

UNIVERZITET U BEOGRADU – HEMIJSKI FAKULTET

Aleksandra M. Đurđević Đelmaš

**Primena molekuskog modelovanja i
eksperimentalnih metoda u cilju proučavanja
uticaja perfluoralkilovanih supstanci na
humane proteine krvi**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE – FACULTY OF CHEMISTRY

Aleksandra M. Đurđević Đelmaš

**Investigation of the effects of perfluoroalkyl
substances on human blood proteins using
molecular modelling and experimental methods**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentor:

dr Miloš Milčić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Maja Gruden-Pavlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Mario Zlatović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Milan Nikolić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Hemijski fakultet

dr Karla Milčić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu–Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za Opštu i neorgansku hemiju, Univerziteta u Beogradu–Hemijskog fakulteta pod mentorstvom dr Miloša Milčića, vanrednog profesora Univerziteta u Beogradu–Hemijskog fakulteta.

Najdublju zahvalnost dugujem svom mentoru, profesoru Milošu Milčiću, što mi je pružio priliku da ponovo pronađem radost u nauci. Hvala na nesebično prenetom znanju, na strpljivim i dragocnim sugestijama, kao i na brojnim analitičkim razgovorima. Nastaviću da učim!

Profesorki Maji Gruden-Pavlović, posebno hvala, što me je radosno dočekala i primila pod okrilje teorijske “kuće”, kao i što je pružila svaku vrstu pomoći! Hvala što je prihvatila, u moru obaveza, da bude član Komisije.

Veliku zahvalnost dugujem profesoru Mariu Zlatoviću na prihvatanju članstva u Komisiji, na izdvojenom vremenu, na svim sugestijama tokom izrade ove disertacije.

Profesoru Milanu Nikoliću, hvala što je bio uz mene na ovom putu koji je oscilovao. Bez takve podrške, iskrenih saveta, bodrenja, bi sve bilo mnogo teže. Hvala i za eksperimentalnu pomoć, iz koje su se izordili lepi rezultati koji su ušli u ovu doktorsku disertaciju.

Zahvalnost dugujem i dr Nikoli Gligorijeviću, koji je od samog početka mog doktorata bio uključen u istraživanje. Takođe, dr Matiji Zlatar, hvala za sve sugestije i pomoć tokom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala svim mojim prijateljima sa fakulteta i van njega koji su mi pružili “vetar u leđa” u profesionalnoj tranziciji! Hvala što ste imali razumevanje za sve moje probleme, ali i pravu reč za rešavanje istih, nije potrebno da vas nabrajam, sami ćete se prepoznati!

Mojoj Boki, jer mi se uvek našla! Hvala i ostalim članovima moje šire porodice koji su me ohrabivali tokom svih godina studiranja.

Mojoj Karli, kojoj se divim i kojoj bih mogla posebnu zahvalnicu da napišem, hvala što je prepoznala da je ovo pravi put i što me je na njemu pratila!

Mojim dragim roditeljima i mojoj Anji, koji su mi pružili najveći oslonac, izgradili temelj za sve što je došlo u životu, koji su sada najponosniji ljudi na svetu! Vredelo je čekati!

Mom Nikoli, koji je moj glas razuma više od deceniju i oslonac u svim životnim izazovima! Ovu doktorsku disertaciju posvećujem našoj deci, Jugu i Anđeliji, koji su moja najveća inspiracija i snaga!

Primena molekulskog modelovanja i eksperimentalnih metoda u cilju proučavanja uticaja perfluoralkilovanih supstanci na humane proteine krvi

Sažetak

Per- i polifluoralkilovane supstance (engl. *perfluoroalkyl substances*, PFAS) predstavljaju izazov za naučnu zajednicu poslednjih nekoliko decenija. Njihova izuzetna hemijska stabilnost omogućila je upotrebu u različitim industrijskim granama i doprinela njihovoj akumulaciji u životnoj sredini i detekciji u ljudskoj krvi. Sve veći broj studija ukazuje na njihovu povezanost sa narušavanjem homeostaze u organizmu.

Tema istraživanja ove doktorske disertacije je bila usmerena ka teorijskoj i eksperimentalnoj analizi vezivanja trifluorsirćetne kiseline (engl. *TFA*), perfluorbutanske kiseline (engl. *PFBA*) i perfluoroktanske kiseline (engl. *PFOA*) za humane proteine krvi: fibrinogen, α 2-makroglobulin (α 2M), hemoglobin i humani serum albumin (HSA). Do sada, uticaj PFAS na strukturu i funkciju ovih proteina nije bio detaljno proučen.

Primenom molekulskog dokinga i simulacija molekulske dinamike (MD) identifikovana su vezivna mesta PFAS na analiziranim proteinima. Takođe, razvijena je nova metoda za praćenje protein-ligand interakcija iz MD simulacija. Eksperimentalno dobijeni podaci su pokazali da PFAS ostvaruju vezivanje srednjeg afiniteta sa fibrinogenom. Enzimski esej ukazao je na mogući uticaj PFAS na antiproteaznu funkciju α 2M usled vezivanja liganda blizu reaktivnog cisteina. Spektrofotometrijska merenja su potvrdila vezivanje PFAS za hemoglobin, uz indikacije o mogućim promenama u strukturi proteina. Analiziranjem interakcija između PFAS i HSA pronađeno je veoma jako vezivanje liganda za proteinski domen koji zadržava strukturu kod svih albuminoida i ima potencijalnu primenu u prečišćavanju životne sredine.

Dobijeni rezultati pružaju jasan uvid u interakcije PFAS sa humanim proteinima krvi i potvrđuju da ova jedinjenja mogu uticati na njihovu strukturu i funkciju.

Ključne reči: Per ili polifluoralkil supstance (PFAS); Fibrinogen; α 2-Makroglobulin; Hemoglobin; Humani serum albumin; Molekulski doking; Molekulska dinamika.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast:

UKD broj: 546

Investigation of the effects of perfluoroalkyl substances on human blood proteins using molecular modelling and experimental methods

Abstract

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) have posed a challenge to the scientific community over the past several decades. Their exceptional chemical stability has enabled their application in various industrial fields and contributed to their accumulation in the environment and detection in human blood. An increasing number of studies indicate their association with the disruption of homeostasis in the organism.

The subject of this doctoral dissertation was directed toward the theoretical and experimental analysis of the binding of trifluoroacetic acid (TFA), perfluorobutanoic acid (PFBA), and perfluorooctanoic acid (PFOA) to human blood proteins: fibrinogen, α 2-macroglobulin (α 2M), hemoglobin, and human serum albumin (HSA). To date, the influence of PFAS on the structure and function of these proteins has not been thoroughly investigated.

By applying molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations, PFAS binding sites on the analyzed proteins were identified. In addition, a new method for monitoring protein–ligand interactions from MD simulations was developed. Experimental data showed that PFAS bind to fibrinogen with moderate affinity. The enzymatic assay indicated a possible effect of PFAS on the antiprotease function of α 2M due to ligand binding near the reactive cysteine. Spectrophotometric measurements confirmed PFAS binding to hemoglobin, with indications of possible changes in protein structure. The analysis of PFAS–HSA interactions revealed very strong ligand binding to a protein domain conserved among all albuminoids, suggesting its potential application in environmental remediation.

The obtained results provide clear insight into PFAS interactions with human blood proteins and confirm that these compounds can affect their structure and function.

Key words: Per- or polyfluoroalkyl substances (PFAS); Fibrinogen; α -2-macroglobulin; Hemoglobin; Human Serum Albumin; Molecular docking; Molecular dynamics.

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield:

UDK number: 546

LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA:

α 2M – α 2-makroglobulin

APS – amonijum-persulfat

BAPNA – N α -Benzoil-L-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid

CBB – komasi brilijant plavo (od engl. *Comassie brilliant blue*)

CD – cirkularni dihiroizam

DFT – teorija funkcionala gustine (od engl. *density functional theory*)

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

FA – masna kiselina (od engl. *fatty acid*)

FEL – površina slobodne energije (od engl. *free energy landscape*)

HSA – humani serum albumin

LRIM – ligand-amino-kiselinski ostatak mapa interakcija (od engl. *ligand-residue interaction maps*)

MC – Monte Karlo metoda

MD – molekulska dinamika

MM – molekulska mehanika

MST – termoforeza na mikroskali (od engl. *microscale thermophoresis*)

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NPT – izotermalni-izobarični ansambl

NVE – mikrokanonski ansambl

NVT – kanonski ansambl

OPC – optimizovan model vode (od engl. *optimal point charge*)

PDB – proteinska baza podataka (od engl. *protein data bank*)

PFAA – perfluoralkil kiselina (od engl. *perfluoroalkyl acid*)

PFAS – per- ili polifluoralkil supstance (od engl. *per- or polyfluoroalkyl substances*)

PFBA – perfluorbutanska kiselina (od engl. *perfluorobutanoic acid*)

PFKK – perfluorkarboksilna kiselina (od engl. *perfluorocarboxyl acid*, *PFCA*)

PFOA – perfluoroktanska kiselina (od engl. *perfluorooctanoic acid*)

PFOS – perfluoroktan sulfonska kiselina (od engl. *perfluorooctanesulfonic acid*)

QM – kvantna mehanika (od engl. *quantum mechanics*)

R_g – radijus žiracije (od engl. *radius of gyration*)

RMSF – fluktacije aminokiselinskog ostatka (od engl. *root mean square fluctuation*)

RMSD – srednje kvadratno odstupanje koordinata atoma u odnosu na referentnu vrednost (od engl. *root mean square deviation*)

SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (od engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

TEMED – tetrametiletildiamin

TFA – triflursirćetna kiselina (od engl. *trifluoroacetic acid*)

UV/VIS – ultraljubičasta/vidljiva svetlost (od engl. *ultraviolet/visible*)

3D – Trodimenzionalna struktura

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. PFAS – definicija i terminologija	2
2.1.1. Struktura, fizička i hemijska svojstva.....	2
2.1.2. Klasifikacija perfluoralkil supstanci.....	3
2.1.3. Perfluoralkil kiseline.....	4
2.1.4. Nasledeni i novi PFAS.....	5
2.1.5. Proizvodnja i industrijska upotreba PFAS	6
2.1.6. Detekcija, degradacija i uklanjanje PFAS	6
2.1.7. Uticaj na životnu sredinu-PFAS kao zagađivači.....	6
2.1.8. Biomonitoring i uticaj na ljudsko zdravlje.....	7
2.1.9. Metabolizam PFAS i njihova eliminacija iz organizma	7
2.2. Krv i njene komponente.....	8
2.2.1. Humani proteini krvi – Opšti pregled.....	8
2.3. Osnovni principi vezivanja PFAS za proteine	17
2.3.1. Afinitet i vezivna mesta PFOA na HSA	17
2.3.2. Interakcija PFOA sa hemoglobinom	18
2.3.3. Uticaj PFAS na strukturu i aktivnost enzima.....	18
2.4. Metode računarske hemije	18
2.4.1. Molekulski doking	19
2.4.2. Uvod u molekulsku dinamiku	25
3. CILJEVI	34
4. EKSPERIMENTALNI DEO	35
4.1. Ispitivanje interakcija fibrinogen-PFAS	35
4.1.1. Izolovanje i kvantifikacija fibrinogena	35
4.1.2. Fluorescentna spektroskopija.....	36
4.1.3. Određivanje konstante afiniteta pomoću MST metode.....	36
4.1.4. CD spektroskopija	37
4.1.5. Spektrofotometrijska analiza formiranja fibrinskog ugruška.....	37
4.1.6. Uticaj PFAS na trombinsku aktivnost	37
4.1.7. Računarske metode	38
4.2. Ispitivanje interakcija između α2-makroglobulina (α2M) i PFAS	38

4.2.1. Izolovanje i kvantifikacija α 2-M	38
4.2.2. Testiranje anti-proteinazne aktivnosti α 2M u prisustvu PFAS	39
4.2.3. Merenje promene unutrašnje fluorescencije α 2M u prisustvu PFAS	39
4.2.4. Merenje uticaja PFAS na tripsinsku aktivnost	39
4.2.5. Merenje promene unutrašnje fluorescencije tripsina u prisustvu PFAS	40
4.2.6. Doking proračun za predviđanje vezivnih mesta	40
4.2.7. Molekulsko-dinamičke simulacije vezivanja PFOA za α 2M	41
4.3. Ispitivanje interakcija hemoglobin-PFAS	41
4.3.1. Uticaj PFAS na intenzitet Soretove trake	41
4.3.2. Računarske metode-priprema liganda, proteina i doking proračun	41
4.3.3. DFT proračun energije vezivanja TFA za hemoglobin	42
4.3.4. Određivanje stabilnosti P-L kompleksa MD simulacijama	42
4.4. Ispitivanje interakcija HSA-PFOA	42
4.4.1. Rezultati molekulskog dokinga vezivanja PFOA za HSA	42
4.4.2. Identifikacija vezivnih mesta pomoću MD simulacije	42
5. REZULTATI I DISKUSIJA	44
5.1. Uticaj PFAS na strukturu i funkciju fibrinogena	44
5.1.1. Afinitet vezivanja PFAS za fibrinogen	44
5.1.2. Predviđanje vezivnih mesta	45
5.1.3. Uticaj vezanih liganada na strukturu fibrinogena	48
5.1.4. Uticaj vezanih liganada na funkciju formiranja krvnog ugruška	49
5.2. Uticaj PFAS na strukturu i funkciju α 2-makroglobulina	50
5.2.1. Antiproteazna aktivnost u prisustvu PFAS	51
5.2.2. Predviđanje vezivnih mesta: doking proračun	52
5.2.3. Konstante afiniteta	55
5.2.4. Molekulsko-dinamičke simulacije vezivanja PFOA za α 2M	56
5.3. Uticaj PFAS na strukturu hemoglobina	59
5.3.1. Soretova traka hemoglobina	59
5.3.2. Predviđanje vezivnih mesta-molekulski doking	61
5.3.3. Doking na α 1 subjedinici Hb	66
5.3.4. Vezivanje TFA u distalnom delu Hb	69
5.3.5. DFT analiza vezivanja TFA za hemoglobin	70
5.3.6. Analiza vezivnog mesta TFA primenom MD simulacija	70
5.4. Karakterizacija vezivnih mesta PFOA na humanom serumu albuminu	71

5.4.1. Predviđanje vezivnih mesta PFOA na HSA doking metodom.....	72
5.4.2. Molekulska dinamika vezivnih mesta identifikovanih doking metodom	75
5.4.3. Rezultati MM-PBSA analize	81
6. ZAKLJUČCI	82
7. LITERATURA	84
8. PRILOZI	98

1. UVOD

Per- i polifluoralkil supstance (engl. *per- and polyfluoroalkyl substances*, PFAS) predstavljaju raznovrsnu grupu hemijskih jedinjenja, sa zajedničkom strukturnom karakteristikom posedovanja polarne glave i nepolarnog repa, koji može biti delimično ili potpuno fluorovan. Upravo zbog posedovanja C–F veze, koja predstavlja jednu od najjačih kovalentnih veza u prirodi, PFAS su hemijski veoma stabilna jedinjenja. Takođe, ove površinski aktivne supstance su otporne na visoke temperature i pritiske, rastvaraju se i u hidrofilnim i u lipofilnim rastvaračima, te ispunjavaju sve industrijske potrebe. Iako je proizvodnja PFAS skupa, navedene karakteristike ih čine nezamenljivim u industrijskoj upotrebi. Koriste se u proizvodnji protivpožarne pene, keramike, kućne hemije, kozmetičkih preparata, nameštaja, tekstila, plastičnih materijala. Sa druge strane, savremeni problem upotrebe PFAS leži upravo u njihovoj hemijskoj stabilnosti. Naime, C–F veza se ne može raskinuti standardnim metodama, dok biološki tretmani hidrolizuju C–C veze, što dovodi samo do skraćivanja fluorovanog repa. Istraživanja su pokazala da se PFAS danas nalaze u vodi, vazduhu, zemljištu, biljkama, mikroorganizmima, a potvrđeni su i u pijaćoj vodi, životinjskoj i ljudskoj krvi u koncentracijama koje nisu zanemarljive. Složenost problema dodatno otežavaju činjenice da se u ekosistemu ne nalazi jedna vrsta PFAS, već kompleksna smeša različitih jedinjenja.

Sprovedena su brojna globalna istraživanja uticaja PFAS na ljudsko zdravlje, čiji rezultati ukazuju na ozbiljne zdravstvene posledice. Nakon što dospeju u organizam, PFAS se akumuliraju u tkivima, naročito u jetri, bubrezima, srcu, mozgu, mišićima i kostima. Oni deluju imunosupresivno, utiču na hormonski disbalans, povezani su sa oboljenjima jetre i bubrega, smanjuju reproduktivnu funkciju, gustinu kostiju, a postoje istraživanja koja ih povezuju i sa pojavom kancera. Regulativa u vezi sa dozvoljenim koncentracijama PFAS u vodi i dalje nije globalno usaglašena i zavisi od lokalne zagađenosti, a u nekim državama uopšte ne postoji. Posebnu grupu PFAS čine perfluoralkil kiseline, od kojih su perfluorkarboksilne kiseline (engl. *perfluorocarboxylic acids*, PFCAs) posebno značajne za ovo istraživanje. Predstavnik ove grupe je PFOA, dugolančani molekul, koji zbog visoke koncentracije u krvi predstavlja i najproučavaniji PFCA.

PFOA se u visokom procentu vezuje za humani serum albumin, a zatim i transportuje kroz organizam, što je pokazano eksperimentalnim i teorijskim metodama. Najpouzdaniji rezultati u istraživanju protein–ligand interakcija postižu se upravo kombinacijom ova dva pristupa. Eksperimentalne metode se ne mogu tumačiti izolovano, a *in silico* pristupi poslednjih godina beleže ubrzan razvoj. Danas je moguće, teorijskim pristupom, sa velikom preciznošću identifikovati vezivna mesta liganada na receptorima, pa čak i na složenim sistemima poput membranskih proteina ili DNK. Najznačajnije teorijske metode uključuju kvantnohemijske proračune (DFT), molekulski doking i molekulsku dinamiku (MD), koje se međusobno nadovezuju i dopunjuju.

Cilj ove doktorske disertacije je da pruži jasan uvid u vezivanje tri PFCAs (TFA, PFBA, PFOA) za četiri važna humana proteina krvi: fibrinogen, α -2-makroglobulin (α 2M), hemoglobin i humani serum albumin. Odabrani ligandi omogućavaju poređenje efekata dužine lanca na vezivanje i potencijalne promene u strukturi, aktivnosti i funkciji proteina. Fibrinogen je ključan protein u kaskadnom procesu koagulacije krvi, dok α 2M učestvuje u antiproteaznoj zaštiti organizma i povezan je sa regulacijom koagulacije. Hemoglobin je glavni transportni protein kiseonika, shodno tome, posebno je značajan za razumevanje mogućih uticaja “večnih hemikalija” na osnovne fiziološke funkcije. Do sada nije ispitan uticaj PFCAs na koagulaciju krvi, niti na antiproteaznu zaštitu, ali je poznato da se PFOA vezuje za hemoglobin i da uzrokuje velike strukturne promene u molekulu. Takođe, dosadašnja istraživanja su bila fokusirana na vezivanje PFOA za HSA, budući da PFACs oponašaju masne kiseline koje se vezuju visokim afinitetom za HSA.

Rezultati dobijeni istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije treba da donosu nova otkrića o interakcijama PFCAs sa humanim proteinima krvi, pružajući uvid o strukturnim i funkcionalnim promenama proteina nastalih usled vezivanja liganada.

2. OPŠTI DEO

U poglavlju “Opšti deo” detaljno je opisana tema ove doktorske disertacije, sa posebnim akcentom na strukturu i osobine ispitivanih liganada (TFA, PFBA i PFOA), njihov uticaj na životnu sredinu i posledice po ljudsko zdravlje. Posebno je razmotreno vezivanje PFAS za humane proteine, što predstavlja osnovu teorijskih i eksperimentalnih istraživanja prikazanih u disertaciji. Takođe, posebna pažnja posvećena je teorijskim metodama koje su iskorišćene za identifikovanje optimalnih mesta vezivanja liganada u proteinima, kao i metodologiji molekulske-dinamičke simulacije.

2.1. PFAS – definicija i terminologija

PFAS su sintetska jedinjenja koja pripadaju velikoj porodici antropogenih organskih supstanci [1,2]. Naziv PFAS je relativno nov, ali se ova jedinjenja koriste od početka dvadesetog veka i tada je korišćen termin PFC (engl. *Perfluorinated chemicals*). Ovaj termin se smatra zastarelim, pa je sve manje u upotrebi, zbog mešanja sa terminom perfluorovani ugljovodonici. Pored ovog naziva, u upotrebi su bili i sinonimi kao što su fluorosurfaktanti ili fluorohemikalije [1]. Evolucija terminologije je trajala od 1994. do 2020. godine [3]. Prvo perfluorovano jedinjenje je proizvedeno još 1886. godine, to bio najjednostavniji perfluorovani molekul, ugljentetrafluorid [1]. Poli-fluoralkil supstance imaju potencijal da se abiotički ili biotički transformišu u perfluoralkil supstance [4].

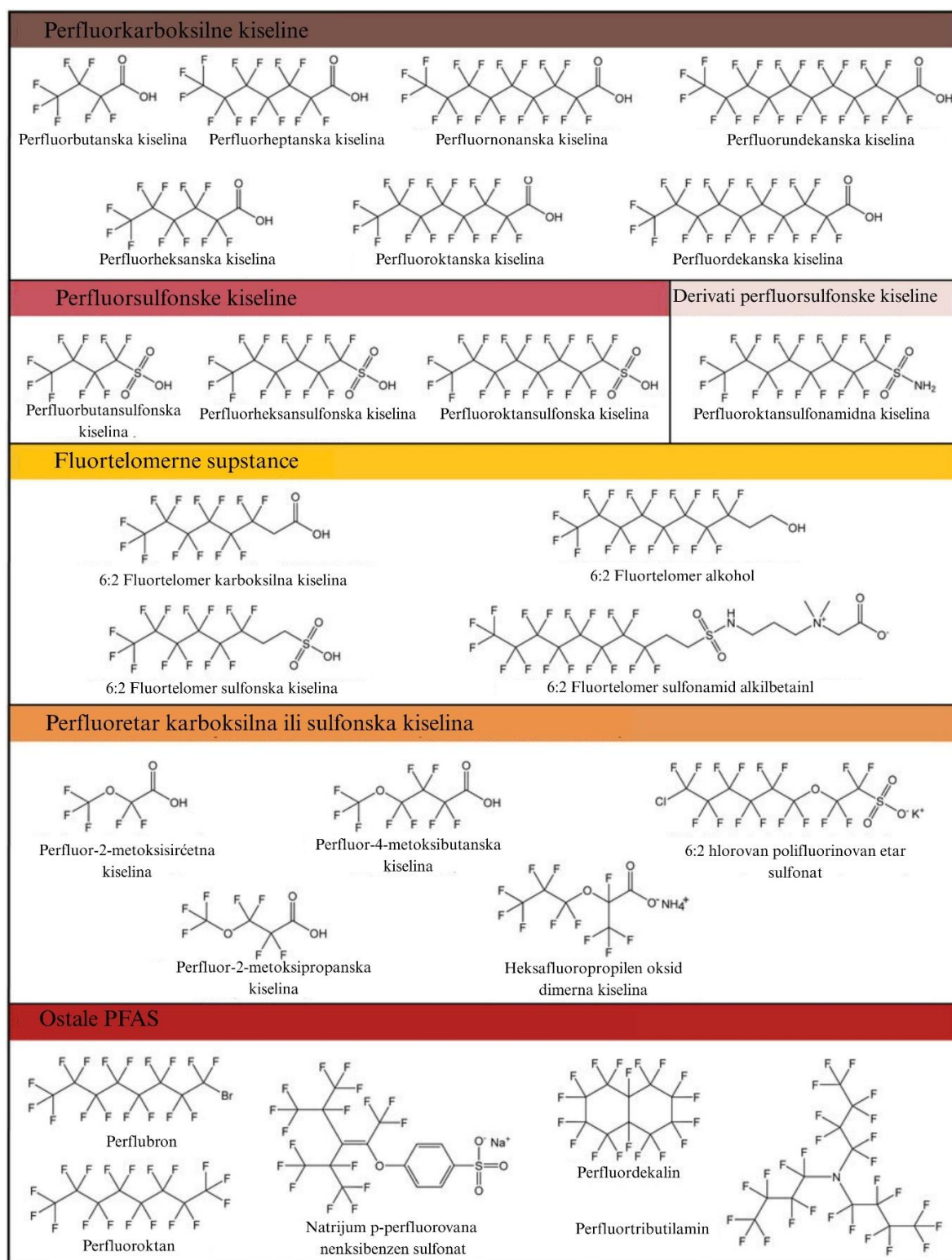
Prvu jasnu definiciju ovih molekula je dao Buck sa svojim saradnicima 2011. godine i oni ih definišu kao alifatične supstance koje sadrže ostatak $-C_nF_{2n+1}$ gde je n najmanje 1 [4]. Kasnije, OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)/UNEP Global PFC Group poručuju da se oni ne mogu tako posmatrati, jer mnoge supstance imaju drugačiji perfluorougljenični ostatak kao perfluorodikarboksilna kiselina [5]. Predloženo je da se koristi prethodno pomenuta definicija, ali da joj se pridodaju i jedinjenja u čijoj formuli je $-C_nF_{2n-}$ (n veće ili jednako 1). Takođe, trenutno tumačenje definicije ovih molekula može uvrstiti i supstance koje imaju perfluorovani ugljenični ostatak koji je vezan za neku funkcionalnu grupu za oba kraja, ili aromatična jedinjenja koja imaju perfluorovani ostatak na jednom kraju i fluorovane cikloalifatične supstance [6]. Postoje i mišljenja da PFAS imaju barem jedan perfluorovani alkil ostatak u kom su svi vodonici zamenjeni fluorom [7].

Postoje četiri osnovna kriterijuma za klasifikaciju PFAS: prema dužini lanca, strukturnoj linearnosti, funkcionalnoj ulozi kao surfaktanta i prema naelektrisanju, odnosno da li se javljaju u anjonskom obliku [4].

2.1.1. Struktura, fizička i hemijska svojstva

Molekulska struktura PFAS se sastoji od alifatičnog lanca (ili nekoliko lanaca) u kojima su svi (per-) ili pojedini (poli-) vodonici zamenjeni fluorom [2]. Odlikuju se raznovrsnom strukturom, ali im je zajedničko posedovanje hidrofobne kičme sačinjene od ugljenika i fluora i hidrofilne, terminalne, funkcionalne grupe, poput ostatka karboksilne kiseline, amina, sulfonske kiseline, alkohola, fosfonata, **Slika 1** [1,2,8].

PFAS se u prirodi nalaze kao anjoni, cviterjoni i neutralne vrste. Perfluorkarboksilne kiseline i perfluorsulfonske kiseline (engl. *Perfluorosulfonic acids*, *PFSA*) često su prisutne u anjonskom obliku, što ih čini rastvorljivim u vodi. Za razliku od njih, neutralne vrste (fluorotelomerni alkoholi, FTOH) su isparljive, biodegradabilne i slabo rastvorne u vodi [2]. Njihova struktura im daje jedinstvenu površinski-aktivnu prirodu, dok ekstremno jaka C-F veza (485 kJ/mol) ove molekule čini termostabilnim i otpornim na hidrolizu, metaboličke i svetlosne promene, čime je njihova hemijska, fizička ili biohemijska razgradnja značajno otežana [1,7,8].



Slika 1. Uprošćen prikaz strukture perfluorovanih jedinjenja. Preuzeto i modifikovano prema [9].

