

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 14.12.2017., одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара Николе Глигоријевића, истраживача сарадника Института за примену нуклеарне енергије - ИНЕП у Земуну, под насловом: **“Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову реактивност и функцију”**.

Поднету дисертацију смо прегледали и подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Николе Глигоријевића написана је на 108 страна, А4 формата и садржи 30 слика и 9 табела. Рад обухвата Увод (2 стране), Општи део (29 страна), Наши радови (32 стране), Закључци (2 стране), Експеримантални део (21 страна), Литература (22 стране, 256 цитата). Поред наведеног, дисертација садржи Извод на српском и енглеском језику (по 3 стране), Садржај (3 стране), Листу скраћеница (2 стране) и Биографију кандидата (1 страна) и Захвалницу (1 страна).

Увод истиче значај испитивања посттранслационих модификација фибриногена, за које се сматра да могу имати битну улогу у развоју коагулопатија код патологија као што су дијабетес мелитус тип 2 (ДМ2) и цироза. Такође, истиче се и значај испитивања промена везаних за старење, чиме се доприноси бољем сагледавању самог процеса старења. Истакнута је интеракција фибриногена са везујућим протеином-1 за факторе раста сличне инсулину (ИГФБП-1) и потенцијална улога овог комплекса у зарастању рана.

Општи део се састоји из четири веће целине. Прва целина даје општи приказ досадашњих знања о фибриногену, са освртом на његову структуру и функцију. Описане су његове посттранслационе модификације у (пато)физиолошким условима, са посебним нагласком на гликозиловање и оксидацију. У другом делу је дат приказ процеса коагулације са примарном и секундарном хемостазом и механизмом стварања фибрина. Трећа целина се бави интеракцијама фибриногена и фибрина са другим протеинима. Четврта целина даје општи приказ система фактора раста сличних инсулину (ИГФ систем), са освртом на ИГФБП-1 протеин и улогу ИГФ система у хемостазу.

Наши радови се састоје из шест делова. Први део описује процес изоловања фибриногена двоструким таложењем етанолом и указује на немогућност његовог квантитативног изоловања у присуству патологија ДМ2 и цирозе. Други део описује процес добијања, изоловања и анализе фибрина имуноблотом. Приказане су две методе

његовог добијања. Једна се базира на уклањању антикоагуланса из плазме дијализом, а друга на добијању фибрина од изолованог фибриногена додатком егзогеног тромбина и инхибицијом фактора XIII. Трећи део описује процес детектовања и доказивања интеракције фибриногена са ИГФБП-1 употребом разних имуно- и лектин-афинитетних метода. У четвртом делу се описују структурне промене фибриногена које настају као последица старења, применом лектинског ереја и спектрофлуориметрије, као и утицај ових промена на његову реактивност и сруктуру добијеног фибрина (применом метода спектрометрије, имуноблота, скенирајуће електронске микроскопије и мерењем Дарсијеве константе). Пети део приказује структурне карактеристике фибриногена код особа са цирозом и њихов утицај на интеракцију фибриногена са ИГФБП-1. Шести део се бави *in vivo* и *in vitro* дејством глукозе и метилглиоксала на структуру и афинитет фибриногена према ИГФБП-1 протеину.

Експериментални део детаљно описује узорке, састав реагенаса и процедуре које су коришћене у овој дисертацији.

Закључак сумира све добијене резултате.

У поглављу **Референце** су наведени радови из области истраживања који покривају све делове дисертације.

Б) Кратак приказ резултата

Употребом двоструког таложења етанолом, добијен је високо пречишћен фибриноген, што је електрофоретски потврђено. Овако добијен фибриноген се користио за даљи рад.

У циљу анализе фибрина имуноблотом, примењена су два приступа за његово добијење. Један се базирао на уклањању антикоагуланса из плазме дијализом и хомогенизацијом фибрина тефлонским хомогенизером, а други на добијању фибрина од изолованог фибриногена додатком егзогеног тромбина и инхибицијом фактора XIII. Иако су се за анализу фибрина користиле обе методе, друга метода је давала јасније резултате и била је лакша за извођење. Предност друге методе у односу на прву се огледа и у одсуству великог броја различитих фрагмената фибриногена.

