

**Nastavno-naučnom veću
Hemijskog Fakulteta
Univerziteta u Beogradu**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, održanoj 14.12.2017. godine, određeni smo za Komisiju za podnošenje izveštaja o oceni ispunjenosti uslova i opravdanosti predložene teme za izradu doktorske disertacije Nikole J. Gligorijevića, master biohemičara, prijavljene pod nazivom: „**Uticaj posttranslacionih modifikacija fibrinogena na njegovu reaktivnost i funkciju**“. Na osnovu podnete i prikupljene dokumentacije, podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Biografski podaci o kandidatu

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), Univerzitetu 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 učestvuje 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), a učesnik je i u COST akcijama: The Biogenesis of Iron-sulfur Proteins: from Cellular Biology to Molecular Aspects (FeSBioNet) (CA15133), European Network on Understanding Gastrointestinal Absorption-related Processes (CA16205) i Personalized Nutrition in aging society: redox control of major age-related diseases (CA16112) Član je Biohemijskog društva Srbije i Srpskog hemijskog društva. Do sada je objavio sedam naučnih radova u međunarodnim časopisima. Imao je pet saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. 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.

B. Bibliografski podaci o kandidatu

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Robajac D., **Gligorijević N.**, Dželetović Ž., Andrejić G., Nedić O., Separation of peroxidases from *Miscanthus x giganteus*, their partial characterisation and application for degradation of dyes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 120 (2017) 179-185.

2. **Gligorijević N.**, Zámárová Križáková M., Penezić A., Katrlík J., Nedić O., Structural and functional changes of fibrinogen due to aging. *International Journal of Biological Macromolecules*, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.016.

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. Lončar N., **Gligorijević N.**, Božić N., Vujčić Z., Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91 (2014) 18-23.

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

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Gligorijević N.**, Stevanović N., Lončar N., Baošić R., Vujčić Z., Božić N., A thin layer chromatographic comparison of raw and soluble starch hydrolysis patterns of some α -amylases from *Bacillus* sp. isolated from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79 (2014) 411-420.

2. **Gligorijević N.**, Nedić O., Interaction between fibrinogen and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human plasma under physiological conditions. *Biochemistry (Moscow)*, 81 (2016) 135-140.

3. 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 (Moscow)*, 82 (2017) 1193-1199.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Božić N., Šokarda Slavić M., **Gligorijević N.**, Lončar N., Vujčić Z., Raw starch digesting α -amylases from some Serbian *Bacillus* sp. isolates. 5th Symposium on the alpha-amylase family, Smolenice, Slovakia, 2013, Abstract Book, p. 74.

2. **Gligorijević N.**, Nedić O., Interaction between fibrinogen and insulin-like growth factor binding protein-1 under physiologic conditions and influence of diabetes mellitus type 2 on this interaction. 41st FEBS Meeting, Ephesus/Kuşadasi, Turkey, 2016, Abstract Book, p. 209.

3. **Gligorijević N.**, Zámorová M., Katrlík J., Nedić O., Glycosylation changes of fibrinogen in relation to aging and possible influence on fibrinogen activity. 42nd FEBS Meeting, Jerusalem, Israel, 2017, Abstract Book, p. 182.

4. **Gligorijević N.**, Influence of fibrinogen modifications on its interaction with insulin-like growth factor-binding protein 1. 7th Conference of Serbian Biochemical Society, 2017, Belgrade, Serbia, Abstract Book, p. 135.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. **Gligorijević N.**, Robajac D., Dželetović Ž., Nedić O., Coomassie Brilliant Blue and Ponso S degrading peroxidases from grass *Miscanthus x giganteus*. Fourth conference of young chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, 2016, Abstract Book, p. 72.

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast

Naučna oblast doktorske disertacije je Biohemija.