2.1.2. Klasifikacija perfluoralkil supstanci

Postoji preko 8000 različitih PFAS na tržištu, neke su još uvek neistražene i nazivaju se prekursorima PFAS [10]. Teško je napraviti striktnu klasifikaciju ovih jedinjenja. PFAS se mogu podeliti prema njihovoj hemijskoj strukturi i funkcionalnim grupama na perfluoralkil supstance, polifluoralkil supstance; takođe, klasifikacija može biti izvršena prema funkcionalnim grupama i prema dužini lanca, **Tabela 1** [2].

Definicije „dugolančanih“ PFOA razlikuju se po broju ugljenika [3]. Iako OECD definicija ne obuhvata perfluoralkil supstance, osim PFAA i PFSA, može se smatrati da je perfluoralkil lanac sa 7 ili više ugljenika, npr. $C_7F_{15}-$, u svakom slučaju dug [2].

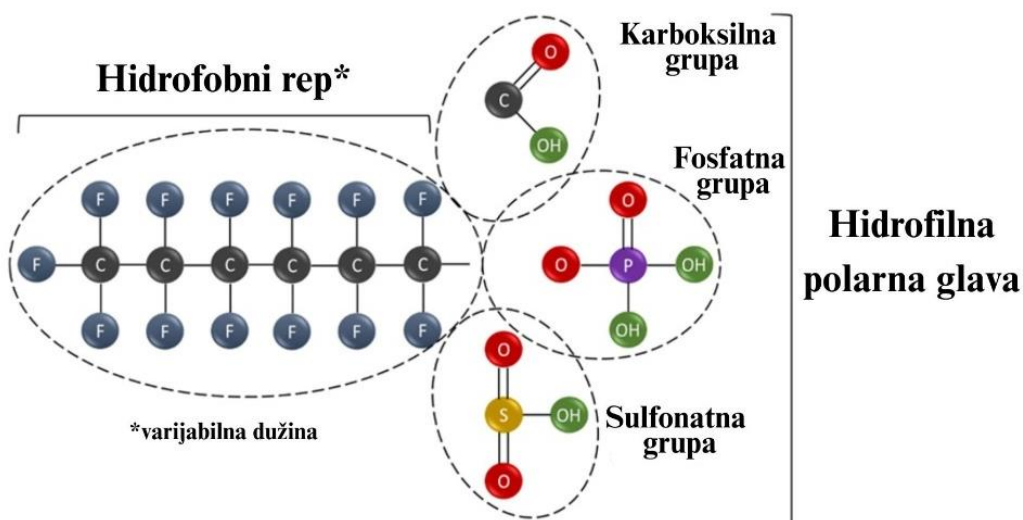
Tabela 1. Uprošćen prikaz klasifikacije PFAS

	Perfluoralkil supstance	Polifluoralkil supstance	Funkcionalna grupa	Dužina lanca
Objašnjenje	Potpuna supstitucija fluorom	Delimična supstitucija fluorom	Karboksilna kiselina, sulfonilna kiselina	Ultrakratkolančani, kratkolančani, dugolančani
Primer jedinjenja	PFOA, PFOS	FTOH	PFAA, PFSA	TFA, PFBA, PFOA

2.1.3. Perfluoralkil kiseline

Perfluoralkil kiseline (engl. *Perfluoroalkyl acids*, PFAA) su najveća grupa PFAS. Porodica PFAA uključuje različita jedinjenja, kao što su perfluoralkil karboksilne kiseline, sulfinske kiseline, sulfonske kiseline, fosforaste i hipofosforaste kiseline, **Slika 2** [4].

PFAA mogu biti direktno emitovane u životnu sredinu ili se mogu formirati indirektno kroz razgradnju drugih jedinjenja. Njihova stabilnost i otpornost na razgradnju izazivaju zabrinutost zbog mogućeg nakupljanja u ekosistemu i uticaja na ljudsko zdravlje [11,12]. pKa vrednosti određuju stepen disocijacije PFAA u vodenim, zemljišnim i sedimentnim sredinama, što rezultuje nastajanjem njihovih anjonskih oblika. Neutralne i naelektrisane forme imaju veoma različita fizičko-hemijska svojstva [4,13].



Slika 2. Prikaz hidrofobnog repa i hidrofilne grupe, koja može biti karboksilna, fosfatna ili sulfonatna u perfluoralkil kiselini. Preuzeto i modifikovano prema [14].

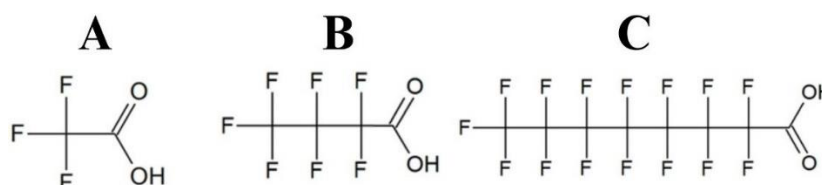
2.1.3.1. Perfluorkarboksilne kiseline

Perfluoralkil karboksilne kiseline, PFKK, poznate i kao perfluorkarboksilne kiseline imaju opštu hemijsku formulu $C_nF_{2n+1}COOH$ [4]. Klasifikacija ovih kiselina se vrši na osnovu dužine hidrofobnog fluorovanog lanca, na utrakratkolančane (2-3 potpuno fluorovana ugljenika), kratkolančane (4-7 potpuno fluorovana ugljenika) i dugolančane (više od osam C atoma u repu) [2,8]. Najvažnije predstavnike svake grupe ćemo opisati u daljem tekstu.

2.1.3.1.1. Trifluorsirćetna kiselina

Molekulske mase 114,023 g/mol i gustine 1,49 g/cm³, trifluorkarboksilna kiselina, TFK (engl. *trifluoroacetic acid*, *TFA*) je predstavnik ultrakratkolančanih perfluoralkil karboksilnih kiselina [14]. Struktura ovog jedinjenja rastvorljivog u vodi je data na **Slici 3A**.

Trenutno su koncentracije TFA u životnoj sredini za redove veličine više od koncentracija drugih per- i polifluoroalkil supstanci. Ovo nagomilavanje je posledica toga što mnogi PFAS imaju TFA kao produkt svoje razgradnje [16].



Slika 3. Strukture predstavnika svake grupe perfluorkarboksilnih kiselina:

A-TFA; B-PFBA; C-PFOA.

2.1.3.1.2. Perfluorbutanska kiselina

Najbitniji predstvanik kratkolančanih perfluorkarboksilnih kiselina je perfluorbutanska kiselina, PFBK (engl. *perfluorobutanoic acid*, *PFBA*), struktura prikazana na **Slici 3B** [17]. Studije pokazuju da je kratkolančani PFBA (Mr 214,04 g/mol; gustine 1,64 g/cm³), jednako prisutan i bioakumulativan kao i njegov dugolančani ekvivalent, a u nekim studijama se pominje da se nalazi u višim koncentracijama od dugolančanih jedinjenja [18]. I kratkolančani i ultrakratkolančani PFAS-ovi su hidrofilni i nisu skloni ka formiranju agregata [2].

2.1.3.1.3. Perfluoroktanska kiselina

Perfluoroktanska kiselina, PFOK (engl. *Perfluorooctanoic acid*, *PFOA*) molekulske mase 414,07 g/mol i gustine 1,8 g/cm³ poseduje potpuno fluorovani rep, sačinjen od sedam ugljenika i nezasićeni kraj, koju čini karboksilna grupa, **Slika 3C**. PFOA je najznačajniji predstavnik PFCAs. PFOA je stabilna i nedegradabilna, ali se pojedini derivati mogu razgraditi do PFOA. Amonijumove soli PFOA su se koristile u proizvodnji fluoropolimera kao što je Teflon [17].

2.1.4. Nasleđeni i novi PFAS

Decenije proizvodnje i upotrebe dovele su do prisustva različitih PFAS u životnoj sredini, pri čemu se nasleđeni (engl. “*legacy*”) PFAS i dalje detektuju uprkos regulativama, dok novi (engl. “*emerging*”) PFAS postavljaju dodatne izazove u pogledu postojanosti, mobilnosti, izloženosti i ekotoksičnosti, **Tabela 2** [2,7,19]. Nove, “*emerging*” PFAS, poput HFPO-DA, DONA i 6:2 Cl-PFESA, su nađene u relativno visokim koncentracijama u blizini poznatih direktnih izvora emisije. Malo se zna o njihovom transportu i da li se on obavlja vazduhom ili vodom [7,20]. Iako se “nove” PFAS često smatraju kao bezbednije alternative, rastući dokazi ukazuju da bi i one mogle imati ozbiljne ekološke i zdravstvene posledice. Današnji fokus je usmeren da se njihova upotreba ograniči pre nego što postanu novi ekološki problem [2].

Tabela 2. Primeri nasleđenih (“*legacy*”) i novih (“*emerging*”) PFAS [10].

Nasleđeni PFAS	Novi PFAS
PFOA	PFBA
PFOS	PFBS
PFNA	PFPeA
PFOSA	PFBSA

2.1.5. Proizvodnja i industrijska upotreba PFAS

PFAS se industrijski dobijaju putem dva procesa: elektrohemijom fluorinacijom i fluorotelomerizacijom [7,22]. Iako skupi za proizvodnju, potpuno zadovoljavaju potrebe industrija koje ih upotrebljavaju [23]. Procenjuje se da čak 90 % PFAS nastaje razgradnjom prekursora [24]. Zbog svojih svojstava imaju široku upotrebu, te se koriste u građevinskoj industriji, u proizvodnji kućne hemije, kozmetičkih preparata, slikarskih boja, mastila, keramike, električnih uređaja, tekstila, nameštaja, hidraulične tečnosti i motornih ulja, protivpožarne pene [8,25].

2.1.6. Detekcija, degradacija i uklanjanje PFAS

U oko 70 % radova koji se bave detekcijom PFAS do 2021. godine korišćena je tečno-masena hromatografija (LC-MS/MS) kao analitička metoda [26]. Tehnika je usavršavana tokom godina, kako bi omogućila analizu više od 50 uzoraka PFAS u jednom merenju. Međutim, neki PFAS nisu pogodni za ovu tehniku. Fluorotelomerni alkoholi (FTOHs), koji nemaju naelektrisane grupe, ne mogu se analizirati sa dovoljnom osetljivošću koristeći LC-MS/MS [6]. Osim hromatografskih metoda, postoje i senzori koji su namenjeni detekciji ovih jedinjenja. Upotreba tehnike zavisi od vrste uzoraka (hrana, biološki materijal, vazduh i zemljište) [8,26].

Degradacija PFAS je izazov današnjice. Postoje istraživanja o korišćenju elektrohemijske oksidacije, plazme, fotokatalize, sonolize, oksidacije u superkritičnoj vodi i termalne degradacije/spaljivanje u te svrhe [27]. Standardni tretmani koji bi mogli da razore perfluorovana jedinjenja su neefikasni zbog jake kovalentne C-F veze u strukturi molekula. Biološkim tretiranjem se raskidaju samo C-C veze, te je na taj način moguće samo skraćivanje hidrofobnog repa. Kwon i saradnici su to i dokazali, koristeći *Pseudomonas aeruginosa* soj HJ4 koji je smanjio koncentraciju PFOS za 67 % nakon 48 sati, pri 30-37 °C i pH 7-9, ali su kratkolančani PFBS i PFHxS nastali kao produkti [28]. Utvrđeno je da bakterija *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D ima sposobnost korišćenja PFOS u vodi i zemljištu kao jedinog izvora ugljenika i energije [29]. Procesi oksidacije ozonom i hidrosil radikalima imaju isti rezultat, odnosno samo parcijalnu degradaciju [2,30].

Uklanjanje ovih molekula je moguće adsorpcijom, jonoimenjivačima, nanofiltracijom pod visokim pritiskom i reverznom osmozom. Ali, do sada su uklanjani samo pojedinačni PFAS u uzorcima dejonizovane vode, dok smeša kratkolančanih i dugolančanih PFAS nije uspešno adsorbovana, niti je regeneracija adsorbenata uspešno obavljena [2,31,32].

2.1.7. Uticaj na životnu sredinu-PFAS kao zagađivači

Na početku 21. veka, istraživanja sprovedena u regionu srednjeg Ohaja skrenula su pažnju naučne zajednice na kontaminaciju perfluoralkilnim supstancama i njene značajne implikacije po ljudsko zdravlje [7]. PFAS prisutni u životnoj sredini, u vodi, zemljištu i vazduhu, potiču iz direktnih i indirektnih izvora, a mogu biti preuzeti od strane flore i faune. Pokazano je da se kratkolančani PFAS pretežno bioakumuliraju u nadzemnim delovima biljaka, dok se dugolančani PFAS uglavnom skladište u korenu biljnih vrsta [2]. Direktni izvori predstavljaju oslobađanje specifičnih PFAS tokom njihove proizvodnje, upotrebe i odlaganja. Smatra se da ovi izvori čine većinu kontaminacije fluorovanih jedinjenja u životnoj sredini [2,7]. Indirektni izvori odnose se samo na formiranje PFAS putem degradacije ili biotransformacije prekursora [7]. Najrasprostranjeniji i najdetektabilniji u vodenom sistemu su PFOA i PFOS, uz napomenu da su PFAS detektovane u svakoj vodenoj sredini [32]. Države Evropske unije, kao ni SAD, još uvek nisu uspostavile jedinstvenu regulativu o koncentracijama PFOA i PFOS u pijaćoj vodi, a svaka članica EU ima različite regulative [17,31,33]. Najveći zagađivači, osim fabrika, su objekti koji koriste pene za gašenje požara (vojne baze, aerodromi, vatrogasne stanice), kao i postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Kanalizacioni mulj, tekstil i drugi PFAS-kontaminirani materijali rutinski se spaljuju u odgovarajućim postrojenjima, dok se pepeo koji nastaje tim procesom odlaže na deponijama otpada. Još uvek nije jasno da li se tokom spaljivanja PFAS oslobađaju u atmosferu u svom originalnom stanju, ali neki izveštaji navode da se u atmosferi nalaze PFAS niže molekulske mase [6].

2.1.8. Biomonitoring i uticaj na ljudsko zdravlje

Biomonitoring ljudi (HBM) je idealan instrument za procenu hemijskih supstanci i/ili njihovih biotransformacionih produkata u ljudskim biološkim tečnostima ili tkivima, koji uzima u obzir sve izvore i načine unosa [34]. Biomonitoring većnih molekula se uglavnom fokusira na ljudsku krv i urin, ali postoje i studije koje objašnjavaju da je moguće detektovati PFAS i u uzorcima kose i noktiju [7,33,35]. Koncentracije PFAS u uzorcima krvi prate opšti redosled: serum > plazma > puna krv i povezane su sa godinama, polom, ishranom, načinom života, porodičnim prihodom, nivoom obrazovanja, društvenim statusom i BMI (engl. body mass index, *BMI*) [36]. Od 1999. godine Sjedinjene Američke Države prate koncentraciju PFAS u krvi. Pronađeno je da 99 % populacije poseduje PFOA, PFOS i perfluorheksansulfonsku kiselinu (engl. *Perfluorohexanesulfonic acid, PFHxS*). Od tada pa do današnjeg dana, PFAS su detektovane u krvi, humanom mleku [37], jetri, bubrezima, srcu, slezini, mišićima, kostima i mozgu [38,39]. Ova fluorovana jedinjenja se dovode u vezu sa najrazličitijim bolestima, poput, koronarnih, disfunkcije žlezda, problema sa reproduktivnim zdravljem, bubrezima, kancerom, smanjenom reproduktivnošću, imunosupresivnošću i kod dece i kod odraslih, ali i uticajem na poremećaj pažnje i hiperaktivnost [1,17,31,40,41]. Nedavne studije izveštavaju o smanjenoj gustini kostiju u vezi sa izloženošću PFAS, ali i pokazuju da PFOA ometa aktivnost vitamina D vezivanjem za receptor vitamina D, što može biti povezano sa mineralizacijom kostiju [6]. Američka Agencija za zaštitu životne sredine (engl. *Environmental Protection Agency, EPA*) je zaključila da postoje indikativni dokazi o kancerogenom potencijalu kako PFOA tako i PFOS kod ljudi, a sposobnost da izazovu oksidativni stres može biti jedan od potencijalnih mehanizama delovanja [33]. Istraživanja sprovedena u Švedskoj, Norveškoj, Danskoj, Nemačkoj, Japanu, Koreji, Kini i Italiji pokazala su varijabilne koncentracije PFAS u krvnoj plazmi. Dok su nivoi PFOS i PFOA opadali od 2000. godine, koncentracije perfluoronanske kiseline, perfluordodekanske kiseline, perfluorundekanske kiseline, perfluorbutansulfonske kiseline, kao i sulfonskih kiselina heksanskog i heptanskog niza, beleže porast u različitim vremenskim periodima. Dodatno, istraživanja su otkrila višestruke razlike u koncentracijama PFAS među urbanim i ruralnim područjima, kao i između različitih demografskih grupa, uključujući decu i odrasle [33,42]. Geografske varijacije u koncentracijama PFAS-a u krvi mogu biti rezultat ishrane, količini unešene vode, prašine i nivoa industrijalizacije u istraživanom području [36].

2.1.9. Metabolizam PFAS i njihova eliminacija iz organizma

PFAS dospevaju u ljudski organizam prvenstveno putem oralne i respiratorne apsorpcije, dok je unos putem kože, prema dosadašnjim istraživanjima, zanemarljiv [17,31,43]. I kratkolančane i dugolančane perfluoralkil kiseline se smatraju metabolički inertnim. Kada dospeju u krvotok, vezuju se za humani serum albumin (*odeljak 2.3.1.*). Dugolančani PFAS se skladište najčešće u jetri i njihovo poluvreme života je od 2,3 do 5,4 godina [31]. Generalno, poluživot PFAS u krvi je duži za sulfonovana jedinjenja nego za karboksilna, ali on raste sa dužinom lanca i kraći je za jedinjenja koja se granaju. Često je poluživot ovih jedinjenja u vezi sa polom, odnosno, kod žena je kraći, jer žene aktivnije ekskretuju ove materijale putem bubrega nego muškarci [17].

Primarna ruta eliminacije perfluorkarboksilnih kiselina iz tela je preko bubrega i urina. Vezivanje za albumin igra ključnu ulogu u određivanju brzine filtracije PFOA, jer je samo nevezana frakcija dostupna za glomerularnu filtraciju i aktivnu sekreciju u bubrezima. Obim vezivanja PFOA za serum albumin zavisi od broja mesta vezivanja na albuminu i njihove konstante afiniteta [44]. Putem glomerularne filtracije, renalne tubularne sekrecije i renalne tubularne reapsorpcije dolazi do prečišćavanja krvi. Prisustvo membransko transportnog proteina i reapsorpcija PFAA u bubrezima su osnovni mehanizmi odgovorni za eliminaciju ovih supstanci [17]. Naravno, eliminacija zavisi od dužine lanca, vrste molekula i pola [16]. Opšte je prihvaćeno da kraći lanac znači i kraći poluživot, odnosno, brža je eliminacija kratkolančanih perfluorkarboksilnih jedinjenja [44].

2.2. Krv i njene komponente

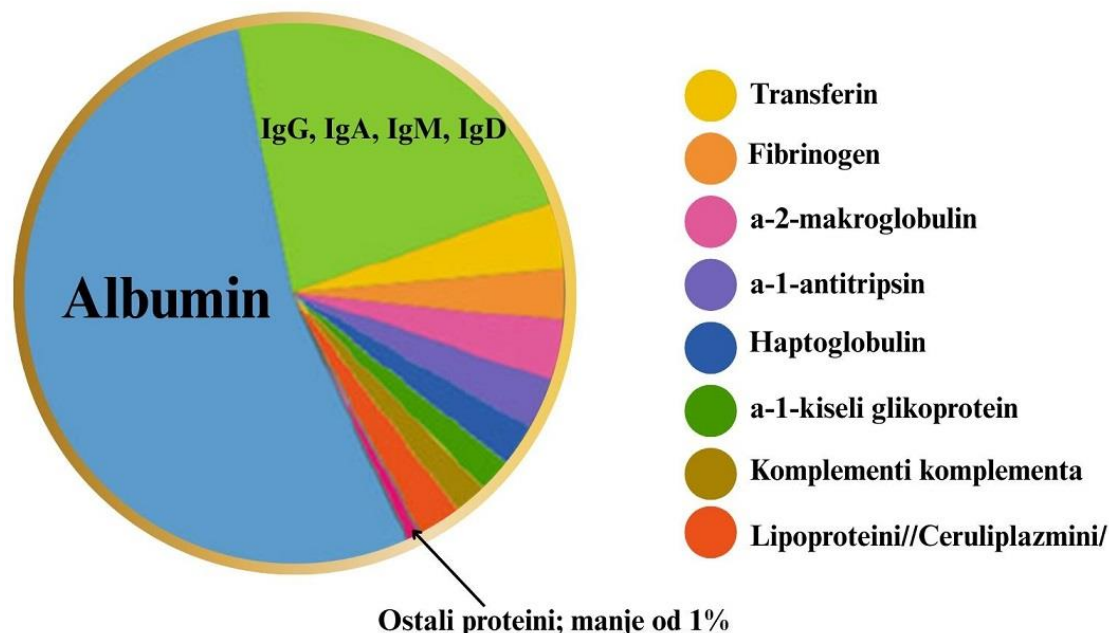
Krv je kompleksan biofluid, odnosno tečni organ, sa složenom strukturom i ključnom ulogom u održavanju sistemske homeostaze organizma [45]. Čini je tečni deo, krvna plazma, koja zauzima oko 55 % ukupne zapremine krvi, i ćelijski elementi koji čine preostalih 45 % [46,47]. Krvna plazma je providna, blago žućkasta tečnost, bogata proteinima i elektrolitima, poput Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} i SO_4^{2-} [48]. Normalna pH vrednost krvi je između 7,35 i 7,45 [49].

Ćelijski deo krvi čine eritrociti, leukociti i trombociti. Eritrociti, poznati i kao crvena krvna zrnca, čine oko 95 % svih ćelija u krvi i sadrže hemoglobin, protein koji omogućava prenos kiseonika (O_2) do tkiva i ugljen-dioksida (CO_2) iz tkiva do pluća. Pored transportne funkcije, eritrociti doprinose održavanju homeostaze i zaštiti od oksidativnog oštećenja, kao i regulaciji protoka krvi u skeletnim mišićima [46]. Leukociti, ili bela krvna zrnca, čine oko 3 % ćelija krvi i imaju ključnu ulogu u imunološkoj odbrani. Oni uključuju granulocite (70 % leukocite: neutrofile, eozinofile, bazofile), monocite/makrofage (oko 6 %) i limfocite (oko 25 %, uključujući B i T ćelije) koji proizvode antitela i formiraju memorijske ćelije [47,48]. Trombociti, ili krvne pločice, prisutni su u koncentraciji od $150\text{--}300 \times 10^9/\text{L}$ i učestvuju u procesu koagulacije i hemostaze, sprečavajući gubitak krvi prilikom povreda. Njihov životni vek u krvi traje od 8 do 14 dana, nakon čega ih uklanjaju makrofagi [49,50].

Pored navedenih funkcija, krv učestvuje i u održavanju telesne temperature i transportu soli i jona neophodnih za homeostazu [50]. Između krvnih ćelija i plazme nalazi se beličasti, viskozni sloj, poznat kao „buffy coat“, koji sadrži bele krvne ćelije i trombocite [49].

2.2.1. Humani proteini krvi – Opšti pregled

Plazma ljudske krvi sadrži složenu mešavinu proteina, **Slika 4**, ukupne koncentracije od približno 7,0 do 7,5 g na 100 mL. Najzastupljeniji među njima je humani serum albumin, koji dostiže koncentraciju od 35 do 45 g/L i čini gotovo polovinu ukupnih plazma proteina. Većina ovih proteina, izuzev imunoglobulina (antitela), sintetiše se u jetri. Iako su strukturno i funkcionalno raznoliki, plazma proteini imaju zajedničku fiziološku važnost, odnosno, učestvuju u održavanju koloidno-osmotskog pritiska, transportu različitih molekula (lipida, gvožđa, hormona), kao i u funkciji bubrega, jetre i imunološkog sistema [51,52].



Slika 4. Zastupljenost najvažnijih proteina u ljudskoj plazmi, sa legendom. HSA čini najveći udeo ukupnih proteina (~60 %), imunoglobulini (Ig) zauzimaju drugo mesto po zastupljenosti. Modifikovano prema [53].

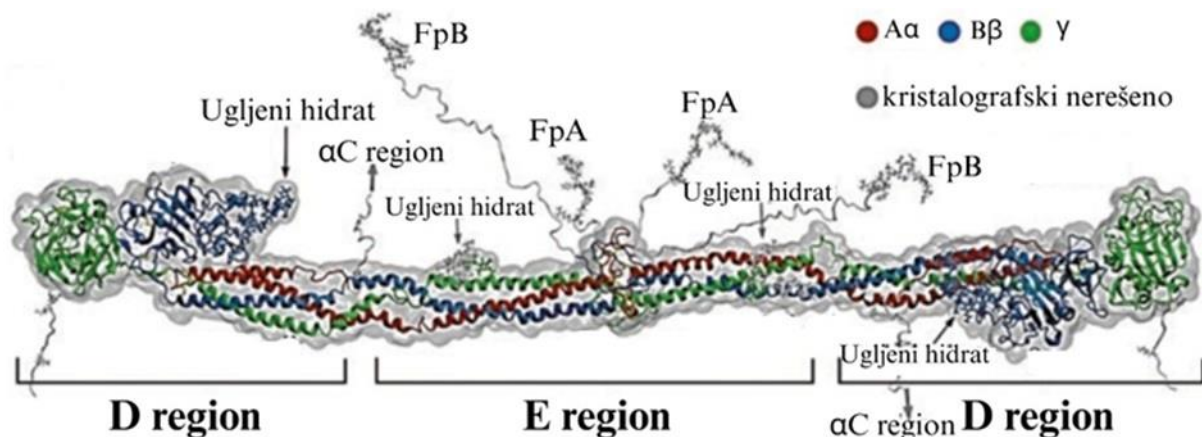
Koncentracije proteina u krvi značajno variraju, pa se tako hemoglobin nalazi u količini od oko 150 g/L, albumin oko 42 g/L, dok su citokini prisutni u veoma niskim koncentracijama (pg/L). Njihova fizičko-hemijska svojstva i poluvreme života takođe su različiti, hemoglobin ima poluvreme života od oko 120 dana, dok aktivator plazminogena traje svega nekoliko minuta. Više od 90 % plazma proteina podložni su barem jednoj posttranslacijskoj modifikaciji, a većina su glikoproteini. Mnogi od ovih proteina su sastavljeni od različitih domena, strukturnih motiva i ponavljanja, što određuje njihove specifične funkcije [50,52]. Među najvažnijim familijama plazma proteina nalaze se α 2-makroglobulinska familija (uključujući α 2M, komponente komplementa C3–C5 i protein trudničke zone (PZP)), familija serum albumina (serum albumin, vitamin D vezujući protein, afamin, α -fetoprotein), familija inhibitora pankreasnog tripsina (serin proteazni inhibitori), globinska familija (hemoglobin, miohemoglobin), serin proteazni inhibitori (kao što su α 1-antitripsin, antitrombin III, α 2-antiplazmin), glikoproteinski hormoni (FSH, LH, TSH, CG), komplement faktori (C6–C9), faktori rasta, citokini i razni peptidni hormoni, poput insulina i kalcitonina [50].