Како би се утврдило да ли у циркулацији неки од ИГФБП протеина интерагује са фибриногеном, изоловани фибриноген је анализиран имуноблотом са четири анти-ИГФБП антитела, након нативне електрофорезе. Имунореактивни сигнал је добијен са анти-ИГФБП-1 антителом. Да би се ова интеракција доказала, употребљено је више метода, две ко-имунопреципитације и лектинска афинитетна хроматографија. Сва три приступа су дала позитиван резултат, а даљом анализом са више узорака је показано да се ради о општој појави у циркулацији. Такође, показано је да ИГФБП-1 имунореактивни сигнал не

потиче од евентуално присутних комплекса α_2 -макроглобулин/ИГФБП-1 или од олигомера ИГФБП-1.

Даљи рад се базирао на испитивању утицаја разних пато(физиолошких) стања на структуру и реактивност фибриногена и добијеног фибрина. Показано је да старење има утицаја на Н-гликозиловање фибриногена. Од 15 коришћених лектина у лектинском ереју, 14 је дало значајно повећање интензитета сигнала код фибриногена изолованог из плазме старијих особа. Како код немутиране форме фибриногена нема места за додатно Н-гликозиловање, повећање реактивности са лектинима може једино бити последица структурних промена постојећих гликана. Судајући по добијеним резултатима, старење прати повећање високо-манозних и хибридних Н-гликана, три/тетраантенарних комплексних Н-гликана, као и већи садржај галактозе и Н-ацетилглукозамина. Спектрофлуориметријски су показане мале структурне промене фибриногена код старијих људи, где је уочено повећање триптофанског сигнала, што упућује на компактнију терцијарну структуру молекула. Како повећана оксидација фибриногена није детектована, претпоставка је да промена терцијарне структуре може бити последица измењеног начина гликозиловања. Даље је показано да време коагулације негативно корелира са старењем, док се брзина коагулације, максимална апсорбанција фибриноског гела, пречник фибринских влакана и Дарсијева константа не мењају значајно. Количина комплекса фибриногена и фибрина са ИГФБП-1 се, такође, не мења значајно са старењем људи.

Анализа гликозиловања фибриногена методом лектинског ереја је показала да цироза јетре доводи до промена на нивоу Н-гликозиловања. Добијени резултати указују на повећање три/тетраантенарних структура гликана, галактозе везане за Н-ацетилглукозамин, терминалне α -2,3 сијалинске киселине и α -1,3 манозе. Са друге стране, α -1,6 фукоза везана за гликанско језго и биантенарни галактозиловани Н-гликани са уметнутим Н-ацетилглукозамином су били значајно смањени код фибриногена пацијената са цирозом. Анализа карбониловања је потврдила да у присуству цирозе долази до повећања степена карбониловања фибриногена. Даље, показано је да је α ланац фибриногена најподложнији карбониловању, а затим следи β ланац. На положају γ ланца није детектован имунореактивни сигнал који потиче од карбонилних група. Применом ЦД спектрометрије је показано да се заступљеност α -хеликса смањује у цирози, а такође су нађене и промене на нивоу терцијарне структуре. Детектовано смањење интензитета сигнала код спектрофлуоресцентне анализе указује на структурну промену фибриногена у којој долази до померања триптофана ка поларнијем окружењу. Ово смањење, такође, може бити и последица присуства специфичне аминокиселинске модификације (није утврђивано које). Имуноблотом је установљено да је количина комплекса фибриногена са ИГФБП-1 значајно већа код особа са цирозом.