2. Predmet rada

Predmet rada ove disertacije je ispitivanje posttranslacionih modifikacija fibrinogena i njihovog uticaja na reaktivnost fibrinogena. Kao polazni materijal će se koristiti izolovani fibrinogen iz plazme zdravih ljudi različitih godišta, kao i pacijenata sa poremećajima u procesu koagulacije: dijabetes melitus tip 2 (DM2) ili ciroza jetre. Očekuje se da kandidat optimizuje proces izolovanja visoko prečišćenog fibrinogena iz plazme, kao i postupak analize oksidovanih i glikozilovanih formi fibrinogena. Fibrinogen je glikoprotein i podložan je oksidativnim promenama više nego neki drugi glavni proteini plazme, te je ideja da se ispita uticaj starenja i bolesti na stepen i način njegovog glikozilovanja, odnosno oksidacije. Starenje je fiziološki proces koga karakteriše, između ostalog, izmenjen obrazac glikozilovanja proteina i povećan oksidativni stres. DM2 i ciroza jetre su bolesti koje prati povećan oksidativni stres, u slučaju ciroze jetre i izmenjen sintetski kapacitet ovog organa u kome se stvara fibrinogen, a oba stanja mogu biti praćena poremećajima u koagulaciji. Zbog svega navedenog, od kandidata se očekuje da ispita posttranslacione modifikacije fibrinogena usled starenja i bolesti (N-glikozilovanje, prisustvo proteinskih karbonila i krajnjih proizvoda glikovanja), kao i da utvrdi njihov mogući uticaj na sekundarnu i tercijarnu strukturu fibrinogena i njegove koagulacione osobine. Od koagulacionih parametara ispitivaće se vreme i brzina koagulacije, struktura fibrinskog ugruška i njegova poroznost. Pošto fibrinogen interaguje sa većim brojem proteina, deo eksperimentalnog rada će se baviti uticajem posttranslacionih modifikacija fibrinogena na njegovu interakciju sa

jednim od tih partnera, vezujućim proteinom 1 za faktore rasta slične insulinu (IGFBP-1), koji je, takođe, učesnik u procesu zarastanja tkivnih povreda.

3. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja u okviru predložene doktorske disertacije su sledeći: optimizacija postupka izolovanja fibrinogena iz humane plazme; optimizacija postupka detekcije i merenja posttranslacionih modifikacija fibrinogena; ispitivanje uticaja starenja, DM2 ili ciroze jetre na obrazac glikozilovanja i stepen oksidacije fibrinogena; ispitivanje promena sekundarne i tercijarne strukture fibrinogena u navedenim stanjima; ispitivanje karakteristika procesa koagulacije u navedenim stanjima; utvrđivanje reaktivnosti fibrinogena sa IGFBP-1 u tim istim stanjima i na kraju, povezivanje podataka o posttranslacionim modifikacijama, strukturi, koagulacionim karakteristikama i interakciji fibrinogena u cilju boljeg razumevanja pojava koje se detektuju *in vivo*.

4. Metode istraživanja

U toku izrade ove doktorske disertacije predviđeno je korišćenje sledećih eksperimentalnih tehnika: a) **elektroforeza i imunoblot**– provera čistoće izolovanog fibrinogena, utvrđivanje oksidativnih promena fibrinogena, ispitivanje interakcije fibrinogena sa IGFBP-1, b) **lektinski mikroerej**– analiza glikana fibrinogena; c) **imunoprecipitacija i lektinska afinitetna hromatografija**– izolovanje kompleksa fibrinogen/IGFBP-1, d) **spektrofotometrija, spektrofluorimetrija, CD-spektrometrija**– analiza kinetike stvaranja fibrina, detekcija i analiza strukturnih promena fibrinogena, detekcija hemijske modifikacije fibrinogena metilglioksalom, određivanje koncentracije proteina i e) **skenirajuća elektronska mikroskopija**– analiza strukture fibrinskog gela.

5. Aktuelnost problematike u svetu

Fibrinogen ili faktor I sistema koagulacije je glikoprotein molekulske mase od 340 kDa. Biološka 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. Pošto fibrinogen podleže brojnim posttranslacionim modifikacijama (glikozilovanje, oksidacija), njihovom karakterizacijom i analizom u patološkim stanjima, može se doprineti boljoj spoznaji njihovog uticaja na sekundarnu i terciarnu strukturu fibrinogena, interakcije fibrinogena, proces stvaranja i karakteristike fibrina. Određene modifikacije fibrinogena, kao što su oksidacija i glikooksidacija (glikovanje), igraju važnu ulogu u razvoju koagulopatija ^[1]. Glikozilovanje fibrinogena je važno za zauzimanje pravilne konformacije molekula i obavljanje biološke uloge. Poznato je da se obrazac glikozilovanja proteina menja sa starenjem i u prisustvu raznih patoloških stanja. Već su nađene mutirane varijante fibrinogena sa promenjenim načinom glikozilovanja, što za posledicu ima izmenjeno ponašanje tokom koagulacije ^[2]. Pošto 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 revidira, jer je konstatovano da je starenje, kao i dečije doba, fiziološki specifičan period života. Iz toga razloga se studije povezane sa aspektima starenja ohrabruju i podstiču svuda u svetu.

