ljudi, dok je koncentracija IGFBP-1 bila više nego dvostruko veća kod pacijenata nego kod zdravih osoba, Tabela 6 (rezultati pacijenata nisu imali normalnu distribuciju).

Tabela 6. Koncentracije proteina u plazmi zdravih ljudi i pacijenata obolelih od ciroze jetre

Koncentracija proteina	Zdrave osobe (n = 20)	Pacijenti sa cirozom jetre (n = 20)
Ukupni proteini (g/L)	75,3 (67,42 – 80,67)	53,8 (45,80 – 64,25)*
Fibrinogen (g/L)	3,3 (2,45 – 4,79)	3,8 (2,22 – 6,15)
IGFBP-1 (µg/L)	15,3 (1,12 – 42,97)	37,7 (9,21 – 108,27)*

*Statistički značajna razlika (p < 0,05)

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa publikovanim. Hipoproteinemija je uobičajena pojava kod pacijenata sa cirozom jetre, dok koncentracija fibrinogena može ostati u referentnom opsegu ili se može smanjiti sa napredovanjem bolesti (de Maat et al., 1995; Saner et al., 2013). Pošto se koncentracija fibrinogena povećava kod inflamatornog stanja (Esmon, 2005), a inflamacija je čest pratilac ciroze, finalna koncentracija fibrinogena je rezultat dva suprotna procesa, inflamacije sa jedne strane i smanjenog sintetskog kapaciteta jetre, sa druge strane. Povećanje koncentracije IGFBP-1 kod ciroze jetre je opisano u nekoliko studija (Ross et al., 1994; Donaghy et al., 1995; Hwang et al., 2003; Nedić et al., 2008).

3.5.2 Analiza glikanskih struktura

Analiza glikozilovanja metodom lektinskog mikroeseja je pokazala da ciroza jetre dovodi do promene u glikozilovanju fibrinogena (Gligorijević et al., 2018b). Kao što se vidi iz Tabele 7, u odnosu na zdrave osobe, značajne razlike su nađene primenom PhoSL, MAL-I, MAL-II, GNL i PHA-E lektina. Ovi rezultati ukazuju na povećanje tri/tetraantenarnih struktura glikana, Gal vezane β -1,4 glikozidnom vezom za GlcNAc, terminalne α -2,3 Sia i α -1,3 Man. Sa druge strane, α -1,6 Fuc vezana za glikansko jezgro i biantenarni galaktozilovani N-glikani sa umetnutim GlcNAc su bili smanjeno prisutni na molekulima fibrinogena pacijenata sa cirozom.

Tabela 7. Reaktivnost izolovanog fibrinogena iz plazmi zdravih osoba i pacijenata sa cirozom jetre sa lektinima i IGFBP-1

Reaktivnost fibrinogena sa lektinima (intenzitet fluorescencije)	Zdrave osobe (n = 20)	Pacijenti sa cirozom jetre (n = 20)
GSL-II	1,88 (1,433 – 2,023)	1,96 (1,803 – 2,088)
GNL	1,84 (1,288 – 1,993)	1,89 (1,806 – 1,932)*
MAL-I	1,02 (0,787 – 1,317)	1,17 (1,030 – 1,263)*
HHL	1,17 (0,950 – 1,347)	1,19 (1,101 – 1,266)
NPL	1,98 (1,473 – 2,222)	2,03 (1,873 – 2,123)
RCA-I	3,19 (3,120 – 3,277)	3,19 (2,903 – 3,235)
LCA	2,29 (2,113 – 2,596)	2,33 (2,182 – 2,407)
AAL	2,17 (2,000 – 2,509)	2,27 (2,125 – 2,443)
PHA-L	1,55 (1,291 – 1,773)	1,68 (1,607 – 1,786)*
ConA	3,11 (3,041 – 3,180)	3,11 (2,894 – 3,169)
PhoSL	2,37 (2,284 – 2,451)	2,34 (2,198 – 2,384)*
SNA	3,06 (3,020 – 3,107)	3,03 (2,890 – 3,089)
PHA-E	2,55 (2,401 – 2,711)	2,53 (2,265 – 2,592)*
WGA	2,27 (2,082 – 2,577)	2,29 (1,991 – 2,376)
MAL-II	1,71 (1,517 – 2,018)	2,01 (1,631 – 2,115)*
Sadržaj IGFBP-1 u kompleksu sa fibrinogenom (odnos denzitometrijskih signala)		
IGFBP-1/fibrinogen	0,13 (0,039 – 0,192)	0,20 (0,034 – 0,282)*

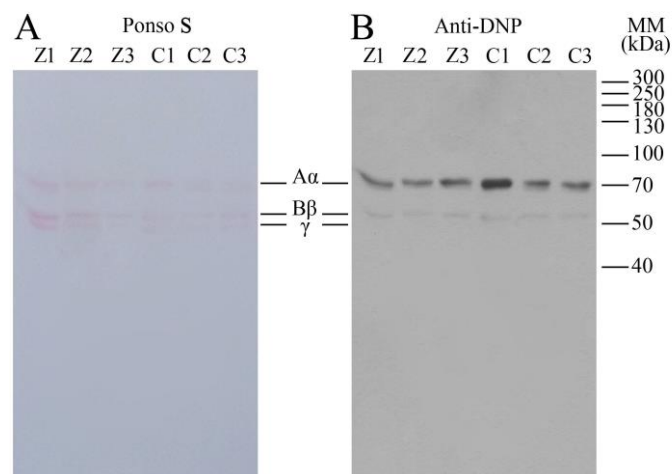
*Statistički značajna razlika (p < 0,05)

Povećanje ukupnog sadržaja Sia usled ciroze jetre je već opisano (Martinez et al., 1978). Takođe, povećanje terminalne Sia i stepena grananja glikana je detektovano na transferinu kod pacijenata sa tumorom jetre (Turner, 1992). Sijalinska kiselina je negativno naelektrisana, a fibrinski ugrušci kod osoba sa cirozom jetre su gušći (Hugenholtz et al., 2016). Kao što je ranije rečeno, Sia ostaci su mesta vezivanja kalcijuma i ova interakcija može favorizovati stvaranje fibrinskog ugruška (Dang et al., 1989). Sistemska hiperkalcemija prati cirozu jetre (Gerhardt et al., 1987; Kuchay et al., 2016) i može biti jedan od uzroka nastanka tromboze. Povećanje Fuc je detektovano kod pacijenata sa obolelom jetrom na nivou serumskog proteoma, kao i na izolovanim proteinima α_1 -kiselini glikoprotein i haptoglobin (Rydén et al., 2002; Liu et al., 2007; Zhu et al., 2014). Povećanje Fuc vezane α -1,6 glikozidnom vezom za GlcNAc na fibrinogenu je izmereno i u ovom radu, ali nije bilo statistički značajno. Sa druge strane, smanjenje broja Fuc ostataka vezanih za jezgro glikana na fibrinogenu sugerise da

ciroza jetre utiče različito na glikozilovanje različitih proteina. Važnost glikana za funkciju fibrinogena je već ranije dokazana, kao i da promena u glikozilovanju može dovesti do njegove potpune ili smanjene funkcije (Langer et al., 1988; Yamazumi et al., 1989; Maekawa et al., 1993; Sugo et al., 1999; Marchi et al., 2004; Gligorijević et al., 2018a).

3.5.3 Analiza karbonilovanja fibrinogena usled ciroze

Analiza stepena karbonilovanja fibrinogena je utvrdila da je A α lanac najpodložniji ovoj modifikaciji, a zatim sledi B β lanac, Slika 24 (Gligorijević et al., 2018b). Na položaju γ lanca nije detektovan DNP imunoreaktivni signal. Isti rezultat je dobijen proučavanjem lanaca fibrinogena poreklom iz zdrave populacije ljudi i iz pacijenata sa cirozom. Xu i saradnici su otkrili da je A α lanac fibrinogena najpodložniji oksidativnim promenama u prisustvu ROS *in vitro*, dok je B β lanac manje podložan. Nalaz opisan u ovoj disertaciji, da su A α i B β lanci fibrinogena primarno (a možda i jedino) oksidativno modifikovani *in vivo* kod pacijenata sa cirozom jetre, može doprineti boljem razumevanju promena koje se dešavaju u procesu koagulacije, budući da A α i B β lanci sadrže mesta za hidrolizu trombinom. Nakon hidrolize i odvajanja fibrinopeptida A i B trombinom, oslobađaju se mesta polimerizacije koja učestvuju u početnoj asocijaciji fibrinskih monomera (spajanjem kraja jednog i središnjeg dela drugog monomera), što dalje dovodi do stvaranja dvolančanih fibrila, lateralnog povezivanja i nastanka višelančanih fibrila. Takođe, oslobođeni α C domeni međusobno interaguju, doprinoseći lateralnom rastu fibrinskih fibrila (Brown et al., 2000; Mosesson, 2005; Martinez et al., 2013; Weisel et al., 2013). Rezultati većeg broja eksperimenata, izvođenih *in vitro* i *in vivo*, su pokazali da karbonilovanje fibrinogena utiče na njegovu funkciju (Undas et al., 2008; Scott et al., 2011; Xu et al., 2012; Martinez et al., 2013; Becatti et al., 2014).

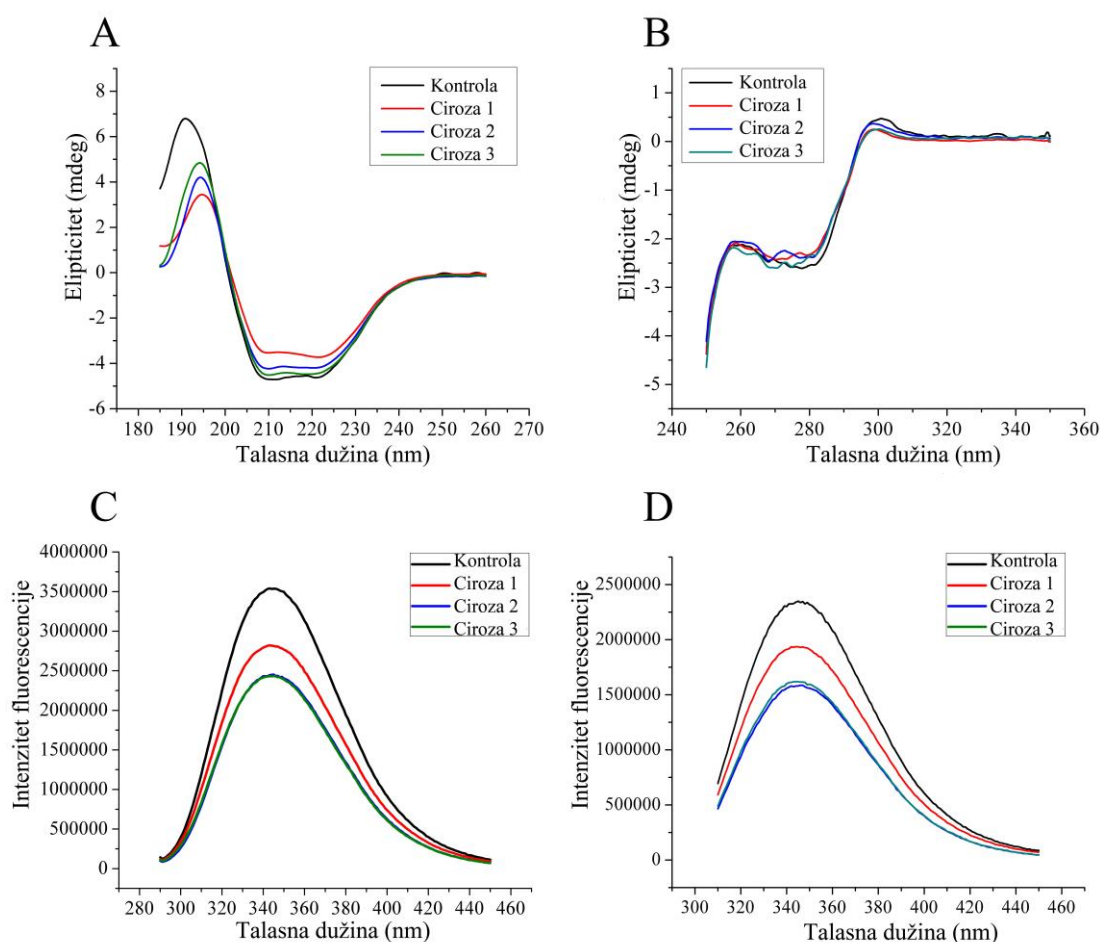


Slika 24. Detekcija lanaca fibrinogena nakon redukujuće SDS-PAGE bojenjem sa Ponso S (A) i imunoblot sa anti-DNP antitelom (B). Prikazana su po tri reprezentativna uzorka fibrinogena izolovanih iz plazmi zdravih osoba (Z1-3) i pacijenata sa cirozom jetre (C1-3); uzorci su derivatizovani sa DNP pre elektroforeze.

Kada su rezultati stepena karbonilovanja fibrinogena upoređeni između dve grupe uzoraka (denzitometrijski signali normalizovani naspram koncentracije proteina), utvrđeno je da ciroza indukuje povećanje stepena karbonilovanja, pre svega na A α lancu. Medijana denzitometrijskih signala kod pacijenata sa cirozom je bila 38,5 (25,40-51,58), dok je kod zdravih bila 17,3 (16,81-34,60), što je takođe u saglasnosti sa literaturnim podacima (Hugenholtz et al., 2016).

3.5.4 Analiza promene sekundarne i tercijarne strukture fibrinogena kod osoba sa cirozom

Pošto su detektovane promene fibrinogena na nivou glikozilovanja i karbonilovanja kod ljudi sa cirozom jetre, dalje je ispitivan mogući uticaj ovih modifikacija na sekundarnu i tercijarnu strukturu fibrinogena, Slika 25. Daleki UV CD spektar fibrinogena je pokazao tipičan signal za α -heliks (negativni minimumi na 209 i 222 nm). Ovo je očekivano, jer je α -heliks dominantna sekundarna struktura fibrinogena. Kod pacijenata sa cirozom jetre je smanjen udeo α -heliksa u odnosu na zdrave osobe, Slika 25A.



Slika 25. Analiza promene sekundarne i tercijarne strukture tri uzorka fibrinogena izolovanih iz plazmi pacijenata sa cirozom jetre i jednog uzorka fibrinogena izolovanog iz zdravih osoba. Prikazani su daleki UV CD spektar (A), bliski UV CD spektar (B) i spektrofluorimetrijska analiza uz ekscitaciju na 280 nm (C) i 295 nm (D).

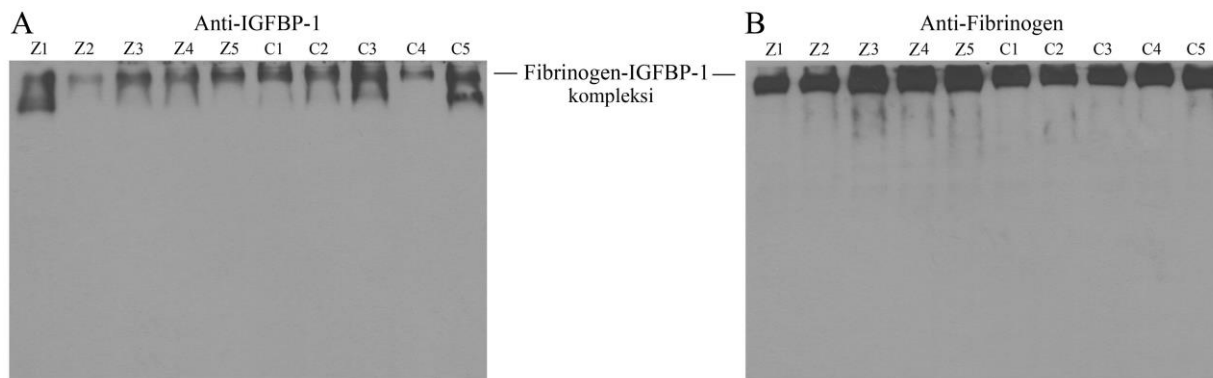
Smanjenje α -heliksa je, takođe, detektovano u fibrinogenu izolovanom iz plazmi pacijenata sa pretrpljenim infarktom srca, kod kojih je dodatno pokazano i da su fibrinski ugrušci gušći. Smatra se da je smanjenje α -heliksa posledica povećane oksidacije fibrinogena (Becatti et al., 2014). Sudeći po dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji i literaturnim podacima (Hugenholtz et al., 2016), sličan odnos strukture i funkcije se može pripisati fibrinogenu u patologiji ciroze jetre. Bliski UV CD spektri su pokazali male razlike na nivou tercijarne strukture fibrinogena i to na nivou Trp signala, Slika 25B.