2.2.1.1. Fibrinogen

Fibrinogen je prvi put 1943. godine okarakterisan kao fibrilarni protein, zajedno sa keratinom, miozinom i epiderminom, na osnovu difrakcionog obrasca X-zraka koji potiče od njegove α -helikoidne strukture [54]. Fibrinogen ili faktor I je glavni glikoprotein plazme (1,5-4 mg/mL), solubilne forme, molekulske mase 340 kDa, sa ulogom u procesu koagulacije [55]. Kodiraju ga geni (FGA, FGB, FGG) grupisani unutar regiona od 65 kilobaza na ljudskom hromozomu 4. Sintetiše se u hepatocitima, a odlikuje se relativno dugim poluživotom od oko 4 dana [56]. Jetra je primarni izvor plazma fibrinogena, sa stopom sinteze od 1,7–5 g dnevno. Tri četvrtine ljudskog fibrinogena prisutno je u plazmi, ali se takođe nalazi i u trombocitima, limfi i intersticijalnoj tečnosti. Njegov fiziološki katabolički put je uglavnom nepoznat. Koagulacija i fibrinoliza čine samo 2–3 % gubitka fibrinogena kod zdravih pojedinaca [55]. Fibrinogen ima slabovezujuća i jakovezujuća mesta vezivanja za jone kalcijuma, koji su važni za njegovu funkciju [55].

2.2.1.1.1. Molekulska struktura fibrinogena

Karakteristične izdužene strukture od oko 45 nm, ovaj heterodimerni protein se sastoji od dva spoljašnja D domena povezana centralnim E domenom (aranžirani kao **D-E-D**), **Slika 5**. Struktura fibrinogena je prvi put opisana 1959. godine od strane Hall i Slayter [57]. Fibrinogen se sastoji od dva seta po tri polipeptidna lanca: A α , B β i glavni γ -lanac, koji su povezani sa pet simetričnih disulfidnih mostova. B β i γ lanci se završavaju globularnim regionima, koji se nazivaju β i γ čvorovi, a formiraju D čvor. Nakon potpune obrade i sastavljanja u endoplazmatskom retikulumu i Goldžijevom aparatu, A α -lanac sadrži 610 amino-kiselina, B β -lanac 461 ostatak, a γ -lanac poseduje 411 amino-kiselina [58–60]. Dva trimera se spajaju na svojim N-terminusima kako bi formirali heksamer pomoću 29 disulfidnih mostova, koji su neophodni za sastavljanje dva polumolekula [60].



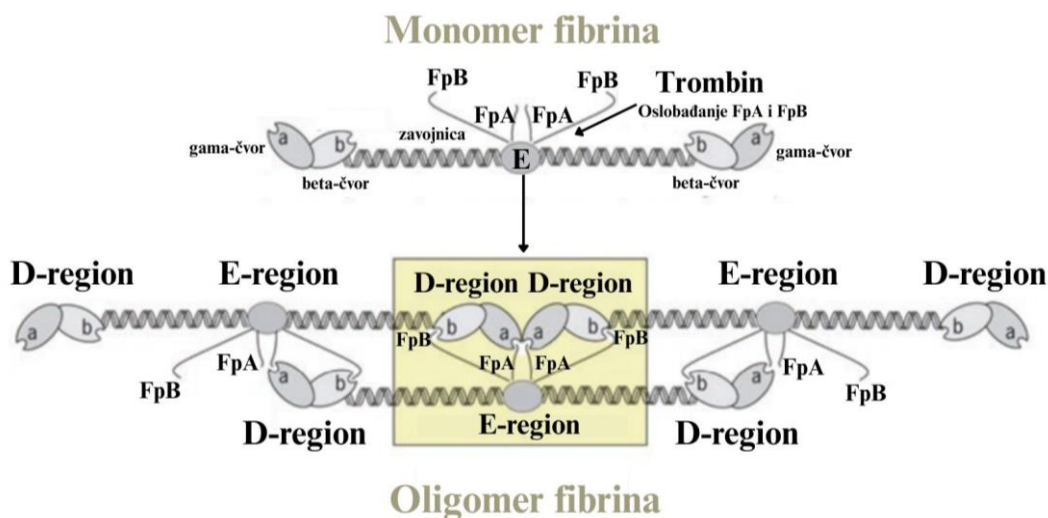
Slika 5. Uporšćen prikaz fibrinskog monomera, sa označenim centralnim (E) regionom i bočnim D regionima. Modifikovano prema [55].

Osim lanaca koji su organizovani u D-E-D domene, fibrinogen poseduje i α C domen veoma neuređene strukture u regionu A α 221-610, što je potvrđeno pomoću transmisijne elektronske mikroskopije i mikroskopije atomskih sila. Uloga ovog domena je u učvršćivanju strukture pri lateralnoj agregaciji [51–63]. Četiri oligosaharidna lanca su povezana sa svakim molekulom fibrinogena preko N-glikozidnih veza: dva su povezana sa ostacima u β -globulinskim regijama (koji su rešeni u kristalnoj strukturi PDB kod: 3GHG [64]), a druga dva su povezana sa γ -lancima, koji nisu kristalografski rešeni) [55].

Nekoliko istraživačkih grupa se bavilo rešavanjem kristalne strukture fibrinogena od 1997. do 2001. godine. Struktura fibrinogena rešena je pomoću difrakcije X-zraka za više od dve trećine njegove dužine. Iako još uvek struktura proteina nije kompletna, jer postoje delovi koji nisu rešeni kristalografski zbog nedostajućih delova (amino-kiseline na sledećim pozicijama: 1–26, 1–57 i 1–13 na N-terminusima A α , B β i γ lanaca; 201–610, 459–461 i 395–411 na C-terminusima A α , B β i γ lanaca), ovi nerešeni delovi rekonstruisani su računarskim metodama [65].

2.2.1.1.2. Formiranje fibrina

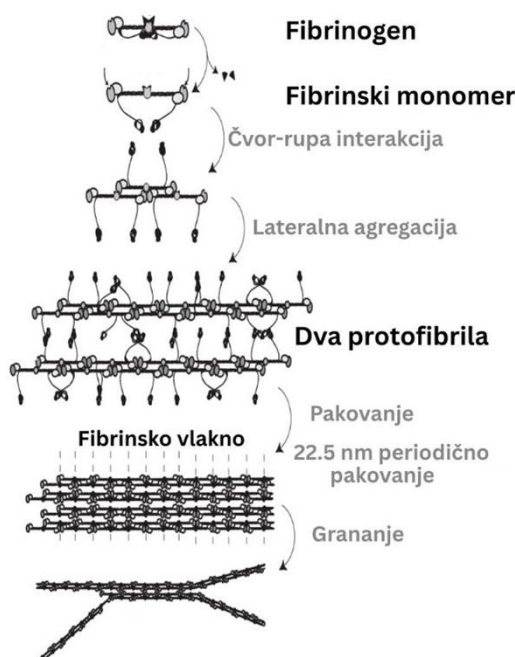
Fibrinogeni domeni sadrže vezivna mesta koja učestvuju u konverziji fibrinogena u fibrin, sastavljanju fibrina, umrežavanju i interakcijama sa trombocitima, kao i mesta koja postaju dostupna nakon razgradnje fibrinopeptida ili koja postaju izložena kao posledica procesa polimerizacije [66]. Kroz svoje brojne biohemijske i biofizičke karakteristike, ovaj protein zajedno sa svojim produktom fibrinom, interaguje sa ćelijama, aktivira ih, posreduje u inflamatornim odgovorima, obezbeđuje strukturni integritet krvnih ugruška tokom lečenja rana i obavlja niz drugih funkcija koje su ključne za fiziologiju i imaju ključnu ulogu u patofiziološkim mehanizmima [56].



Slika 6. Pojednostavljeni shematski prikaz polimerizacije monomera u oligomer. Fibrinopeptidi u E regionu poseduju FpA i FpB koji su komplementarni otvorima koji su uvek izloženi na krajevima proteina. Kada trombin ukloni fibrinopeptide, dolazi do interakcije fibrinopeptida i "rupa" (prikazano kao polukrug unutar čvora), što dovodi do formiranja oligomera (prikazan je trimer); modifikovano prema [55].

Konverzija fibrinogena u fibrin je katalizovana trombinom i igra ključnu ulogu u formiranju i stabilizaciji ugruška; pojednostavljen prikaz formiranja oligomera je prikazan na **Slici 6**. Trombin je visoko specifična serin proteinaza koja hidrolizuje A α i B β lanac oslobađajući fibrinopeptide A i B sa N terminalnog kraja (FpA i FpB); to inicira formiranje fibrina, tako što otvara mesto za polimerizaciju poznato kao E $_A$ i E $_B$ [58]. Nakon oslobađanja FpA, α lanci imaju nove N-terminalne sekvence Gly-Pro-Arg- (GPR) koje se nazivaju čvor A (engl. "knobs A"), dok nakon oslobađanja FpB β lanac dobija novu N-terminalnu sekvencu Gly-His-Arg-Pro (GHRP), koja formira čvor B (engl. "knobs B"), koje se veže za džep "b" koja se nalazi u β -globuli [67,68].

Nakon što se fibrinopeptidi oslobode, molekul je spreman da podleže polimerizaciji i formira nerastvorno fibrinsko vlakno, odnosno, ugrušak [58]. Tokom polimerizacije fibrina, čvor A interaguje sa džepovima "a" koji su uvek otvoreni u γ -globulama interagujućih fibrinskih molekula; vezivanje čvora A (na **Slici 6** označeno kao gama-čvor) za rupu a (engl. "holes a") naziva se "A-a" interakcija (veoma jake, visoko specifične i stabilne intermolekulske interakcije) i na ovaj način počinje polimerizacija [69]. Dva monomerna fibrinogena se ovom interakcijom povezuju u dimernu formu, dok sledeći fibrinogen formira vezu sa dimerom preko D regiona, formirajući D-D interakciju koja je vrlo slaba [65]. Fibrinski monomeri nastavljaju da se dodaju longitudinalno oligomerima, koji se dalje produžavaju kako bi formirali protofibrile. Protofibrili agregiraju lateralno kako bi formirali deblje vlakno, a u toj reakciji dolazi do ostvarivanja veze čvor B (engl. "knobs B") za rupu b (engl. "holes b") [70]. Kako fibrinske niti postaju deblje lateralnom agregacijom i rastu u dužini, one se takođe granaju, stvarajući trodimenzionalnu mrežu koja popunjava prostor, **Slika 7** [55].



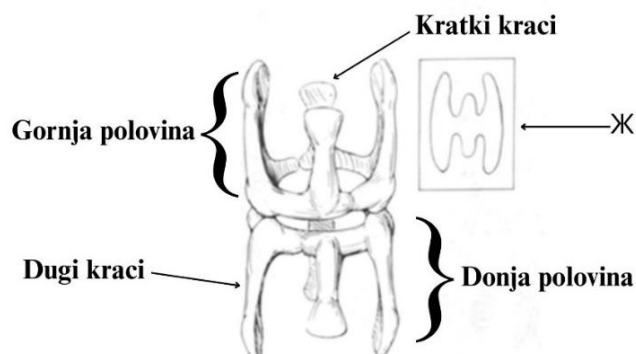
Slika 7. Od fibrinogena do fibrinskog vlakna, uprošćena shema. Oligomeri fibrinogena stvaraju dvolančane protofibrile sastavljene od molekula u polustepenastom rasporedu. Protofibrili se zatim lateralno agregiraju u vlakna, a ovaj proces je pojačan interakcijama α C regiona i formiranjem α C-polimera. Modifikovano prema [55].

Pored toga, fibrinogen indukuje aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju, vezujući se za receptor fibrinogena na trombocitima, glikoprotein GPIIb/IIIa [58]. Aktivirani trombociti se lepe za povređeni zid krvnog suda stvarajući ugrušak bogat trombocitima koji u početku osigurava hemostazu. Da bi stabilizovao ugrušak protiv proteolitičkih i mehaničkih oštećenja, fibrin se kovalentno umrežava pomoću plazma transglutaminaze, Faktora XIIIa, aktivnog oblika zimogena Faktora XIII koji je aktiviran trombinom u prisustvu jona Ca^{2+} . Nakon toga, ugrušak fibrina se razgrađuje tokom nekoliko dana enzimima endogenih fibrinolitičkih sistema (plazmin, elastaza neutrofila), formirajući fibrin degradacione produkte [55,59].

2.2.1.2. α 2-Makroglobulin

α 2-Makroglobulin je univerzalni inhibitor aktivnih endopeptidaza svih katalitičkih tipova. Prvi put je izolovan 1946. godine, a danas je poznato da je molekulske mase 720 kDa, da se sintetiše u jetri i da je sastavljen od dva nekovalentno povezana para identičnih subjedinica koje su međusobno povezane disulfidnim mostovima, formirajući tzv. dimer dimera [71–73]. Nakon pola veka od otkrića, molekularno-biološke karakteristike ovog proteina su opisane [74].

Ovaj protein je evolutivno povezan sa komponentama komplementa C3 i C4, pri čemu se pretpostavlja da svi potiču od zajedničkog pretka, ali su razvili različite funkcije prilagođene svojoj ulozi u imunološkom odgovoru [75,76]. Na elektronskim mikrogramima, nativni $\alpha 2M$ ima oblik koji podseća na ćirilično slovo „Ж“ (Slika 8). Molekul sadrži četiri subjedinice cilindričnog izgleda, pri čemu ravan normalna na osu cilindra deli protein na dve identične funkcionalne polovine. Svaka polovina se sastoji od prstena sa četiri "kraka", dva kratka i dva duga, po jedan od svakog tipa na svakom monomeru. Zarobljavanje proteinaza ostvaruje se pokretom jednog dugog kraka po monomeru, tj. dva kraka po funkcionalnoj polovini [73].

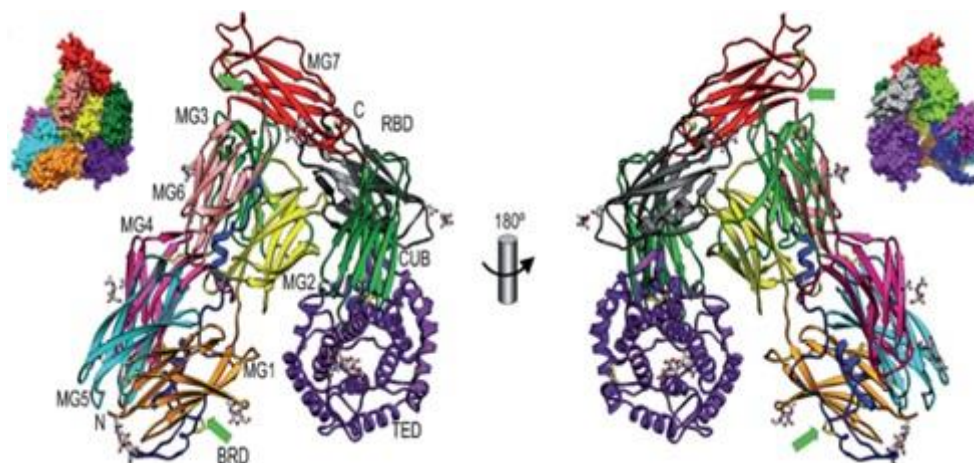


Slika 8. Shematski prikaz modela $\alpha 2M$. Dve funkcionalne polovine, sa po četiri kraka (dva kratka i dva duga). Preuzeto i modifikovano prema [73].

Koncentracija $\alpha 2M$ u krvi iznosi $4,64 \pm 1,42 \mu M$. Njegov nivo se povećava u stanjima kao što su hronične bolesti jetre, inflamatorne bolesti zglobova, multipla skleroza i nefrotski sindrom, dok je snižen kod žena sa reumatoidnim artritismom. Proteomski podaci ukazuju i na njegovu smanjenu ekspresiju u više vrsta karcinoma, uključujući rak dojke, jajnika, debelog creva i pluća [77]. Identifikovan je kao potencijalni biomarker za rak bešike [78], a takođe je uočen i u patofiziologiji Alchajmerove bolesti [79]. Biološki značaj $\alpha 2M$ je višestruk. Tokom inflamatornih procesa, ovaj protein inhibira proteaze koje luče aktivirani leukociti (npr. neutrofili), čime štiti tkiva od strukturnih oštećenja. Dodatno, inhibira proteaze koje proizvode invazivni mikroorganizmi. Zanimljivo je da kavezna struktura koju $\alpha 2M$ formira oko vezanih proteinaza štiti te enzime od inhibicije drugim inhibitorima proteinaza [71].

2.2.1.2.1. Struktura i domeni $\alpha 2$ -Makroglobulina

Svaka subjedinica $\alpha 2M$ sadrži 1451 aminokiselinski ostatak organizovanih u 11 domena. Prvih sedam domena su tzv. makroglobulinu-slični (MG) domeni MG1 do MG7, koji formiraju antiparalelne β -sendvič strukture od po 110 amino-kiselina, Slika 9 [80].



Slika 9. Prikaz $\alpha 2M$ subjedinice sa označenim domenima, u prostornoj orijentaciji. Preuzeto i modifikovano prema [80].

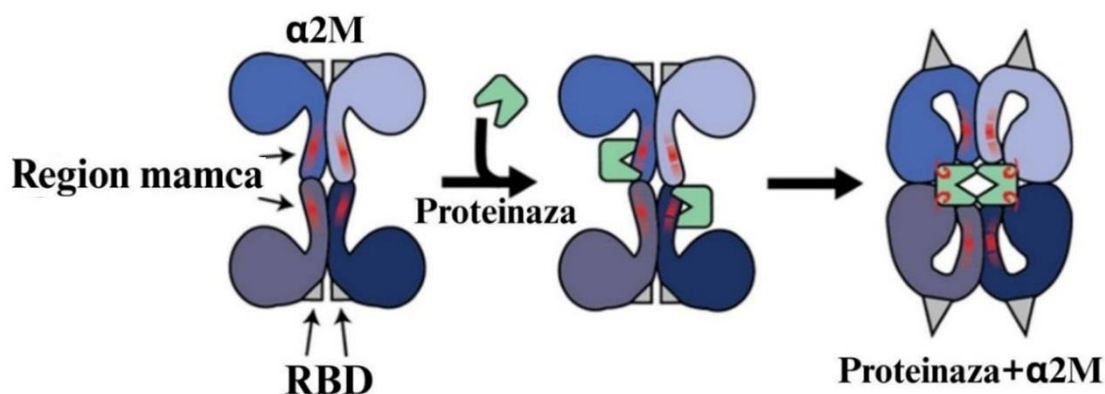
Ostali domeni nemaju numeraciju već nazive po funkciji, te tako nekoliko amino-kiselina čine specifičnu sekvencu koja se zove region mamca (engl. „*bait-region domen*“, *BRD*). Osim regiona mamca, ovaj metaloprotein (cink vezujuće mesto), poseduje i TED domen (tiolestarski domen) i mesto za vezivanje receptora (engl. *receptor binding domen*, *RBD*) [73,80]. Domen TED (tioestarski motiv, C972-G973-E974-Q975) predstavlja helikoidni domen od 315 amino-kiselina, odnosno, koncentričnih α -heliksa raspoređenih kao šestokraki propeler oko centralne ose. Takođe, α 2M poseduje i CUB domen sastavljen od 116 amino-kiselina, koji se sastoji od dve antiparalelne β -ploče sa četiri lanca, i naknadno se bočno vezuje za domen MG2 [80]. Domeni MG3–MG6 formiraju prstenastu strukturu oko elipsoidnog otvora poznatog kao „ulaz 1“, koji omogućava ulazak molekula u centralni prostor α 2M. Drugi otvor, „ulaz 2“, formiraju MG2, MG3, MG7, kao i CUB i TED domen jednog monomera [80]. Struktura monomera karakteristična je po tome što sadrži manje od 5 % α -heliksa, dok su β -pločice dominantni sekundarni strukturni elementi, sa udelom između 35 % i 60 %.

2.2.1.2.2. Mehanizam antiproteazne aktivnosti

Formiranje kompleksa enzim- α 2M započinje sečenjem regiona mamca (engl. *bait*) od strane proteinaze, a uprošćen prikaz je dat na **Slici 10**. Ovaj region sadrži mesta hidrolize za brojne proteaze sve četiri klase proteinaza (serinske, tiolne, metalo i karboksilne) [81]. Humani α 2M vezuje mnoge proteaze u molskom odnosu 2:1 [72].

Hidroliza mamac regiona izaziva konformacione promene koje uzrokuju da se α 2M obmotava oko proteinaze, čime se formira velika šupljina i fizički ometa interakcija između enzima i supstrata. Ovaj mehanizam se ponekad naziva ‘*snap-trap*’ (brza zamka) ili ‘*venus-flytrap*’ mehanizam [81]. U ovom modelu, jedina konformaciona promena potrebna za ostvarivanje mehanizma zarobljavanja je blago pomeranje bočnih kraka proteina. Proteinaze, i dalje reaktivne prema malim supstratima koji mogu da difunduju u šuplinu, postaju kovalentno vezane za α 2M reakcijom ϵ -amino grupa izloženih lizinskih ostataka sa unutrašnjim tiol-estrom koji se aktivira prilikom hidrolize regiona mamca. Odnosno, dolazi do ireverzibilne inhibicije sa smanjenom aktivnošću inhibiranog enzima prema velikim supstratima [82]. Tioestar je smešten blizu šarke kraka zarobljavanja svake subjedinice, a njegov prekid omogućava kraku zarobljavanja da se pomeri [73].

Nakon inhibicije proteaze, α 2M izlažu C-terminalni domen (engl. *receptor binding domen*, *RBD*) za prepoznavanje od strane hepatocita i retikuloendotelinih ćelija, koji je u nativnom α 2M unutar proteina. Specifični receptori za α 2M postoje na mnogim tipovima ćelija, te kompleks proteinaza- α 2M podleže endocitozi i biva brzo uklonjen iz cirkulacije [71].

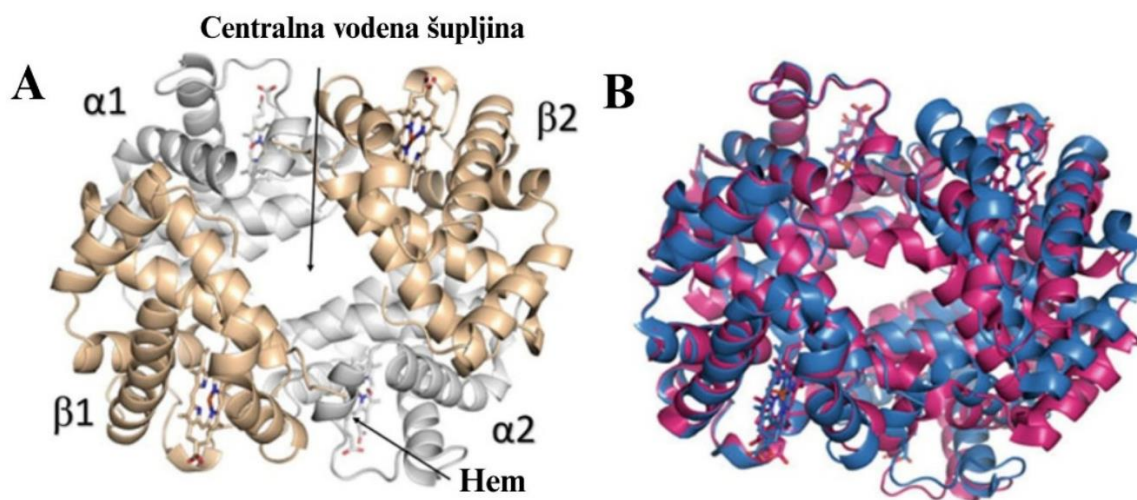


Slika 10. Ilustracija interakcije između α 2M i aktivne proteinaze. Označeni su RBD domen, region mamca i proteinaza (označena zeleno). Kada pokida region mamca, proteinaza aktivira α 2M i dovodi do njegove konformacione promene. Rezultat je zarobljavanje enzima, pri čemu RBD region biva izložen na površini; modifikovano prema [71].

2.2.1.3. Hemoglobin – struktura i uloga

Hemoglobin (Hb) je tetramerni protein sastavljen od dva α -lanca (po 141 amino-kiselina) i dva β -lanca (po 146 amino-kiselina), koji zajedno formiraju funkcionalne dimere ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$) [83]. Dva $\alpha\beta$ dimera ($\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_2\beta_2$) raspoređena su tako da formiraju veliku šupljinu koja je ispunjena vodom, a po vezivanju kiseonika dolazi do konformacione promene i šupljina postaje manja, prikazano na **Slici 11A** [84,85]. Njegova 3D struktura je rešena rendgenskom kristalografijom, za šta je Max Perutz 1962. godine nagrađen Nobelovom nagradom za hemiju [84,86]. Glavna funkcija hemoglobina je transport kiseonika iz pluća do perifernih tkiva, pri čemu se kiseonik vezuje i oslobađa na kooperativan način, što omogućava efikasan prenos kiseonika kroz organizam.

Hemoglobin postoji u ravnoteži između dva alternativna oblika; R (engl. “*relax*”) stanje je relaksirano sa visokim afinitetom za kiseonik, a T (engl. “*tense*”) stanje je napeto sa niskim afinitetom za kiseonik, prikazano na **Slici 11B**. U T-stanju, postoji značajno više vodoničnih veza i sonih mostova koji povezuju $\alpha_1\beta_2$ interfejs u poređenju sa R-stanjem [85].

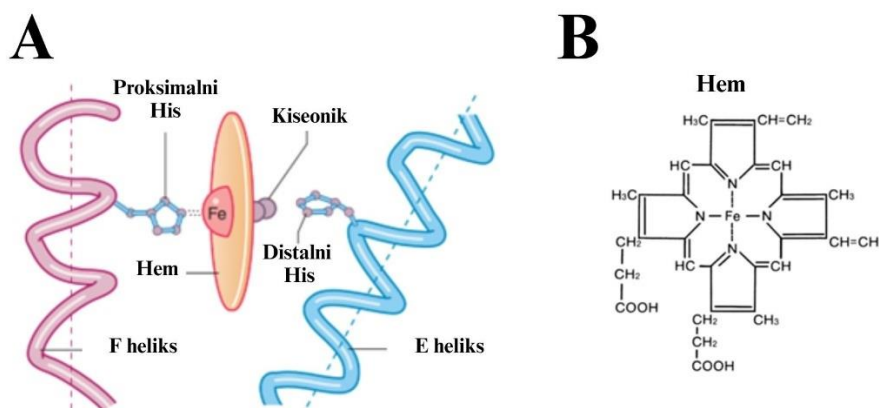


Slika 11. Kristalna struktura hemoglobina. A) Kvaternarna struktura Hb, α -lanci su obojeni sivo, a β -lanci smeđe. B) Struktura oksidovanog (R-stanje) Hb (ljubičasta boja) preklopljena sa strukturom deoksi-Hb (T-stanje) (obojeno u plavo).

α -Subjedinica se sastoji od 7 α -heliksa, dok β subjedinicu čini 8 α -heliksa, obeleženi abecednim slovima A-H. Svaka subjedinica ima džep koji je formiran E i F heliksima i čini mesto za hem, **Slika 12**. Hem se sastoji od fero-jona (Fe^{2+}) koji je smešten u centru porfirinskog prstena (tetrapirrol) i koji je kovalentno vezan za četiri azota (N) porfirinskog prstena. Gvožđe je vezano za hemoglobin preko histidina (His) koji se nalazi u F heliksu, poznat kao proksimalni histidin, ostvarujući mogućnost za vezivanje molekula kiseonika na šestom koordinacionom mestu Fe^{2+} jona usmerenom ka distalnom džepu hemoglobina [87]. Distalni histidin koji se nalazi u E heliksu stabilizuje vezivanje kiseonika vodoničnim vezama.

Poznato je da Hb vezuje još neke ligande, poput, nitritnog jona (NO_2^-), azot-monoksida (NO), ugljen-monoksida (CO), cijanida (CN^-), sumpor-monoksida (SO) i sulfida (S^{2-}). Oni se vezuju za šesto koordinaciono mesto na Fe^{2+} jonu, ometajući vezivanje O_2 , a pojedini imaju veći afinitet za hemoglobin od kiseonika, što ih čini toksičnim za ljude. Afinitet Hb za CO je čak 240 puta veći nego za O_2 , pa već koncentracija CO od 0,1 % u vazduhu može izazvati gubitak svesti i smrt [88].