Raniji eksperimenti su utvrdili da fibrinogen i fibrin mogu interagovati sa vezujućim proteinom 3 za IGF peptide (IGFBP-3) ^[3]. Pretpostavka je da ova interakcija doprinosi koncentrovanju IGF-I na mestu povrede, gde on stimulatorno deluje na proces zarastanja. Otkriće interakcije IGFBP-1 sa fibrinogenom je zanimljivo, uzevši u obzir da sam IGFBP-1 stimuliše proces oporavka tkiva. Deo molekula IGFBP-1, poznat kao RGD sekvenca, omogućava njegovo vezivanje za integrin $\alpha_5\beta_1$ na površini ćelija ^[4], a taj integrin je nađen na površini trombocita. Takođe, IGFBP-1 je supstrat za plazmin, glavni enzim fibrinolize ^[5]. Proteolizom IGFBP-1 se oslobađa IGF-I, ali nastaju i bioaktivni peptidi koji ispoljavaju samostalni migratorni i proliferativni uticaj na humane dermalne fibroblaste ^[6]. U jednoj od patologija koju karakteriše tromboza, abdominalnoj aortnoj aneurizmi, detektovano je povećano prisustvo IGFBP-1 u trombu i ono 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 ^[7]. 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 ^[8,9].

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 postranslacionih 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 postranslacionih modifikacija fibrinogena kod dugovečnih zdravih ljudi može doprineti otkriću faktora odgovornih za dugovečnost na molekulskom nivou ^[10].

Refence:

[1] Dunn EJ, Ariëns RAS, Grant PJ, The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia* 48 (2005) 1198–1206.

[2] Marchi R, Arocha-Piñango CL, Nagy H, Matsuda M, Weisel JW. 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 → Ser with extra glycosylation). *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 940-948.

[3] Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 30215–30221.

[4] Galiano R, 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. Evidence in a rabbit ear dermal ulcer model. *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 2462–2468.

[5] Mañes S., Mira E., del Mar Barbacid M., Ciprés A., Fernández-Resa P., Buesa J.M., 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.* 272 (1997) 25706–25712.

[6] 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.* 25 (2015) 34–40.

[7] 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* 221 (2012) 544– 550.

[8] 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.* 14 (2016) 1054-1066.

[9] 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* 49 (2006) 1071–1080.

[10] Miura Y, Hashii N, Tsumoto H, Takakura D, Ohta Y, Abe Y, Arai Y, Kawasaki N, Hirose N, Endo T, Change in N-glycation of plasma proteins in Japanese emisupercentenarians. *PLoS One* 10 (2015) e0142645.

6. Očekivani rezultati

Očekuje se da kandidat optimizuje proces izolovanja visoko prečišćenog fibrinogena iz humane plazme i razvije optimalne postupke za analizu fibrinogena i fibrina elektroferezom i imunoblotom, lektinskim mikroerejom, spektrofotometrijskim metodama, spektrofluorimetrijom, CD-spektrometrijom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Takođe se očekuje da primenom afinitetnih metoda izoluje komplekse fibrinogena sa IGFBP-1 i optimizuje postupke njihovog analiziranja nabrojanim tehnikama.

U drugom delu doktorske disertacije, od kandidata se očekuje da izoluje i analizira uzorke fibrinogena iz većeg broja humanih plazmi, dobijenih od zdravih osoba različite starosne dobi i pacijenata sa oboljenjima za koje je poznato da su praćena promenama u koagulaciji: DM2 i ciroza jetre. Očekuje se da se ispitivanjem posttranslacionih modifikacija, sekundarne i tercijarne strukture, kao i funkcije fibrinogena, produbi znanje o mehanizmima koji dovode do neželjenih promena u koagulaciji i o ulozi fibrinogena u njima, što dalje može poslužiti u traganju za efikasnijim postupcima sprečavanja i lečenja koagulopatija.

D. Zaključak

Na osnovu svega iznetog, Komisija smatra da je predložena tema doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj posttranslacionih modifikacija fibrinogena na njegovu reaktivnost i funkciju“

naučno zasnovana i da kandidat Nikola Gligorijević ispunjava sve uslove za početak izrade disertacije, te preporučujemo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta u Beogradu da odobri kandidatu izradu doktorske disertacije pod navedenim naslovom. Za mentora predlažemo dr Zorana Vujčića, redovnog profesora Hemijskog fakulteta i dr Olgicu Nedić, naučnog savetnika Instituta za primenu nuklearne energije.

Članovi komisije

dr Zoran Vujčić, redovni profesor, mentor

dr Olgica Nedić, naučni savetnik, mentor

dr Milica Popović, docent