Spektrofluorimetrijska analiza je pokazala smanjenje fluorescencije fibrinogena pacijenata sa cirozom, koja potiče od Tyr i Trp ostataka nakon ekscitacije na 280 nm, Slika 25C, odnosno Trp nakon ekscitacije na 295 nm (Ghisaidoobe i Chung, 2014), Slika 25D, što potvrđuje da se okolina Trp promenila. Uzevši sve navedene spektralne podatke u obzir, može se zaključiti da se sekundarna struktura fibrinogena značajnije menja usled ciroze jetre nego što se menja tercijarna struktura. Smanjenje intenziteta fluorescencije kod spektrofluorimetrije može biti posledica promene strukture proteina, ali isto tako i posledica prisustva određene aminokiselinske modifikacije (Gligorijević et al., 2018b). Koje su sve moguće aminokiselinske modifikacije proteina usled ciroze jetre i kako one utiču na spektrofluorimetrijski signal se trenutno ne zna. Proteinski karbonili nastali oksidacijom ne fluoresciraju, te njihovo postojanje ne utiče direktno na jačinu signala. Poznato je, naime, da se oni mogu detektovati fluorimetrijskom metodom tek nakon obeležavanja molekulima koji fluoresciraju (Tamarit et al., 2012; Rogowska-Wrzesinska et al., 2014; Mukherjee et al., 2015).

3.5.5 Ispitivanje zastupljenosti fibrinogen/IGFBP-1 kompleksa kod osoba sa cirozom

Analiza reaktivnosti fibrinogena prema IGFBP-1 je pokazala da je količina IGFBP-1 kompleksa sa fibrinogenom značajno veća kod pacijenata sa cirozom jetre nego kod zdravih ljudi, Slika 26, Tabela 6. Kako je koncentracija ukupnog IGFBP-1 veća kod pacijenata, ovaj rezultat nije iznenađujući. Sa druge strane, koncentracija IGFBP-1 kod pacijenata je oko 2,5 puta veća u odnosu na zdravu populaciju, a koncentracija kompleksa je veća 1,5 puta, što ukazuje da pored koncentracije IGFBP-1 postoje i drugi faktori koji utiču na formiranje kompleksa. Jedan od njih može biti i smanjen afinitet fibrinogena za IGFBP-1 usled strukturne modifikacije (Gligorijević et al., 2018b). Rezultati koji su dobijeni za formiranje kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 kod starijih zdravih ljudi i kod pacijenata sa cirozom jetre su u izvesnom smislu uporedivi. Kod obe populacije je detektovano manje formiranje kompleksa nego što bi se moglo očekivati uzevši u obzir neuporedivo veću koncentraciju IGFBP-1 u odnosu na zdrave sredovečne individue, što doprinosi čvršćem uverenju da je reaktivnost fibrinogena (bar prema

IGFBP-1, a možda i prema drugim partnerima) uslovljena posttranslacionim modifikacijama i promenama u konformaciji molekula.



Slika 26. Detekcija kompleksa fibrinogena sa IGFBP-1 u preparatima fibrinogena izolovanih iz plazmi zdravih ljudi (Z1-5) i pacijenata sa cirozom jetre (C1-5) imunoblotom sa anti-IGFBP-1 (A) ili anti-fibrinogenkim antitelom (B).

Kako je već pomenuto, IGFBP-1 može delovati na povređeno tkivo dopremanjem IGF-I (Mañes et al., 1997) ili direktnom interakcijom sa ćelijama (Galiano et al., 1996; Brandt et al., 2015). U cirozi jetre, povećana koncentracija IGFBP-1 može stimulisati stvaranje tromba. Analizom tromba pacijenata sa abdominalnim aortnim aneurizmom, nađeno je povećano prisustvo IGFBP-1, koji se smatra faktorom rizika. Povećana proteazna aktivnost u trombu, naime, može izazvati povećanu proteolizu IGFBP-1 uz lokalno povećanje koncentracije slobodnog IGF-I, koji dalje aktivira krvne pločice (Ramos-Mozo et al., 2012). Slična zavisnost može važiti i kod tromba u cirozi jetre, a zna se da je fibrinolitički kapacitet kod osoba sa cirozom povećan (Rijken et al., 2012), kao i da je IGFBP-1 supstrat za plazmin (Mañes et al., 1997).

Zbirno, dobijeni rezultati ukazuju na značajne promene na fibrinogenu usled ciroze jetre i to na nivou glikozilovanja, karbonilovanja, sekundarne i, verovatno, tercijarne strukture, kao i na nivou njegove interakcije sa IGFBP-1. Ovi podaci upotpunjuju i potpomažu tumačenje već objavljenih podataka o hiperkoagulacionim anomalijama izazvanim cirozom jetre (Buresi et al., 2012; Hugenholtz et al., 2016).

3.6 Uticaj *in vivo* i *in vitro* gliko-oksidacije na interakciju fibrinogena sa IGFBP-1

Kako su fibrinogen i IGFBP-1 usko povezani sa metaboličkim komplikacijama kod DM2, i kako ova dva proteina interaguju u plazmi (Gligorijević i Nedić, 2016), u ovom delu disertacije je ispitano da li se i u kojoj meri menja količina kompleksa fibrinogena i fibrina sa IGFBP-1 usled DM2 i koji su potencijalni razlozi za promenu.

3.6.1 Biohemijski parametri osoba sa dijabetes melitusom tipa 2 i zdravih (kontrolnih) ljudi

Koncentracije relevantnih biohemijskih parametara dve ispitivane grupe ljudi, zdravih osoba i pacijenata sa loše kontrolisanim DM2, su prikazane u Tabeli 8 (medijane i percentili). U studiji su korišćeni uzorci pacijenata sa DM2 kod kojih su koncentracije glukoze i HbA1c vrlo velike, a sprega insulin/IGFBP-1 još uvek očuvana, što se ogleda u smanjenoj koncentraciji IGFBP-1 (Rajpathak et al., 2012). Koncentracija fibrinogena se nije razlikovala između dve grupe uzoraka.

Tabela 8. Koncentracije biohemijskih parametara u uzorcima plazme ili pune krvi (HbA1c) zdravih osoba i pacijenata sa DM2

Koncentracija	Zdrave osobe (n = 25)	Pacijenti sa DM2 (n = 30)
Glukoza (mmol/L)	5,0 (4,9–5,6)	12,8 (9,6–14,5)*
HbA1c (%)	5,1 (4,1–5,2)	9,2 (9,0–9,8)*
IGFBP-1 (µg/L)	21,7 (2,79–41,5)	11,5 (5,3–19,2)*
Fibrinogen (g/L)	3,2 (2,2–4,2)	3,4 (2,9–4,2)

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

3.6.2 Zastupljenost kompleksa fibrina i fibrinogena sa IGFBP-1 kod osoba sa dijabetes melitusom tipa 2

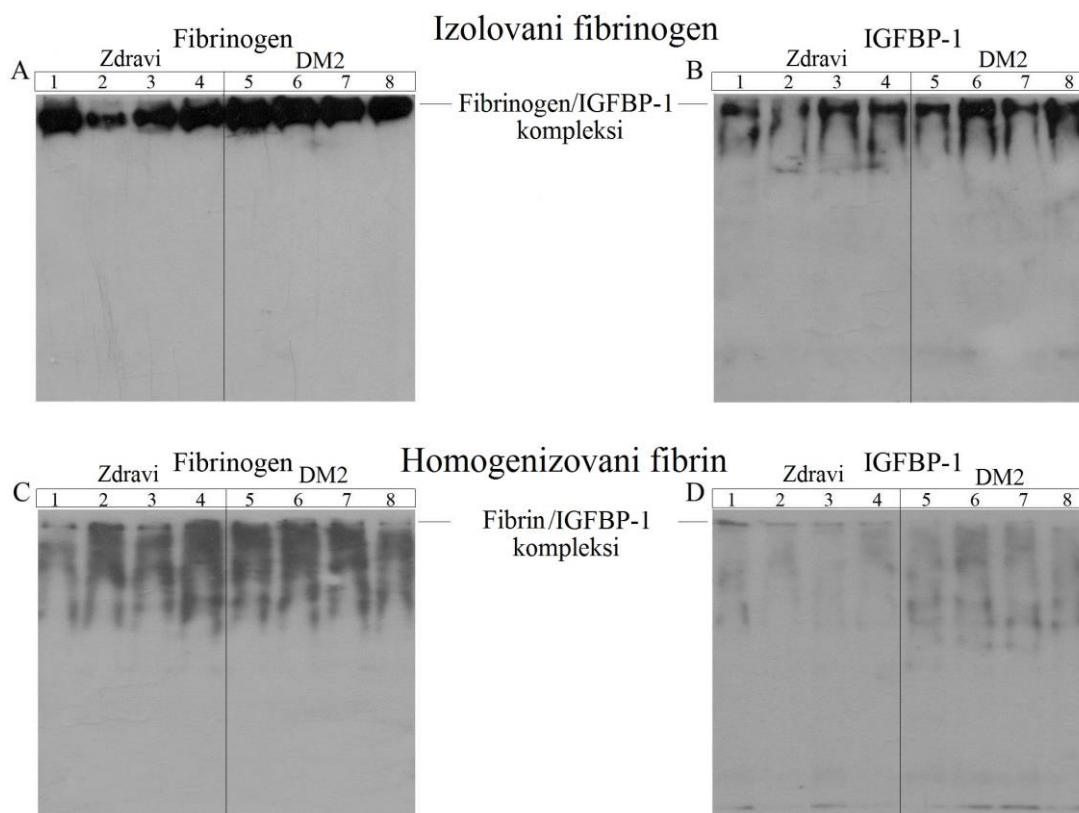
Imunoblot analiza kompleksa fibrinogena i fibrina sa IGFBP-1, kao i denzitometrijska procena jačine signala je urađena kako je ranije opisano. Rezultati su prikazani na Slici 27. Postupak za dobijanje fibrina je bio fizičko-hemijski, a ne

enzimski. Količina kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 je bila slična u dve grupe uzoraka, Slika 27A i B, Tabela 9, dok su kompleksi fibrin/IGFBP-1 bili značajno manje zastupljeni kod pacijenata sa DM2 nego kod zdravih osoba, Slika 27C i D, Tabela 9.

Tabela 9. Zastupljenost IGFBP-1 u kompleksima sa fibrinogenom i fibrinom kod zdravih ljudi i pacijenata sa DM2, denzitometrijske jedinice

Uzorak	Imunoreaktivne vrste	Zdrave osobe (n = 25)	Pacijenti sa DM2 (n = 30)
Izolovani fibrinogen	IGFBP-1 u kompleksima	0,72 (0,381-0,732)	0,74 (0,722-0,804)
	Fibrinogen	2,03 (0,880-2,465)	244 (2,264-2,622)
	Odnos signala IGFBP-1 i fibrinogena	0,36 (0,284-0,442)	0,31 (0,286-0,334)
Homogenizovani fibrin	IGFBP-1 u kompleksima	3,33 (2,751-3,982)	0,53 (0,321-0,994)*
	Fibrinogen	5,19 (3,634-5,287)	4,77 (3,496-5,043)
	Odnos signala IGFBP-1 i fibrin	0,63 (0,730-1,121)	0,18 (0,163-0,206)*

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

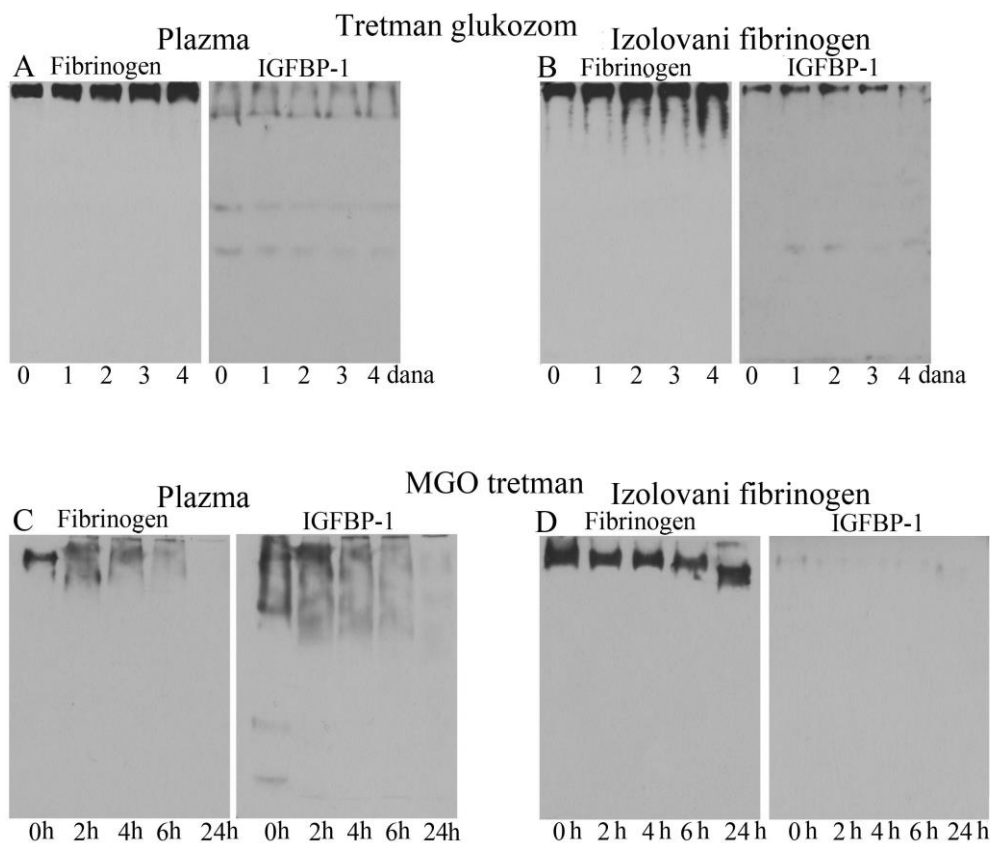


Slika 27. Detekcija kompleksa fibrinogena (A, B) ili fibrina (C, D) sa IGFBP-1 u preparatima fibrinogena, odnosno fibrina, izolovanih iz plazmi zdravih ljudi (1-4) i pacijenata sa DM2 (5-8) imunoblotom sa anti-fibrinogenkim (A, C) ili anti-IGFBP-1 antitelom (B, D), nakon native PAGE.

3.6.3 *In vitro* ispitivanje uticaja modifikacije fibrinogena glukozom i metilglioksalom na komplekse fibrinogena sa IGFBP-1

Pošto je nađena razlika u količini kompleksa fibrina i IGFBP-1 između dve ispitivane grupe, sledeći korak je bio utvrditi da li gliko-oksidativni procesi koji prate DM2 mogu biti odgovorni za smanjenje kompleksa. U tu svrhu, zbirni uzorci izolovanih fibrinogena i plazmi zdravih osoba su inkubirani sa velikom koncentracijom glukoze, odnosno MGO (Svensson et al., 2012; Xu et al., 2012), imitirajući patofiziološku situaciju koja se može dogoditi *in vivo*.