Pored liganada koji mogu da dovedu do fatalnih posledica, značajne promene mogu nastati i usled mutacija u samoj proteinskoj sekvenci hemoglobina. Stanje koje potiče od tačkaste mutacije ($\beta\text{Glu6Val}$) u β -globinskom lancu dovodi do formiranja srpastog hemoglobina (HbS). Ovaj poremećaj je prvi put opisan 1910. godine u kliničkoj praksi. Mutacija se nalazi na površini proteina, a pod uslovima hipoksije ili deoksigenacije, βVal6 iz jednog molekula HbS vezuje se za hidrofobni džep susednog HbS molekula, stvarajući nerastvorne polimere [89].



Slika 12. A) Slikoviti prikaz vezivanja kiseonika u aktivnom mestu Hb, koje se nalazi između E i F heliksa. Gvožđe u centru hem grupe koordinuje se sa proksimalnim histidinom (His) iz F heliksa, dok distalni histidin iz E heliksa stabilizuje vezani kiseonik; B) Hem grupa – protoporfirin IX kompleksiran sa Fe²⁺ jonom u centru, koji učestvuje u reverzibilnom vezivanju kiseonika. Preuzeto i modifikovano prema [83].

2.2.1.3.1. Alosterija u molekulu hemoglobina

Hemoglobin pripada alosternim proteinima. Alosterija je pojava kod koje vezivanje jednog liganda na makromolekulu utiče na vezivanje drugog liganda na udaljenom mestu, te kod hemoglobina alosterni efektori, poput 2,3-BPG (2,3-bisfosfoglicerat), smanjuju afinitet za kiseonik, olakšavajući njegovo oslobađanje u tkivima [90]. Postoji nekoliko načina objašnjavanja alosterije, predstavljena su dva najstarija:

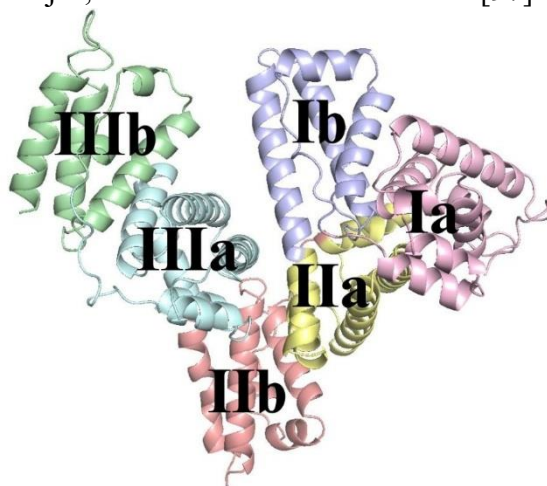
- **MWC** (Perutz) model postulira da sve četiri subjedinice u hemoglobinu moraju istovremeno preći u napetu (deoksi) ili relaksiranu (oksi) strukturu. Oba oblika vezuju ligande, dok se afinitet prema ligandu menja tokom prelaska iz jedne u drugu strukturu. Deoksi ima niži afinitet za ligand u poređenju sa oksii, a vezivanje kiseonika je kooperativno, odnosno, vezivanje prvog molekula kiseonika povećava afinitet prema ostalim molekulima [91].
- **KNF** (Koshland-Nemethy-Filmer), indukovano-uklapanje ili sekvencijalni model, objašnjava da vezivanje liganda za jednu subjedinicu može indukovati konformacione promene u tercijarnoj strukturi susednih subjedinica, iako one nemaju vezan ligand. Odnosno, u slučaju Hb ne postoji samo T i R, već postoji niz intermedijarnih stanja [92].

2.2.1.4. Humani serum albumin- struktura i vezivna mesta

Humani serum albumin je monomerni protein mase 66,5 kDa, izgrađen od 585 amino-kiselina i pretežno α -helikoidne strukture (68 %). Sastoji se od tri domena (I (1–195), II (196–383), III (384–585)), koji formiraju sroliku strukturu proteina, a svaki domen je podeljen na dva poddomena – A i B, **Slika 13**. Iako strukturno slični, svaki od domena ostvaruje različite vrste interakcija sa susednim domenima. Zbog toga orijentacija domena I i II u odnosu na domene II i III stvara izraženo asimetrično okruženje, u kome se nalazi veliki broj različitih mesta za vezivanje liganada (masne kiseline, protoporfirin IX, hem, sintetski porfirini, varfarin, ibuprofen, diazepam, metali) [93–95].

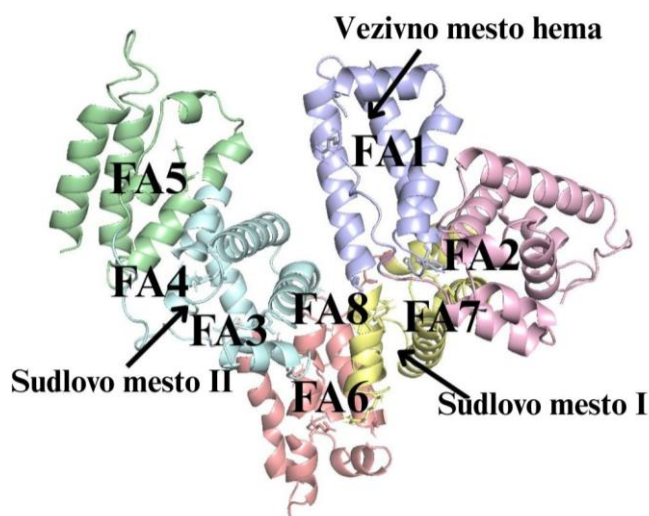
HSA čini oko 60 % ukupnih proteina u krvnom serumu i predstavlja ključni biomarker za različite bolesti, a osim dijagnostičke uloge, široko se primenjuje i u terapiji [93]. Do danas je u RCSB Protein Data Bank deponovano više od 50 kristalnih struktura HSA u kompleksu sa različitim ligandima. Na osnovu tih podataka sprovedena je klusterska analiza, koja je pokazala postojanje samo dve jasno definisane konformacije, jedne koja odgovara apoproteinu i druge koja se podudara sa kompleksom HSA–miristinska kiselina [94].

Gorepomenutoj organizaciji domena se može pridodati da HSA poseduje dva mesta vezivanja liganada, poznato kao Sudlova mesta vezivanja. Sudlovo mesto I je ranije poznato kao „mesto vezivanja varfarina“, nalazi se u subdomenu IIA i sastoji se od hidrofobnog džepa okruženog pozitivno naelektrisanim amino-kiselinama, dok je Sudlovo mesto II poznato kao „indol-benzodiazepinsko mesto vezivanja“, i nalazi se u subdomenu IIIA [97].



Slika 13. Kristalna struktura HSA (PDB kod:1N5U) sa označenim domenima u različitim bojama (domen Ia-roze; domen Ib-ljubičasto; domen IIA-žuto; domen IIB-ružičasto; domen IIIA-svetloplavo; domen IIIB-zeleno). PDB fajl strukture preuzet 6.6.2025. godine. Prikazano u Pymol-u.

Zahvaljujući svojoj jedinstvenoj sposobnosti vezivanja različitih liganada, HSA funkcioniše kao moćan transportni protein i rezervoar za brojne endogene i egzogene molekule, uključujući one koji premašuju svoju rastvorljivost u plazmi. Ova sposobnost omogućava mu da istovremeno veže nekoliko ekvivalenata dugolančanih masnih kiselina (FA), pri čemu su mesta vezivanja različite afinitetske jačine i prostorne organizacije [98]. Numeracija FA mesta (1–8), **Slika 14**, utvrđena na osnovu kristalne strukture kompleksa HSA–miristat, prema lokaciji u strukturi proteina [98,99]. Mnoga FA mesta učestvuju i u vezivanju drugih liganada, na primer, FA7 se preklapa se sa Sudlovim mestom I, dok FA3 i FA4 se preklapaju sa Sudlovim mestom II [99]. Upotrebom NMR spektroskopije, utvrđeno je da su mesta 2, 4 i 5 visokoafinitetna [99]. Osim ovih osam vezivnih mesta, postoji i FA9, koji je kao i FA7 sekundarno vezivno mesto [100].



Slika 14. Struktura HSA sa označenim vezivnim mestima masnih kiselina (FA1-FA8), hema, varfarina (Sudlovo mesto I), ibuprofena (Sudlovo mesto II), PDB kod:1N5U. Generisano u programu Pymol.

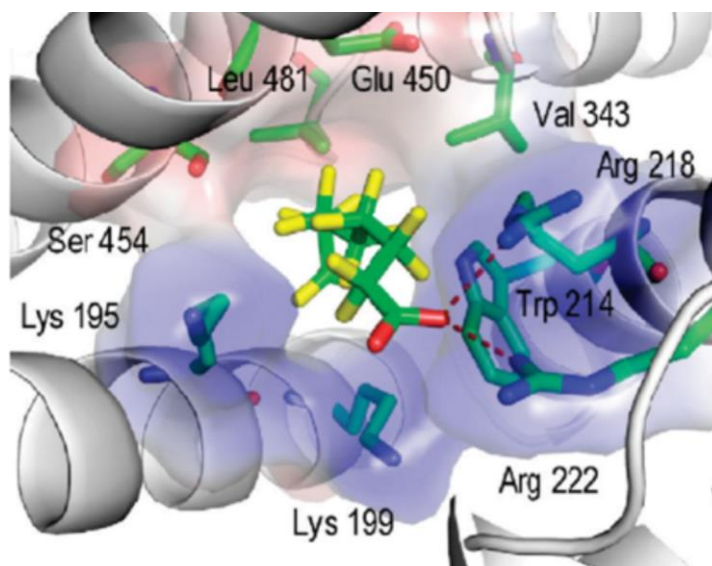
2.3. Osnovni principi vezivanja PFAS za proteine

2.3.1. Afinitet i vezivna mesta PFOA na HSA

Sredinom prošlog veka je precipitacionim tehnikama potvrđeno da se PFOA vezuje za HSA, a do danas su korišćene i druge metode, uključujući i računarske, koje su detaljnije objasnile način vezivanja [101–104]. Procenjeno je da je manje od 1,2 % PFAS-a u krvi nevezano, jer se PFAS sa molekulskom masom manjom od 500 ($M_w < 500$) vezuju za albumin, dok je vezivanje za globuline značajnije sa porastom molekulske mase PFAS [105]. U HSA Sudlovo mesto II je manje u odnosu na Sudlovo mesto I i ono preferencijalno vezuje aromatične karboksilne kiseline, ali pokazuje i visoku selektivnost prema anjonima dugolančanih masnih kiselina (C8). Perfluorkarboksilne kiseline oponašaju ponašanje masnih kiselina, a pokazano je da se PFOA specifično vezuje za mesta na HSA koja služe za vezivanje masnih kiselina [106,107].

Zhang i saradnici su pokazali da vezivanje PFOS za HSA menja njegovu sekundarnu strukturu i inhibira transportne funkcije HSA [108]. Slična studija je proizišla iz druge laboratorijske grupe koja je pokazala da interakcije između PFOS i goveđeg seruma albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) narušavaju sekundarnu i tercijarnu strukturu BSA i smanjuju njegovu funkcionalnost [107]. Takođe, ispitan je uticaj i drugih fluorovanih jedinjenja na BSA, poput perfluoronanske kiseline, perfluordekanske i perfluoroktansulfonske, gde je utvrđeno da se na različitim mestima vezuju kratkolančane kiseline u odnosu na dugolančane [110,111].

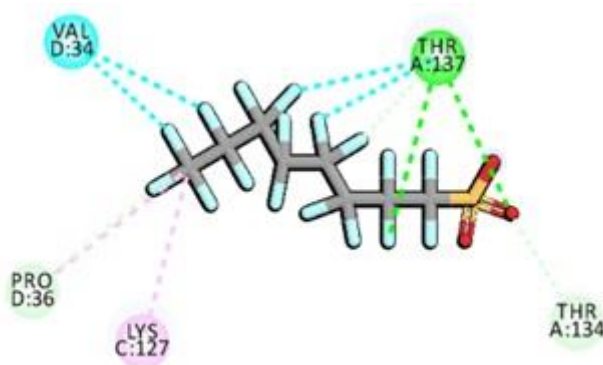
PFOA se vezuje za triptofanski 214 (*Trp214*) ostatak subdomena IIA HSA, sa konstantom vezivanja $2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. PFBA ne ostvaruje interakcije sa *Trp 214*, što ukazuje da je vezivanje liganda zavisno od dužine lanca: što je ugljenični lanac duži, to je veća konstanta vezivanja [112]. Dominantne sile vezivanja PFAS za ovaj protein su van der Valsove sile i vodonične veze [36]. Doking metodom je utvrđeno koja mesta su najizloženija vezivanju PFOA, te su se Matteo i saradnici fokusirali na pet mesta sa slobodnom energijom vezivanja većom od -6.0 kcal/mol. Najniža energija vezivanja PFOA za mesto vezivanja *Trp214* iznosi -8.0 kcal/mol. Na **Slici 15** prikazano je najpogodnije mesto vezivanja PFOA za HSA, pri čemu su istaknuti ključni aminokiselinski ostaci koji su ostvarili interakcije sa ligandom [113]. Pored navedenih autora, i druge istraživačke grupe su se bavile proučavanjem interakcije PFOA sa HSA, pri čemu je utvrđeno da se ovaj perfluoralkil molekul može vezivati i za Sudlovo mesto I, kao i za Sudlovo mesto II [114,115,116].



Slika 15. Rezultat doking simulacije. Prikazana je poza najnegativnije energije vezivanja (-8.0 kcal/mol) za PFOA u HSA. Ovo mesto karakterišu brojne van der Valsove interakcije između hidrofobnog repa i amino-kiselina *Lys 199*, *Lys 195*, *Arg 218*, *Arg 222* i *Trp 214*, kao i elektrostatičke interakcije koje uključuju karboksilnu grupu surfaktanta i doprinose slobodnoj energiji vezivanja. Preuzeto iz [113].

2.3.2. Interakcija PFOA sa hemoglobinom

Perera i autori prvi put pokazuju prisustvo više mesta vezivanja PFOA na humanom hemoglobinu. Detaljna analiza podataka apsorbancije met Hb ukazuje na prisustvo barem dva mesta vezivanja sa konstantama disocijacije od $0,8 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M i $63 \pm 15 \times 10^{-5}$ M; takođe dolazi i do destabilizacije strukture, što i dokazuju CD spektrometrijski [117]. Fluorescentni intenzitet mioglobina i goveđeg hemoglobina u prisustvu perfluoropentanske kiseline i PFOA su nepromenjene, dok perfluorodekanska kiselina značajno povećava unutrašnju fluorescenciju proteina, uzrokuje promene u hem grupi, što dovodi do promena u njegovoj sekundarnoj strukturi. Na ovaj način su autori dodatno učvrstili dokaze da postoji odnos između dužine lanaca i funkcionalnih grupa i njihove toksičnosti, *in vitro* [118]. Osim ove studije, Yang i saradnici su pokazali da se PFOS vezuje za goveđi hemoglobin (-10.6 kcal/mol) [119], te su potvrdili da se PFAS vezuju radije hidrofobnim repom nego hidrofilnom glavom za aminokiselinne ostatke, Slika 16.



Slika 16. 2D dijagram interakcija PFOS sa goveđim hemoglobinom. Preuzeto iz [119].

Takođe, studija Trousdale i saradnika pokazala je da perfluoroktanska kiselina destabilizuje strukturu humanog hemoglobina već pri nanomolarnim koncentracijama, izazivajući disocijaciju α -subjedinice i oslobađanje hema. Korišćenjem spektroskopskih i masenih tehnika, autori su pokazali da PFOA izaziva konformacione promene proteina. Ovi rezultati sugerišu da PFOA može imati značajan uticaj na funkciju hemoglobina i pri koncentracijama bliskim onima koje se smatraju regulatorno bezbednim [120].

2.3.3. Uticaj PFAS na strukturu i aktivnost enzima

Ispitivan je uticaj perfluorovanih jedinjenja i na aktivnost enzima. Pokazano je da izlaganje PFOA i PFOS rezultira povećanom aktivnošću superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-reduktaze (GR), dok dolazi do smanjenja aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx) i glutation-S-transferaze (GST). PFOA i PFOS mogu narušiti ravnotežu antioksidativnog sistema, povećati proizvodnju slobodnih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), uticati na mitohondrije i izazvati pokretanje programa apoptoze [121]. Studija na katalazi iz goveđe jetre je pokazala da su PFOA i PFOS uticali na sekundarnu strukturu katalaze, smanjenjem sadržaja α -heliksa i povećanjem sadržaja β -pločica, ali nije primećen nikakav efekat na njegovu aktivnost [122].

2.4. Metode računarske hemije

Za razumevanje i proučavanje reakcijskih mehanizama, kao i interakcija na molekulskom nivou, teorijski pristupi i molekulsko modelovanje imaju ključnu ulogu. Oni omogućavaju uvid u mikroskopske procese koji su često nedostupni eksperimentu, pružajući ne samo detaljnu interpretaciju već i prediktivnu moć u pogledu strukturnih, dinamičkih i reaktivnih svojstava sistema. U sinergiji sa eksperimentalnim tehnikama karakterizacije, molekulsko modelovanje predstavlja nezamenljiv alat za razumevanje i predviđanje ponašanja kompleksnih hemijskih i biohemijskih sistema.

2.4.1. Molekulski doking

Molekulski doking je metoda koja se koristi od 1980. godine, pokrenuta potrebama hemije, molekularne biologije i farmaceutske industrije. Cilj dokinga je predviđanje najverovatnijeg načina vezivanja liganda (L) za protein (P) poznate 3D strukture, a dostupnost i snage računara značajno su olakšali razvoj ove oblasti [123–125].

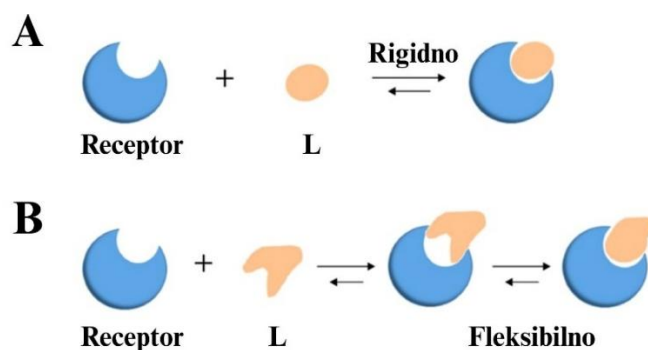
Rezultati dobijeni molekulskim dokingom omogućavaju procenu slobodne energije vezivanja kompleksa P–L, kao i afinitet i konstantu vezivanja koje opisuju jačinu i stabilnost interakcije. Dublje razumevanje molekulskih sila, poput van der Valsovih interakcija, vodoničnih veza i elektrostatičnih interakcija, igra ključnu ulogu u predviđanju geometrije P–L kompleksa kao i stabilnosti tog kompleksa u fiziološkim uslovima [126,127].

Molekulski doking obuhvata tri ključna i međusobno povezana aspekta: predikciju položaja liganda (engl. *pose prediction*), virtualno pretraživanje velikih baza podataka i procenu afiniteta vezivanja. Osnovni alati ove metodologije su algoritam pretrage i funkcija bodovanja, koji omogućavaju generisanje i evaluaciju mogućih konformacija liganda unutar vezujućeg mesta receptora, najčešće proteina [126]. Na osnovu geometrijske komplementarnosti, uz dodatnu energetska usklađenost i konformacionu reorganizaciju, ligand i receptor mogu postići najstabilniji kompleks kroz minimizaciju geometrije zasnovanu na smanjenju potencijalne energije sistema [128]. Programi za molekulski doking koriste specifične algoritme za pronalaženje optimalne konformacije i orijentacije liganda, nakon čega se primenjuje funkcija bodovanja (engl. *scoring function*), radi procene afiniteta vezivanja i analize vrsta međumolekulskih interakcija.

U pogledu fleksibilnosti, postoje tri mogućnosti izvođenja dokinga [127], pri čemu treba napomenuti da su rigidnost i fleksibilnost proteina aproksimacije u modelovanju:

- aproksimacija rigidnog proteina i delimično rigidnog liganda: istražuju se samo translacioni i rotacioni stepeni slobode liganda;
- aproksimacija rigidnog proteina i potpuno fleksibilnog liganda: istražuju se svi stepeni slobode liganda (translacioni, rotacioni i konformacioni), dok protein ostaje rigidan;
- aproksimacija delimično fleksibilnog proteina i potpuno fleksibilnog liganda: istražuju se svi stepeni slobode bočnih ostataka amino-kiselina u aktivnom mestu proteina i liganda, dok ostatak proteina ostaje rigidan.

Važno je istaći da tri savremena modela dokinga imaju svoje korene u klasičnim pristupima poznatim kao model „ključa i brave” i model „indukovanog uklapanja” [129]. Prvi se zasniva na pretpostavci rigidne strukture receptora i liganda, pri čemu se traži odgovarajuća orijentacija „ključa” koja savršeno odgovara „bravi”, naglašavajući značaj geometrijske komplementarnosti. Nasuprot tome, model indukovano uklapanje podrazumeva fleksibilnost oba partnera (i liganda i receptora), koji menjaju svoju konformaciju tokom procesa vezivanja kako bi se postiglo optimalno uklapanje, što je ilustrativno prikazano na **Slici 17**. Fleksibilno-rigidni doking je široko primenjivan, ali, budući da je fleksibilno uklapanje obično preciznije, istraživanja u ovom području postala su vrlo popularna poslednjih godina [124].



Slika 17. Dva modela molekulskog dokinga: A) ključ-brava model; B) indukovano uklapanje. Preuzeto i modifikovano prema [124].

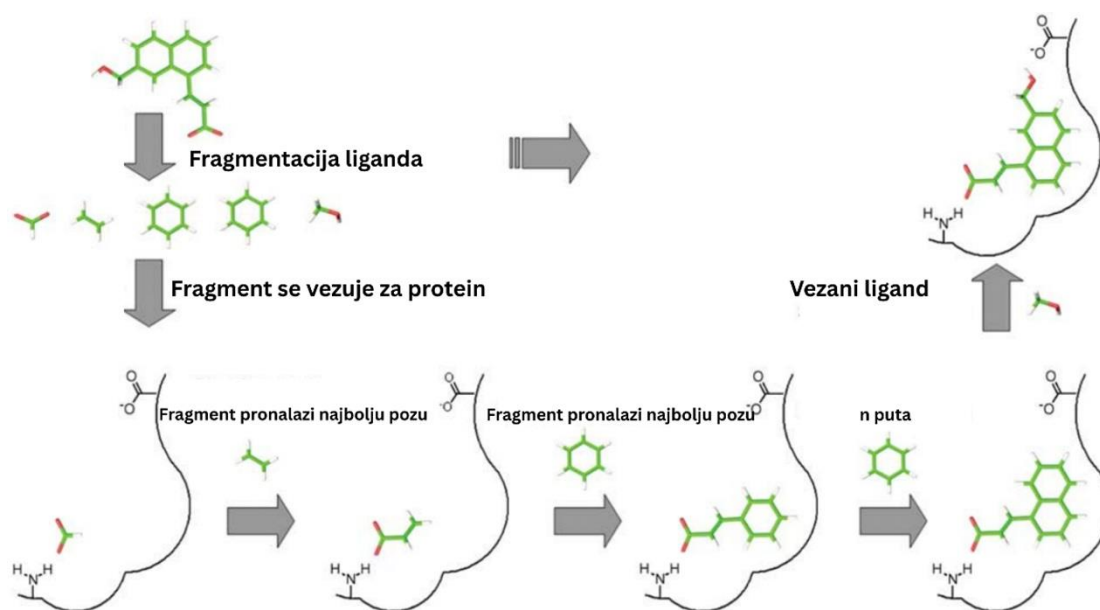
2.4.1.1. Algoritmi pretrage

U zavisnosti od primenjenih algoritama pretrage, koji su definisani skupom pravila i parametara za predviđanje konformacija, programi za molekularni doking mogu se klasifikovati u više kategorija [130]. Ovi algoritmi imaju zadatak da istraže multidimenzionu površinu potencijalne energije, kako bi identifikovali najpovoljniji položaj liganda na receptoru, tj. globalni energetski minimum [131,132]. U većini slučajeva, protein se tretira kao rigidna struktura, dok se ligand modeluje kao fleksibilan molekul, odnosno, dozvoljene su rotacije oko prostih veza, dok se dužine veza i unutrašnji uglovi zadržavaju fiksni [131]. Kako bi se procenila energija interakcije između liganda i receptora, koristi se precizna definisana funkcija za računanje energije vezivanja, nazvana funkcija bodovanja (engl. *scoring function*), koja ocenjuje kako sterna komplementarnost (prostorno uklapanje), tako i hemijsku komplementarnost među molekulima [132].

Algoritam za rigidni doking je algoritam prepoznavanja oblika (sistem ključ-brava). Algoritmi za fleksibilni doking mogu se podeliti u tri osnovne kategorije [133]:

1. Sistemska pretraga;
2. Stohastički;
3. Deterministički algoritmi pretrage.

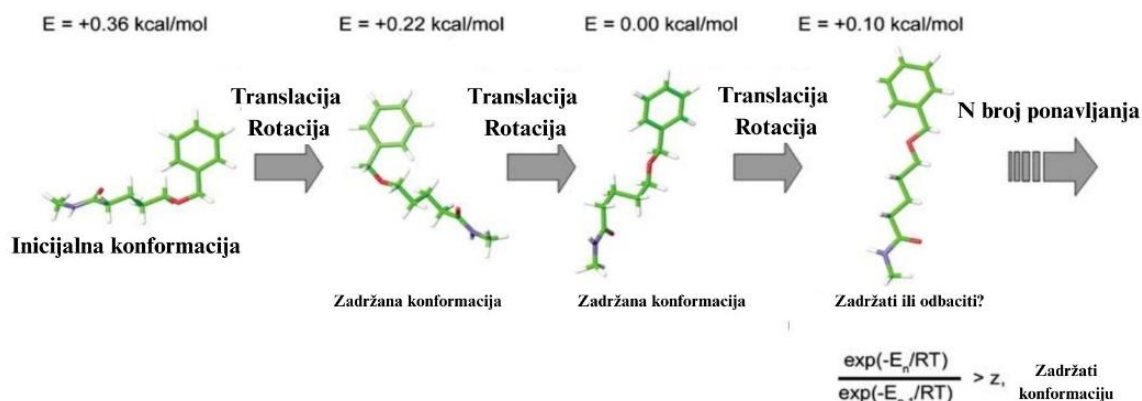
Sistemska pretraga generiše sve moguće poze liganda u ispitivanom mestu proteina. U ovu kategoriju pripadaju algoritam iscrpne pretrage, algoritam fragmentacije i algoritam konformacionog ansambla. Algoritam iscrpne pretrage se izvodi tako što se sistemski rotiraju sve rotabilne veze liganda u datim intervalima. Kako broj rešenja eksponencijalno raste, uvode se kriterijumi zaustavljanja, koji sprečavaju algoritam da istražuje prostore za koje je poznato da vode ka pogrešnim rešenjima. Algoritam fragmentacije uključuje fragmentisanje liganda, te se bazni fragment smešta u vezivno mesto ili svaki deo uklapa u vezivno mesto, a potom spaja kovalentnim vezama, **Slika 18**. Algoritam konformacionog ansambla generiše sve moguće konformacije liganda, a potom rigidnim dokingom svaka konformacija smešta u vezivno mesto i računa se afinitet vezivanja [134].



Slika 18. Primer algoritma rigidnog dokinga: Algoritam fragmentacije, shematski prikaz. Preuzeto i modifikovano prema [135].

Stohastički algoritmi pretrage vrše nasumične izmene, menjajući po jedan stepen slobode u sistemu (konformacioni prostor i translacioni/rotacioni prostor), umanjujući problem poze zarobljene u lokalnim energetskim minimumima. Da bi se poboljšala verovatnoća konvergencije, često se sprovodi više nezavisnih pokretanja algoritma. Primeri stohastičkih metoda su Monte Karlo (MC) metode, evolucioni algoritmi, metode Tabu pretrage i metode optimizacije grupe [136].