Количина комплекса фибриногена и ИГФБП-1 се не мења код особа са ДМ2. Са друге стране, показано је да се значајно мање ИГФБП-1 налази у комплексу са фибрином код особа са дијабетесом. Пошто је детектовано смањење ових комплекса, даље је

испитано у *in vitro* условима да ли глико-оксидативне промене (карактеристичне за ДМ2) доводе до ове појаве. Након четири дана инкубирања плазме са глукозом, количина комплекса се смањила за 20 %. Третман изолованог фибриногена са глукозом је имао већи утицај, јер се након 4 дана инкубације детектовало смањење количине комплекса за 40 %. За разлику од глукозе, третман метилглиоксалом (МГО) је изазвао брзе промене у плазми и у изолованом фибриногену. Смањење комплекса је детектовано већ након 2 часа инкубације, док су сигнали који потичу од комплекса на имуноблоту нестали након 6 часова у случају плазме, односно након 24 часа у случају изолованог фибриногена. Додатна протеинска трака, која је била имунореактивна са анти-фибриногенским и анти-ИГФБП-1 антителом, је уочена на маси већој од масе фибриногена. Ова трака, вероватно, потиче од умрежених протеина у присуству МГО. Поред тога, фибриноген се кретао даље у гелу након структурне модификације изазване инкубацијом са МГО 24 часа. Ова појава није изненађујућа, јер МГО модификује аминокиселине са базним остацима, као што су лизин и аргинин. Ради потврде ефекта МГО на стварање комплекса фибриноген/ИГФБП-1, изоловани фибриноген је инкубиран са рекомбинантним хуманим (рх) ИГФБП-1, преко ноћи, а затим са МГО наредна 4 часа. Инкубирање са рх ИГФБП-1 је довело до повећаног стварања комплекса, док је додаток МГО имао супротан ефекат, односно изазивао је разлагање комплекса већ након 2 часа инкубације. Спектрофлуориметријском анализом је детектовано смањење триптофанског сигнала код изолованог фибриногена дијабетичара, као и код фибриногена модификованог у присуству МГО. Такође, детектован је и црвени померај максимума емисије, који је износио 3 nm за фибриноген дијабетичара, односно 4 nm за фибриноген модификован са МГО, што све заједно упућује на закључак да повећана концентрација МГО у дијабетесу утиче на промену структуре фибриногена. Да МГО модификује фибриноген код дијабетичара *in vivo*, доказано је спектрофлуориметријски праћењем повећања сигнала аргпиримидина, молекула који настаје реакцијом МГО и аргинина.

Општи закључак је да је фибриноген подложен структурним променама у разним (пато)физиолошким стањима, а неке од ових промена могу бити одговорне за његово измењено понашање током коагулације. Промена Н-гликозиловања прати здраво старење, али и промењену биосинтезу фибриногена у јетри. Оксидација фибриногена није нужан пратилац старења, али јесте стања повећаног оксидативног стреса у организму. Поред утицаја на његову структуру и коагулационе особине, посттранслационе модификације могу имати утицаја и на интеракције фибриногена са другим протеинима, као што је ИГФБП-1. Потребна су даља истраживања да би се повезале одређене структурне карактеристике фибриногена са његовом улогом у одређеним фазама коагулације, као и евентуална улога комплекса фибриногена са ИГФБП-1 у хемостази.

В) Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Фибриноген је главни протеин секундарне хемостазе. Његова улога се огледа у стварању фибрина који за циљ има ојачање примарног угрушка на месту повреде. Такође,