Tretman glukozom je trajao 4 dana, jer je to vreme poluživota fibrinogena u ljudskom organizmu (Tennent et al., 2007). Ovaj tretman je uticao na promenu količine kompleksa u plazmi (izmereno je smanjenje od oko 20 % posle 4 dana u odnosu na početni, netretirani uzorak), Slika 28A. Na slici se vide i IGFBP-1 imunoreaktivne trake koje potiču od dimera i monomera IGFBP-1. Tretman izolovanog fibrinogena glukozom je imao veći uticaj na formiranje kompleksa. U ovom slučaju je, nakon 4 dana inkubacije, intenzitet signala koji potiče od IGFBP-1 iz kompleksa sa fibrinogenom opao za oko 40 % u odnosu na početni, netretirani uzorak, Slika 28B.

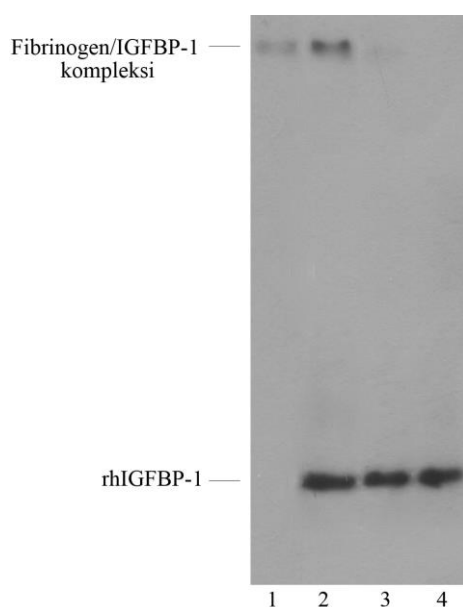


Slika 28. Detekcija kompleksa fibrinogena sa IGFBP-1 u plazmi (A, C) i u preparatu fibrinogena (B, D) izolovanog iz plazme zdravih ljudi, imunoblotom sa anti-fibrinogenim ili anti-IGFBP-1 antitelom, nakon nativne PAGE uzoraka inkubiranih sa 20 mM glukozom (A, B) ili 9 mM MGO (C, D).

Za razliku od tretmana glukozom, tretman MGO je izazvao brze promene, na nivou plazme i izolovanog fibrinogena. Smanjenje količine kompleksa je detektovano već nakon 2 h inkubacije. Signali na imunoblotu koji potiču od kompleksa su skoro nestali nakon 6 h u slučaju plazme i nakon 24 h u slučaju izolovanog fibrinogena, Slika 28C i D. Dodatna proteinska traka u uzorku tretirane plazme, koja je bila imunoreaktivna sa anti-fibrinogenim i anti-IGFBP-1 antitelom je uočena na većoj masi od mase fibrinogena nakon 2 h inkubiranja sa MGO. Ova traka, verovatno, potiče od umrežavanja proteina u prisustvu MGO. Pored toga, uočava se i pomeranje glavne trake fibrinogena na gelu nakon inkubacije sa MGO 24 h. Pojava je očekivana, jer MGO modifikuje aminokiseline sa baznim ostacima, kao što su Arg i Lys.

Dobijeni rezultati su pokazali da su fibrinogen i njegovi kompleksi sa IGFBP-1 podložni gliko-oksidaciji *in vitro*, što za posledicu ima smanjenje udela kompleksa.

Kako je uticaj MGO na stabilnost kompleksa bio veći od uticaja glukoze, urađen je dodatni eksperiment u cilju dokazivanja promene afiniteta fibrinogena prema IGFBP-1 usled modifikacije MGO-om. Izolovani fibrinogen, koji sadrži određenu količinu kompleksa sa IGFBP-1, je prvo preko noći inkubiran sa rhIGFBP-1, a zatim sa MGO tokom naredna 4 h, Slika 29. Inkubiranje u prisustvu rhIGFBP-1 je dovelo do povećanja udela kompleksa fibrinogen/IGFBP-1, dok je dodatak MGO proizveo suprotan efekat, značajno redukujući udeo kompleksa već nakon 2 h inkubacije. U nezavisnom eksperimentu je utvrđeno da prisustvo MGO ne ometa imunodetekciju rhIGFBP-1, što znači da su promene u intenzitetu signala koji potiče od IGFBP-1 iz kompleksa posledica promene stabilnosti kompleksa.



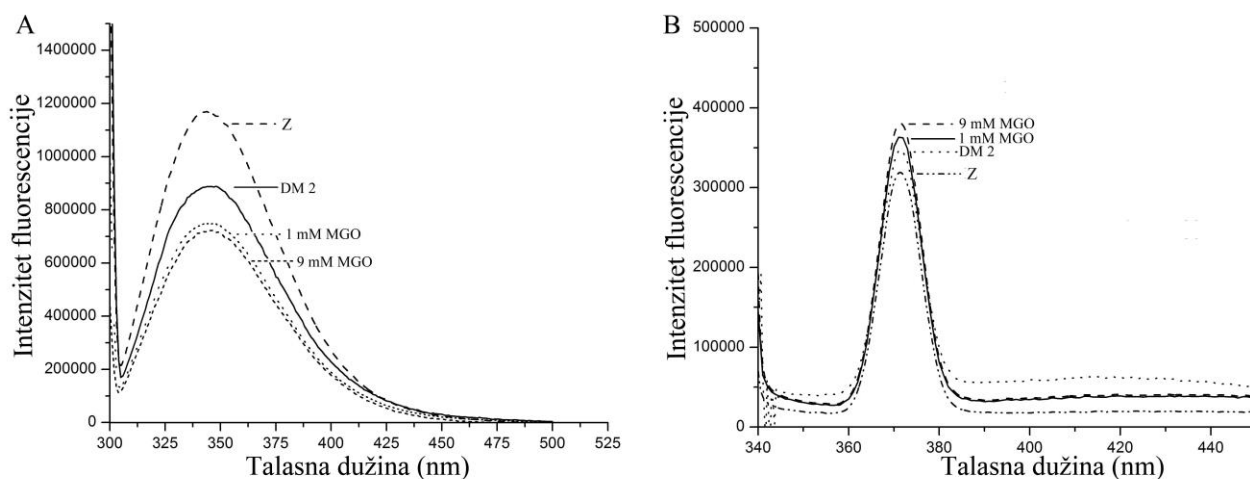
Slika 29. Detekcija kompleksa fibrinogena sa IGFBP-1 u nativnom preparatu fibrinogena (1), nakon inkubacije sa rhIGFBP-1 (2) i nakon inkubacije smeše fibrinogena i rhIGFBP-1 sa MGO 2 h (3) i 4 h (4); imunoblot sa anti-IGFBP-1 antitelom je rađen nakon native PAGE.

3.6.4 Detekcija promene tercijarne strukture fibrinogena i prisustva modifikacija fibrinogena MGO-om

Urađena spektrofluorimetrijska analiza, da bi se uporedile promene tercijarne strukture fibrinogena do kojih dolazi *in vivo* (protein izolovan iz plazmi pacijenata sa

DM2) i *in vitro* (fibrinogen modifikovan dejstvom MGO). Na Slici 30A se vidi smanjenje fluorescencije, nakon eksitacije na 295 nm, uzorka fibrinogena iz DM2 grupe, kao i uzorka fibrinogena tretiranog sa MGO, u odnosu na fibrinogen iz kontrolne grupe. Smanjenje signala je bilo oko 24 % za DM2 uzorak, odnosno 36 i 38 % za uzorak fibrinogena tretiranog sa 1 ili 9 mM MGO. Smanjenje fluorescencije može biti posledica strukturne promene, ali i prisustva novih fluorofora na fibrinogenu usled MGO modifikacije (Liang i Chylack, 1987). Takođe, crveni pomeraj maksimuma emisije je detektovan i iznosi 3 nm za fibrinogen iz DM2 uzorka i 4 nm za fibrinogen modifikovan sa MGO, što dodatno podupire zaključak da se struktura fibrinogena menja usled DM2 na način sličan onome koji izaziva MGO.

Fluorofora argpirimidin, koja nastaje reakcijom MGO sa argininom (Shipanova et al. 1997; Awasthi et al., 2015) je detektovana u većoj meri kod fibrinogena iz DM2 grupe i fibrinogena tretiranog sa MGO, što ponovo potvrđuje sličan mehanizam promene fibrinogena u fiziološkim i laboratorijskim uslovima. Povećanje intenziteta fluorescencije poreklom od argpirimidina je bilo oko 8, 13 i 19 % za fibrinogen iz DM2 grupe, odnosno fibrinogen tretiran sa 1 ili 9 mM MGO, Slika 30B.



Slika 30. Spektrofluorimetrijska analiza zbirnih uzoraka fibrinogena izolovanih iz plazmi zdravih osoba (Z), pacijenata sa DM2 (DM2) i fibrinogena tretiranog sa 1 ili 9 mM MGO, nakon eksitacije na 295 nm (A) ili 330 nm (B).

Populacione studije su pokazale da je DM2 jedna od najčešćih bolesti u svetu, ali i dalje nema dovoljno znanja o etiologiji, prevenciji i tretmanu (Shaw et al., 2010). Mnogi metabolički putevi i molekuli trpe posledice DM2. U zdravom metabolizmu, IGFBP-1 je pod kontrolom insulina i reguliše dostupnost IGF molekula (Westwood et al., 1997; Heald et al., 2002). Pored toga, IGFBP-1 interaguje sa integrinskim receptorima na površini ćelija, što za posledicu ima translokaciju GLUT 4 transportera do ćelijske membrane i podsticanje preuzimanja glukoze (Wheatcroft i Kearney, 2009). Konstatovana je negativna korelacija između koncentracije IGFBP-1 i rizika za nastanak dijabetesa i kardiovaskularnih komplikacija (Petersson et al., 2009; Rajpathak et al., 2012).

Oksidativni stres ima vodeću ulogu u razvoju komplikacija kod dijabetesa (Tiwari et al., 2013). Osobe sa lošom glikemijskom kontrolom imaju povećan stepen gliko-oksidativnog stresa i smanjen antioksidativni kapacitet, što dovodi do brojnih komplikacija (Lodovici et al., 2008; Hisalkar et al., 2012), uključujući i stvaranje AGE vrsta (Singh et al., 2014). Dodatno, direktna oksidacija glukoze indukuje stvaranje reaktivnih karbonilnih vrsta, kao što je MGO, koji modifikuje proteine (Kalapos, 2013; Suh et al., 2014). Pokazano je da je fibrinogen meta intenzivne MGO modifikacije u elastičnim arterijama ljudi (Lund et al., 2011). Spektrofluorimetrijska analiza izvedena u ovoj disertaciji je ustanovila strukturne promene fibrinogena usled DM2 i povećano prisustvo argpirimidina, potvrđujući MGO zavisni put modifikacije.

In vitro eksperimenti sa glukozom i MGO su potvrdili da i neenzimsko glikozilovanje i MGO oksidacija redukuju količinu kompleksa sa IGFBP-1, i da je MGO modifikacija od većeg uticaja. Promene fibrinogena su bile izražajnije *in vitro*, nego *in vivo*, u plazmi osoba sa DM2. Takođe, smanjenje udela kompleksa usled neenzimske glikozilacije je bilo izražajnije u slučaju izolovanog fibrinogena nego u plazmi. Ovaj nalaz nije neočekivan, budući da je fibrinogen osetljiviji na neenzimsko glikozilovanje *in vitro* nego *in vivo* (Austin et al., 1987), kada i drugi proteini plazme, kao što je albumin, dele teret oksidativnog stresa (Kielmas et al., 2013). Koncentracija MGO u ovim eksperimentima je bila višestruko veća od one izmerene *in vivo* (McLellan et al., 1992), ali je ovo bilo neophodno da bi se za kratko vreme (24 h) fibrinogen dovoljno modifikovao (Xu et al., 2012). Takođe, treba imati na umu da u konkretnoj patofiziološkoj situaciji (npr. dijabetesu), čitav spektar modifikujućih

molekula deluje zajedno (slobodni radikali, O- i N-reaktivne vrste), što dovodi do sinergističkih efekata i značajne modifikacije proteina. Eksperimenti sa glukozom i MGO su ukazali samo na jedan od velikog broja puteva koji karakterišu (gliko)oksidativni stres. Izlaganje fibrinogena MGO indukovalo je proteinsko umrežavanje (Lo et al., 1994), što su potvrdili i naši eksperimenti, dok se afinitet prema IGFBP-1 drastično smanjio.

Iako je koncentracija IGFBP-1 bila manja kod pacijenata sa DM2 u odnosu na zdrave osobe (Tabela 7), to nije mogao biti glavni razlog smanjenja količine kompleksa fibrin/IGFBP-1. Prvo, količina IGFBP-1 koja se nalazi u kompleksu sa fibrinogenom predstavlja samo mali deo ukupnog IGFBP-1 (Gligorijević i Nedić, 2016), što znači da se IGFBP-1 u plazmi nalazi u daleko većoj koncentraciji od one koja je u kompleksu sa fibrinogenom. Drugo, razlika relativnih odnosa signala IGFBP-1 i fibrinogena kod osoba sa DM2 i zdravih nije statistički značajna. Na kraju, smanjenje koncentracije IGFBP-1 kod osoba sa DM2 je oko dva puta, dok je smanjenje IGFBP-1 signala u kompleksu sa fibrinom oko šest puta (Tabela 8), što sugeriše da dodatni efekti, a ne samo koncentracija, doprinose smanjenju formiranja kompleksa kod pacijenata sa DM2.

Već je napomenuto da IGFBP-1 može stimulisati proces zarastanja rana zahvaljujući interakciji sa $\alpha_5\beta_1$ integrinom (Galiano et al., 1996), a krvne pločice sadrže ovaj integrin (Podolnikova et al., 2003). Krvne pločice se lakše aktiviraju u slučaju DM2 patologije (Schneider, 2009; Ferreira et al., 2010). Kod njih je promenjena regulacija signalnih puteva, što dovodi do izražajnije adhezije i agregacije. U dijabetesu je smanjen fibrinolitički kapacitet organizma, koji potiče od više faktora, kao što je povećano prisustvo trombina, smanjena aktivacija plazmina i promene strukture fibrinskog ugruška (Kearney et al., 2017). Prema rezultatima opisanim u ovoj disertaciji, dodani IGFBP-1 se oslobađa pri formiranju fibrina kod pacijenata sa DM2 (Gligorijević et al., 2017). Ovaj oslobođeni IGFBP-1 bi mogao biti inicijator aktivacije krvnih pločica, doprinoseći hiperkoagulaciji u dijabetesu (Carr, 2001), zajedno da drugim faktorima. Sposobnost IGFBP-1 da aktivira krvne pločice je tema za dalje istraživanje. Sa druge strane, oslobođeni IGFBP-1 bi mogao ispoljiti i inhibitorno dejstvo na IGF-I. U ovom momentu, sa trenutno dostupnim znanjima, teško je proceniti da li oslobađanje IGFBP-1 iz kompleksa sa fibrinogenom, pri formiranju tromba u dijabetesu, ima pozitivno ili negativno dejstvo.