Slika 19 prikazuje osnovne korake MC simulacije, korišćene za ispitivanje različitih konformacija molekula. Proces započinje inicijalnom konformacijom, kojoj se zatim nasumično menjaju prostorne karakteristike, translacija i rotacija molekula ili njegovih veza. Na svakom koraku, energija nove konformacije se izračunava i poredi sa prethodnom. Ako je nova konformacija energetski niža, automatski se prihvata. Ako nije, odluka o prihvatanju se donosi na osnovu Boltzmanove funkcije raspodele. Ovaj postupak se ponavlja N puta, čime se istražuje prostor konformacija i omogućava nalaženje najstabilnijih (energetski najpovoljnijih) struktura [135].



Slika 19. Monte Karlo metoda u istraživanju konformacija molekula. Preuzeto i modifikovano prema [135].

Deterministički algoritmi pretrage funkcionišu tako da početno stanje određuje naredni korak, pri čemu novo stanje mora imati jednaku ili nižu energiju u odnosu na početno. Ako se isti deterministički algoritam pokrene više puta, sa identičnim početnim uslovima i parametrima, uvek će proizvesti isto konačno stanje. Glavni nedostatak ovih algoritama je što se često „zarobe” u lokalnim minimumima, jer ne mogu da prevaziđu energetske barijere. Razvijaju se različiti pristupi kako bi se povećala sposobnost prelaska preko barijera, ili kako bi se te barijere snizile. Primeri determinističkih metoda su metode minimizacije energije i simulacije molekulske dinamike [137].

2.4.1.2. Predviđanje afiniteta vezivanja liganda

Jedan od ključnih izazova u svim računarskim metodologijama je razvoj energetske funkcije bodovanja koja može brzo i precizno opisati interakciju između proteina i liganda [138]. Za dati ciljani protein, molekulski doking generiše stotine hiljada mogućih orijentacija i konformacija liganda unutar aktivnog mesta proteina. Funkcija bodovanja je matematički metod koji se koristi kako bi se ove konformacije rangirale na osnovu jačine vezivanja svakog od potencijalnih P-L kompleksa [130]. Tačnost procene može se validirati ako funkcija bodovanja uspešno isključi lažno pozitivne rezultate i ako rezultat bude u skladu sa eksperimentalnim podacima [139]. Funkcije bodovanja su korisne u metodama za predviđanje nepoznatih vezujućih mesta na proteinima, predviđanju afiniteta vezivanja između proteina, kao i u specifičnim optimizacijama za proteine iz iste porodice proteina [130].

Korišćenjem atomskih koordinata P-L kompleksa, funkcije bodovanja mogu proceniti slobodnu energiju vezivanja ili konstantu vezivanja. Slobodna energija vezivanja se dobija Gibbs-Helmholtz jednačinom (ΔG slobodna energija vezivanja, ΔH entalpija, T temperatura (K), a ΔS entropija):

$$\Delta G = \Delta H - \Delta TS \quad (1)$$

Osim promene slobodne energije, može se izračunati i konstanta vezivanja, K_a , kao što je prikazano u sledećoj jednačini:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (2)$$

Prema načinu na koji su izvedene, ove matematičke funkcije se mogu podeliti na funkcije zasnovane na polju sila, zasnovane na statističkom posmatranju poznatih struktura i empirijske funkcije bodovanja.

- Funkcije zasnovane na polju sila (engl. *force field*) su bazirane na sumi van der Valsovih i elektrostatičkih interakcija između parova atoma P-L kompleksa, uzimajući u obzir entalpiju i entropiju sistema. Primeri programa koji koriste ove funkcije su AutoDock i GOLD. Nove verzije uključuju i kvantno mehaničke funkcije (QM) i kvantno-mehaničke/molekulsko mehaničke funkcije (QM/MM).
- Funkcije temeljene na statističkim opažanjima iz baza podataka struktura (engl. *knowledge-based functions*) se baziraju na posmatranju bliskih međumolekulskih kontakata u velikim bazama podataka, poput PDB (engl. *Protein Data Bank*). Na osnovu učestalosti pojavljivanja u bazama podataka direktno se izvodi potencijal parova atoma Boltzmanovom relacijom, a nakon toga se ti podaci prevode u pseudopotencijal (engl. *mean-force potential, MFP*) koji opisuje geometriju liganda u P-L kompleksu.
- Empirijske funkcije bodovanja koriste nekoliko intermolekularnih termina koji su kalibrisani pomoću linearne regresije, gde se teorijske vrednosti prilagođavaju eksperimentalnim podacima. Odnosno, one računaju jačinu P-L vezivanja zbirom doprinosa svih interakcija. AutoDock Vina je predstavnik programa koji koriste ovaj način funkcije bodovanja.

Tokom dokinga funkcije bodovanja se koriste za optimizaciju pozicije liganda, a nakon završetka dokinga, ove funkcije rangiraju ligande prema afinitetu vezivanja, predviđajući tako najbolji ligand sa najvećim afinitetom [130].

2.4.1.3. Programi za molekulski doking-AutoDock Vina

DOCK je prvi program razvijen 1982. godine na Univerzitetu Kalifornije u San Francisku, pod vođstvom Briana K. Shoicheta i Irwina D. Kuntza [140,141]. Tokom 1990-ih, pojavljuje se AutoDock, program koji su razvili Arthur J. Olson i saradnici, i on postaje jedan od prvih široko korišćenih alata za molekulski doking [142]. AutoDock koristi globalni optimizacioni algoritam poznat kao Lamarkijanski genetski algoritam (LGA). Međutim, molekulski doking pomoću AutoDock-a bio je kompleksan, računarski zahtevan i nije uvek bio pouzdana metoda. Godine 2009, razvijen je program AutoDock Vina brža i preciznija varijanta u odnosu na originalni AutoDock. U **Tabeli 3** se nalazi prikaz različitih programa koji su u upotrebi, sa informacijama o algoritmu, brzini i karakteristikama [124]. Oznake F-R, F, R u koloni "karakteristike" označavaju fleksibilno-rigidni doking, fleksibilni doking i rigidni doking, redom.

Tabela 3. Programi koji se koriste za molekulski doking.

Ime programa	Algoritam	Metoda računanja slobodne energije	Brzina programa	Karakteristike
Flex X	Algoritam fragmentacije	Polu-empirijska računanja	Brza	F-R
Gold	Genetski algoritam (GA)	Polu-empirijska računanja	Brza	F
Glide	Iscrpna sistematska pretraga	Polu-empirijska računanja	Srednja	F
AutoDock	GA LGA	Polu-empirijska računanja	Srednja	F-R
ZDOCK	Geometrijska komplementarnost i MD	Molekulsko polje sila	Srednja	R
RDOCK	GA, Monte Carlo (MC), MIN	Molekulsko polje sila	Srednja	R
LeDOCK	GA, Simultano kaljenje	Molekulsko polje sila	Brza	F
Dock	Algoritam fragmentacije	Molekulsko polje sila	Brza	F
AutoDock Vina	GA	Polu-empirijska računanja	Brza	F-R

Za potrebe ove doktorske disertacije korišćen je program AutoDock Vina, jedan od najkorišćenijih alata za molekularni doking, poznat po brzini, preciznosti i jednostavnom korišćenju [143]. Razvijen je kao deo AutoDock paketa, sa ciljem da omogući efikasno predviđanje vezivanja malih molekula za biomolekule. Vina koristi globalni optimizacioni algoritam, koji kombinuje lokalnu pretragu sa elementima GA. Algoritam započinje nasumičnim konformacijama liganda i zatim pretražuje prostor promenom koordinata kako bi poboljšao energiju vezivanja, čime omogućava identifikaciju globalnog energetskog minimuma [144]. Iako je veoma efikasan, postojao je određeni skup ograničenja u prethodnim verzijama ovog programa. U verziji AutoDock Vina 1.2.0, mnoge funkcionalnosti su dodate ili poboljšane. Nova verzija uključuje unapređenu funkciju za izračunavanje energije, mogućnost simultnog dokinga sa više liganada. Dodatno, implementirane su Python komande, koje omogućavaju lakše pisanje programa koji upravljaju simulacijom i razvoj automatskih procedura za izvođenje doking simulacije [145].

2.4.1.4. Baze podataka

Najpoznatije baze podataka za kristalne strukture biomolekula, uključujući proteine, nukleinske kiseline i njihove komplekse, jesu proteinska baza podataka (engl. *Protein Data Bank*, *PDB*) [146] i UniProt baza, koje predstavljaju ključni resurs za molekularno modelovanje, omogućavajući istraživačima pristup eksperimentalno određenim strukturama. Dostupna je i ZINC baza podataka [147], koja sadrži komercijalno dostupne ligande spremne za molekularni doking. Kembrička baza podataka (engl. *Cambridge Structural Database*, *CSD*) sadrži kristalografske podatke o malim molekulima [148]. Korišćenje ovih baza podataka predstavlja osnovu za pripremu ulaznih struktura u savremenim *in silico* metodama.

2.4.1.5. Ograničenja molekularnog dokinga

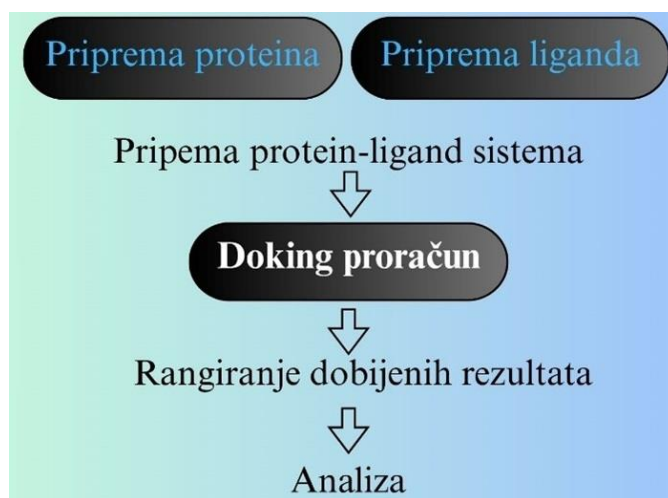
Problem molekularnog dokinga može se definisati kao zadatak predviđanja „pravilnog“ vezanog stanja između dva molekula, polazeći od njihovih atomskih koordinata [149]. Iako doking predstavlja važan alat u savremenoj nauci, njegova primena nosi niz metodoloških izazova. Većina trenutno dostupnih algoritama uzima u obzir isključivo fleksibilnost liganda, što omogućava rešavanje problema sa nekoliko desetina stepeni slobode [150]. Ovakva pojednostavljenja mogu značajno narušiti tačnost predikcije, naročito u slučajevima kada dolazi do izraženih konformacionih promena pri vezivanju liganda [136]. Međutim, kada se u analizu uključi i fleksibilnost receptora, broj stepeni slobode se značajno povećava, u rasponu od nekoliko stotina do nekoliko hiljada, čime se značajno komplikuje računarska obrada [150]. Ograničenja se javljaju i u samim funkcijama za bodovanje (engl. *scoring functions*) koje se koriste za evaluaciju stabilnosti predloženih kompleksa. Zbog nedovoljno preciznih parametara i nepotpunog obuhvata konformacionog prostora, ove funkcije često dodeljuju visoke vrednosti i molekulima koji eksperimentalno ne pokazuju nikakvu biološku aktivnost, što dovodi do pojave lažno pozitivnih rezultata [151]. Jedan od problema koji se javlja u praksi su tzv. „*binding decoys*“, odnosno, molekuli koji se u dokingu rangiraju visoko, iako se eksperimentalno ne vezuju za ciljani protein. Na sličan način, pojam „*pose decoys*“ odnosi se na konformacije poznatog liganda koje tokom dokinga dobijaju bolju ocenu od položaja sličnih stvarnoj (nativnoj) konformaciji. Ipak, uključivanjem parametara poput RMSD (engl. *Root Mean Square Deviation*) moguće je dobiti tačnije rezultate i smanjiti broj pogrešnih predviđanja [152].

Greške se mogu javiti i kada fizičko-hemijska svojstva molekula značajno odstupaju od podataka iz baze koja se koristi za doking. Naime, 3D struktura iz baze podataka često ne odgovara biološki aktivnoj formi proteina, što može rezultirati netačnim predviđanjima. Zbog toga je važno uzeti u obzir i termodinamičke karakteristike sistema, kao i koristiti retrospektivne validacije kako bi se procenila pouzdanost modela predikcije afiniteta. S obzirom na to da se savremene metode dokinga oslanjaju na brojne aproksimacije, ne postoji garancija da će simulirani kompleks zaista odgovarati prirodnom načinu vezivanja liganda za receptor. Stoga je ključno teorijske rezultate uporediti sa eksperimentalnim podacima [125,131].

2.4.1.6. Protokol molekulskog dokinga

Bez obzira na program koji se koristi za molekulski doking, protokol uključuje pripremu liganda, proteina, doking proračun, rangiranje i analizu dobijenih rezultata [153]. Uprošćena procedura izvođenja molekulskog dokinga je prikazana na **Slici 20**. Priprema proteina počinje pretragom proteinske baze podataka, gde se vodi računa o kompletnosti strukture, rezoluciji, kao i eksperimentalnim uslovima pod kojim je protein kristalisan. Najkvalitetnije strukture su snimljene metodom difrakcije X zraka na monokristalu. Ako ciljni protein još nije kristalisan (npr. ne postoji u PDB-u), tada je neophodno koristiti homologno modelovanje ili *ab initio* modelovanje. Homologno modelovanje podrazumeva predviđanje strukture proteina na osnovu srodnog, homolognog proteina (tzv. šablona), čija je struktura već određena.

Kada se pronade željena struktura koja ispunjava uslove za rad, prelazi se na tehnički deo gde se brišu svi ostali atomi iz pdb fajla, a ostavlja se samo proteinska sekvenca sa koordinatama, jer su često proteini kristalisan sa nekim ligandom. Ukoliko nedostaju delovi proteina oni se modeluju homologim modelovanjem. Nakon toga, potrebno je dodati atome vodonika i odrediti protonovanost aminokiselinskih ostataka na fiziološkoj pH, što je posebno bitno za histidin, koji može biti u tri različito protonovana stanja (HIE, HIP, HID). U te svrhe koristimo H++ program [154] koji se zasniva na rešavanju Pauson-Bolcmanove jednačine. Nakon toga se pravi pdbqt fajl proteina sa podacima o koordinatama, parcijalnim naelektrisanjima atoma, pomoću AutoDock Tools (ADT) programa. Pripremanje liganda se svodi na pronalaženje već poznate 3D strukture, ili crtanje liganda pomoću programa poput Avogadro. Nakon toga, potrebno je uraditi optimizaciju geometrije liganda kvantno-hemijskim proračunima [155]. Takođe, ADT i u ovom koraku služi za pravljenje pdbqt fajla, koji će sadržati potrebne podatke o ligandu. Ono što je važno napomenuti je da se moraju odrediti rotabilne veze liganda, za slučaj ako se radi rigidno-fleksibilni doking.



Slika 20. Procedura izvođenja doking simulacije, uprošćeno.

Kada imamo potrebne datoteke liganda i proteina, prelazimo na pripremu mesta na proteinu na kom će se izvršiti doking pretraga. Ukoliko nije poznato vezivno mesto, pretražuje se cela površina i zapremina proteina. U našoj grupi se to radi postavljanjem niza manjih kutija koje se međusobno preklapaju i zajedno pokrivaju celu površinu i zapreminu proteina. U svakoj kutiji se radi po jedan proračun i na taj način obezbeđuje da se cela površina potencijalne energije vezivanja liganda za protein detaljno ispita. Svaka kutija mora biti dovoljno velikih dimenzija kako bi u njoj ligand mogao slobodno da rotira u svojoj najizduženijoj konformaciji. Broj kutija obezbeđuje kvalitet doking simulacije, odnosno, pretrage. Ulazna datoteka mora da poseduje ligand, receptor, veličinu kutije, centar kutije i razmak između kutija u angstromima. Nakon završene pretrage dobija se izveštaj o pretrazi sa procenjenim afinitetima vezivanja i RMSD vredostima. Uglavnom su najbolja vezivna mesta sa najnižim energijama vezivanja, ali je potrebna i dodatna vizualizacija rezultata pomoću programa kao što su Pymol, Discovery Studio Viewer.

2.4.2. Uvod u molekulsku dinamiku

Molekulska-dinamičke simulacije omogućavaju praćenje kretanja svakog atoma unutar proteina tokom vremena, zasnovano na zakonima fizike međuatomskih interakcija, te služe kao "teleskop" za fenomene koji su teško uočljivi eksperimentalnim metodama [156,157]. Prva simulacija proteina korišćenjem molekulska-dinamičkih simulacija sprovedena je kasnih 1970-ih, a osnovna dostignuća koja su omogućila razvoj ove metode bila su nagrađena Nobelovom nagradom za hemiju 2013. godine koja je dodeljena Martinu Karplusu, Mihaelu Levitu i Arieihu Varshelu [158,159].

MD simulacije omogućavaju uvid u različite molekulske procese u realnom vremenu, kao što konformacione promene, uvođenje mutacija, uvijanje proteina (engl. *folding*), enzimski kataliza, kretanje kroz membranu ili interakcije sa ligandima [158,160,161]. Obično ne postoji eksperiment koji bi mogao da pruži sve informacije koje simulacija nudi, a rezultati simulacija mogu da usmere dalji eksperimentalni rad. Takođe, simulacije pružaju mogućnost da se predvidi ponašanje biomolekula nakon uvedenih promena poput mutacija, fosforilacije, protonovanja, ili prisustva/odsustva liganda [158]. Može se zaključiti da je MD ključno naučno oruđe, čiji je razvoj podstakao rast računarske moći, efikasne algoritme i unapređena polja sila, što potvrđuje sve veći broj publikacija koje kombinuju eksperimentalne i računarske metode [162]. Postoje dva glavna pristupa molekulske dinamike, *ab initio* MD, koji se zasniva na kvantnoj mehanici i minimalno se oslanja na empirijske parametre, i klasična MD koja predstavlja oblik računarske simulacije, gde atomi i molekuli mogu da interaguju u određenom vremenskom intervalu, u skladu sa zakonima klasične i statističke mehanike [163]. Donedavno je za izvođenje visokokvalitetnih MD simulacija bio potreban superračunar, međutim, razvojem nove računarske opreme, naročito grafičkih procesora (engl. *GPUs*), zahtevne simulacije se mogu izvoditi uz relativno razumno vreme proračuna [164–166].

MD simulacije obično obuhvataju tri glavne faze: pripremu sistema, produkciju simulaciju i analizu dobijenih trajektorija. Pripremna faza uključuje unos struktura, parametara polja sila (engl. *force-field*) i topologiju [167].

2.4.2.1. Teorijska osnova

Osnovna pretpostavka MD simulacija jeste Born–Openhajmerova aproksimacija, prema kojoj se elektronska i nuklearna kretanja razmatraju odvojeno, jer se elektroni kreću znatno brže od atomskih jezgara. U okviru klasične MD simulacije, elektronski doprinos energiji sistema se ne izračunava eksplicitno, već se efekat elektrona uključuje posredno, putem empirijskih funkcija. Polje sila u molekulskim dinamičkim (MD) simulacijama predstavlja računarski model koji se sastoji od matematičkih funkcija i pripadajućih parametara, a koristi se za izračunavanje potencijalne energije sistema atoma i molekula. Definišući energiju interakcija između atoma, polje sila omogućava izračunavanje sila koje deluju na svaki atom (kao gradijent energije). Te sile se zatim koriste u klasičnim MD simulacijama za određivanje vremenske evolucije položaja i brzina atoma.

Simulacija započinje definisanjem početnih uslova (položaji i brzine čestica), nakon čega se sistem evoluira u vremenu pomoću integracionih algoritama, najčešće Verletovog algoritma ili njegovih modifikacija. U svakom koraku, izračunavaju se sile na osnovu gradijenata potencijalne energije, a potom se ažuriraju položaji i brzine čestica. Tokom simulacije generiše se trajektorija sistema, koja predstavlja skup vremenski zavisnih mikrostanja. Za pravilnu interpretaciju rezultata simulacije, od suštinske je važnosti teorijski okvir statističke mehanike, koji omogućava prevođenje mikroskopskih podataka u makroskopske termodinamičke veličine. U tu svrhu, koristi se koncept ansambala, koji predstavljaju skup svih mogućih stanja sistema pod određenim uslovima. Najčešće korišćeni su mikrokanonski (NVE) ansambl, u kojem su broj čestica (N), zapremina sistema (V) i ukupna energija (E) konstantni, kanonski (NVT) ansambl, koji opisuje sistem u ravnoteži sa termostatom na konstantnoj temperaturi (T) i izotermalni-izobarički (NPT) ansambl. U NPT ansamblu su konstantni broj čestica (N), pritisak (P) i temperatura (T). Proseci koji se računaju tokom simulacije (npr. energija, gustina, radijalne distribucije) interpretiraju se kao vremenski proseci koji, pod pretpostavkom ergodičnosti, odgovaraju prosečnim vrednostima ansambla [168,169].

Važno je napomenuti da klasična MD simulacija ne omogućava formiranje niti raskidanje kovalentnih veza. U slučajevima kada je potrebno opisati hemijske reakcije ili procese koji uključuju prelaze između elektronskih stanja (npr. reakcije inicirane svetlošću), primenjuju se hibridne kvantno-mehaničko/molekulska-mehaničke (QM/MM) metode. U ovim pristupima, mali deo sistema, najčešće reaktivni centar, opisuje se kvantno-mehaničkim proračunima, dok se ostatak modeluje klasičnim MD metodama [170].

2.4.2.1.1. Klasična mehanika

Klasična mehanika koristi jednačine za rešavanje kretanja atoma u sistemu koji uzima u obzir međumolekulske interakcije [169]. Proračun simulacija molekulske dinamike zasniva se na primeni drugog Njutnovog zakona, kako bi se predvidelo ponašanje atoma u sistemu tokom vremena (jednačina 3).

$$F_i = m \cdot a = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (3)$$

gde je $r_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$, odnosno koordinate i -te čestice, F_i sila koja deluje na česticu mase m_i u vremenu t .

Sila koja deluje na česticu se može izraziti i preko potencijalne energije, jednačina 4, gde je V potencijalna energija sistema.

$$F_i = -\nabla V \quad (4)$$

Kombinacijom ove dve jednačine, dobija se jednačina 5 koja povezuje Njutnovu jednačinu kretanja, odnosno potencijalnu energiju sa promenama položaja u funkciji vremena.

$$\frac{-dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (5)$$

Na osnovu poznatih početnih položaja svih atoma u sistemu, na primer, proteina okruženog molekulima vode, računaju se sile (iz potencijalne energije sistema) koje deluju na svaki atom usled interakcija sa ostalim atomima. Početni položaji čestica dobijaju se iz eksperimentalno određenih 3D struktura. Usled velikog broja čestica, jednačinu kretanja je nemoguće rešiti analitički, već se primenjuju numeričke metode. Ovaj proces se ponavlja u malim fiksnim vremenskim intervalima, omogućavajući simulaciju dinamičkog ponašanja sistema na atomskom nivou [158].

2.4.2.1.2. Algoritmi integraljenja-Verletov algoritam

Numeričke metode za računanje položaja i brzina svih atoma u sistemu za integraljenje jednačina kretanja uključuju različite algoritme i najpoznatiji su Bimanov, Verletov, algoritam preskakanja (engl. *Leap-frog*) i korigovani Verletov algoritam.

Svi algoritmi mogu biti aproksimirani primenom *Taylor*-ovog reda, jednačina 6:

$$r(t + dt) = 2r(t) - r(t - dt) + \frac{d^2 r(t)}{dt^2} dt^2 + O(dt^4) \quad (6)$$

Verlet algoritam je jedan od najpoznatijih metoda za numeričku integraciju jednačina kretanja. On koristi informacije o položaju i /ili ubrzanju u trenucima t i $t - dt$ kako bi izračunao novu poziciju čestice u trenutku $t + dt$ [172]. Glavne prednosti Verletovog algoritma su njegova jednostavnost, numerička stabilnost i preciznost. Međutim, njegova mana leži u tome što brzine, koje su potrebne za proračun kinetičke i ukupne energije sistema, nisu direktno izračunate, već se moraju procenjivati iz pozicija. Iako se i danas koristi, često je zamenjen unapređenim verzijama, kao što su korigovani Verlet i algoritam preskakanja, koji omogućavaju tačnije određivanje putanje atoma u prostoru.

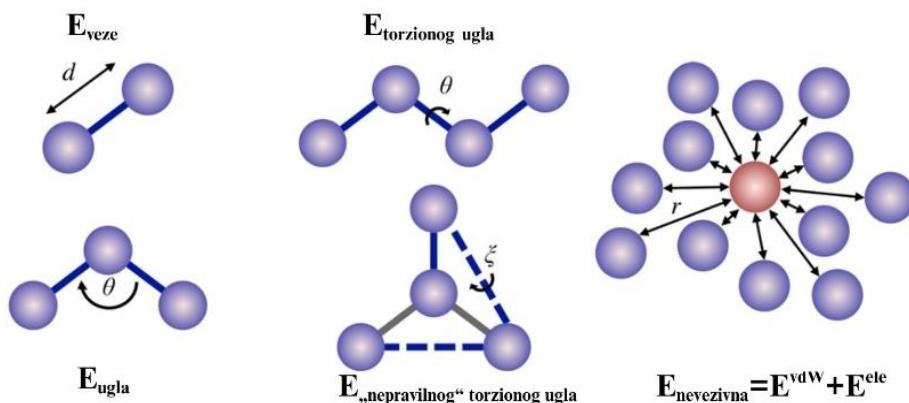
Poboljšanja u efikasnosti često se postižu zamrzavanjem najbržih vibracionih modova, ograničavanjem dužina veza sa vodonikovim atomima na fiksne vrednosti, pomoću algoritama kao što su SHAKE, Rattle i Lincs. SHAKE algoritam (poznat i kao ograničena Verlet metoda), predstavlja jednostavnu modifikaciju Verlet algoritma koja nameće ograničenja na unutrašnje koordinate, kao što su dužine veza i uglovi veza. Dužina vremenskog koraka je ograničena zahtevom da dt bude mali u poređenju sa periodom najviših frekvencija pokreta koji se simuliraju.

Za biomolekulske sisteme, najviši frekvencijski pokreti su vibracije istezanja veza, koje su, međutim, obično minimalno interesantne za proučavanje biomolekulske strukture i funkcije. S toga su algoritmi, kao što je SHAKE, koji ograničavaju veze na njihove ravnotežne dužine, korisni [158].

2.4.2.2.1. Polje sila

Jedan od ključnih koraka u simulacijama molekulske dinamike jeste izbor skupa odgovarajućih energetske funkcije kojima se opisuju intermolekulske i intramolekulske interakcije. Precizan, ali istovremeno računski efikasan opis ovih interakcija predstavlja osnovu za dobijanje validnih i fizički relevantnih rezultata. Ove energetske funkcije u sebi sadrže više parametara, koji se najčešće dobijaju na osnovu eksperimentalnih podataka ili kvantno-mehaničkih proračuna. Kompletan skup funkcija i pratećih parametara poznat je kao polje sila.

Za potrebe simulacije proteina razvijeno je više specifičnih polja sila, te većina njih deli sličnu strukturu, odnosno, molekul se posmatra kao skup tačaka (atoma) sa parcijalnim naelektrisanjima, povezanih kovalentnim vezama [173]. Vezivne interakcije uključuju istezanje veza, savijanje uglova i torziju rotaciju, i modeluju se pomoću harmonijskih izraza ili Furijevih transformacija. Nevezivne interakcije, poput van der Valsovih i elektrostatičkih sila, opisuju se Lenard-Džounsovim i Kulonovim potencijalima, **Slika 21**.



Slika 21. Prikaz vezivnih i nevezivnih energija koje doprinose polju sila. Preuzeto i prilagođeno prema [173].