овај протеин подлеже посттранслационим модификацијама које му омогућавају правилно обављање функције. О значају Н-гликозиловања сведоче бројне детектоване мутације фибриногена које доводе до измењеног гликозиловања, што драстично утиче на његову функцију. Фибриноген је јако подложен оксидацији. Показано је да стања оксидативног стреса могу довести до оксидативних модификација фибриногена, што битно утиче на његову структуру и функцију. Оксидацијом, фибриноген постаје тромбоген и карактерише се мањом порозношћу. Структурне промене могу утицати на интеракције фибриногена са другим протеинима, посебно оним који су део каскаде процеса коагулације. Резултати добијени у овој докторској дисертацији указују на значајне промене фибриногена услед цирозе јетре и то на нивоу гликозиловања, карбониловања, секундарне и терцијарне структуре. Наведени подаци употпуњују и потпомажу тумачење већ постојећих података о хиперкоагулацији изазваној цирозом. У овој дисертацији је детектовано и постојање комплекса између фибриногена и ИГФБП-1 *in vivo*. Зна се да је концентрација ИГФБП-1 код пацијената са цирозом јетре изнад референтног опсега, а у овом раду је утврђено да је повећана и концентрација комплекса фибриногена и ИГФБП-1 код особа са цирозом. Ово повећање може стимулисати стварање тромба, пошто се зна да ИГФ-1 потенцира активацију крвних плочица, након везивања за рецептор ИГФ-1R, кога има на ћелијској мембрани плочица. Повећана протеазна активност у тромбу особа са цирозом може интензивирати протеолизу ИГФБП-1, што даље за последицу има локално повећање ИГФ-1, који се ослобађа из комплекса са ИГФБП-1. Повећана концентрација ИГФБП-1 у крви особа са абдоминалном аортном анеуризмом се показала као фактор ризика од тромбозе.

Дијабетес мелитус се карактерише гликовањем (неензимским гликозиловањем) протеина и настанком напредних производа гликовања, који даље изазивају значајне промене структуре и функције протеина. Због непрекидног пораста броја оболелих од дијабетеса у свету, испитивања узрока, последица и могућих терапија дијабетеса су, такође, у порасту. Познато је да фибриноген подлеже глико-оксидацији, што даље доприноси хиперкоагулацији. Резултати ове дисертације показују да метилглиоксал, чија се концентрација веома повећава у дијабетесу, има значајну улогу у хемијској модификацији и промени структуре фибриногена. Метаболички путеви које контролишу инсулин и ИГФ пептиди су повезани, а синтеза ИГФБП-1 у јетри је у директној корелацији са лучењем инсулина из панкреаса. Глукоза, а нарочито метилглиоксал, изазивају модификације фибриногена, које смањују његов афинитет за ИГФБП-1 и могу, поред других фактора, утицати на отпуштање ИГФБП-1 из комплекса приликом стварања фибрина код особа са дијабетесом.

Познато је да старење прате промене у коагулацији. Концентрација фибриногена је најчешће повећана у односу на вредности које индивидуе имају у млађем добу, што се сматра фактором ризика за тромбозу. Старење се често посматра као стање у коме је присутна перманентна инфламација ниског интензитета, те су и концентрације фактора

запаљенских процеса (у које се убраја фибриноген) повећане. Интереснатно је да се стање хиперкоагулације јавља код старих људи и у одсуству конкретних патологија. Како се животни век људи продужава, све је више студија које истражују промене које се догађају у организму са старењем. Сходно томе, један од циљева ове дисертације је био испитивање промена на молекулском нивоу самог фибриногена, које би могле допринети хиперкоагулацији код старих. Добијени резултати указују да се гликозиловање фибриногена мења са старењем и да ова промена може утицати на његову функцију, пре свега на време коагулације које се скраћује са старењем.

Резултати ове дисертације упућују на могућу улогу комплекса фибриноген/ИГФБП-1 у процесу хемостазе. Физиолошка улога ових комплекса се за сада не зна, као ни последице њиховог повећања односно смањења. За ИГФБП-3 (главни ИГФ везујући протеин у крви) постоји претпоставка да он, захваљујућу својој интеракцији са фибриногеном (која је детектована искључиво у *in vitro* условима) допрема ИГФ-1 до места повреде, где овај пептид испољава своје дејство. То може бити случај и са ИГФБП-1, који је у циркулацији високо фосфорирован и има велики афинитет за ИГФ-1. Познато је да плазмин може протеолизovati ИГФБП-1 и на тај начин отпусти ИГФ-1 који помаже опоравку на месту повреде, али у физиолошким условима још увек није показано да је тај механизам на делу. Фрагменти ИГФБП-1 настали деградацијом, такође, могу утицати на ћелије ендотела подстичући њихову миграцију. Свему овоме треба додати податак да ИГФБП-1 има и ИГФ независно дејство које испољава преко своје RGD секвенце, након њеног везивања за $\alpha_5\beta_1$ интегрин. Посредством ове интеракције, ИГФБП-1 поспешује растање рана. Крвне плочице садрже поменути интегрин, али није још увек доказано да се за њих везује ИГФБП-1. У наставку ове дисертације, кандидат ће се бавити истраживањем додирних тачака између фибриногена(фибрина), плочица и ИГФ система.