3.7 Zaključci

- Primenom metode dvostrukog taloženja etanolom dobija se izuzetno prečišćen fibrinogen iz plazme.
- Preparat izolovanog fibrinogena sadrži i komplekse sa IGFBP-1.
- N-glikozilovanje fibrinogena se menja sa starenjem, povećava se ukupni stepen glikozilovanja, što verovatno utiče na skraćenje vremena koagulacije fibrinogena. Intenzivnija (gliko)oksidacija fibrinogena kod zdrave starije populacije nije konstatovana.
- Spektrofluorimetrijskom metodom su detektovane male promene tercijarne strukture fibrinogena sa starenjem, što ukazuje na kompaktniju strukturu molekula fibrinogena.
- Promena količine kompleksa fibrin(ogena) i IGFBP-1 sa starenjem nije nađena, ali je smanjen udeo IGFBP-1 koji formira komplekse. Kako se koncentracija IGFBP-1 značajno povećava sa starenjem, a relativna količina kompleksa se ne menja, moguće je da promene u N-glikozilovanju i konformaciji fibrinogena utiču na smanjenje afiniteta za IGFBP-1.
- Izolovani fibrinogen iz plazme osoba sa cirozom jetre ima povećan stepen karbonilovanja, pre svega na A α lancu.
- Stepem i način N-glikozilovanja fibrinogena u cirozi jetre se menja.
- Konstatovana je promena sekundarne i tercijarne strukture fibrinogena usled ciroze, uporebom CD UV spektrometrije i spektrofluorimetrije.
- Količina kompleksa fibrinogena i IGFBP-1 je značajno veća kod osoba sa cirozom u odnosu na zdrave, ali ne potpuno srazmerno povećanju ukupne koncentracije IGFBP-1, ukazujući na postojanje i drugih faktora koji smanjuju afinitet fibrinogena za IGFBP-1.
- Povećano prisustvo kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 može doprineti trombogenom karakteru fibrinogena u cirozi.
- Dijabetes melitus tipa 2 izaziva promenu tercijarne strukture fibrinogena, koji podleže gliko-oksidaciji stvarajući argpirimidin dejstvom metilglioksala.
- *In vivo* promene fibrinogena kod osoba sa dijabetesom i *in vitro* izazvane dejstvom glukoze i metilglioksala su verovatno istog tipa.

- *In vitro* indukovane modifikacije fibrinogena izazivaju smanjenje količine kompleksa fibrin(ogena) i IGFBP-1.
- U plazmi osoba sa dijabetesom, nema velikog smanjenja količine kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 u odnosu na zdrave ljude, ali prilikom formiranja fibrina se udeo kompleksa značajno smanjuje uz oslobađanje IGFBP-1. Ovako lokalno oslobođeni IGFBP-1, zajedno sa IGF-I, bi mogao dodatno podstaći aktivaciju krvnih pločica ili ćelije endotela, doprineseci hiperkoagulaciji karakterističnoj za dijabetes.
- Iz svih priloženih rezultata se vidi da je fibrinogen podložan strukturnim promenama u raznim (pato)fiziološkim stanjima, a neke od njih su odgovorne za njegovo izmenjeno ponašanje tokom koagulacije. Promena u N-glikozilovanju prati zdravo starenje, ali i izmenjenu sintezu fibrinogena u jetri. Oksidacija fibrinogena nije nužan pratilac starenja, ali jeste stanja povećanog oksidativnog stresa u organizmu, kao što su ciroza jetre i dijabetes. Posttranslacione modifikacije fibrinogena menjaju njegovu konformaciju, a u izvesnim slučajevima i sekundarnu strukturu (udeo alfa heliksa), što zajedno utiče na njegovu funkciju i reaktivnost prema partnerima, kao što je IGFBP-1.
- Dalja istraživanja su neophodna da bi se čvršće povezale pojedine strukturne izmene fibrinogena sa specifičnim fazama njegovog delovanja tokom koagulacije, kao i eventualni značaj kompleksa fibrinogen/IGFBP-1 u hemostazi.

4. Eksperimentalni deo

4.1 Supstancije

Beolab, Beograd, Srbija

Tween-20

Alfapanon, Novi Sad, Srbija

Fovelov reagens

Zorka Pharma, Šabac, Srbija

Metanol

Gvožđe(III)-hlorid

Glicerol

Etanol

Hlorovodonična kiselina

Mangan hlorid

Natrijum hlorid

Natrijum acetat

Natrijum hidroksid

Centrohem, Stara Pazova, Srbija

Glicin

Natrijum dodecilsulfat (SDS)

Amonijum persulfat (APS)

Messer Tehnogas AD, Beograd, Srbija

Ugljen dioksid

Azot

Serva, Hajdelberg, Nemačka

ϵ -aminokaproinska kiselina

Merck, Darmštad, Nemačka

Natrijum dihidrogenfosfat

Natrijum hidrogenfosfat

Glacijalna sirćetna kiselina

Kalcijum hlorid

Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka

Akrilamid

Goveđi serum albumin

Trihlorsirćetna kiselina

N,N'-metilen bisakrilamid

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP)

Ponso S boja

N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED)

Agarozni matriks sa imobilizovanim konkanavalinom A

4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansulfonska kiselina (HEPES)

Coomassie Brilliant Blue R-250 boja

Glutaraldehid

Poliklonska anti-DNP antitela (dobijena u kuniću)

Human GmbH, Visbaden, Nemačka

Humani trombin

Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD

ECL reagens

Komplet za imunoprecipitaciju

Komplet za određivanje koncentracije proteina bicinhoninskom kiselinom

Markeri za SDS elektroforezu

ICN Biomedicals, Kosta Mesa, SAD

Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris)

Natrijum azid

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, SAD

Nitrocelulozna membrana, 0,45 µm, Whatman® Protran®

Vector Laboratories, Berlingam, SAD

HRP-avidin konjugat

Lektini: GSL-II, GNL, MAL-I, HHL, NPL, RCA-I, LCA, AAL, PHA-L, ConA, PhoSL,

SNA, PHA-E, WGA, MAL-II

Poliklonska biotinirovana anti-kozji IgG antitela (sekundarna antitela)

Diagnostic Systems Laboratory, Vebster, SAD

Poliklonska anti-IGFBP-3 antitela (dobijena u kozi)

KODAK, Pariz, Francuska

Rentgen film MXB

Biogenesis, Velika Britanija

Poliklonska anti-IGFBP-2 antitela (dobijena u kuniću)

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, SAD

Poliklonska anti-IGFBP-4 antitela (dobijena u kuniću)

Hemikalije za razvijanje filmova

Abcam, Kembridž, Velika Britanija

ELISA komplet za određivanje koncentracije IGFBP-1

Poliklonska anti-fibrinogenska antitela (dobijena u kuniću)

AbD Serotec, Kidlington, Velika Britanija

Poliklonska anti-IGFBP-1 antitela (dobijena u kozi)

Poliklonska anti- α_2 -makroglobulin antitela (dobijena u kuniću)

Poliklonska anti-zečji IgG antitela konjugovana sa HRP (sekundarna antitela)

4.2 Oprema

Sistem za elektroforezu i blot, Mini-PROTEAN[®] Tetra, Bio-Rad

Sistem za polu-suvi blot, Trans-Blot SD, Bio Rad

pH metar/konduktometar, WTW inoLab 720

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf

Centrifuga 5804 R, Eppendorf

Biohemijski analizator Konelab 20, Thermo Scientific

Filetri za ultrafiltraciju Microcon, Millipore

Magnetna mešalica ARE, Velp

Mešalica PMR-30, Grant-Bio

Analitička vaga B6, Mettler

Tehnička vaga, Chyo

ELISA čitač Victor³V, PerkinElmer

Vorteks ZX3, Velp

Spektrofotometar Ultrospec 2000, Pharmacia

Skenirajući elektronski mikroskop, JSM 6390LV, JEOL

Spektrofluorimetar Fluoromax-4 Jobin Yvon, Horiba Scientific

CD spektrometar J-815, Jasco

Spoter sciFLEXARRAYER S1, Scienion AG

InnoScan[®]710, Innopsys

4.3 Uzorci

Kontrolne grupe uzoraka su namenski pravljene za svaki eksperiment, da bi se po polu i godištu ispitanika iz čijih plazmi je izolovan fibrinogen slagale sa grupom uzoraka koja je poticala od pacijenata. Zdravu grupu ljudi su činile osobe čiji su nalazi osnovnih biohemijskim i hematoloških ispitivanja bili u referentnom opsegu i koji su sebe smatrali zdravim.

Za analizu promena fibrinogena sa starenjem, grupa od 70 zdravih dobrovoljaca je uključena u studiju, u opsegu od 21 do 83 godine.

Grupa osoba sa cirozom jetre se sastojala od 20 pacijenata, u opsegu od 43 do 72 godine. Etiologija nastanka ciroze jetre je bila različita: alkoholna ciroza (n = 17), ciroza usled infekcije hepatitisom C (n = 1) i ciroza sa nepoznatom etiologijom (n = 2). Svi pacijenti su imali dekompenzovanu cirozu, Child score C. Kriterijumi za uključenje pacijenata u studiju su bili odsustvo naslednih poremećaja koagulacije, nedavne infekcije, HIV pozitivan status i malignitet.

Grupa osoba sa DM2 se sastojala od 30 pacijenata u opsegu od 45 do 75 godina. Za ovu grupu su birane osobe sa novootkrivenim nekontrolisanim dijabetesom.

Za uzorke svih navedenih grupa, krv se vadila nakon prekonoćnog gladovanja i odvajana je plazme od ćelija. Jedan deo plazme se koristio za određivanje biohemijskih parametara (osim HbA1c koji se određivao iz pune krvi), a iz ostatka je izolovan fibrinogen.

4.4 Izolovanje fibrinogena

Potrebni rastvori:

Etanol, 53,3 %:

Etanol: 53,3 mL

Voda: do 100 mL

0,8 M acetatni pufer, pH 4,0:

Natrijum acetat: 6,56 g

Voda: do 100 mL

Pufer se pravi tako što se prvo natrijum acetat rastvori u vodi, pH dotitruje glacijalnom kiselinom i dopuni se zapremina do 100 mL, dejonizovanom vodom.

10 mM PBS pufer, pH 7,4:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 0,26 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$: 1,44 g

NaCl: 9 g

Voda: do 1 L

Pufer se dotitruje po potrebi do pH 7,4.

150 mM citratni pufer, pH 6,1:

Na-citrat: 4,41 g

Voda: do 100 mL

Pufer se titruje koncentrovanom hlorovodiničnom kiselinom do pH 6,1.

Krv izvađena u prisustvu antikoagulansa (EDTA ili citrat) je prvo centrifugirana na 3000 o/min na sobnoj temperaturi da bi se odvojila plazma od ćelija krvi. Iz plazme je izolovan fibrinogen metodom taloženja etanolom po publikovanoj proceduri (Cohn et

al., 1946). U 1 mL plazme je dodato 177 μ L hladnog 53,3 % etanola i 1 μ L 0,8 M acetatnog pufera pH 4,0. Ova smeša je blago promešana i ostavljena je u frižideru 1 h. Uzorak je centrifugiran na 10000 o/min, dajući beli talog fibrinogena i supernatant koji je odbačen. Fibrinogeni talog je rastvoren u 1 mL 10 mM PBS i procedura taloženja je ponovljena. Posle druge precipitacije je dobijen veoma čist preparat fibrinogena, koji je rastvoren u PBS i korišćen je za dalji rad. Njegova čistoća je dokazana nativnom i redukujućom SDS elektroforezom i bojenjem proteina sa CBB. Fibrinogen se rastvarao u 10 mM PBS za potrebe lektinskog mikroeseja, jer su u ovom puferu dobijeni čišći i intenzivniji signali. Eksperimentalno je utvrđeno da je fibrinogen stabilniji u citratnom puferu (odnosno duže nema spontane precipitacije), te je u njemu čuvan, a i deo eksperimenata je izveden sa takvim rastvorom. Za analizu koagulacije fibrinogena, citratni pufer je izmenjen dijalizom. Po izolovanju, rastvoreni fibrinogen je čuvan u zamrzivaču na -20 °C do daljeg rada. Pre svakog eksperimenta, izolati fibrinogena su svođeni na željenu koncentraciju proteina.

4.5 Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u preparatima izolovanog fibrinogena se koristio komercijalni reagens koji sadrži bicinhoninsku kiselinu. Za svako određivanje je pravljena standardna prava korišćenjem komercijalnog goveđeg serum albumina. Po dodatku reagensa, reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37 °C i merena je apsorbancija na 531 nm. Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u plazmi se koristila biuretska metoda, dok se fibrinogen u plazmi određivao Fowell-ovim reagensom (Exner et al., 1979). Metoda se radi tako što se 100 μ L citratne plazme pomeša sa 900 μ L Fovelovog reagensa. Slepa proba se pravi od svakog uzorka tako što se plazmi umesto reagensa doda fiziološki rastvor. Nakon tri minuta se meri apsorbancija na 510 nm i određuje koncentracija prema formuli

$$\text{Fibrinogen (g/L)} = A_{510 \text{ nm}} \times F,$$

gde je F faktor koji se određuje na osnovu rastvora ili serije rastvora poznate koncentracije fibrinogena ili plazme sa poznatom koncentracijom fibrinogena u određenoj referentnoj laboratoriji (kontrolna plazma).

4.6 Nativna elektroforeza

Nativna elektroforeza sa uzorcima fibrinogena i fibrina je rađena na 8 % poliakrilamidnom gelu, debljine 1 mm, na standardni način. Sastav gelova za razdvajanje i koncentrovanje je dat u sledećoj tabeli.

Gel za razdvajanje		Gel za koncentrovanje	
Voda	4,7 mL	Voda	3,05 mL
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 mL	0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 mL
30 % akrilamid	2,7 mL	30 % akrilamid	0,65 mL
APS	100 µL	APS	50 µL
TEMED	16 µL	TEMED	50 µL

Pre nanošenja na gel, uzorci su pomešani sa puferom za uzorke za nativnu elektroforezu u odnosu 1:2 i odmah naneti.

Sastav 3 puta koncentrovanog pufera za uzorke za nativnu elektroforezu, pH 6,8:

0,5 M Tris, pH 6,8:	7,5 mL
85 % glicerol:	7,2 mL
Voda:	4,1 mL
0,1 % brom fenol plavo	1,2 mL

Sastav 25 mM Tris pufera za nativnu elektroforezu, pH 8,3:

Tris:	3 g
Glicin:	14,4 g
Voda:	do 1 L

Ovom puferu se ne mora podešavati pH vrednost.

Pufer za elektroforezu se uvek koristio hladan da bi obezbedio hlađenje sistema tokom elektroforeze. Uslovi za elektroforezu su bili sledeći: napon od 80 V dok uzorci ne uđu u gel za razdvajanje, a potom 120 V tokom razdvajanja. Nakon završene elektroforeze, u zavisnosti od daljih eksperimenata, gel je bojen rastvorom CBB-a ili je

rađen transfer na nitroceluloznu membranu i imunoblot (svi postupci su izvođeni na standardni način).

Sastav rastvora za bojenje:

CBB R-250:	0,5 g
Metanol:	500 ml
Sirćetna kiselina:	100 ml
Voda:	do 1 L

Sastav rastvora za fiksiranje:

Metanol:	500 mL
Sirćetna kiselina:	100 mL
Voda:	do 1 L

7 % rastvor sirćetne kiseline:

Sirćetna kiselina:	7 mL
Voda:	do 100 mL

Prilikom bojenja, gel je prvo bojen rastvorom za bojenje, 15 min, a potom obezbojavan rastvorom za fiksiranje, tri puta po 5 min i 7 % sirćetnom kiselinom.

4.7 Redukujuća SDS elektroforeza

Redukujuća SDS elektroforeza je rađena po istom principu kao i nativna, s tom razlikom što je prilikom pravljenja gelova i pufera za elektroforezu dodavan SDS u finalnoj koncentraciji od 0,1 %. Takođe je i pufer za pripremu uzoraka imao u svom sastavu SDS i β -merkaptetanol.

Sastav tri puta koncentrovanog pufera za uzorke za redukujuću SDS elektroforezu, pH

6,8:

2 M Tris, pH 6,8:	7,5 mL
SDS:	1,2 g
85 % glicerol:	7,2 mL
5 % β -merkaptoetanol	3 mL
0,1 % brom fenol plavo:	1,2 mL
Voda:	do 20 mL

Uzorci su pomešani sa puferom za uzorke u zapreminskom odnosu 2:1 (uzorak : pufer), a potom kuvani na 100 °C, 10 min u termobloku. Uslovi za elektroforezu su bili sledeći: napon od 80 V do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje, a zatim 150 V. Gelovi su dalje bojani CBB-om ili su proteini prenošeni na membranu.