Opšta forma funkcija potencijalne energije u okviru polja sila obuhvata sve pomenute doprinose i može se izraziti sledećim jednačinama (7-12):

$$V_{total} = V_{veza} + V_{ugao} + V_{torzija} + V_{vdW} + V_{elec} \quad (7)$$

$$V_{veza} = \sum_{veze} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \quad (8)$$

$$V_{ugao} = \sum_{ugao} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (9)$$

$$V_{torzija} = \sum_{torzija} \frac{1}{2} k_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (10)$$

$$V_{vdW} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (11)$$

$$V_{elec} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} \quad (12)$$

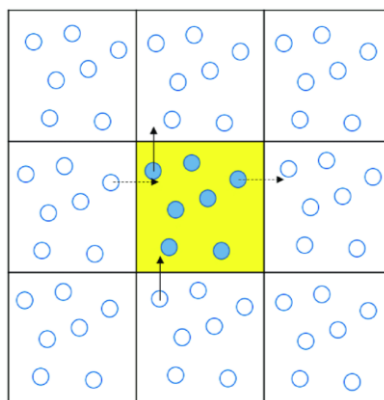
k_b i k_θ su konstante sile, r_0 i θ_0 ravnotežne vrednosti dužine veze (r) i ugla veze (θ) važi za jednačine 8 i 9; φ diedarski ugao, k_φ konstanta sile, n multiplicitet i δ fazni pomeraj, važi za jednačinu 10; ϵ_{ij} je dubina potencijalne jame interakcije para atoma, σ je razdaljina između dva atoma na kojoj je energija interakcije nula, važi za Lenard-Džounsovu funkciju koja opisuje privlačne van der Vals interakcije (jednačina 11); jednačina 12 je Kulonov zakon, gde q_i i q_j opisuju parcijalna naelektrisanja atoma, r_{ij} je rastojanje, a ϵ i ϵ_0 su dielektrična konstanta i sredine u kojoj se radi simulacija.

Obično se parametri prvo određuju za proteinske sisteme, a zatim za nukleinske kiseline, lipide i druge biomolekule, tako da budu u skladu sa parametrima za proteine. Glavne razlike između različitih sila polja proizlaze iz različitih pristupa za određivanje pojedinačnih parametara, kao i različitih oblika funkcija. Polje sila AMBER95 za proteine predstavlja primer jednog od često korišćenih, koje je razvijeno zajedno sa određenim programom za molekulsko-dinamičke simulacije. Tačnost dodeljenih parcijalnih naelektrisanja različitim atomima u proteinskoj strukturi je od ključne važnosti. U AMBER polju sila, parcijalna naelektrisanja su određena korišćenjem metode ograničenog elektrostatičnog potencijala (engl. *restrained electrostatic potential, RESP*). Ova metoda prilagođava kvantno-mehanički izračunat elektrostatički potencijal na površini molekula koristeći model tačkastih naelektrisanja smeštenih u atomskim centrima. Naknadne studije su procenjivale koliko je metoda uspešna u izračunavanju konformacionih energija, i pokazala se boljom od ostalih testiranih polja sila [174].

2.4.2.2.2. Rastvarač u MD simulaciji

Nekada su u simulacijama proteini posmatrani kao izolovani entiteti, često u vakuumu. Danas je praksa da se u simulaciju uključi rastvarač, najčešće voda, a da se simulirani sistem periodično replicira u svim prostornim pravcima, čime se obezbeđuje okruženje nalik realnim uslovima u ćeliji [158]. Rastvarač se može uključiti u simulaciju na implicitni ili eksplicitni način. U implicitnom modelu voda nije direktno prisutna u simulaciji, već se njen efekat uzima u obzir preko efektivne dielektrične konstante, koja ulazi u jednačinu za potencijalnu energiju. U eksplicitnom modelu, molekuli vode se direktno uključuju u simulaciju, što omogućava realniji prikaz. Međutim, ovaj pristup značajno povećava broj čestica koje se moraju računati, pa je potrebna veća procesorska snaga i pažljivo definisani granični uslovi kako bi se sprečilo da se molekuli vode udalje od sistema tokom simulacije. Prednost eksplicitne vode je u tome što omogućava preciznije izračunavanje makroskopskih svojstava jer simulirani sistem je sličniji realnom sistemu. Da bi se simulacije izvele efikasno, često se koriste periodični granični uslovi (engl. *Periodic Boundary Conditions, PBC*). Oni omogućavaju da se simulira mali sistem, koji se ponaša kao da je deo beskonačnog prostora. U okviru ovih uslova, formira se beskonačna rešetkasta struktura ponavljanjem simulacione kutije u prostoru. Kada molekul napusti kutiju, njegova slika ulazi sa suprotne strane, i to na potpuno isti način i u istom pravcu, **Slika 22**. Na taj način se broj molekula u simulacionoj kutiji održava, a sistem se može posmatrati kao da nema graničnu površinu. Periodični granični uslovi se uobičajeno primenjuju u molekulskoj dinamici kako bi se eliminisao efekat površine i izbegla potreba za ogromnim brojem molekula rastvarača i velikom simulacionom kutijom [175,176].

Za tačno i efikasno računanje elektrostatičkih interakcija na velikim rastojanjima u sistemima sa periodičnim graničnim uslovima, često se koristi metoda *Particle Mesh Ewald* (PME). Ovo je aproksimativna metoda koja omogućava izračunavanje elektrostatike na velikim rastojanjima bez potrebe za direktnim računanjem svih međudejstava u paru, čime se značajno štedi vreme potrebno za izvođenje simulacije [163].



Slika 22. 2D prikaz PBC. Centralna ćelija (obojena žuto) predstavlja simulacionu kutiju, tamnoplavi krugovi su čestice unutar simulacione kutije, dok prazni krugovi predstavljaju njihove periodične slike u susednim ćelijama. Preuzeto iz [177].

2.4.2.2. Priprema sistema za simulaciju

Iako je teorijski moguće simulirati sisteme bez prethodno poznate strukture, u praksi se molekulske-dinamičke simulacije najčešće započinju eksperimentalno određenim strukturama, poput onih dobijenih kristalografski ili NMR spektroskopijom, koje je potom neophodno pripremiti za simulaciju dodavanjem nedostajućih atoma (posebno vodonika), uklanjanjem neželjenih liganada, ubacivanjem molekula rastvarača i jona (ili lipida za membranske proteine), kao i dodeljivanjem polja sila, pri čemu treba imati u vidu da eksperimentalne strukture predstavljaju prosečne konformacije i mogu sadržati artefakte nastale usled ograničenja metode određivanja [158,178].

2.4.2.2.1. Izbor računarske opreme i programa za MD simulaciju

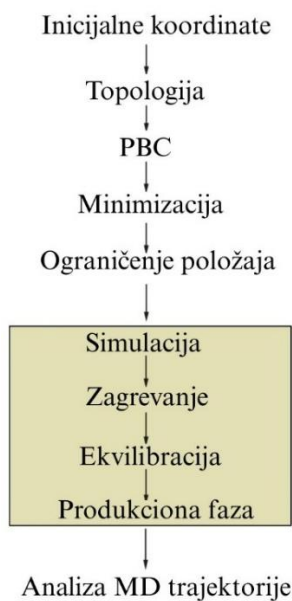
Efikasno izvođenje molekulskih simulacija u velikoj meri zavisi od izbora računarske infrastrukture i odgovarajućeg programskog paketa. Iako se osnovni principi molekulske dinamike zasnivaju na univerzalnim fizičkim zakonima, tehnička realizacija simulacije može znatno varirati u zavisnosti od dostupnih resursa i ciljeva istraživanja. Tradicionalno, molekulske dinamike su se izvodile na procesorima (engl. *central processing unit*, *CPU*), gde je svaki procesor obavljao računanje sila i integraciju položaja za određeni broj čestica. Danas, međutim, sve veći broj programa koristi prednosti grafičkih procesorskih jedinica (engl. *GPUs*), koje omogućavaju masivnu paralelizaciju i značajno skraćanje vremena potrebno za izvođenje simulacije. Moderne GPUs platforme omogućavaju višestruko ubrzanje simulacija u poređenju sa CPU konfiguracijama. Takođe, izvođenje simulacija na superračunarima omogućava paralelizaciju na hiljade jezgara i koristi se pretežno u simulacijama velikih bioloških sistema, koje uključuju više proteina, membranskih struktura ili kompleksne multisistemske konfiguracije [179].

Sledeće pitanje je koji program koristiti? Uobičajeni izbori uključuju GROMACS, NAMD, AMBER, CHARMM ([180],[181],[182],[180–183]). Važno je naglasiti da izbor programskog paketa često zavisi i od kompatibilnosti sa određenim poljima sila. Na primer, GROMACS je isprva razvijen za korišćenje sa GROMOS i AMBER poljima sila, ali u novim verzijama podržava i CHARMM i OPLS parametre. Tako je i AMBER usklađen sa AMBER ff14SB ili ff19SB poljima sila, dok je CHARMM prilagođen korišćenju CHARMM36m parametara za proteine i lipide.

2.4.2.2.2. Protokol MD simulacije

Pravilna priprema sistema je ključna za dobijanje validnih i pouzdanih rezultata. Početne koordinate proteina mogu se pronaći u proteinskoj bazi podataka ili modelovanjem 3D strukture. Prilikom pripreme sistema neophodno je dodati sve nedostajuće atome vodonika i ukloniti suvišne molekule (ligandi, joni itd). Sledeći korak je prevođenje strukture u formate koji su kompatibilni sa programima za MD simulacije, pri čemu se generišu i topološki fajlovi i molekulske koordinate. Na **Slici 23** je shematski predstavljen protokol simulacije, po koracima.

Nakon toga, sistem se postavlja u periodične granične uslove. Kutija se zatim puni molekulima vode, a po potrebi se dodaju i kontraioni radi neutralizacije sistema i postizanja željene jonske sile. Pre započinjanja dinamike, sistem mora biti energetski minimizovan. U ovoj fazi, atomi proteina su često fiksirani, dok se molekuli rastvarača slobodno kreću, čime se uklanjaju nepovoljne van der Valsove interakcije. Zagrevanje sistema se vrši postepenim povećanjem temperature do ciljane vrednosti (npr. 300 K), uz dodeljivanje početnih brzina atomima prema Boltzmanovoj raspodeli. Prvo se relaksiraju molekuli vode (uz poziciona ograničenja na protein), a potom se ukidaju ta ograničenja, pa se ceo sistem ravnomerno zagreva. Kod proteina i nukleinskih kiselina, bočni lanci se relaksiraju pre glavnog lanca, kako bi se omogućilo ublažavanje lokalnih napetosti bez narušavanja sekundarne strukture.



Slika 23. Shematski prikaz faza u MD simulaciji [184]

Potom sledi faza ekvibracije, tokom koje se prate parametri poput temperature, pritiska i ukupne energije. Simulacija se vodi dok se ove veličine ne stabilizuju, što može zahtevati dodatno skaliranje brzina. Kada se postigne stabilan sistem, započinje faza produkcione simulacije, koja može trajati od nekoliko desetina nanosekundi (ns) do mikrosekundi (μ s), u zavisnosti od postavljenih ciljeva i dostupnih resursa. Tokom ove faze, položaji i brzine atoma se beleže u regularnim vremenskim intervalima, čime se omogućava analiza ponašanja sistema tokom vremena. Po završetku simulacije sledi analiza dobijenih podataka. Vizualizacija se može vršiti pomoću programa kao što je VMD, dok se kvantitativna analiza zasniva na parametrima kao što su prosečna energija sistema, RMSF (engl. *Root Mean Square Fluctuation*), RMSD i radijus žiracije (R_g) [184].

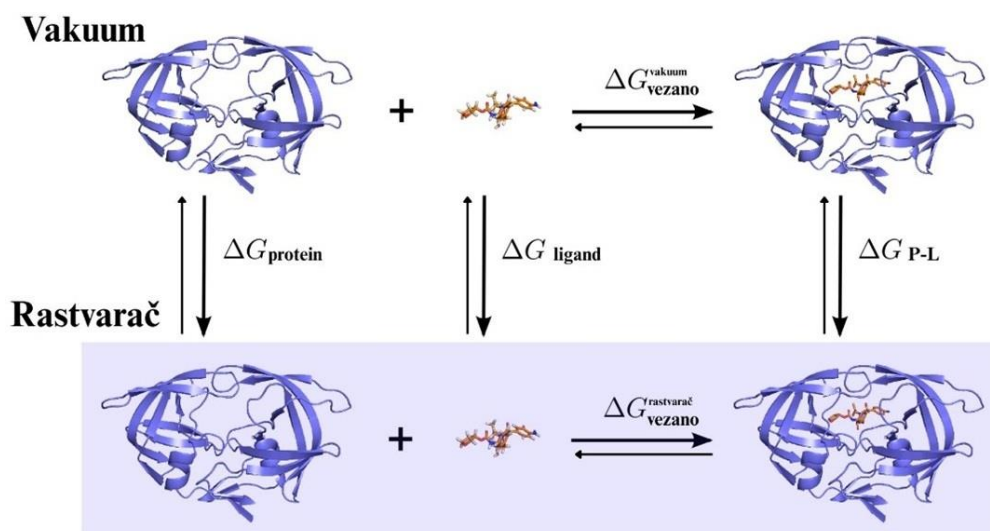
2.4.2.2.3. Analiza MD trajektorije

Jedan od najvećih izazova u molekularnoj dinamici ne leži u samoj simulaciji, već u analizi dobijene trajektorije, jer se tokom simulacije generiše ogromna količina podataka. Tipična MD simulacija prati prostorne koordinate (i opcionalno brzine) za desetine, ili stotine hiljada atoma kroz stotine hiljada, ili čak milione vremenskih koraka. Kao rezultat toga, nastaje dinamička putanja sistema (trajektorija), koja sadrži mnogo informacija o atomskim fluktuacijama, konformacionim promenama i međumolekulskim interakcijama tokom vremena. Važno je imati u vidu da su molekularni sistemi haotični, te male promene u početnim uslovima mogu dovesti do različitih rezultirajućih trajektorija. Zbog toga se u praksi često sprovodi više nezavisnih simulacija pod istim ili različitim uslovima, kako bi se identifikovale značajne promene u ponašanju sistema.

Za detaljno razumevanje dinamičkog ponašanja biomolekulskih sistema tokom MD simulacija, koristi se niz analiza. Jedna od najosnovnijih i najčešće korišćenih je RMSD, koja predstavlja srednje kvadratno odstupanje koordinata atoma u odnosu na referentnu strukturu. RMSD se koristi za procenu globalne stabilnosti sistema i može ukazivati na velike konformacione promene ili stabilizaciju strukture tokom vremena. Kada je cilj praćenje sekundarne strukture proteina, najčešće se koristi DSSP algoritam (engl. *Define Secondary Structure of Proteins*), koji klasifikuje elemente sekundarne strukture u kategorije poput α -heliksa, β -pločica. Ova analiza omogućava detekciju stabilnosti i eventualnih promena u sekundarnoj strukturi tokom simulacije, uključujući prelaze između različitih strukturnih motiva. Za uvid u lokalnu fleksibilnost i kolektivno kretanje molekula, primenjuju se analize kao što su RMSF (za kvantifikaciju prosečnih fluktuacija po amino-kiselinskom ostatku) i analiza glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*, PCA) ili analiza vibracionih modova, koje omogućavaju identifikaciju dominantnih pravaca kretanja i dinamičkih modova koji doprinose funkcionalnoj fleksibilnosti.

U kontekstu praćenja interakcija između proteina i liganada, kao i interakcija protein–protein, može se koristiti SASA analiza (engl. *Solvent Accessible Surface Area*), koja kvantifikuje površinu molekula koja je dostupna molekulima rastvarača, ili kontaktne mape i distance između ostataka koje se koriste za vizuelizaciju i kvantifikaciju prostorne blizine između različitih delova molekula.

Za kvantitativnu procenu afiniteta liganada prema proteinu koristi se MM-PBSA (engl. *Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area*) analiza, koja kombinuje rezultate molekulskih simulacija sa metodom implicitnog rastvarača, kako bi se procenila ΔG vezivanja, **Slika 24**. Ova analiza omogućava poređenje stabilnosti kompleksa P–L i uvid u energetske doprinose pojedinačnih komponenti, kao što su elektrostatičke i van der Waalove interakcije (jednačine 13 i 14), kao i doprinos energije rastvaranja.



Slika 24. Termodinamički ciklus MM-PBSA metode. Ljubičastim pravougaonikom je istaknuto polje rastvarača.

$$\Delta G_{\text{vezano}} = \Delta E_{\text{vakuum}} + \Delta G_{\text{rastvarač}} - T\Delta S \quad (13)$$

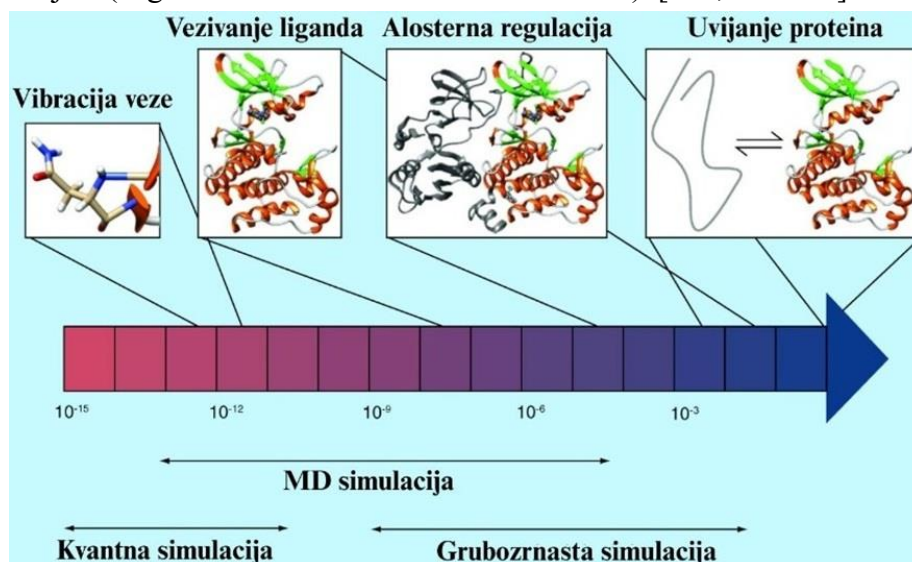
$$\Delta E_{\text{vakuum}} = \Delta E_{\text{int}} + \Delta E_{\text{vdW}} + \Delta E_{\text{elec}} \quad (14)$$

Kombinovanjem ovih analiza moguće je pratiti ne samo stabilnost i fleksibilnost proteinskih domena, već i identifikovati funkcionalne promene koje nastaju usled mutacija, vezivanja liganada ili promene uslova sredine [158,185,186].

2.4.2.3. Ograničenja MD simulacija

Iako simulacije molekulske dinamike predstavljaju izuzetno moćan alat za proučavanje ponašanja biomolekula na atomskom nivou, njihova primena je i dalje ograničena određenim metodološkim i tehničkim izazovima. Polja sila koja se koriste u MD simulacijama, iako značajno unapređena i dalje predstavljaju aproksimacije potencijalne energije sistema. Klasična polja sila zasnovana su na statičnim parametrima, te ova ograničenja mogu dovesti do sistematskih grešaka [187]. Polja sila ne mogu pouzdano opisati kvantne efekte koji su ključni za ponašanje mnogih bioloških sistema, naročito onih koji sadrže prelazne metale. Takođe, MD simulacije ne omogućavaju prekidanje niti formiranje kovalentnih veza, jer su zasnovane na fiksnoj topologiji sistema. To znači da protonovana stanja titrabilnih ostataka moraju biti unapred definisana i ostaju konstantna tokom simulacije, osim ukoliko se ne koriste specijalizovane metode poput simulacija sa konstantnim pH [188]. Međutim, ovakvi pristupi zahtevaju znatno više računarskih resursa i često kompleksniju postavku sistema. Isto važi i za disulfidne veze, koje se moraju definisati pre početka simulacije. Dalje, pouzdanost rezultata MD simulacije u velikoj meri zavisi od kvaliteta početne strukture, odnosno od dostupnosti eksperimentalnih struktura.

I na kraju, MD simulacije su računski zahtevne i najčešće ograničene na mikrosekundsku vremensku skalu, dok se mnogi biološki relevantni procesi odvijaju na znatno dužim, milisekundskim ili sekundnim skalama, što zahteva skupu opremu i naprednu tehničku ekspertizu, **Slika 25**. Zbog navedenih ograničenja, sve više se koristi čitav niz metoda poboljšanog uzorkovanja, koje omogućavaju efikasnije istraživanje multidimenzionalne površine potencijalne energije i ubrzavaju prelazak preko energetske barijere. Među najznačajnijima su metadinamika, replikaciona razmena (engl. *REMD*), ubrzana MD (engl. Accelerated MD, *aMD*) i ubrzana MD sa dodavanjem Gausijanskog potencijala (engl. *Gaussian accelerated MD*, *GaMD*) [179,189–191].



Slika 25. Ograničenje u vremenskoj skali klasičnih MD simulacija. Preuzeto i modifikovano prema [192].

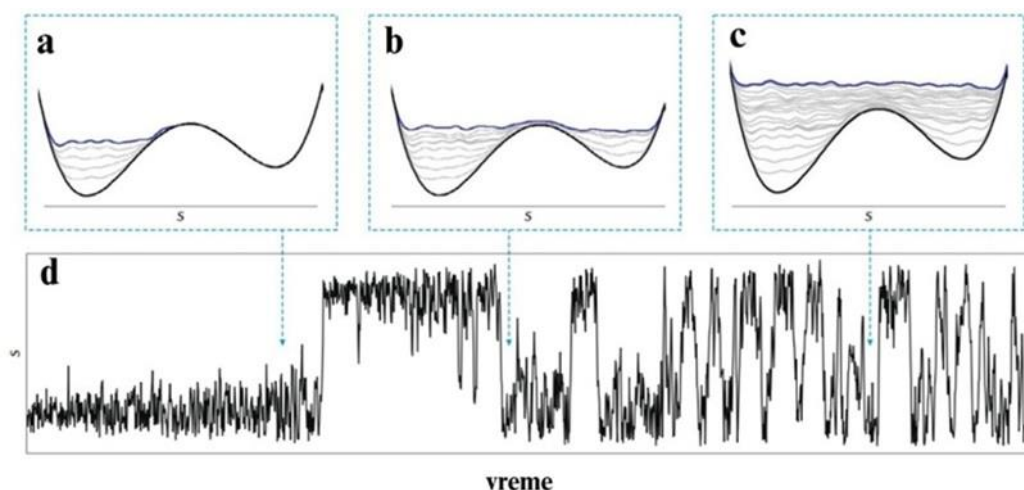
2.4.2.3.1. Metadinamičke simulacije

Metadinamičke simulacije istovremeno omogućavaju ubrzavanje retkih događaja i pouzdanu procenu slobodne energije u složenim molekulskim sistemima. Razvijene su kao odgovor na ograničenja klasične MD, koja često ostaje zarobljena u jednom metastabilnom stanju, tj. u lokalnom minimumu energije tokom čitave simulacije, što onemogućava istraživanje kompletnog konformacionog prostora sistema [193]. Uvedene su 2002. godine od strane Laia i Parinela, a od tada predstavljaju jedan od najkorišćenijih alata za istraživanje multidimenzionalne površine potencijalne energije i prelaza između metastabilnih stanja u molekulskim sistemima. Metadinamičke simulacije integrišu dve ključne ideje, sistematsko "popunjavanje" minimuma slobodne energije kroz dodavanje Gausijanskog potencijala i uvođenje istorijski zavisnog "*bias*" potencijala (potencijal pristrasnosti) koji usmerava dinamiku sistema ka slabije posećenim stanjima [193,194].

Metadinamičke simulacije se zasnivaju se na „popunjavanju“ potencijalne energije sistema pomoću zbira Gausijanskih funkcija koje su postavljene duž trajektorije definisane odgovarajućim skupom kolektivnih varijabli (CV, engl. *collective variables*), čime se sistem primorava da prelazi iz jednog energetskog minimuma u drugi, obeshrabrujući sistem da se vraća u već posećena stanja. Na ovaj način sistem je podstaknut da prevazilazi energetske barijere i da istražuje nove delove konformacionog prostora, **Slika 26**. Potencijal pristrasnosti predstavlja veštački doprinos ukupnoj energiji sistema, koji se koristi kako bi se promenila verovatnoća posete određenim konformacijama. Ovaj potencijal se gradi postepeno tokom simulacije, odnosno, u prostor CV se u pravilnim vremenskim intervalima dodaju Gausijanske funkcije na pozicije koje je sistem već posećivao, jednačina 15:

$$V_{bias}(s, t) = \omega \sum_{t' < t} \exp\left(-\frac{(s_{t'} - s)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (15)$$

gde je s vrednost CV, ω visina Gausijan-ove funkcije potencijala pristrasnosti, σ širina funkcije, t vreme odnosno faktor povezan sa brzinom deponovanja potencijala.



Slika 26. Princip rada metadinamičkih simulacija. Paneli a-c: Sistem iz jednog minimuma prelazi u drugi dodavanjem *bias* potencijala koji „popunjava“ minimum; panel d prikazuje kretanje CV (s) u funkciji vremena, pri čemu je jasno vidljiv prelazak iz jednog metastabilnog stanja u drugo. Preuzeto i modificirano po [193].

Efikasnost metadinamičkih simulacija u velikoj meri zavisi od izbora kolektivnih varijabli. CV su proizvoljne funkcije atomskih koordinata i moraju biti u stanju da razlikuju ne samo metastabilna stanja, već i prelazna stanja između njih. Ako ova dva uslova nisu ispunjena, *bias* potencijal ne može efikasno da ubrza prelaze, a slobodna energija se ne može tačno rekonstruisati. Dodatno, broj korišćenih CV treba da bude umeren, jer popunjavanje višedimenzionalnog prostora *bias* funkcijama postaje računski neefikasno. U cilju prevazilaženja ovih ograničenja, razvijene su varijante metadinamike, poput dobro-usmerene metadinamike (engl. *well-tempered*), gde se visina Gausijanskih funkcija postepeno smanjuje tokom simulacije, čime se omogućava tačnija procena slobodne energije. Takođe, razvijeni su pristupi koji omogućavaju korišćenje većeg broja CV kroz višestruke replike, kao što su *bias-exchange* metadgaussinamika i *parallel-bias* metadinamika.

U zaključku, metadinamičke simulacije se mogu koristiti za rešavanje više problema, koji se odnose na vezivanje liganada za proteine, enzimsku katalizu, transport kroz membrane, konformacione promene i procese uvijanja proteina. Ipak, glavno ograničenje je izbor odgovarajućih kolektivnih varijabli, zato se sve češće kombinuje sa tehnikama mašinskog učenja koje omogućavaju automatsku identifikaciju optimalnih CV i efikasnije istraživanje konformacionog prostora.

2.4.2.4. Primena MD simulacija

Sve veći broj studija pokazuje da rezultati dobijeni putem MD simulacija mogu ne samo da objasne postojeće eksperimentalne rezultate, već i da iniciraju nove eksperimente, usmere dizajn mutagenih studija, ili predlože nova mesta za vezivanje lekova. MD simulacije su doprinele identifikaciji mehanizama, objašnjenju vezivanja jona i liganada (npr. LeuT, BetP, M2 receptor), dizajnu lekova putem otkrivanja novih mesta za vezivanje (npr. HIV integrasa), predikciji konformacija receptora koje nisu eksperimentalno određene (npr. aktivacija GPCR, Kv kanal), istraživanju efekata mutacija na strukturu i funkciju proteina (npr. Na^+/H^+ antiporter, P450cam). U mnogim slučajevima, dobijene predikcije potvrđene su eksperimentalnim metodama, kao što su rendgenska kristalografija, elektronska mikroskopija (cryo-EM), elektroforeza, fluorescencija, NMR i spektroskopske metode, izotermalna kalorimetrija (ITC). Ove studije potvrđuju da MD simulacije ne predstavljaju izolovan metod, već bitnu oblast koja se sve više koristi za interpretaciju dinamičkih događaja koje statična strukturna analiza ne može u potpunosti da obuhvati [158,160].