Г) Објављени радови и саопштења која чине део дисертације

1) Објављени радови

1. Nedić O., Šunderić M., Miljuš G., Penezić A., **Gligorijević N.**, Robajac D., Application of the lectin-affinity techniques: Advances in the analysis and understanding of the insulin-like growth factor (IGF) system. In: *Advances in Medicine and Biology* Vol. 131. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY. Editor: Leon V. Berhardt. 2018, 100 страна (у штампи). ISBN: 978-1-53613-841-2. (M₁₄).

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=64802

2. **Gligorijević N.**, Zamarová Križáková M., Penezić A., Katrlík J., Nedić O., Structural and functional changes of fibrinogen due to aging. *International Journal of Biological Macromolecules* 108 (2018) 1028-1034. (ИФ 3,671, Категорија: Биохемија и молекуларна биологија 92/290 у 2016. години, Категорија: Примењена хемија 9/72 у 2016. години и Категорија: Наука полимера 12/86 у 2016. години, M₂₁).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017336085?via%3Dihub>

3. **Gligorijević N.**, Minić S., Križáková M., Katrlík J., Nedić O., Structural changes of fibrinogen as a consequence of cirrhosis. *Thrombosis Research* 166 (2018) 43-49. (ИФ 2,650, Категорија: Хематологија 32/70 у 2016. години и Категорија: Периферна васкуларна болест 31/63 у 2016. години, **M₂₂**).

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384818303037?_rdoc=1&fmt=high&origin=gateway&docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb

4. **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. (ИФ 3,188, Категорија: Биохемија и молекуларна биологија 129/290 у 2016. години, **M₂₂**).

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715762.2016.1268689?journalCode=ifra20>

5. 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. (ИФ 1,537, Категорија: Биохемија и молекуларна биологија 235/290 у 2016. години, **M₂₃**).

<https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0006297917100133>

6. **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. (ИФ 1,537, Категорија: Биохемија и молекуларна биологија 235/290 у 2016. години, **M₂₃**).

<https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0006297916020073>

2) Саопшетања

1. **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. (**M₃₄**)
2. **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. (**M₃₄**)
3. **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/Kuşadası, Turkey, 2016, Abstract Book, p. 209. (**M₃₄**)

Д) Закључак

На основу свега изложеног, може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову реактивност и функцију”, кандидат Никола Глигоријевић успешно одговорио на постављене задатке који се односе на испитивање структурних и функционалних

карактеристика фибриногена у присуству разних (пато)физиолошких стања. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације су објављени у једном поглављу у монографији међународног значаја (M₁₄), једном раду штампаном у врхунском међународном часопису (M₂₁), два рада штампана у истакнутим међународним часописима (M₂₂), два рада штампана у међународним часописима (M₂₃) и у форми саопштења на три научна скупа (M₃₄). Резултати ове дисертације су од фундаменталног биохемијског значаја, а доприносе разумевању фактора који утичу на процес коагулације.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Николе Глигоријевића под насловом „**Утицај посттранслационих модификација фибриногена на његову реактивност и функцију**” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду,
20.06.2018.

Комисија:

др Зоран Вујчић, редовни професор

Хемијски факултет

Универзитет у Београду

др Олгица Неђић, научни саветник

Институт за примену нуклеарне енергије

Универзитет у Београду

др Милица Поповић, доцент

Хемијски факултет

Универзитет у Београду