4.8 Imunoblot analiza

Pufer za blot, 25 mM Tris, pH 8,3:

Tris:	3 g
Glicin:	14,4 g
Metanol:	200 mL
Voda:	do 1 L

Ovom puferu se ne podešava pH vrednost.

10 puta koncentrovani TBST pufer, 100 mM Tris, pH 7.4:

Tris:	12,1 g
NaCl:	87 g
Tween 20:	10 mL
Voda:	do 1 L

Ovom puferu se pH podešava koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom pre dodatka Tween-a. Radni pufer se pravi tako što se koncentrovani razblaži deset puta dejonizovanom vodom.

5 % sirćetna kiselina:

Sirćetna kiselina: 5 mL
Voda: do 100 mL

Rastvor Ponso S boje:

Ponso S: 0,1 g
5 % sirćetna kiselina: do 100 mL

5 % posno mleko:

Odmašćeno mleko: 5 g
TBST pufer: 100 mL

Od ove suspenzije je pravljeno 1 % posno mleko u TBST puferu.

Rastvor avidina:

Avidin: 1 μ L
TBST pufer: 50 mL

ECL reagens:

Pravljen prema upustu proizvođača.

Pufer za stripovanje membrane pH 2,2:

Glicin: 1,5 g
SDS: 0,1 g
Tween 20: 1 mL
Voda: do 100 mL

Ovom puferu se pH doteruje koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom pre dodavanja Tween-a.

Za potrebe imunoblota, proteini razdvojeni elektroforezom su preneti na nitroceluloznu membranu, mokrim ili polu-suvim transferom. U tu svrhu, gel je nakon elektroforeze prvo inkubiran u puferu za blot, 10 min. Potom je pravljjen sendvič za transfer po sledećem redosledu: papir za hromatografiju, gel, membrana i na kraju ponovo papir za hromatografiju. Ovako sklopljen sendvič je stavljen u bloter vodeći računa da membrana bude okrenuta ka anodi. Uslovi transfera su bili sledeći: napon od 20 V, trajanje 1 h. Po završenom transferu, proteini na membrani su prvo detektovani Ponso S bojom. Nevezana mesta na membrani su blokirana u rastvoru 5 % posnog mleka i dalje je rađen imunoblot preko noći na 4 °C sa odgovarajućim antitelima (u 1 % rastvoru obezmašćenog mleka). Za svako antitelo je eksperimentalno optimizovano razblaženje. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom i detaljnog ispiranja u 10 mM TBS puferu koji sadrži 1 % TWEEN 20 (TBST), membrana je inkubirana sa odgovarajućim sekundarnim antitelima, 30 min na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje. I razblaženje sekundarnih antitela je optimizovano. Nakon detaljnog ispiranja, ukoliko su sekundarna antitela bila obeležena sa HRP, membrana je direktno inkubirana u rastvoru ECL (3 do 5 min). U slučaju sekundarnih antitela obeleženih biotinom, membrana je inkubirana u rastvoru avidina (1 h na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje), ispirana i inkubirana u rastvoru ECL. Za detekciju reaktivnih vrsta korišćena je metoda autoradiografije na rendgen filmu. Za razvijanje filmova su primenjeni komercijalni rastvori, a postupak je bio standardan. Dužina ekspozicije filma je varirala u zavisnosti od jačine signala. Intenzitet signala na filmu je kvantifikovan denzitometrijski, upotrebom Image TotalLab softvera.

U eksperimentima u kojima je namera bila da se detektuje prisustvo više različitih proteina na istoj membrani metodom imunoblota, membrana je nakon prvog imunoblota „stripovana“, odnosno „oguljeni“ su proteini fizičko-hemijskim putem. Primenjena procedura je bila sledeća: membrana je inkubirana dva puta po 10 min u 200 mM Glicin/HCl puferu pH 2,2, zatim dva puta po 10 min u 50 mM PBS pH 7,4 i dva puta po 5 min u 50 mM TBST pH 7,4. Membrane je ponovo blokirana u 5 % posnom mleku i dalje inkubirana u rastvoru primarnog antitela, kako je već opisano.

4.9 Imunoprecipitacija kompleksa fibrinogena i IGFBP-1

Pufer za neutralizaciju, 2 M Tris, pH 8,9

Tris: 4,84 g
Voda: do 20 mL

Ovom pufer se pH doteruje koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom po potrebi.

Za imunoprecipitaciju je korišćen komercijalni komplet. Svi rastvori, osim pufera za neutralizaciju, su se nalazili u kompletu. Celokupan postupak je izvođen u kolonama za centrifugiranje, a svako centrifugiranje je izvedeno na 2000 x g 30 sek. Za 50 µL suspenzije matriksa (AminoLink[®]Plus smola za kuplovanje) je vezano po 5 µg primarnih antitela (anti-fibrinogenska ili anti-IGFBP-1). Matriks je, nakon intenzivnog ispiranja, inkubiran sa 200 µL preparata fibrinogena, koncentracije 0,4 g/L. Nakon inkubacije preko noći na 4 °C, matriks je intenzivno ispran 50 mM PBS puferom (osam puta). Vezani proteini su eluirani sa 110 µL pufera za eluiranje pH 2,5 (10 + 50 + 50 µL) i odmah neutralisani sa 2 µL 2 M Tris pufera pH 8,9. Ovako dobijeni eluati su dalje analizirani imunoblotom sa anti-fibrinogenkim ili anti-IGFBP-1 antitelom.

4.10 Lektinska afinitetna hromatografija

Sastav osnovnog pufera za lektinsku afinitetnu hromatografiju, 20 mM HEPES, pH 7,5:

HEPES x 0,5 Na: 0,49 g
NaCl: 0,9 g
CaCl₂: 0,011 g
MgCl₂: 0,009 g
MnCl₂: 0,013 g
Voda: do 100 mL

Pufer za eluciju, 50 mM acetat, pH 5,0:

Natrijum acetat:	0,41 g
NaCl:	5,85 g
Voda:	do 100 mL

Lektinska afinitetna hromatografija sa imobilizovanim konkanavalinom A na agarozu je rađena sa 2 mL matriksa i 1 mL uzorka fibrinogena koncentracije 0,4 g/L, koji je prethodno dijalizovan spram osnovnog pufera. Uzorak je recirkulisan kroz Con A kolonu 1 h na sobnoj temperaturi, a potom je kolona ostavljena u frižideru preko noći. Po završenoj inkubaciji, kolona je intenzivno isprana osnovnim puferom (30 mL), a vezani proteini su eluirani sa 15 mL 50 mM acetatnog pufera pH 5,0 i neutralisani 2 M Tris puferom pH 8,9. Skupljane su frakcije od 1 mL i analizirane imunoblotom.

4.11 Stvaranje i analiza fibrinskog monomera

Fiziološki rastvor sa 2,2 mM CaCl₂ pH 7,4:

NaCl:	9 g
CaCl ₂ :	0,244 g
Voda:	do 1 L

Pošto ovaj rastvor nije puferisan, pH se pažljivo podešava.

Sastav pufera za koagulaciju fibrinogena, 50 mM, pH 7,5:

Tris:	6,05 g
NaCl:	9 g
CaCl ₂ :	0,277 g
Jodoacetamid:	0,5 g
ε-Aminokaproinska kiselina:	5 g
Voda:	do 1 L

Ovom puferu se pH doteruje koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom.

Humani trombin (Human), 10 IU/mL:

Liofilizat se rastvara po uputstvu proizvođača.

20 mM sirćetna kiselina:

Sirćetna kiselina:	115 µL
Voda:	do 100 mL

50 mM PBS pH 7,4:

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O:	1,31 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O:	7,21 g
NaCl:	9 g
Voda:	do 1L

Ovom puferu se pH doteruje po potrebi do 7,4.

Za dobijanje i analizu fibrina su korišćena dva pristupa. U prvom postupku je plazma, u kojoj se nalazila EDTA kao antikoagulans, dijalizovana spram fiziološkog rastvora pH 7,4, koji je sadržao 2,2 mM kalcijum hlorid, tokom 4 h. Uklanjanje EDTA iz uzorka je pokrenulo stvaranje fibrina. Nastali fibrin se taložio centrifugiranjem na 3000 o/min i ispirao više puta sa 50 mM PBS pH 7,4. Fibrin je dalje homogenizovan teflonskim homogenizatorom, tokom 1 min u 50 mM PBS, centrifugiran i supernatant je korišćen za dalju analizu.

Druga metoda (koja se pokazala efikasnijom i lakšom za rad) je primenjena direktno na izolovani fibrinogen; u 1 mL preparata koncentracije 1 g/L dodato je 1 IU humanog trombina. Reakcija je izvođena u puferu za koagulaciju. Po dodatku trombina, smeša je inkubirana na 37 °C preko noći, a nastali fibrin je intenzivno ispiran istim puferom i rastvoren dodatkom 20 mM sirćetne kiseline. Prilikom pripreme uzorka fibrina za elektroforetsku analizu i nanošenja na gel, treba raditi brzo, jer sa povećanjem pH rastvora, fibrin počinje ponovo da polimerizuje.

4.12 Određivanje karbonila proteina plazme, izolovanog fibrinogena i analiza podložnosti lanaca fibrinogena na oksidaciju (karbonilovanje)

10 % TCA:

TCA:	10 g
Voda:	do 100 mL

2 M HCl:

Koncentrovana HCl:	16,43 mL
Voda:	do 100 mL

10 mM DNPH u 2 M HCl:

DNPH:	0,0396 g
2 M HCl:	20 mL

DNPH se teško rastvara.

80 mM fosfatni pufer, pH 8,0:

Na ₂ HPO ₄ :	1,14 g
Voda:	do 100 mL

Pufer se pravi tako što se prvo so rastvori u maloj količini vode, rastvor dotitruje koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom do pH 8,0 i dopuni vodom do potrebne zapremine.

Pufer za rastvaranje:

SDS:	2 g
EDTA:	0,05 g
80 mM fosftani pufer:	do 100 mL

Za određivanje proteinskih karbonila je svaki uzorak imao svoju slepu probu naspram koje je merena apsorbancija derivatizovanih proteina. Slepa proba se

pripremala na isti način kao i derivatizovan uzorak, stoma razlikom što je bio izostavljen DNP. Procedura se izvodila na sledeći način:

- plazma je razblažena dejonizovanom vodom do koncentracije proteina od 10 g/L,
- u 500 μ L razblažene plazme dodato je 250 μ L 10 % rastvora TCA; jedan alikvot plazme je korišćen za slepu probu, a drugi za derivatizaciju,
- smeša je centrifugirana na 1500 x g 5 min i supernatant odbačen,
- za derivatizaciju, talogu je dodato 250 μ L 10 mM DNP rastvorenog u 2 M HCl; slepoj probi je dodata samo 2 M HCl,
- suspenzija je mešana na vorteksu tokom 30 min inkubacije,
- smeši je dodato 500 μ L 10 % TCA,
- staloženi proteini su odvojeni centrifugiranjem na 1500 x g 5 min, a supernatant je odbačen,
- talog je ispiran dva puta sa po 1 mL smeše etanol : etilacetat (1:1),
- talog je rastvoren u 1,5 mL 2 % SDS u 80 mM fosfatnom puferu pH 8,0, inkubiranjem na 37 °C 20 min uz povremeno mešanje na vorteksu,
- apsorbcija rastvora svakog derivatizovanog uzorka je merena na 375 nm naspram sopstvene slepe probe.

Za računanje koncentracije karbonila je korišćen ekstinkcioni koeficijent 22000 $M^{-1}cm^{-1}$. Sadržaj karbonila je izražen u nmol po mg proteina.

Za određivanje karbonila na izolovanom fibrinogenu je korišćen isti pristup, ali su koncentracije i zapremine dodanih reagenasa smanjene, srazmerno polaznom uzorku koji je bio 150 μ L rastvora fibrinogena, koncentracije 2 g/L. Osim spektrofotometrijski, sadržaj karbonila na fibrinogenu je određivan i imunoblotom sa anti-DNP antitelom. Intenzitet signala je kvantifikovan denzitometrijski, upotrebom Image TotalLab softvera.

4.13 Analiza glikozilovanja fibrinogena metodom lektinskog mikroeseja

Izolovani fibrinogen (0,1 g/L u 10 mM PBS pH 7,4) je nanet na ploču Nexterion E, koristeći uređaj sciFLEXARRAYER S1 („spotter“) i kapilaru PDC 90. Naneto je po 480 pL uzorka u triplikatu u specijalnoj komori pri temperaturi od 10 °C i vlažnosti vazduha od 50 %. Nakon inkubiranja uzorka na 4 °C 2 h, neizreagovale epoksidne grupe na ploči su blokirane rastvorom 3 % goveđeg serum albumina tokom 1 h. Ploča je

intenzivno isprana sa 50 mM PBST i 15 biotinizovanih lektina u PBST je testirano u različitim koncentracijama (10 – 200 mg/L). Koncentracija od 25 mg/L se pokazala kao optimalna za sve lektine i dalje je ona korišćena. Posle inkubiranja sa lektinima 1 h, ploča je intenzivno isprana sa PBST i dodat je CF647-konjugovani streptavidin u koncentraciji od 0,5 mg/L. Inkubiranje sa streptavidinom je trajalo 15 min na sobnoj temperaturi, ploča je intenzivno isprana sa PBST i destilovanom vodom, osušena i skenirana u InnoScan[®]710 laserskom fluorescentnom skeneru na talasnoj dužini od 635 nm. Dobijene slike i izmereni intenziteti fluorescencije su obrađeni Mapix 5.5.0 softverom. Specifičnom interakcijom su smatrani signali čija je jačina bila bar tri puta veća od pozadinskog signala.

4.14 Test koagulacije

Rekcija se izvodila u duplikatu u mikrotitracionoj ploči, tako što je izolovanom fibrinogenu (180 µL) koncentracije 0,8 g/L dodato 0,1 IU humanog trombina. Fibrinogenu je pre dodavanja trombina, dijalizom izmenjen osnovni pufer puferom za koagulaciju. Odmah po dodatku trombina, ploča je stavljena u Victor³V ELISA čitač i na svakih 10 sek je merena apsorbancija na 350 nm. Rezultati su obrađeni sa dobijene slike zavisnosti $A = f(t)$. Vreme koagulacije je vreme za koje se dostigne polovina maksimalne apsorbancije. Brzina koagulacije je merena u početnom, lineranom delu rasta apsorbancije, dok je maksimalna promena apsorbancije očitavana tako što se od krajnje, maksimalne apsorbancije oduzimala početna. Za maksimalnu apsorbanciju se uzimala ona koja se više nije menjala sa vremenom.

4.15 Određivanje poroznosti fibrina

U silikonsko crevo prečnika 2,4 mm, koje je povezano sa špricom (rezervoarom vode) zapremine 5 mL, je dodato 100 µL reakcione smeše za stvaranje fibrina koja se sastojala od 2 g/L fibrinogena rastvorenog u 10 mM PBS, 2,5 mM kalcijum hlorida i 0,1 IU humanog trombina. Po homogenizaciji, reakciona smeša je brzo prenetu u crevo, koje je ostavljeno na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori tokom 3 h. Nakon stvaranja fibrinskog gela, špric je napunjen vodom i merena je zapremina vode koja je protekla za 2 h pri konstantnom hidrostatičkom pritisku. Darsijeva konstanta je izračunata po sledećoj formuli:

$$\text{Darsijeva konstanta} = \frac{Q \cdot L \cdot \eta}{t \cdot A \cdot P}$$

gde je Q zapremina tečnosti (mL) koja ima viskoznost η (P) i prolazi kroz fibrinski gel dužine L (cm) i poprečnog preseka A (cm²), tokom vremena t (sek) pod konstantnim hidrostatičkim pritiskom P (dyn/cm²). Darsijeva konstanta se izražava u cm².