3. CILJEVI

Ova doktorska disertacija bila je usmerena na razjašnjenje prirode interakcija između odabranih perfluoralkil jedinjenja (trifluorsirćetne (engl. *TFA*), perfluorbutanske (engl. *PFBA*) i perfluoroktanske kiseline (engl. *PFOA*)) i ključnih humanih proteina krvi: fibrinogena, α 2-makroglobulina, hemoglobina i humanog seruma albumina. Kako bi se objasnili mehanizmi vezivanja i razumela njihova uloga u promeni strukturnih i funkcionalnih svojstava proteina, primenjen je kombinovani eksperimentalni i teorijski pristup, koji je obuhvatio sledeće istraživačke aspekte:

A. Karakterizacija interakcija između fibrinogena i PFAS

1. Predviđanje potencijalnih vezivnih mesta za TFA, PFBA i PFOA, metodom molekuskog dokinga, korišćenjem kristalne strukture iz PDB i modelovane strukture fibrinogena;
2. Kvantifikacija afiniteta liganada za fibrinogen, fluorimetrijskom metodom i termoforezom na mikroskali (MST);
3. Ispitivanje uticaja vezivanja liganada na proteinsku strukturu fibrinogena, metodom cirkularnog dihiroizma (CD);
4. Ispitivanje uticaja vezivanja liganada na funkciju fibrinogena i trombina, spektrofotometrijskim i fluorimetrijskim metodama.

B. Ispitivanje interakcija između α 2-makroglobulina i PFAS

1. Predviđanje vezivnih mesta metodom molekuskog dokinga, na monomernom i dimernom obliku proteina;
2. Provera stabilnosti kompleksa α 2M-PFOA metodom molekulske dinamike;
3. Eksperimentalna validacija vezivanja, uzimajući u obzir ograničenja usled veličine i kompleksnosti proteina, pomoću MST metode.

C. Interakcija PFAS sa hemoglobinom: in silico i eksperimentalna ispitivanja

1. Određivanje mogućih mesta vezivanja TFA, PFBA i PFOA na kristalnoj strukturi deoksi-hemoglobina, pomoću molekuskog dokinga;
2. Upotreba molekulske dinamike za određivanje stabilnosti kompleksa PFAS-Hb;
3. Procena slobodne energije vezivanja liganada za hem primenom DFT metode;
4. Eksperimentalno praćenje promena u spektru Soretove trake, kao pokazatelja interakcije liganada sa hemom.

D. Detaljna analiza vezivanja PFOA za humani serum albumin (HSA)

1. Identifikacija i poređenje različitih mesta vezivanja PFOA pomoću molekuskog dokinga;
2. Praćenje stabilnosti HSA-PFOA kompleksa korišćenjem molekulske dinamike;
3. MM-PBSA kalkulacije.

Kombinovanjem računarskih i eksperimentalnih pristupa postignuto je sveobuhvatno razumevanje interakcija PFAS sa različitim proteinima krvi, kao i sagledavanje mogućih posledica njihovog vezivanja na strukturnu stabilnost i funkcionalna svojstva ovih biomolekula.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Ispitivanje interakcija fibrinogen-PFAS

4.1.1. Izolovanje i kvantifikacija fibrinogena

4.1.1.1. Izolovanje proteina

Venska krv je uzeta od zdravih dobrovoljaca različitog pola, uzrasta i životne dobi, uz prethodno pribavljenu etičku saglasnost dobijenu od Etičke komisije Univerziteta u Beogradu–Hemijskog fakulteta (rešenje broj 4-6/24). Uzorkovanje je sprovedeno u laboratoriji Beo-lab u Beogradu, akreditovanoj za sprovođenje medicinsko-biokemijskih ispitivanja (akreditacioni broj: 03-002). Dobijeni uzorci krvi, prikupljeni u epruvetama sa etilendiamin-tetra sirćetnom kiselinom (*engl.* EDTA) kao antikoagulansom, dalje su procesuirani na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Izolovanje fibrinogena iz plazme izvršeno je metodom dvostruke frakcionacije pomoću amonijum-sulfata, u skladu sa prethodno objavljenom procedurom [195]. Nakon separacije plazme, centrifugiranjem uzoraka 5 minuta pri 3000 rpm na sobnoj temperaturi, u supernatant je postepeno dodat zasićen rastvor amonijum-sulfata do konačne koncentracije od 20 %. Uzorak je potom inkubiran na 4 °C tokom jednog sata, radi parcijalnog taloženja plazma proteina. Sledeće centrifugiranje je obavljeno na 10 °C, 10 minuta na 8000 rpm. Dobijeni talog je razblažen u minimalnoj zapremini pufera (Dulbecco's PBS, dPBS, pH 7,4), nakon čega je ponovljen postupak frakcionisanja sa istom koncentracijom amonijum-sulfata i inkubacija tokom 30 minuta na 4 °C. Konačno centrifugiranje sprovedeno je pod istim uslovima kao prethodno, a dobijeni precipitat koji sadrži obogaćeni fibrinogen resuspendovan je u dPBS puferu pH 7,4.

4.1.1.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija izolovanog proteina određena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 280 nm, korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta za fibrinogen ($\epsilon_{1\%} = 15,1$). U cilju određivanja koncentracije fibrinogena primenjen je Lambert-Beerov zakon (jednačina 16):

$$A = a \times b \times c \quad (16)$$

gde je a -ekstincioni koeficijent, b -pređeni put svetlosti, c -molarna koncentracija proteina.

4.1.1.3. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Čistoća preparata fibrinogena potvrđena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecil-sulfata (SDS-PAGE). SDS-PAGE je urađena na vertikalnom sistemu Bio-Rad, u puferu za denaturišuću poliakrilamidnu elektroforezu (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS). Pripremljen je 8 % razdvajajući gel (donji), kao i 4 % koncentrujući gel (gornji gel). Komponente oba gela su date u Tabeli 4.

Tabela 4. Sastav razdvajajućeg i koncentrujućeg gela.

Komponenta	Razdvajajući gel (8 %)	Koncentrujući gel (4 %)
30 % rastvor akrilamida, 2,7 % biskrilamida	2,66 mL	0,5 mL
1,5M Tris-HCl pufer pH 8,8	2,5 mL	–
0,5 M Tris-HCl pufer pH 6,8	–	0,94 mL
Dejonizovana voda	4,67 mL	2,25 mL
10 % SDS	0,1 mL	0,038 mL
TEMED (tetrametiletildiamin)	0,004 mL	0,02 mL
10 % APS (amonijum-persulfat)	0,075 mL	0,028 mL

Između dve staklene ploče, naliven je donji gel koji je nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije donjeg gela, n-butanolni rastvor je odliven i ispiran destilovanom vodom, a potom je naliven i gornji gel sa češljevima koji su služili za oblikovanje bunarića. Nakon polimerizacije gornjeg gela, gel je spakovan u sistem za elektroforezu i u njega je naliven pufer za denaturišuću elektroforezu. Uzorci su pripremljeni mešanjem sa 5x koncentrovanim puferom za uzorke (300 mM Tris, pH 6,8, 10 % SDS, 50 % glicerol, 25 % β -merkaptotanol i 0,05 % bromfenolplavo) koji je razblažen do 1x nakon mešanja sa uzorkom proteina. Uzorci su denaturisani u termobloku na 95 °C 5 min. Nakon nanošenja uzoraka proteina, kao i proteinskih markera poznatih molekulskih masa, u bunare gela za razdvajanje puštena je elektroforeza pri konstantnom naponu od 80 V, a po prelasku uzoraka u donji gel napon je pojačan na 180 V. Gel je obojen 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) bojom u 50 % metanolu i 10 % sirćetnoj kiselini, nakon čega je ispran u dejonizovanoj vodi i obezbojen u rastvoru 7 % sirćetne kiseline.

4.1.2. Fluorescentna spektroskopija

Za procenu konstante vezivanja (K_a) između fibrinogena i PFAS, korišćena je standardna metoda titrovanja proteina, zasnovana na gašenju unutrašnje fluorescencije aromatičnih ostataka proteina (tirozina i triptofana). Merenja su izvedena pri 37 °C korišćenjem FluoroMax®-4 spektrofluorometra (HORIBA Scientific, Japan). Uzorci su pripremljeni tako što je urađena titracija liganada uz konstantnu koncentraciju fibrinogena (40 nM), dok su koncentracije liganda sukcesivno povećavane (3,33; 6,66; 9,99; 13,32; 16,65; 19,98; 23,31 i 26,64 μ M). Svi eksperimenti izvedeni su u triplikatu. Kontrolni uzorak pozadinske fluorescencije je bio dPBS. Ekscitacija je urađena na 280 nm, kako bi se pobudili aminokiselinski ostaci triptofana i tirozina, dok je emisija beležena u opsegu od 290 do 500 nm, uz dve akumulacije i širine proreza od 5 nm za ekscitacioni i emisioni snop. Na osnovu izmerenih spektra, konstanta vezivanja K_a izračunata je prema linearizovanom obliku sledeće jednačine (17):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \times \log C + n \times \log K_a \quad (17)$$

gde je F_0 intenzitet fluorescencije fibrinogena, F intenzitet fluorescencije fibrinogena u prisustvu liganda (PFAS), C je koncentracija PFAS. Pošto je koncentracija proteina značajno niža od koncentracije liganda, u ovoj analizi zanemaren je doprinos proteinske koncentracije, što je u skladu sa modifikovanim pristupom opisanom u literaturi [196].

4.1.3. Određivanje konstante afiniteta pomoću MST metode

Konstanta afiniteta vezivanja PFAS za fibrinogen dodatno je ispitana metodom termoforeze na mikroskali (MST). Serijska razblaženja liganda pripremljena su u $1 \times$ dPBS puferu (pH 7,4) nakon čega su u jednakom odnosu mešana sa prethodno obeleženim fibrinogenom čija je finalna koncentracija bila 20 nM. Fibrinogen je obeležen pomoću RED-NHS 2nd Generation Protein Labeling Kit-a (NanoTemper Technologies, Minhen, Nemačka), prema uputstvu proizvođača uz odnos boja:fibrinogen 3:1, a višak boje je uklonjen kolonom za rasoljavanje, koja je ekvilibrisana u 10 mM PBS puferu pH 7,4. Koncentracija liganda je varirala je u opsegu od 0,74 μ M do 0,97 mM za PFBA i od 0,24 μ M do 0,50 mM za TFA i PFOA. Molarna koncentracija fibrinogena (C_{fbn}), kao i stepen obeležavanja (DOL), izračunati su prema sledećim jednačinama (18–19) iz uputstva proizvođača:

$$C_{fbn} = \frac{A_{280} - (A_{650} \times 0,04)}{\epsilon_{280} \times d} \quad (18)$$

$$DOL = \frac{A_{650}}{195 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1} \times C_{fbn}(M)} \quad (19)$$

ϵ_{280} je molarni ekstinkcioni koeficijent fibrinogena na 280 nm, d je dužina puta svetlosti kroz kivetu (u cm), a 0,04 predstavlja korekcionni faktor za apsorbcu na 280 nm.

Pripremljeni uzorci su ubačeni u kapilare za Monolith™ NT i inkubirani petnaest minuta, nakon čega je sprovedeno merenje uz 40 % snagu MST i korišćenje Nano RED fluorescencije. Analiza rezultata izvršena je pomoću programa MO.Affinity Analysis v2.3, koji omogućava izračunavanje konstante disocijacije (K_d) primenom jednačine 20:

$$f(C) = \text{nevezani} + (\text{vezani} - \text{nevezani}) \times \frac{C + C_{\text{target}} + K_d - \sqrt{(C + C_{\text{target}} + K_d)^2 - 4 \times C \times C_{\text{target}}}}{2 \times C_{\text{target}}} \quad (20)$$

gde je $f(C)$ frakcija vezanog liganda, *nevezani* predstavlja normalizovani signal nevezanog proteina, dok *vezani* odgovara signalu kompleksa protein-ligand. K_d označava ravnotežnu konstantu disocijacije, a C_{target} predstavlja konačnu koncentraciju proteina u ispitivanju.

4.1.4. CD spektroskopija

CD spektroskopija je iskorišćena za ispitivanje promene sekundarne strukture fibrinogena u prisustvu dve koncentracije TFA, PFBA i PFOA. Merenja su izvedena na Jasco J-815 spektropolarimetru (Jasco, Tokio, Japan). Spektri su snimani u termostatisanim uslovima, na 37 °C, brzinom skeniranja od 50 nm/min. Uzorci su bili pripremljeni u 1× dPBS puferu (pH 7,4). Za merenja u oblasti bliskog UV spektra (260–320 nm) korišćena je kiveta čija je dužina puta svetlosti 1 cm, pri čemu je koncentracija fibrinogena bila 0,5 mg/mL, a ligandi su ispitivani pri koncentracijama od 50 μM i 100 μM. U oblasti dalekog UV spektra (190–260 nm), merenja su izvedena uz upotrebu kivete od 0,01 cm. Analiza sadržaja sekundarnih struktura sprovedena je pomoću CONTIN algoritma iz programskog paketa CDPPro, korišćenjem baze podataka SP29.

4.1.5. Spektrofotometrijska analiza formiranja fibrinskog ugruška

Radi ispitivanja potencijalnog uticaja tri liganda na mehanizam stvaranja fibrinskog ugruška, sprovedena su UV–Vis spektrofotometrijska merenja pri dve različite talasne dužine, koristeći instrument Cary 3500 Multicell, uz održavanje temperature na 37 °C. Eksperimenti su izvedeni na uzorcima koji su sadržali fibrinogen koncentracije 0,7 mg/mL, kao i jedno od testiranih jedinjenja (TFA, PFBA ili PFOA) u finalnim koncentracijama od 50 μM, 100 μM i 200 μM, pripremljenim u 50 mM Tris puferu (pH 7,4). Tris pufer je odabran umesto uobičajenog dPBS zbog kalcijumovih jona potrebnih za aktivaciju trombina. Kako bi se ispratila dinamika koagulacije, reakcija je inicirana dodatkom trombina u dve različite koncentracije (0,025 IU/mL i 1 IU/mL) uz 2,5 mM CaCl₂. Kao negativna kontrola korišćeni su uzorci koji su sadržali identične komponente, ali bez dodatka liganda. Pre početka reakcije, mešavine fibrinogena i liganda su inkubirane 10 minuta na 37 °C kako bi se omogućila njihova međusobna interakcija. Apsorbancija je merena na svakih 90 sekundi tokom ukupno 30 minuta, čime je obuhvaćen kinetički tok procesa formiranja ugruška.

Indeks agregacije izračunat je sledećom jednačinom 21, opisanom u literaturi [197]:

$$AI = \frac{A_{350}}{A_{280} - A_{350}} \times 100 \quad (21)$$

gde A_{280} i A_{350} predstavljaju apsorbanciju pri 280 nm i 350 nm, redom.

4.1.6. Uticaj PFAS na trombinsku aktivnost

Promene u aktivnosti trombina ispitane su u uslovima prisustva i odsustva TFA, PFBA, PFOA, fluorescentnim esejem. Fluorescentni supstrat III (benzoil-Phe-Val-Arg-AMC, HCl), Sigma-Aldrich, je rastvoren po uputstvu proizvođača, a finalna koncentracija trombina je bila 0,025 IU/mL. Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 200 μL, od čega je zapremina supstrata bila 20 μL, pufera 140 μL, trombina 20 μL, a ostatak je poticao od liganada različitih koncentracija ili pufera. Koncentracije liganada su bile u opsegu 0 μM do 200 μM. Smeša je inkubirana na 37 °C, 10 minuta. Praćena je promena intenziteta fluorescencije tokom vremena, pri čemu je ekscitacija vršena na 360 nm, a emisijski signal detektovan na 440 nm.

4.1.7. Računarske metode

4.1.7.1. Priprema liganada za sve teorijske eksperimente

Geometrijske optimizacije molekula TFA, PFBA i PFOA sprovedene su korišćenjem DFT metode na B3LYP nivou uz primenu 6-311G(d,p) baznog seta. Svi proračuni izvršeni su u programskom paketu *Gaussian09* [155]. Optimizacije su sprovedene u vakuumu, bez primene rastvarača, pri čemu su dobijene stabilne konformacije koje odgovaraju minimumima na površini potencijalne energije (engl. *potential energy surface, PES*), što je potvrđeno odsustvom imaginarnih vibracionih frekvencija. Dobijene geometrije korišćene su kao ulaz za dalji molekulski doking i simulacije molekulske dinamike. Tokom doking simulacija omogućena je slobodna rotacija oko jednostrukih veza, čime je u potpunosti obuhvaćena konformaciona fleksibilnost liganda. Na taj način, njihova fleksibilnost, posebno u perfluorovanom repu, ostaje očuvana tokom procesa vezivanja. Ovakav pristup je značajan, jer kvalitet početne geometrije direktno utiče na pouzdanost dokinga, dok slobodne rotacije omogućavaju adekvatnu adaptaciju liganda u vezivnom mestu.

4.1.7.2. Priprema strukture fibrinogena za molekulski doking

Početna struktura ljudskog fibrinogena odabrana je na osnovu pretrage literature pri čemu je korišćena struktura sa PDB kodom 3GHG. Stanja naelektrisanja svih aminokiselinskih ostataka procenjena su programom *H++* koji radi po principu Puason-Bolcmanove metode. Svi heteroatomi iz kristalne strukture su obrisani. Priprema proteina za molekulski doking obavljena je pomoću programskog paketa *AutoDockTools* (verzija 1.5.7). Takođe, kako pomenuta struktura nije bila dovoljna, ona je korišćena samo za doking na E (centralnom) regionu proteina. Modelovali smo datu strukturu prema Klykov et al. [198], čija je struktura obuhvatala 78 % ukupne sekvence i na njoj je urađen doking na -E-D regionima fibrinogena, jer je rađeno na polovini simetrične strukture. Kako α -lanac kristalne strukture obuhvata amino-kiseline od 27. do 200. pozicije, dopunjen je segmentima koji predstavljaju fleksibilne regione i delove lanca na N- i C-terminalu. Slično tome, β -lanac, koji u kristalnoj strukturi sadrži 400 amino-kiselina, proširen je kako bi uključio neuređene delove, fibrinopeptid B i regiju za vezivanje heparina. Takođe, γ -lanac je dopunjen amino-kiselinama čija uloga u strukturi proteina još nije u potpunosti poznata.

4.1.7.3. Simulacija molekulskog dokinga fibrinogen-PFAS

Zbog fibrilarne prirode fibrinogena, koji je dug oko 45 nm, pristup dokingu organizovan je kroz mrežu manjih kutija (grid box) dimenzija $24 \times 24 \times 24$ Å. Ova veličina kutije je bila dovoljna za neometano rotiranje veza liganada. Prva kutija je postavljena u centar proteina, u centar E regiona, a potom su kutije pomerane za 8 Å duž sve tri prostorne ose (x, y, z), kako bi se obuhvatila cela struktura proteina. Ukupno je bilo neophodno generisati 3840 različitih kutija kako bi se omogućio detaljan pregled potencijalnih vezivnih mesta. Fleksibilno-rigidni doking proračuni sprovedeni su korišćenjem programa *AutoDock Vina*, koji je korišćen i za procenu energija vezivanja (izraženih u kcal/mol). Vizualizacija i analiza dobijenih doking pozicija realizovana je pomoću programskog alata *PyMOL 2*, kojim se može zaključiti pozicija vezanog liganda i *Discovery Studio (2024)* programom kojim se mogu predvideti kontakti između liganda i amino-kiselina.

4.2. Ispitivanje interakcija između $\alpha 2$ -makroglobulina ($\alpha 2M$) i PFAS

4.2.1. Izolovanje i kvantifikacija $\alpha 2$ -M

Protein $\alpha 2$ -makroglobulin izolovan je prema modifikovanom protokolu Rehmana i saradnika [199]. Ukupna zapremina seruma je iznosila 20 mL, a serum je dobijen od troje zdravih dobrovoljaca. Serum je tretiran amonijum-sulfatom do 40 % zasićenja, a dobijeni precipitat je resuspendovan u 1 mL 50 mM TBS pH 7,4 i nanet na kolonu ispunjenu Sephadex G-200 (ukupne zapremine 43 mL). Kolona je eluirana sa 20 mL istog pufera, a poslednja frakcija je sadržala uzorak proteina.

Koncentracija proteina određena je korišćenjem BCA reagensa (Pierce Biotechnology, SAD). Prema uputstvu proizvođača, napravljeno je razblaženje reagensa u odnosu 1:200, a potom su napravljena razblaženja standarda proteina HSA (0 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL; 1 mg/mL). Za merenje je korišćeno 25 μ L svih koncentracija HSA, kao i uzorak prečišćene frakcije, a potom je pomešano sa 200 μ L pripremljenog reagensa i izmereno nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, nakon čega je konstruisana i standardna prava koja je imala jednačinu: $y=1,2279x + 0,1156$ (pri čemu je koeficijent determinacije iznosio $R^2=0,9937$). Čistoća proteina potvrđena je metodom SDS-PAGE elektroforeze na 8 % gelu, kao što je opisano u 4.1.1.3.

4.2.2. Testiranje anti-proteinazne aktivnosti α 2M u prisustvu PFAS

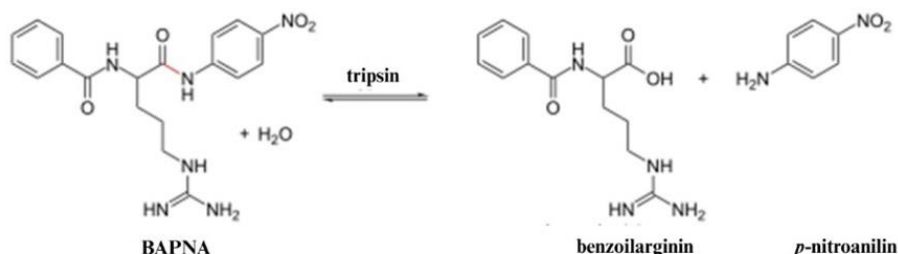
Biološka aktivnost nativnog α 2M proteina u prisustvu TFA, PFBA i PFOA ispitana je u četvostrukim ponavljanjima, po objavljenom protokolu [200]. Protein (2,2 mg/mL; $\sim 3 \mu$ M) je prethodno inkubiran sa različitim koncentracijama liganada (0 nM, 10 nM, 1 μ M, 10 μ M i 100 μ M) na 37 °C tokom 30 minuta. U svaki uzorak (50 μ L) smeše protein-ligand dodato je 3 μ L rastvora tripsina (1 mg/mL, Carl Roth, Nemačka). Reakcione smeše su inkubirane na 37 °C tokom 10 minuta, a zatim im je dodato 6 μ L rastvora inhibitora sojinog tripsina (1 mg/mL, Carl Roth), kako bi se deaktivirao preostali slobodni tripsin. Nakon još jedne inkubacije od 10 minuta na istoj temperaturi, u smeše je dodat 80 μ L radni pufer (50 mM Tris-HCl sa 10 mM CaCl_2 , pH 8,2), kao i 100 μ L rastvora supstrata-BAPNA (3 mM N_α -Benzoil-L-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid; Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, SAD). Reakcija je inkubirana 30 minuta na 37 °C, a zatim zaustavljena dodatkom 10 μ L koncentrovane sirćetne kiseline. Apsorbancija uzoraka je izmerena na 405 nm, pri čemu je porast signala proporcionalan aktivnosti tripsina koji je ostao slobodan ili zarobljen u kompleksu sa α 2M, a koji katalizuje razgradnju supstrata do žutog nitrofenolnog produkta.

4.2.3. Merenje promene unutrašnje fluorescencije α 2M u prisustvu PFAS

Merenja su izvedena na spektrofotometru FluoroMax[®]-4 (HORIBA Scientific, Japan) pri temperaturi od 37 °C, uz očuvanje fizioloških uslova (pH, koncentracija proteina i liganada). Uzorci su pripremljeni metodom titracije liganada u rastvor konstantne koncentracije proteina (100 nM), dok su koncentracije liganada postepeno povećavane. Maksimalna koncentracija liganada iznosila je 100 μ M za TFA, a 37 μ M za PFBA i 31 μ M PFOA. Kako ne postoje zakonske regulative dozvoljenih koncentracija PFAS u krvi, koncentracije su odabrane na osnovu istraživanja drugih grupa [199,200]. Ekscitacija je postavljena na 280 nm radi pobuđivanja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka triptofana i tirozina, a emisija je izmerena u intervalu od 290 do 450 nm. Svaki spektar je sniman uz dve akumulacije, pri širini proreza od 5 nm za oba snopa – ekscitacioni i emisioni.

4.2.4. Merenje uticaja PFAS na tripsinsku aktivnost

Aktivnost goveđeg tripsina određena je pomoću UV-Vis kolorimetrijskog esej, baziranog na hidrolizi supstrata BAPNA, prema standardnom protokolu opisanom u literaturi, pri čemu se dobija obojeni proizvod *p*-nitroanilin, prikazano na Slici 27 [203].



Slika 27. Shematski prikaz hidrolize BAPNA.

Odmereno je 2,5 mg tripsina iz goveđeg pankreasa (Sigma-Aldrich) i rastvoreno u 1 mL 50 mM Tris-HCl puferu. Supstrat je pripremljen u dimetilsulfoksidu (DMSO) neposredno pre upotrebe. Reakciona sneša je sadržala 790 μ L 50 mM Tris-HCl pufera sa dodatkom 20 mM CaCl_2 , 10 μ L rastvora 100 mM supstrata i 200 μ L rastvora enzima. Mešavina je inkubirana 10 minuta na 37 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 100 μ L 30 % sirćetne kiseline.

Oslobađanje *p*-nitroanilina, produkta hidrolize, praćeno je spektrofotometrijskim merenjem absorbancije na 405 nm. Postupak sa dodatkom liganda je bio isti, osim što je 100 mM ligand prethodno inkubiran sa enzimom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga je dodat supstrat. Kontrola bez enzima korišćena je za korekciju pozadinske absorbancije. Aktivnost enzima izračunata je po jednačini 22. Molarni ekstinkcioni koeficijent *p*-nitroanilina na 405 nm bio je 8800 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

$$\text{Enzimska aktivnost (U/mL)} = \frac{dA}{\epsilon \times l} \times \frac{V_{\text{rs}}}{V_{\text{enzima}}} \quad (22)$$

4.2.5. Merenje promene unutrašnje fluorescencije tripsina u prisustvu PFAS

Merenja su sprovedena na spektrofluorometru FluoroMax[®]-4 (HORIBA Scientific, Japan) pri temperaturi od 37 °C, u puferu koji je korišćen za enzimске eseje pH 8,0. Uzorci su pripremljeni tako što je ligand dodavan u rastvor konstantne koncentracije proteina (10 μ M), dok su koncentracije liganada varirale u rasponu od 10 do 100 μ M (10, 50 i 100 μ M). Ekscitacija je postavljena na 280 nm radi pobuđivanja aromatičnih aminokiselinskih ostataka triptofana i tirozina, a emisija je merena u intervalu od 290 do 450 nm. Svaki spektar je sniman uz dve akumulacije, pri širini proreza od 5 nm za oba snopa – ekscitacioni i emisijni.

4.2.6. Doking proračun za predviđanje vezivnih mesta

Priprema liganda je urađena na isti način kao što je opisano u odeljku 4.1.7.1.