4.16 Skenirajuća elektronska mikroskopija fibrina

2 % glutaralhid:

25 % glutaralhid: 1,6 mL

Pufer za koagulaciju: do 20 mL

30 % etanol:

Apsolutni etanol: 30 mL

Voda: 70 mL

50 % etanol:

Apsolutni etanol: 50 mL

Voda: 50 mL

70 % etanol:

Apsolutni etanol: 70 mL

Voda: 30 mL

U 100 μ L uzoraka fibrinogena koncentracije 1 g/L u puferu za koagulaciju je dodato 0,1 IU humanog trombina. Smeša je ostavljena preko noći u vlažnoj komori. Nastali fibrin je intenzivno ispran sa 10 mM PBS i fiksiran preko noći 2 % rastvorom glutaraldehida u puferu za koagulaciju na 4 °C. Nakon ispiranja u 10 mM PBS, uzorak je postepeno dehidratiran rastvorima etanola koncentracija 30, 50, 70, 96 % i, na kraju, dva puta apsolutnim etanolom. U svakom rastvoru za dehidrataciju, fibrin je inkubiran 4 h. Kada je apsolutni etanol drugi put dodat, inkubiranje je trajalo preko noći. Fibrin je osušen metodom kritičke tačke sušenja i sniman skenirajućim elektronskim mikroskopom. Dobijene slike su analizirane ImageJ softverom.

4.17 Spektrofluorimetrijska analiza fibrinogena

Spektri izolovanog fibrinogena su dobijeni na FluoroMax[®]-4 spektrofluorimetru, sa širinom ekscitacionog i emisionog otvora od 4 ili 5 nm. Spektri su snimljeni u dva opsega: 290-400 nm nakon ekscitacije na 280 nm, za Tyr i 310-400 nm nakon ekscitacije na 295 nm, za Trp (Ghisaidoobe and Chung, 2014). Za detekciju argpirimidina su snimljeni spektri u opsegu talasne dužine 335-450 nm nakon ekscitacije na 330 nm (Shipanova et al., 1997). Svaki spektar je snimljen dva puta, uprosečen i oduzet je spektar slepe probe (pufer). Za analizu fibrinogena u odeljcima 3.4, 3.5 i 3.6 su korišćeni redom rastvori koncentracija 100, 40 i 15 nM u 10 mM PBS puferu.

4.18 CD spektrometrijska analiza fibrinogena

Analiza izolovanog fibrinogena, koncentracije 1 μ M je rađena na Jasco J-815 spektropolarimetru. Daleki UV CD spektri su snimljeni u opsegu talasnih dužina 185-260 nm, pri brzini skeniranja od 50 nm/min, korišćenjem kivete sa dužinom optičkog puta od 0,1 mm. Za svaki uzorak su urađena tri skeniranja. Bliski UV CD spektri istih

rastvora su snimljeni u opsegu talasnih dužina 250-350 nm, pri brzini skeniranja od 50 nm/min, korišćenjem kivete sa optičkom dužinom od 10 mm (dva skeniranja za svaki uzorak). Dobijeni spektri su uprosečeni i oduzet je spektar slepe probe (pufer).

4.19 Modifikacija plazme i fibrinogena *in vitro* glukozom i metilglioksalom

20 mM rastvor glukoze:

Glukoza: 0,18 g

Voda: 50 mL

900 mM metilglioksal:

Metilglioksal, 5,55 M štok: 81,17 mL

Voda: 418,83 mL

Uzorci plazme i izolovanog fibrinogena su razblaženi u 150 mM citratnom puferu pH 6,1 do koncentracije proteina od 2,5 g/L i dodata im je glukoza u finalnoj koncentraciji od 20 mM. Reakcione smeše su inkubirane na 37 °C, tokom 4 dana. Svakog dana je uziman alikvot iz oba uzorka i čuvan je na -20 °C. Četvrtog dana, kada je uzet poslednji alikvot, uzorci su analizirani nativnom elektroforezom i imunoblotom.

Za modifikaciju metilglioksalom, plazma i fibrinogen su svedeni u 150 mM citratom puferu pH 6,1 do koncentracije proteina od 3 g/L. Metilglioksal je dodat u finalnoj koncentraciji od 1 ili 9 mM i reakciona smeša je inkubirana na 37 °C tokom 24 h. Alikvoti su uzimani nakon 2, 4, 6 i 24 h. Po uzimanju alikvota, fibrinogen iz plazme i iz preparata izolovanog fibrinogena je odmah precipitiran etanolom (poglavlje 4.4), intenzivno ispiran korišćenjem filtera za centrifugiranje sa porama od 50 kDa i analiziran nativnom elektroforezom i imunoblotom.

4.20 Inkubiranje fibrinogena sa rekombinantnim humanim IGFBP-1

Izolovani fibrinogen (1 mL koncentracije 30 mg/L) je inkubiran sa rekombinantnim humanim IGFBP-1 (1 µg) u 150 mM citratnom puferu pH 6,1, preko noći na 4 °C. Nakon toga je uzet alikvot, a ostatak je tretiran sa 9 mM MGO, kao što je već opisano. Druga dva alikvota su uzeta nakon 2 i 4 h inkubacije sa MGO. Svi uzorci su dalje analizirani nativnom elektroforezom i imunoblotom.

5. Reference

- Adamczyk B, Struwe WB, Ercan A, Nigrovic PA, Rudd PM. Characterisation of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. *J. Proteome Res.* 2013, **12**, 444-454.
- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, **1833**, 2430-2437.
- Aghdam SY, Eming SA, Willenborg S, Neuhaus B, Niessen CM, Partridge L, Krieg T, Bruning JC. Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, **421**, 197-202.
- Al-Fakhri N, Wilhelm J, Hahn M, Heidt M, Hehrlein FW, Endisch AM, Hupp T, Cherian SM, Bobryshev, Lord RSA, Katz N. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ in atherosclerosis. *J. Cell. Biochem.* 2003, **89**, 808-823.
- Andress DL. Heparin modulates the binding of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 to a membrane protein in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 28289-28296.
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol.* 2011, **48**, 1-9.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, **1473**, 4-8.
- Arakawa Y, Moriyama M, Arakawa Y. Liver cirrhosis and metabolism (sugar, protein, fat and trace elements). *Hepatol. Res.* 2004, **30S**, S46-S58.
- Austin GE, Mullins RH, Morin LG. Non-enzymic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients. *Clin. Chem.* 1987, **33**, 2220-2224.
- Awasthi S, Murugan Arul N, Saraswathi NT. Advanced glycation end products modulate structure and drug binding properties of albumin. *Mol. Pharmaceutics* 2015, **12**, 3312-3322.
- Baig MH, Jan AT, Rabbani G, Ahmad K, Ashraf JM, Kim T, Min HS, Lee YH, Cho W-K, Ma JY, Lee EJ, Choi I. Methylglyoxal and advanced glycation end products: insight of the regulatory machinery affecting the myogenic program and of its modulation by natural compounds. *Sci. Rep.* 2017, **7**:5916.

- Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A, Dake BL, Booth BA. Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990, **127**, 497-499.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 2004, **63**, 582-592.
- Baxter R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Endocrinol. Metab.* 2000, **278**, E967-E976.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999, **48**, 1-9.
- Beattie J, Phillips K, Shand JH, Szymanowska M, Flint DJ, Allan GJ. Molecular recognition characteristics in the insulin-like growth factor (IGF)-insulin-like growth factor binding protein -3/5 (IGFBP-3/5) heparin axis. *J. Mol. Endocrinol.* 2005, **34**, 163-175.
- Becatti M, Marcucci R, Bruschi G, Taddei N, Bani D, Gori AM, Giusti B, Gensini GF, Abbate R, Fiorillo C. Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014, **34**, 1355-1361.
- Benbassat CA, Maki KC, Unterman TG. Circulating levels of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate levels and anthropometric measures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, **82**, 1484-1491.
- Bhattacharjee P, Bhattacharyya D. 2014. An insight into the abnormal fibrin clots - its pathophysiological roles. In Kolev K. (Ed.), *Fibrinolysis and thrombolysis* (1st edition). Rijeka, Croatia: IN TECH.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J.* 2012, **5**, 9-19.
- Bok RA, Mangel WF. Quantitative characterization of the binding of plasminogen to intact fibrin clots, lysine-sepharose, and fibrin cleaved by plasmin. *Biochemistry* 1985, **24**, 3279-3286.
- Brandt K, Grünler J, Brismar K, Wang J. Effects of IGFBP-1 and IGFBP-2 and their fragments on migration and IGF-induced proliferation of human dermal fibroblasts. *Growth Horm. IGF Res.* 2015, **25**, 34-40.

- Brass EP, Forman WB, Edwards RV, Lindan O. Fibrin formation: effect of calcium ions. *Blood* 1978, **52**, 654-658.
- Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 85-90.
- Brunngraber EG, Webster JC. Changes in glycoprotein carbohydrate content in the aging human brain. *Neurochem. Res.* 1986, **11**, 579-588.
- Buresi M, Hull R, Coffin CS. Venous thromboembolism in cirrhosis: a review of the literature. *Can. J. Gastroenterol.* 2012, **26**, 905-908.
- Butenas S, Orfeo T, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Tissue factor in thrombosis and hemorrhage. *Surgery* 2007, **142**, S2-S14.
- Butt AJ, Williams AC. IGFBP-3 and apoptosis-a licence to kill? *Apoptosis* 2001, **6**, 199-205.
- Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 30215-30221.
- Cappelletti RM. 2012. Fibrinogen and fibrin: structure and functional aspects. In Stief T. (Ed.), *Thrombin: function and pathophysiology* (1st edition). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Carr ME. Diabetes mellitus. A hypercoagulable state. *J. Diabetes Compl.* 2001, **15**, 44-54.
- Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014, **20**, 8082-8091.
- Clemmons DR. Role of IGF binding proteins in regulating metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016, **27**, 375-391.
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Jr., Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 1946, **68**, 459-475.
- Connelly MA, Gruppen EG, Otvos JD, Dullaart RPF. Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. *Clin. Chim. Acta* 2016, **459**, 177-186.
- Conover CA, Lee PDK, Lawrence Riggs B, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-1 expression in cultured human bone cells: regulation by insulin and glucocorticoid. *Endocrinology* 1996, **137**, 3295-3301.

- Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012, **23**, 399-406.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 2003, **329**, 23-38.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, **39**, 67-101.
- Dang CV, Shin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 15104-15108.
- de Maat MPM, Nieuwenhuizen W, Knot EAR, van Buuren HR, Swart Roel G. Measuring plasma fibrinogen levels in patients with liver cirrhosis. The occurrence of proteolytic fibrin(ogen) degradation products and their influence on several fibrinogen assays. *Thromb. Res.* 1995, **78**, 353-362.
- de Maat MPM, Verschuur M, Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited. *Curr. Opin. Hematol.* 2005, **12**, 377-383.
- de Willige SU, de Visser MCH, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen γ' levels. *Blood*, 2005, **106**, 4176-4183.
- DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJG, Jacobs KMG, Van El B, Van Roermund PM, Bank RA, Bijlsma JWJ, TeKoppele JM, Lafeber FPJG. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004, **50**, 1207-1215.
- Delafontaine P. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 1995, **30**, 825-834.
- Domingues MM, Macrae FL, Duval C, McPherson HR, Bridge KI, Ajjan RA, Ridger VC, Connell SD, Philippou H, Ariëns RAS, Thrombin and fibrinogen γ' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood* 2016, **127**, 487-495.
- Donaghy A, Ross R, Gimson A, Hughes SC, Holly J, Williams R. Growth hormone, insulinlike growth factor-1, and insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 in chronic liver disease. *Hepatology* 1995, **21**, 680-688.
- Dowd P, Ham S-W, Naganathan S, Hershline R. The mechanism of action of vitamin K. *Annu. Rev. Nutr.* 1995, **15**, 419-440.

Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005, **142**, 44-52.

Dunn EJ, Ariëns RAS, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia*, 2005, **48**, 1198-1206.

Dunn EJ, Philippou H, Ariëns RAS, Grant PJ. Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006, **49**, 1071-1080.

Durham SK, Lawrence Riggs B, Conover CA. The insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4)-IGFBP-4 protease system in normal human osteoblast-like cells: regulation by transforming growth factor- β^* . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994, **79**, 1752-1758.

Emmerson E, Campbell L, Davies FCJ, Ross NL, Ashcroft GS, Krust A, Chambon P, Hardman MJ. Insulin-like growth factor-1 promotes wound healing in estrogen-deprived mice: new insights into cutaneous IGF-1R/ER α cross talk. *J. Invest. Dermatol.* 2012, **132**, 2838-2848.

Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br. J. Haematol.* 2005, **131**, 417-430.

Exner T, Burridge J, Power P, Rickard K. An evaluation of currently available methods for plasma fibrinogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979, **71**, 521-527.

Ezzat VA, Duncan ER, Wheatcroft SB, Kearney MT. The role of IGF-I and its binding proteins in the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Obes. Metab.* 2008, **10**, 198-211.

Favaloro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age-a narrative review. *Semin. Thromb. Hemost.* 2014, **40**, 621-633.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 2014, **33**, 79-97.

Ferreiro JL, Gomez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2010, **7**, 251-259.

Firth SM, Baxter RC. Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Endocrinol.* 1999, **160**, 379-387.

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 2002, **23**, 824-854.

Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Jaeken J, Mills P, Winchester B, Krieger M, Annaert W, Matthijs G. Conserved oligomeric Golgi

complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, **103**, 3764-3769.

Franchini M. Hemostasis and aging. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006, **60**, 144-151.

Fredenburgh JC, Stafford AR, Leslie BA, Weitz JI. Bivalent binding to γ A/ γ '-fibrin engages both exosites of thrombin and protects it from inhibition by the antithrombin-heparin complex. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 2470-2477.

Frommer KW, Reichenmiller K, Schutt BS, Hoeflich A, Ranke MB, Dodt G, Elmlinger MW. IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J. Mol. Endocrinol.* 2006, **37**, 13-23.

Fu Y, Zhang J-Z, Redman CM, Grieninger G. Formation of the human fibrinogen subclass Fib₄₂₀: disulfide bonds and glycosylation in its unique (α_E chain) domains. *Blood* 1998, **92**, 3302-3308.

Galiano RD, Zhao LL, Clemmons DR, Roth SI, Lin X, Mustoe TA. Interaction between the insulin-like growth factor family and the integrin receptor family in tissue repair processes. *J. Clin. Invest.* 1996, **98**, 2462-2468.

Gerhardt A, Greenberg A, Reilly JJ, Van Thiel DH. Hypercalcemia. A complication of advanced chronic liver disease. *Arch. Intern. Med.* 1987, **147**, 274-277.

Ghisaidoobe ABT, Chung SJ. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, **15**, 22518-22538.

Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Rad. Res.* 2006, **40**, 495-505.

Gleeson LM, Chakraborty C, Mckinnon T, Lala PK. Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through $\alpha 5\beta 1$ integrin via mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, **86**, 2484-2493.

Gligorijević N, Nedić O. Interaction between fibrinogen and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human plasma under physiological conditions. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, **81**, 231-237.

Gligorijević N, Penezić A, Nedić O. Influence of glyco-oxidation on complexes between fibrin(ogen) and insulin-like growth factor-binding protein-1 with diabetes mellitus type 2. *Free Rad. Res.* 2017, **51**, 64-72.

- Gligorijević N, Zámorová Križáková M, Penezić A, Katrlík, Nedić O. Structural and functional changes of fibrinogen due to aging. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018a, **108**, 1028-1034.
- Gligorijević N, Minić S, Križáková M, Katrlík J, Nedić O. Structural changes of fibrinogen as a consequence of cirrhosis. *Thromb. Res.* 2018b, **166**, 43-49.
- Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A, Libman I, Lerner HT, Trakhtenberg S, Martín-Belloso O. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J. Protein Chem.* 2000, **19**, 637-642.
- Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet physiology. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016, **42**, 191-204.
- Griffiths HR. Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 2008, **7**, 544-549.
- Gupta MB. The role and regulation of IGFBP-1 phosphorylation in fetal growth restriction. *J. Cell Commun. Signal.* 2015, **9**, 111-123.
- Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-I and EGF-dependent signaling pathways. *J. Cell Sci.* 2003, **116**, 3227-3238.
- Hager K, Seefried G, Felicetti M, Platt D. Plasma fibrinogen- are there age-dependent changes? *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1994, **19**, 99-106.
- Haglund AC, Ronquist G, Frithz G, Ek P. Alteration of the fibrinogen molecule and its phosphorylation state in myocardial infarction patients undergoing thrombolytic treatment. *Thromb. Res.* 2000, **98**, 147-156.
- Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation and products in aging human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2007, **103**, 2068-2076.
- Haywood NJ, Cordell PA, Tang KY, Makova N, Yuldasheva NY, Imrie H, Viswambharan H, Burns AF, Cubbon RM, Kearney MT, Wheatcroft SB. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 could through its RGD domain improve glucose regulation and insulin sensitivity. *Diabetes* 2017, **66**, 287-299.
- Heald AH, Cruickshank JK, Riste LK, Cade JE, Anderson S, Greenhalgh A, Sampayo J, Taylor W, Fraser W, White A, Gibson JM. Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations. *Diabetologia* 2001, **44**, 333-339.

- Heald AH, Siddals KW, Fraser W, Taylor W, Kaushal K, Morris J, Young RJ, White A, Martin Gibson J. Low circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) are closely associated with the presence of macrovascular disease and hypertension in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, **51**, 2629-2636.
- Hers I. Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3K α pathway. *Blood* 2007, **110**, 4243-4252.
- Hisalkar PJ, Patne AB, Karnik AC, Fawade MM, Mumbare SS. Ferric reducing ability of plasma with lipid peroxidation in type 2 diabetes. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2012, **2**, 53-56.
- Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.* 2001, **61**, 8601-8610.
- Hoeflich A, Russo VC. Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2-consensus and dissent metabolic and control and malignant potential. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015, **29**, 685-700.
- Hoffmann M, Marx K, Reichl U, Wuhrer M, Rapp E. Site-specific O-glycosylation analysis of human blood plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2016, **15**, 624-641.
- Hong J, Zhang G, Dong F, Rechler MM. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 10489-10497.
- Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 1982, **257**, 2912-2919.
- Hsieh T, Gordon RE, Clemmons DR, Busby WH, Duan C. Regulation of vascular smooth muscle cell responses to insulin-like growth factor (IGF)-I by local IGF-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 42886-42892.
- Huang S, Mulvihill ER, Farrell DH, Chung DW, Davie EW. Biosynthesis of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 8919-8926.
- Huang L, Lord ST. The isolation of fibrinogen monomer dramatically influences fibrin polymerization. *Thromb. Res.* 2013, **131**, 258-263.
- Hugenholtz GCG, Macrae F, Adelmeijer J, Dulfer S, Porte RJ, Lisman T, Ariëns RAS. Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen. *J. Thromb. Haemost.* 2016, **14**, 1054-1066.

- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 1999, **20**, 761-787.
- Hwang DL, Huang S-P, Lan W-S, Lee PDK. Elevated insulin, proinsulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in liver disease. *Growth Horm. IGF Res.* 2003, **13**, 316-321.
- Iino M, Takeya H, Takemitsu T, Nakagaki T, Gabazza EC, Suzuki K. Characterization of the binding of factor Xa to fibrinogen/fibrin derivatives and localization of the factor Xa binding site on fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 1995, **232**, 90-97.
- Itakura Y, Sasaki N, Kami D, Gojo S, Umezawa A, Toyoda M. N- and O-glycosylation cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.* 2016, **6**, Broj rada14.
- Izumi K, Kurosaka D, Iwata T, Oguchi Y, Tanaka Y, Mashima Y, Tsubota K. Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in corneal fibroblasts during corneal wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006, **47**, 591-598.
- Jones JJ, Joseph D'Ercole A, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and *in vivo*: effects on affinity for IGF-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**, 7481-7485.
- Jones JJ, Busby WH, Wright G, Smith CE, Kimack NM, Clemmons DR. Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 1125-1131.
- Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int. J. Endocrinol.* 2011, **2011**, Broj rada 742719.
- Kalapos MP. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2013, **99**, 260-271.
- Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham study. *J. Am. Med. Assoc.* 1987, **258**, 1183-1186.
- Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017, **37**, e13-e21.
- Kearney K, Tomlinson D, Smith K, Ajjan R. Hypofibrinolysis in diabetes: a therapeutic target for the reduction of cardiovascular risk. *Cardiovasc. Diabetol.* 2017, **16**, Broj rada 34.

Kielmas M, Szewczuk Z, Stefanowicz P. A study on human serum albumin influence on glycation of fibrinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, **439**, 78-83.

Kim H-S, Rosenfeld RG, Oh Y. *Exp. Mol. Med.* 1997, **29**, 85-96.

Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, **20**, 959-969.

Kolev K, Tenekedjiev K, Ajtai K, Kovalszky I, Gombás J, Váradi B, Machovich R. Myosin: a noncovalent stabilizer of fibrin in the process of clot dissolution. *Blood*, 2003, **101**, 4380-4386.

Koshizuka S, Kanazawa K, Kobayashi N, Takazawa I, Waki Y, Shibusawa H, Shumiya S. The beneficial effects of recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) on wound healing in severely wounded senescent mice. *Jpn. J. Surg.* 1997, **27**, 946-952.

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2014, **69**, 779-789.

Kuchay MS, Mishra SK, Farooqui KJ, Bansal B, Wasir JS, Mithal A. Hypercalcemia of advanced chronic liver disease: a forgotten clinical entity! *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 2016, **13**, 15-18.

Langer BG, Weisel JW, Dinauer PA, Nagaswami C, Bell WR. Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 15056-15063.

Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, **2014**, Broj rada 908539.

Lee PDK, Conover CA, Powell DR. Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1993, **204**, 4-29.

Lee PDK, Giudice LC, Conover CA, Powell DR. Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997, **216**, 319-357.

Lee Y, Shacter E. Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, **321**, 175-181.

- LeRoith D, Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003, **195**, 127-137.
- Leung LLK. Interaction of histidine-rich glycoprotein with fibrinogen and fibrin. *J. Clin. Invest.* 1986, **77**, 1305-1311.
- Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, **16**, 26087-26124.
- Liang JN, Chylack LT, Jr. Spectroscopic study on the effects of nonenzymatic glycation in human α -crystallin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1987, **28**, 790-794.
- Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* 1993, **218**, 1-27.
- Lisman T, Ariëns RAS. Alterations in fibrin structure in patients with liver diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016, **42**, 389-396.
- Lisman T, Porte RJ. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood*, 2010, **116**, 878-885.
- Liu B, Lee H-Y, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor- α regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 33607-33613.
- Liu X-E, Desmyter L, Gao C-F, Laroy W, Dewaele S, Vanhooren V, Wang L, Zhuang H, Callewaert N, Libert C, Contreras R, Chen C. N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatology*, 2007, **46**, 1426-1435.
- Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N α -acetylarginine, N α -acetylcysteine, and N α -acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 32299-32305.
- Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat. Res.* 2008, **638**, 98-102.
- Lorand L. Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. *J. Thromb. Haemost.* 2005, **3**, 1337-1348.
- Lund T, Svindland A, Pepaj M, Jensen A-B, Berg JP, Kilhovd B, Hanssen KF. Fibrin(ogen) may be an important target for methylglyoxal-derived AGE modification in elastic arteries of humans. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2011, **8**, 284-294.

- Lupidi G, Angeletti M, Eleuteri AM, Tacconi L, Coletta M, Fioretti E. Peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation. *FEBS Lett.* 1999, **462**, 236-240.
- Maddux BA, Chan A, De Filippis EA, Mandarino LJ, Goldfine ID. IGF-binding protein-1 levels are related to insulin-mediated glucose disposal and are a potential serum marker of insulin resistance. *Diabetes Care* 2006, **29**, 1535-1537.
- Maekawa H, Yamazumi K, Muramatsu S, Kaneko M, Hirata H, Takahashi N, Arocha-Piñango CL, Rodriguez S, Nagy H, Perez-Requejo JL, Matsuda M. Fibrinogen Lima: a homozygous dysfibrinogen with an A α -arginine-141 to serine substitution associated with extra N-glycosylation at A α -asparagine139. Impaired fibrin gel formation but normal fibrin-facilitated plasminogen activation catalyzed by tissue-type plasminogen activator. *J. Clin. Invest.* 1992, **90**, 67-76.
- Mañes S, Mira E, del Mar Barbacid M, Ciprés A, Fernández-Resa P, Buesa JM, Mérida I, Aracil M, Márquez G, Martínez-A C. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 25706-25712.
- Marchi R, Arocha-Piñango CL, Nagy H, Matsuda M, Weisel W. The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen on polymerization and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen Lima (A α Arg141 \rightarrow Ser with extra glycosylation), *J. Thromb. Haemost.* 2004, **2**, 940-948.
- Marguerie G. The binding of calcium to fibrinogen: some structural features. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **494**, 172-181.
- Mari D, Mannucci PM, Bottasso B, Bauer KA, Rosenberg RD. Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging. *Blood*, 1995, **85**, 3144-3149.
- Mari D, Ogliari G, Castaldi D, Vitale G, Bollini EM, Lio D. Hemostasis and aging. *Immun Ageing* 2008, **5**:12.
- Mari D, Coppola R, Provenzano R. Hemostasis factors and aging. *Exp. Gerontol.* 2008, **43**, 66-73.
- Martin SC, Forsberg P-O, Eriksson SD. The effects of *in vitro* phosphorylation and dephosphorylation on the thrombin-induced gelation and plasmin degradation of fibrinogen. *Thromb. Res.* 1991, **61**, 243-252.
- Martin SC, Ekman P, Forsberg P-O, Ersmark H. Increased phosphate content of fibrinogen *in vivo* correlates with alteration in fibrinogen behavior. *Thromb. Res.* 1992, **68**, 467-473.

- Martin Spencer E, Tokunaga A, Hunt TK. Insulin-like growth factor binding protein-3 is present in the α -granules of platelets. *Endocrinology*, 1993, **132**, 996-1001.
- Martinez J, Keane PM, Gilman PB. The abnormal carbohydrate composition of the dysfibrinogenemia associated with liver disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1983, **408**, 388-396.
- Martinez M, Weisel JW, Ischiropoulos H. Functional impact of oxidative post-translational modifications on fibrinogen fibrin clots. *Free Rad. Biol. Med.* 2013, **65**, 411-418.
- Masnikosa R, Živković B, Nedić O. IGFBP-1 forms associated with placental cell membranes. *J. Serb. Chem. Soc.* 2009, **74**, 707-716.
- McCarty OJ, Zhao Y, Andrew N, Machesky LM, Staunton D, Frampton J, Watson SP. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J. Thromb. Haemost.* 2004, **2**, 1823-1833.
- McLellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatisation with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal. Biochem.* 1992, **206**, 17-23.
- Meh DA, Siebenlist KR, Brennan SO, Holyst T, Mosesson MW. The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb. Haemost.* 2001, **85**, 470-474.
- Mehta S, Livingstone C, Borai A, Ferns G. Insulin-like growth factor binding protein-1 in insulin resistance and cardiovascular disease. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* 2012, **12**, 17-25.
- Miljuš G, Petrović M, Nedić O. Isolation of complexes formed between insulin-like growth factor-binding protein-3 and transferrin from human serum. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012, **77**, 607-617.
- Mills JD, Ariens RAS, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 2002, **106**, 1938-1942.
- Miura Y, Hashii N, Tsumoto H, Takakura D, Ohta Y, Abe Y, Arai Y, Kawasaki N, Hirose N, Endo T. Change in N-glycosylation of plasma proteins in Japanese semisupercentenarians. *PLoS One*, 2015, **10**, e0142645.
- Mosesson MW, DiOrio JP, Hernandez I, Hainfeld JF, Wall JS, Grieninger G. The ultrastructure of fibrinogen-420 and the fibrin-420 clot. *Biophys. Chem.* 2004, **112**, 209-214.

- Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* 2005, **3**, 1894-1904.
- Mukherjee K, Chio TI, Sackett DL, Bane SL. Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* 2015, **84**, 11-21.
- Nagae M, Yamaguchi Y. Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, **13**, 8398-8429.
- Nagel T, Meyer B. Simultaneous characterisation of sequence polymorphisms glycosylation and phosphorylation of fibrinogen in a direct analysis by LC-MS. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, **1844**, 2284-2289.
- Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood AB, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006, **21**, 947-957.
- Nedić O, Malenković V, Đukanović B, Baričević I. Association of elevated IGFBP-1 with increased IGF-II concentration in patients with carcinoma of the liver. *Int. J. Biol. Markers*, 2008, **23**, 226-231.
- Nedić O, Šunderić M, Gligorijević N, Malenković V, Miljuš G. Analysis of four circulating complexes of insulin-like growth factor binding proteins in human blood during aging. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, **82**, 1200-1206.
- Nickerson JM, Fuller GM. Modification of fibrinogen chains during synthesis: glycosylation of B β and γ chains. *Biochemistry*, 1981, **20**, 2818-2821.
- Nobukata H, Ishikawa T, Obata M, Shibutani Y. Age-related changes in coagulation, fibrinolysis, and platelet aggregation in male WBN/Kob rats. *Thromb. Res.* 2000, **98**, 507-516.
- Northup PG, Sundaram V, Fallon MB, Reddy KR, Balogun RA, Sanyal AJ, Anstee QM, Hoffman MR, Ikura Y, Caldwell SH, The coagulation in liver disease group. Hypercoagulation and thrombophilia in liver disease. *J. Thromb. Haemost.* 2008, **6**, 2-9.
- Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 2005, **24**, 1311-1317.
- Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, **126**, 855-867.
- Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 2014, **58**, 515-523.

- Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J. Exp. Med.* 1988, **167**, 1731-1736.
- Perks CM, Newcomb PV, Norman MR, Holly JMP. Effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on integrin signaling and the induction of apoptosis in human breast cells. *J. Mol. Endocrinol.* 1999, **22**, 141-150.
- Petersson U, Östgren CJ, Brudin L, Brismar K, Nilsson PM. Low levels of insulin-like growth-factor-binding protein-1 (IGFBP-1) are prospectively associated with the incidence of type 2 diabetes and impaired glucose tolerance (IGT): the Söderåkra cardiovascular risk factor study. *Diabetes Metab.* 2009, **35**, 198-205.
- Pieters M, van Zyl DG, Rheeder P, Jerling JC, Loots DT, van der Westhuizen FH, Gottsche LT, Weisel JW. Glycation of fibrinogen in uncontrolled diabetic patients and the effects of glycaemic control on fibrinogen glycation. *Thromb. Res.* 2007, **120**, 439-446.
- Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer*, 2015, **15**, 540-555.
- Piryazev AP, Aseichev AV, Azizova OA. Effect of oxidation-modified fibrinogen on the formation and lysis of fibrin clot in the plasma. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009, **148**, 881-885.
- Podolnikova NP, Yakubenko VP, Volkov GL, Plow EF, Ugarova TP. Identification of a novel binding site for platelet integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) and $\alpha_5\beta_1$ in the γ C-domain of fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 32251-32258.
- Polgár J, Hidasi V, Muszbek L. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage factor XIII). *Biochem. J.* 1990, **267**, 557-560.
- Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 12181-12188.
- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Ednocr. Rev.* 1997, **18**, 801-831.
- Rajpathak SN, McGinn AP, Strickler H, Rohan TE, Pollak M, Cappola AR, Kuller L, Xue X, Newman AB, Strotmeyer ES, Psaty BM, Kaplan RC. Insulin-like growth factor-(IGF)-axis, inflammation, and glucose intolerance among older adults. *Growth Horm. IGF Res.* 2008, **18**, 166-173.

- Rajpathak SN, He M, Sun Q, Kaplan RC, Muzumdar R, Rohan TE, Gunter MJ, Pollak M, Kim M, Pessin JE, Beasley J, Wylie-Rosett J, Hu FB, Strickler HD. Insulin-like growth factor axis and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes*, 2012, **61**, 2248-2254.
- Ramos-Mozo P, Rodriguez C, Pastor-Vargas C, Blanco-Colio LM, Martinez-Gonzalez J, Meilhac O, Michel J-B, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. Plasma profiling by a protein array approach identifies IGFBP-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*, 2012, **221**, 544-550.
- Redman CM, Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001, **936**, 480-495.
- Rijken DC, Kock EL, Guimarães AHC, Talens S, Darwish Murad S, Janssen HLA, Leebeek FWG. Evidence for an enhanced fibrinolytic capacity in cirrhosis as measured with two different global fibrinolysis tests. *J. Thromb. Haemost.* 2012, **10**, 2116-2122.
- Ritchie H, Lawrie LC, Crombie PW, Mosesson MW, Booth NA. Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and α_2 -antiplasmin to fibrin(ogen). *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 24915-24920.
- Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla K, Nedić O, Baron CP, Griffiths HR. Analysis of protein carbonylation- pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Rad. Res.* 2014, **48**, 1145-1162.
- Romanic AM, Arleth AJ, Willette RN, Ohlstein EH. Factor XIIIa cross-links lipoprotein(a) with fibrinogen and is present in human atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 1998, **83**, 264-269.
- Ross RJM, Rodriguez-Arno J, Donaghy A, Bentham J, Clark A, Holly J, Williams R, Gimson A. Expression of IGFBP-1 in normal and cirrhotic human livers. *J. Endocrinol.* 1994, **141**, 377-382.
- Rutanen E-M, Kärkkäinen T, Stenman U-H, Yki-Järvinen H. Aging is associated with decreased suppression of insulin-like growth factor binding protein-1 by insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993, **77**, 1152-1155.
- Rydén I, Pahlsson P, Lindgren S. Diagnostic accuracy of α_1 - acid glycoprotein fucosylation for liver cirrhosis in patients undergoing hepatic biopsy. *Clin. Chem.* 2002, **48**, 2195-2201.
- Sakai K, Busby WH, Jr., Clarke JB, Clemmons DR. Tissue transglutaminase facilitates the polymerization of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and leads to loss of IGFBP-1's ability to inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 8740-8745.

Salahifar H, Firth SM, Baxter RC, Martin JL. Characterization of an amino-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 and its effects in MCF-7 breast cancer cells. *Growth Horm. IGF Res.* 2000, **10**, 367-377.

Saner FH, Gieseler RK, Akiz H, Canbay A, Görlinger K. Delicate balance of bleeding and thrombosis in end-stage liver disease and liver transplantation. *Digestion* 2013, **88**, 135-144.

Santacroce R, Cappucci F, Pisanelli D, Perricone F, Luisa Papa M, Santoro R, Grandone E, Margaglione M. Inherited abnormalities of fibrinogen: 10-year clinical experience of an Italian group. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2006, **17**, 235-240.

Scandalios JG. 2004. Genomic responses to oxidative stress. In Meyers RA. (Ed.), *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine* (2nd edition). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Schneider DJ. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. *Diabetes Care* 2009, **32**, 525-527.

Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008, **371**, 838-851.

Scott DJA, Prasad P, Philippou H, Rashid ST, Sohrabi S, Whalley D, Kordowicz A, Tang Q, West RM, Johnson A, Woods J, Ajjan RA, Ariëns RAS. Clot architecture is altered in abdominal aortic aneurysms and correlates with aneurysm size. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011, **31**, 3004-3010.

Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Rad. Biol. Med.* 1994, **17**, 429-437.

Shacter E, Williams JA, Levine RL. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Rad. Biol. Med.* 1995, **18**, 815-821.

Sharathkumar AA, Shapiro A. 2008. Platelet function disorders. In Schulman S. (ed.), *Treatment of hemophilia* (2nd edition). Montréal, Canada: World Federation of Hemophilia.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010, **87**, 4-14.

Shental-Bechor D, Levy Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8256-8261.

Shibuya H, Sakai K, Kabir-Salmani M, Wachi Y, Iwashita M. Polymerization of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) potentiates IGF-I actions in placenta. *J. Cell. Physiol.* 2011, **226**, 434-439.

Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog. Growth Factor Res.* 1991, **3**, 243-266.

Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997, **344**, 29-36.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 2001, **44**, 129-146.

Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2014, **18**, 1-14.

Štikarová J, Kotlín R, Riedel T, Suttar J, Pimková K, Chrastinová L, Dyr JE. The effects of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function. *Sci. World J.* 2013, **2013**, Broj rada 359621.

Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br. J. Ophthalmol.* 2001, **85**, 746-753.

Stone MC, Thorp JM. Plasma fibrinogen- a major coronary risk factor. *J. R. Coll. Gen. Pract.* 1985, **35**, 565-569.

Suenson E, Lützen O, Thorsen S. Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur. J. Biochem.* 1984, **140**, 513-522.

Sugo T, Nakamikawa C, Takano H, Mimuro J, Yamaguchi S, Mosesson MW, Meh DA, DiOrio JP, Takahashi N, Takahashi H, Nagai K, Matsuda M. Fibrinogen Niigata with impaired fibrin assembly: an inherited dysfibrinogen with a B β Asn-160 to Ser substitution associated with extra glycosylation at B β Asn- 158. *Blood*, 1999, **94**, 3806-3813.

Suh DY, Hunt TK, Spencer EM. Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. *Endocrinology*, 1992, **131**, 2399-2403.

Suh KS, Choi EM, Rhee SY, Kim YS. Methylglyoxal induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Free Rad. Res.* 2014, **48**, 206-217.

Svensson J, Bergman A-C, Adamson U, Blombäck M, Wallén H, Jörneskog G. Acetylation and glycation of fibrinogen *in vitro* occur at specific lysine residues in a concentration dependent manner: a mass spectrometric and isotope labeling study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, **421**, 335-342.

Šunderić M, Malenković V, Nedić O. Complexes between insulin-like growth factor binding proteins and alpha-2-macroglobulin in patients with tumor. *Exp. Mol. Pathol.* 2015, **98**, 173-177.

Šunderić M, Mihailović N, Nedić O. Protein molecular form of insulin-like growth factor binding protein-2 change with aging. *Exp. Gerontol.* 2014, **58**, 154-158.

Tamarit J, de Hoogh A, Obis E, Alsina D, Cabiscol E, Ros J. Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *J. Proteomics* 2012, **75**, 3778-3788.

Taylor VL, Spencer EM. Characterisation of insulin-like growth factor-binding protein-3 binding to a novel receptor on human platelet membranes. *J. Endocrinol.* 2001, **168**, 307-315.

Telasky C, Tredget EE, Shen Q, Khorramizadeh MR, Iwashina T, Scott PG, Ghahary A. IFN- α 2b suppresses the fibrogenic effects of insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts. *J. Interf. Cytok. Res.* 1998, **18**, 571-577.

Tennent GA, Brennan SO, Stangou AJ, O'Grady J, Hawkins PN, Pepys MB. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, 2007, **109**, 1971-1974.

Thieme R, Kurz S, Kolb M, Debebe T, Holtze S, Morhart M, Huse K, Szafranski K, Platzer M, Hildebrandt TB, Birkenmeier G. Analysis of alpha-2 macroglobulin from the long-lived and cancer-resistant naked mole-rat and human plasma. *PLoS One*, 2015, **10**, e0130470.

Tilley D, Levit I, Samis JA. Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. *Thromb. J.* 2011, **9**, Broj rada 1.

Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *J. Biomarkers* 2013, **2013**, Broj rada 378790.

Tofler GH, Massaro J, Levy D, Mittleman M, Sutherland P, Lipinska I, Muller JE, D'Agostino RB. Relation of the prothrombotic state to increasing age (from the Framingham offspring study). *Am. J. Cardiol.* 2005, **96**, 1280-1283.

Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, Rudolph R, Jameson J, Havran WL. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med.* 2009, **206**, 743-750.

Tracy RP, Bovill EG, Fried LP, Heiss G, Lee MH, Polak JF, Psaty BM, Savage PJ. The distribution of coagulation factors VII and VIII and fibrinogen in adults over 65 years results from the cardiovascular health study. *Ann. Epidemiol.*, 1992, **2**, 509-519.

- Tracy RP. Hemostatic and inflammatory markers as risk factors for coronary disease in the elderly. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* 2002, **11**, 93-101.
- Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* 2011, **365**, 147-156.
- Tsuboi R, Shi C-M, Sato C, Cox GN, Ogawa H. Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models. *J. Invest. Dermatol.* 1995, **104**, 199-203.
- Tsurupa G, Medved L. Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) α C-domains. *Biochemistry* 2001, **40**, 801-808.
- Undas A, Szuldrzynsky K, Stepień E, Zalewski J, Godlewski J, Tracz W, Pasowicz M, Zmudka K. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis* 2008, **196**, 551-557.
- Vanhooren V, Desmyter L, Liu X-E, Cardelli M, Franceschi C, Federico A, Libert C, Laroy W, Dewaele S, Contreras R, Chen C. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res.* 2007, **10**, 521a-531a.
- Vanhooren V, Dewaele S, Libert C, Engelborghs S, De Deyn PP, Toussaint O, Debacq-Chainiaux F, Poulain M, Glupczynsky Y, Franceschi C, Jaspers K, van der Pluijm I, Hoeijmakers J, Chen CC. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Exp. Gerontol.* 2010, **45**, 738-743.
- Watt KWK, Takagi T, Doolittle RF. Amino acid sequence of the β chain of human fibrinogen: homology with the γ chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**, 1731-1735.
- Weinzimer SA, Gibson TB, Collett-Solberg PF, Khare A, Liu B, Cohen P. Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, **86**, 1806-1813.
- Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 2013, **121**, 1712-1719.
- Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.* 2005, **70**, 247-299.
- Westwood M, Gibson JM, White A. Purification and characterization of the insulin-like growth factor-binding protein-1 phosphoform found in normal plasma. *Endocrinology*, 1997, **138**, 1130-1136.

- Westwood M, Aplin JD, Collinge IA, Gill A, White A, Gibson JM. α_2 -macroglobulin: a new component in the insulin-like growth factor/insulin-like growth factor binding protein-1 axis. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 41668-41674.
- Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Grieve DJ, Williams IL, Miell JP, Crossey PA. Vascular endothelial function and blood pressure homeostasis in mice overexpressing IGF binding protein-1. *Diabetes*, 2003, **52**, 2075-2082.
- Wheatcroft SB, Kearney MT, IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009, **20**, 153-162.
- Whiteheart SW. Platelet granules: surprise packages. *Blood* 2011, **118**, 1190-1191.
- Wilhelmsen L, Svärdsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1984, **311**, 501-505.
- Wyatt AR, Kumita JR, Farrowell NE, Dobson CM, Wilson MR. Alpha-2-macroglobulin is acutely sensitive to freezing and lyophilization: implications for structural and functional studies. *PLoS One*, 2015, **2015**, e0130036.
- Xu Q, Li S, Zhao Y, Maures TJ, Yin P, Duan C. Evidence that IGF binding protein-5 functions as a ligand-independent transcriptional regulator in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2004, **94**, e46-e54.
- Xu Y-J, Qiang M, Zhang J-L, Liu Y, He R-Q. Reactive carbonyl compounds (RCCs) cause aggregation and dysfunction of fibrinogen. *Protein Cell* 2012, **3**, 627-640.
- Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry*, 2000, **39**, 15730-15741.
- Yamazumi K, Shimura K, Terukina S, Takahashi N, Matsuda M. A γ methionine-310 to threonine substitution and consequent N-glycosylation at γ asparagine-308 identified in a congenital dysfibrinogenemia associated with posttraumatic bleeding, fibrinogen asahi. *J. Clin. Invest.* 1989, **83**, 1590-1597.
- Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011, **254**, 72-85.
- Yonekawa O, Voskuilen M, Nieuwenhuizen W. Localization in the fibrinogen γ -chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen. *Biochem. J.* 1992, **283**, 187-191.

Young SCJ, Miles MV, Clemmons DR. Determination of the pharmacokinetic profiles of insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 in rats. *Endocrinology* 1992, **131**, 1867-1873.

Zauner G, Hoffmann M, Rapp E, Koeleman CAM, Dragan I, Deelder AM, Wuhrer M, Hensbergen PJ. Glycoproteomic analysis of human fibrinogen reveals novel regions of O-glycosylation. *J. Proteome Res.* 2012, **11**, 5804-5814.

Zhou T, Rosen BP. Tryptophan fluorescence reports nucleotide-induced conformational changes in a domain of the ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 19731-19737.

Zhu J, Lin Z, Wu J, Yin H, Dai J, Feng Z, Marrero J, Lubman DM. Analysis of serum haptoglobin fucosylation in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis of different etiologies. *J. Proteome Res.* 2014, **13**, 2986-2997.

Biografija

Nikola (Jovan) Gligorijević je rođen 27.1.1989. godine u Kruševcu. Osnovnu i srednju školu je završio u Varvarinu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Diplomirani biohemičar je upisao 2008. a završio 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,71. Master studije je upisao iste godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Biohemija i završio 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,50 i radom „Karakterizacija proizvoda hidrolize sirovog i rastvornog skroba α -amilazama iz sojeva *Bacillus* sp. upotrebom tankoslojne hromatografije” (mentori: dr Zoran Vujčić, redovni profesor i dr Nataša Božić, viši naučni saradnik). Doktorske studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija, je upisao 2013. godine. Od 2015. godine zaposlen je u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP), Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Strukturne karakteristike vezujućih proteina i receptora za insulinu slične faktore rasta (IGF), njihove interakcije sa drugim fiziološkim molekulima i promene kod poremećaja metabolizma“ (rukovodilac projekta: dr Olgica Nedić, naučni savetnik). Sa kolegama iz Slovačke akademije nauka je učestvovao na bilateralnom projektu „Glycan biomarkers analysis as a tool for biomedical research, follow-up and diagnosis of tumor diseases” (SK-SRB-2016-0023, 2017-2018). U toku 2016. godine je bio na kratkom studijskom boravku u Slovačkoj akademiji nauka u Bratislavi. 2017. godine je dobio FEBS-ovu stipendiju za učešće na 42. Kongresu FEBS-a u Jerusalimu. Član je Biohemijskog društva Srbije i Srpskog hemijskog društva. Do sada je objavio osam naučnih radova u međunarodnim časopisima. Imao je pet saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Никола Ј. Глигоријевић

Број индекса д621/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову
реактивност и функцију**

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

У Београду,

Потпис аутора

Никола Глигоријевић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Никола Ј. Глигоријевић _____

Број индекса _____ д621/2013 _____

Студијски програм _____ Биохемија _____

Наслов рада Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову реактивност и функцију

Ментори _____ др Зоран Вујчић, др Олгица Недић _____

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

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

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

У Београду,

Потпис аутора

Никола Ј. Глигоријевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

**Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову
реактивност и функцију**

која је моје ауторско дело.

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

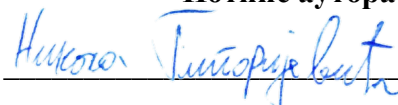
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду,

Потпис аутора



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

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

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

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

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

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