Istraživanje vezivanja TFA, PFBA i PFOA za α 2M zahtevalo je upotrebu celokupnog molekula, uključujući i „mamac”-region koji nije prisutan u kristalnim strukturama. Međutim, kako je mamac region prilično pokretljiv, takva kristalna struktura u PDB nije pronađena. U tu svrhu preuzet je predikcioni model jednog lanca α 2-makroglobulina iz AlfaFold baze proteina [204], sa uključenim amino-kiselinama u regionu „mamac”. Korišćen model je generisan u junu 2022. godine. Poređenjem kristalne strukture jedne subjedinice proteina sa modelovanom jednom subjedinicom proteinom iz AlfaFolda ustanovili smo visoku sličnost.

Za potrebe analize interfejsa, pripremljen je dimerni oblik α 2M, u skladu sa uputstvima iz prethodno objavljenog rada [206]. Kristalna struktura α 2M preuzeta je iz PDB baze (ID: 4ACQ). Iz strukture su uklonjeni svi molekuli vode i hetero atomi, dok je nestandardna amino-kiselina N5-metilglutamin na poziciji 975 zamenjena ostatkom glutamina. Amino-kiselinski ostaci koji su nedostajali u kristalnoj strukturi nisu modelovani, ali su nedostajući atomi bočnih lanaca dodati korišćenjem CHARMM programa [183], verzija c35b1. Struktura je optimizovana kroz 5000 optimizacionih koraka u programu CHARMM koristeći charmm36 polja sila, kako bi se ispravili mogući loši kontakti i nesavršenosti u odabranoj kristalnoj strukturi proteina. Stanja naelektrisanja svih aminokiselinskih ostataka procenjena su pomoću H++ programa.

Priprema proteina za molekulski doking izvršena je u programu AutoDockTools (verzija 1.5.7). Radi bolje pretrage vezujućih mesta PFAS, pristup dokingu organizovan je kroz mrežu manjih kutija dimenzija $24 \times 24 \times 24$ Å, koje su se pomerale za 8 Å duž sve tri prostorne ose (x, y, z). Ukupno je generisano 3094 različitih kutija za monomerni oblik proteina, a 1716 kutija za dimerni interfejs, čime je omogućeno detaljno ispitivanje potencijalnih vezivnih mesta na α 2M. Fleksibilno–rigidni doking proračuni sprovedeni su korišćenjem programa AutoDock Vina, koji je korišćen i za predviđanje slobodne energije vezivanja (kcal/mol), a vizualizacija i analiza dobijenih pozicija obavljena je Discovery Studio (2024) i PyMOL 2 programima.

4.2.7. Molekulsko-dinamičke simulacije vezivanja PFOA za $\alpha 2M$

Topologija PFOA liganada je dobijena prema standardnoj proceduri koju preporučuje AMBER. Za veze, valentne uglove, torzione i nepravilne torzione uglove, kao i Lenard–Džounsove parametre, korišćeni su standardni parametri generalizovanog AMBER polja sila verzija 2 (gaff2). Parcijalna atomska naelektrisanja određena su računanjem Mertz–Kollman elektrostatičkog potencijala na MP2/def2-TZVP nivou teorije, a zatim je primenjena RESP procedura [207]. Simulacije molekulske dinamike sprovedene su korišćenjem AMBER programa u duplikatu. Struktura proteina (AlfaFold proteina) pripremljena je dodeljivanjem odgovarajućih protonacionih stanja i parametrizovane pomoću ff19SB sila polja. Početna struktura solvatisana je OPC molekulima vode i neutralisana dodatkom jona Na^+ i Cl^- (150 mM) kako bi se simulirali fiziološki uslovi.

Simulacije su obuhvatale više faza: početnu minimizaciju, kontrolisano zagrevanje sistema do fiziološke temperature, ekvibraciju u NPT ansamblu, i produkcione simulacije u trajanju do 1 μs . Tokom produkcioni simulacija korišćen je Langevin termostat i Berendsen barostat, dok je algoritam SHAKE primenjen za fiksiranje veza koje uključuju vodonik. Analiza trajektorija sprovedena je pomoću programa cpptraj, a vizuelizacije struktura i interakcija urađene su u programima PyMOL, VMD i Discovery Studio Visualizer.

4.3. Ispitivanje interakcija hemoglobin-PFAS

4.3.1. Uticaj PFAS na intenzitet Soretove trake

Liofilizovani ljudski Hb kompanije Sigma je pripremljen u 1x dPBS pH 7,4, a potom i centrifugiran kako bi se uzorak izbistrio. Koncentracija Hb je dobijena spektrofotometrijski pomoću Drabkinovog reagensa. U 20 μL uzorka proteina je dodato 5 mL Drabkinovog reagensa (660 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ i 650 mg KCN rastvoreno u 100 mL 0,5 M fosfatnog pufera pH 7,0) te nakon 20 minuta je apsorbancija izmerena na 545 nm. Slepa proba je sadržala vodu umesto uzorka proteina. Koncentracija proteina je izračunata prema jednačini 22 (gde vrednost od 16114 odgovara molekulknoj masi Hb u odnosu na gvožđe, R je faktor razblaženja, a 11000 milimolarni ekstincioni koeficijent proteina):

$$Hb = \frac{16114 \times A_{545} \times R}{11000} \quad (22)$$

U pripremljenim uzorcima koncentracija hemoglobina iznosila je 20 μM , dok je koncentracija PFAS je bila u opsegu (10 μM – 233 μM). Eksperimenti UV–Vis apsorbancije su sprovedeni korišćenjem Cary 3500 Multicell (Agilent Technologies) spektrofotometra.

4.3.2. Računarske metode-priprema liganda, proteina i doking proračun

Priprema liganada je urađena na isti način kao što je opisano u odeljku 4.1.7.1. Za ispitivanje vezivanja PFAS za humani Hb sprovedena je studija molekuskog dokinga korišćenjem kristalne strukture hemoglobina (PDB kod: 2DN2). Protonaciona stanja titrabilnih aminokiselinskih ostataka određena su pomoću H++ 3.0 programa. Priprema ulaznih fajlova za doking izvršena je u programu AutoDockTools (v1.5.7), što je obuhvatalo optimizaciju strukture, kao i dodelu odgovarajućih parcijalnih atomskih naelektrisanja. S obzirom na dimenziju hemoglobina, primenjena je strategija dokinga u više manjih kutija. Ovaj pristup podrazumevao je upotrebu kutija dimenzija $24 \times 24 \times 24$ Å, koje su pomerane za po 8 Å duž svake prostorne ose, čime je omogućeno pokrivanje celokupne površine i zapremine proteina. U prvom slučaju, ukupno je generisano 810 kutija kako bi se obuhvatila kompletna struktura. U drugom slučaju, dokinga na jednoj subjedini, generisano je 252 kutija. U trećem slučaju je urađen doking sa jednom kutijom oko centra gvožđa (x 18,409; y 14,436; z 23,715), veličine $5 \times 5 \times 5$ Å. Tokom simulacija protein je tretiran kao rigidna celina, dok je ligandu omogućena fleksibilnost oko jednostrukih veza. Svi proračuni dokinga i energija vezivanja (izraženih u kcal/mol) izvedeni su korišćenjem AutoDock Vina. Analiza i vizualizacija rezultata dokinga uspešno je realizovana u programima Discovery Studio (2024) i PyMOL 2.

4.3.3. DFT proračun energije vezivanja TFA za hemoglobin

Kako bismo ispitali mogućnost vezivanja malih molekula u distalnom delu hema, predviđenom za vezivanje kiseonika, primenjeni su DFT proračuni energije vezivanja TFA za hem-imidazol kompleks. Proračuni su sprovedeni korišćenjem ADF programskog paketa. Potpuna optimizacija geometrije sprovedena je primenom BP86 funkcionala u kombinaciji sa trostrukom zeta bazis setom proširenom sa dve polarizacione funkcije (TZ2P). Nakon optimizacije, konačne energije određene su single-point proračunima na nivou B3LYP/TZ2P, što daje realniju energetiku u poređenju sa GGA funkcionalima. Za precizniji opis slabih van der Valsovih interakcija korišćena je Grimme D3 disperziona korekcija sa Becke–Johnson dampingom. Relativistički efekti uključeni su kroz ZORA aproksimaciju nultog reda, čime se obezbeđuje tačniji opis elektronske gustine.

4.3.4. Određivanje stabilnosti P-L kompleksa MD simulacijama

Za potrebe MD simulacija $\alpha 1$ lanca Hb bilo je neophodno izvršiti parametrizaciju hem-imidazol kompleksa. Parametrizacija je sprovedena korišćenjem MCPB programa (engl. *Metal Center Parameter Builder*) [208,209]. Ova metoda uključuje parametrizaciju veza, valentnih i torzionih uglova i parcijalnih naelektrisanja na osnovu kvantno-hemijskih proračuna. Parametri za veze, valentne uglove i torzione uglove su određene Seminario metodom [210] primenjenom na optimizovanu geometriju hem-imidazol kompleksa dobijenu DFT optimizacijom korišćenjem B3LYP funkcionala i 6-31G baznim setom. Parcijalna naelektrisanja izračunata su RESP metodom, uz uključivanje doprinosa lokalnih amino-kiselina. Za gvožđe u deoksi-Hb pretpostavljeno je oksidaciono stanje +2 i multipletnost 5. Inicijalne geometrije kompleksa korišćene za parametrizaciju preuzete su iz PDB fajlova dobijenih molekulskim dokingom. Za optimizaciju TFA su korišćeni standardni parametri generalizovanog AMBER force polja verzije 2 (gaff2) za veze, valentne, torzione i nepravilne torzione uglove, kao i za Lenard–Džounsove parametre. Parcijalna atomska naelektrisanja određena su izračunavanjem Merz–Kolman elektrostatičkog potencijala na MP2/def2-TZVP nivou teorije, nakon čega je primenjena RESP procedura [207].

4.4. Ispitivanje interakcija HSA-PFOA

4.4.1. Rezultati molekulskog dokinga vezivanja PFOA za HSA

Korišćena je kristalna struktura HSA visoke rezolucije (PDB kod: 1N5U, rezolucija 1,90 Å). Svi kokristalisani ligandi (miristinska kiselina) su izbrisani. Geometrija liganda optimizovana je korišćenjem Gaussian 09 (DFT/funkcional B3LYP sa 6-311G(d,p) baznim setom) u programu Gaussian09, opisano u odeljku 4.1.7.1. Za identifikaciju potencijalnih mesta vezivanja, primenjena je sistematska pretraga koja je obuhvatila 1248 kutija, postupak opisan u 4.1.7.2. Vizualizacija finalnih poza je obavljena u PyMOL2 i Discovery Studio 2024 programu.

4.4.2. Identifikacija vezivnih mesta pomoću MD simulacije

Za 12 najboljih liganada po energiji vezivanja, predviđeno molekulskim dokingom, sprovedene su MD simulacije, u triplikatu, u programskom paketu AMBER. Proteinska struktura je prethodno pripremljena dodavanjem odgovarajućih protonacionih stanja i parametrisana korišćenjem ff19SB sila polja [211], dok su topologije liganada dobijene prema proceduri koju preporučuje AMBER. Za veze, valentne uglove, torzione i nepravilne torzione uglove, kao i Lenard–Džounsove parametre, korišćeni su standardni parametri generalizovanog AMBER force polja verzija 2 (gaff2). Parcijalna atomska naelektrisanja određena su računanjem Mertz–Kollman elektrostatičkog potencijala na MP2/def2-TZVP nivou teorije, a zatim je primenjena RESP procedura [207]. Korišćena je voda kao okolni rastvarač, OPC model, uz dodatak jona za neutralizaciju sistema. Sistem je neutralisan sa Na^+ jonima i solvatisan u kutiju oblika isečenog oktaedra sa molekulima vode, pri čemu je najmanje rastojanje između ivica kutije i ostataka proteina bilo 10 Å. Dodatni Na^+ i Cl^- joni ubačeni su radi simulacije fiziološke koncentracije soli (0,15 M). Simulacije su izvođene uz primenu periodičnih graničnih uslova, a za računanje elektrostatičkih interakcija na velikim rastojanjima korišćen je PME metod.

Energetska minimizacija izvršena je u dve faze: inicijalno je system minimizovan u 2.000 koraka pomoću Njutn–Rafson algoritma, a zatim je postepeno zagrevan sa 100 K na 298 K tokom 1 ns uz vremenski korak od 1 fs, dok je zapremina održavana konstantnom. Inicijalna restrikcija na atome proteina i liganada iznosila je 100 kJ/mol-Å². Potom je sistem relaksiran tokom ukupno 6 ns u NPT ansamblu, uz vremenski korak od 1 fs, postepenim smanjivanjem restrikcija (na 10,0, 1,0 i 0,1 kJ/mol-Å²). Na kraju je sprovedena ekvilibracija od 5 ns u NPT ansamblu sa vremenskim korakom od 1 fs, bez restrikcija. U fazi produkcije korišćen je NPT ansambl sa Langevin termostatom i Berendsen barostatom, uz vremenski korak od 2 fs. Algoritam SHAKE primenjen je da nametne ograničenja na atome vodonika. Analiza trajektorija i proračun kolektivnih varijabli urađeni su korišćenjem CPPTRAJ programa [212], gde su izračunate vrednosti RMSD i profili interakcija. Za proračune površine slobodne energije korišćen je Gromacs sham alat [180]. Program PLIP (engl. *protein ligand interaction profiler*) korišćen je za izračunavanje interakcija protein–ligand iz MD trajektorija. Grafička obrada rezultata realizovana je pomoću programa PyMOL, VMD i Discovery Studio Visualizer.

4.4.2.1. Procena slobodne energije vezivanja HSA-PFOA MM-PBSA metodom

Za procenu slobodne energije vezivanja između 12 liganda i HSA korišćena je metoda MM-PBSA implementirana u okviru programa AMBER. Analiza je izvedena korišćenjem skripte MMPBSA.py, pri čemu su korišćeni okviri iz stabilne faze MD simulacije (određene na osnovu RMSD parametara), sa vremenskim razmakom od 10 ns između uzastopnih snimaka. Uračunate su nepolarna i polarna komponenta solvatacione energije putem Poason–Bolcmanov modela, kao i molekulsko-mehaničke komponente energije (van der Vals i elektrostatičke sile). Entropijski doprinos nije uključen, imajući u vidu njegovu veliku računsku zahtevnost i diskutabilnu pouzdanost u ovom kontekstu. Dobijene vrednosti slobodne energije vezivanja ($\Delta G_{\text{(bind)}}$) predstavljaju razliku ukupne energije kompleksa i zbirne energije proteina i liganda u slobodnom stanju, i iskazane su u kcal/mol.

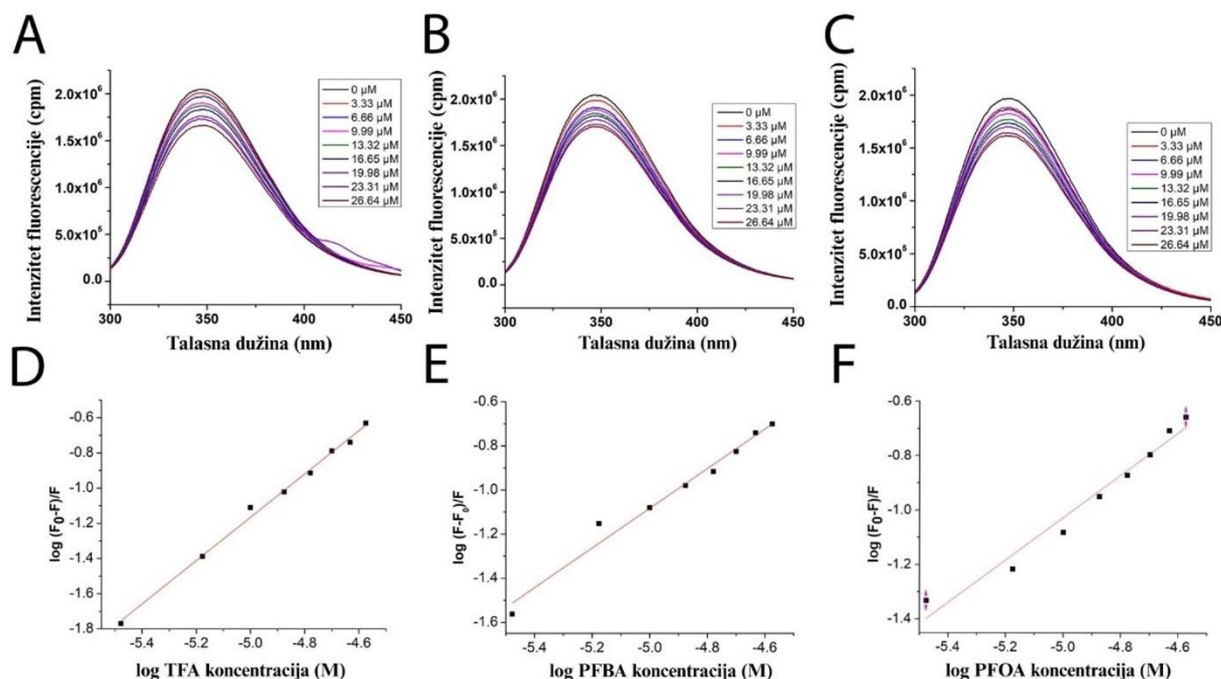
5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Uticaj PFAS na strukturu i funkciju fibrinogena

Kako bi se ispitalo ponašanje perfloralkil karboksilnih kiselina različitih dužina lanca u ljudskom organizmu, istraživali smo njihovo vezivanje za jedan od glavnih proteina krvne plazme, fibrinogen, koji smo prethodno izolovali i prečistili, Prilog, **Slika P1**.

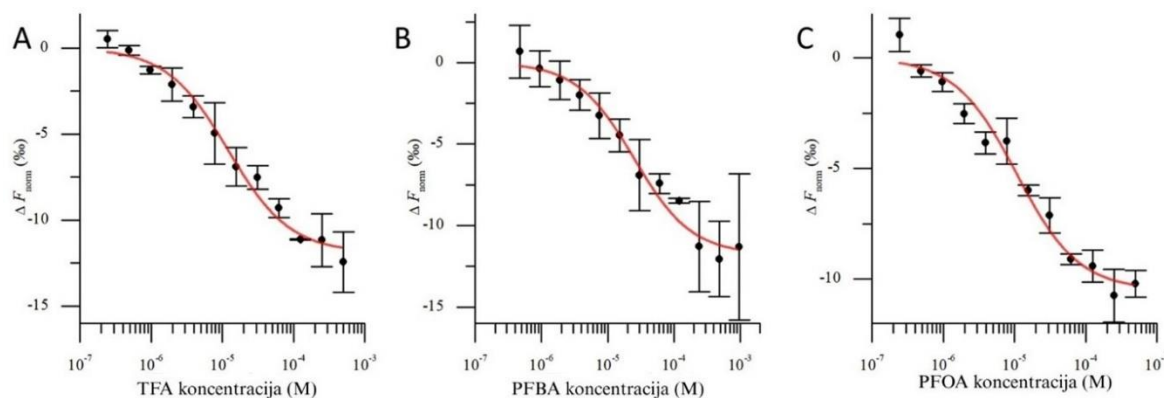
5.1.1. Afinitet vezivanja PFAS za fibrinogen

Često korišćena metoda za proučavanje interakcija proteina i malih molekula je gašenje unutrašnje fluorescencije proteina, jer je fluorescencija aromatičnih ostataka proteina (tirozina, triptofana) osetljiva na promene mikrokruženja koje mogu nastati vezivanjem liganada. U prisustvu svih ispitivanih jedinjenja uočen je pad intenziteta fluorescencije fibrinogena sa povećanjem koncentracije liganada, odnosno fluorescentni „kvenčing“ (**Slika 28**, paneli A–C). Konstante afiniteta (K_a) izračunate su prema jednačini 17 (videti poglavlje Materijal i Metode 4.1.2.). Logaritamske vrednosti relativne promene fluorescencije u zavisnosti od logaritma koncentracije liganda (normalizovane na fluorescenciju proteina bez liganada) nalaze se na **Slici 28**, paneli D–F. Na osnovu linearne zavisnosti dobijene ovim pristupom, određene su konstante vezivanja (K_a). Konstanta disocijacije (K_d) definisana je kao recipročna vrednost K_a , prikazano u **Tabeli 5**. Dobijeni rezultati ukazuju da fibrinogen ima veći afinitet prema manjim molekulima, odnosno, prema TFA, a zatim slede PFBA i PFOA. Iz ovih merenja je zaključeno da se perfluorovani ligandi vezuju za protein koagulacije umerenim afinitetom. Ovakvi rezultati izazivaju opravdanu zabrinutost: TFA je, kao ultrakratkolančani perfluorovani molekul, trenutno najzastupljeniji u pijaćoj vodi na većem broju lokacija [213]. S obzirom da za ultrakratkolančane i kratkolančane PFAS trenutno ne postoji jasna zakonska regulativa i da su u literaturi nedovoljno proučeni, odlučili smo da nastavimo detaljnu analizu njihovog vezivanja za fibrinogen. Uporedo smo sprovedi i analizu PFOA, kao glavnog predstavnika PFAS, kako bismo obezbedili referentni okvir i poređenje dobijenih rezultata.



Slika 28. Emisioni spektri fibrinogena pri titraciji sa rastućim koncentracijama: (A) TFA, (B) PFBA i (C) PFOA. Promene u intenzitetu fluorescencije ukazuju na interakciju između fibrinogena i odgovarajućih liganada. Grafici D–F prikazuju podatke korišćene za izračunavanje afinitetnih konstanti za vezivanje TFA, PFBA i PFOA za fibrinogen.

Zbog ograničenja gorepomenute metode, koja može biti nedovoljno osetljiva kada se ligand vezuje daleko od aromatičnih ostataka, naročito kod velikih i strukturno složenih proteina poput fibrinogena, u ovom radu smo primenili termoforezu na mikroskali (MST), metodu koja omogućava kvantitativnu analizu vezivanja na osnovu promena u termoforetskom ponašanju molekula, nezavisno od pozicije amino-kiselina u proteinskoj strukturi. Na **Slici 29** je prikazana zavisnost promene fluorescencije od koncentracije liganda.



Slika 29. Rezultat MST merenja. Grafici A–C prikazuju titraciju fibrinogena perfluorovanim ligandima.

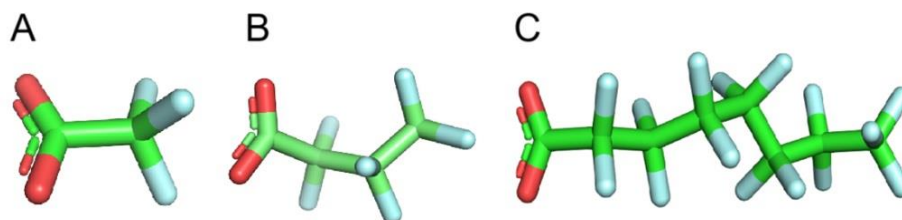
Prema jednačinama (18–20), iz odeljka Materijal i metode 4.1.3., su izračunate vrednosti konstanti disocijacije, **Tabela 5**. Rezultati ukazuju na jače vezivanje liganada u poređenju sa dobijenom goreopisanom metodom, ali afiniteti i dalje spadaju u umereni opseg. Moguće je da se TFA vezuje u blizini aromatičnih ostataka, dok se PFBA i PFOA vezuju na lokacijama koje su udaljenije od aromatičnih ostataka. Statistička analiza pokazuje da je samo razlika između K_d vrednosti za PFOA i TFA statistički značajna ($p < 0,05$).

Tabela 5. Izračunate vrednosti konstante disocijacije za sva tri liganda, pomoću dve metode.

Konstante disocijacije liganada (K_d/M) dobijene fluorimetrijski			Konstante disocijacije liganada (K_d/M) dobijene MST		
TFA	PFBA	PFOA	TFA	PFBA	PFOA
$8,9 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-5}$
$\pm 1,4 \times 10^{-5}$	$\pm 0,5 \times 10^{-4}$	$\pm 0,4 \times 10^{-4}$	$\pm 0,24 \times 10^{-5}$	$\pm 0,58 \times 10^{-5}$	$\pm 0,28 \times 10^{-5}$

5.1.2. Predviđanje vezivnih mesta

Nakon što su merenja gašenja unutrašnje fluorescencije i MST metoda potvrdile vezivanje perfluoralkil karboksilnih kiselina za fibrinogen, bilo je neophodno identifikovati njihova potencijalna mesta vezivanja. Strukture optimizovanih liganada su prikazane na **Slici 30**.



Slika 30. Prikaz optimizovanih geometrija liganada korišćenih u daljim proračunima. Strukture su prikazane u formi štafičastog modela, gde su atomi ugljenika obeleženi zeleno, kiseonika crveno, vodonika svetloplavo. (A) TFA; (B) PFBA; (C) PFOA.

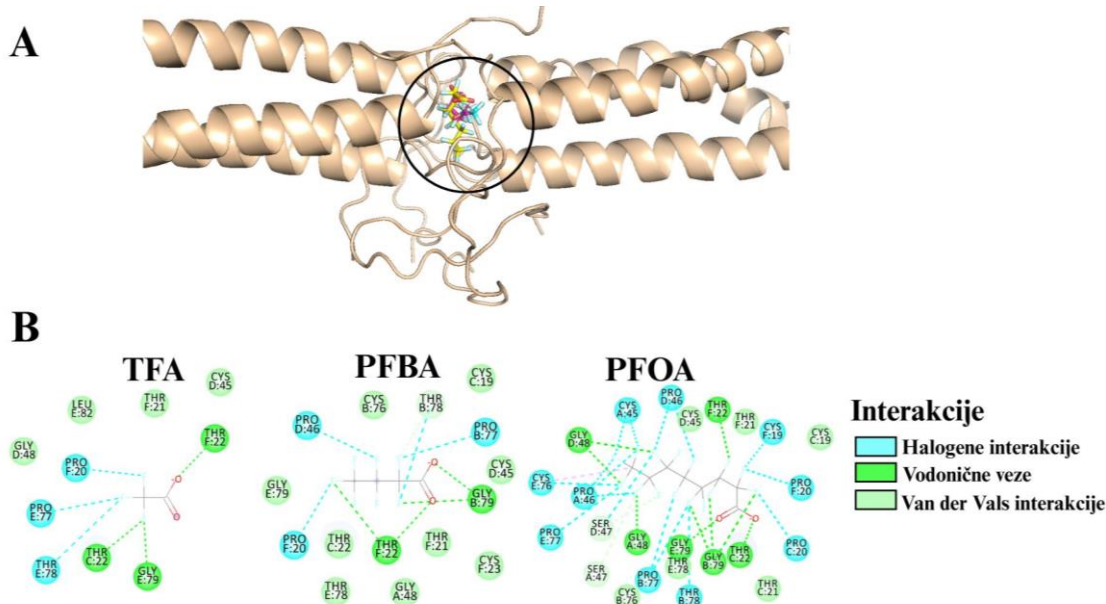
Zbog velike molekulske mase i činjenice da raspoložive kristalne strukture fibrinogena ne obuhvataju ceo molekul, analiza je organizovana kroz dva odvojena doking proračuna, kako bi se omogućila detaljnija i preciznija procena potencijalnih vezivnih mesta. Prvi proračun je bio na kristalnoj strukturi (PDB kod: **3GHG**), na osnovu koje je izvršeno predviđanje vezivanja u E regionu. Ova struktura obuhvata samo oko 66 % ukupne strukture proteina sa nepotpuno definisanim regijama, poput visoko fleksibilnog α -C domena. Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, izvršeno je dodatno modelovanje strukture fibrinogena, jedne polovine simetričnog proteina, koristeći podatke iz prethodnih istraživanja [117] opisano u Materijali i metode u odeljku 4.1.7.2. Na ovaj način su dobijeni rezultati doking metode postali relevantniji u smislu predviđanja vezivnih mesta liganda duž jedne polovine simetričnog molekula proteina.

Na centralnom E regionu fibrinogena identifikovano je vezivanje sva tri ispitivana liganda, pri čemu je najniža energija vezivanja zabeležena za PFOA (-8,9 kcal/mol, **Tabela 6**).

Tabela 6. Energije vezivanja PFAA za fibrinogen (kcal/mol)

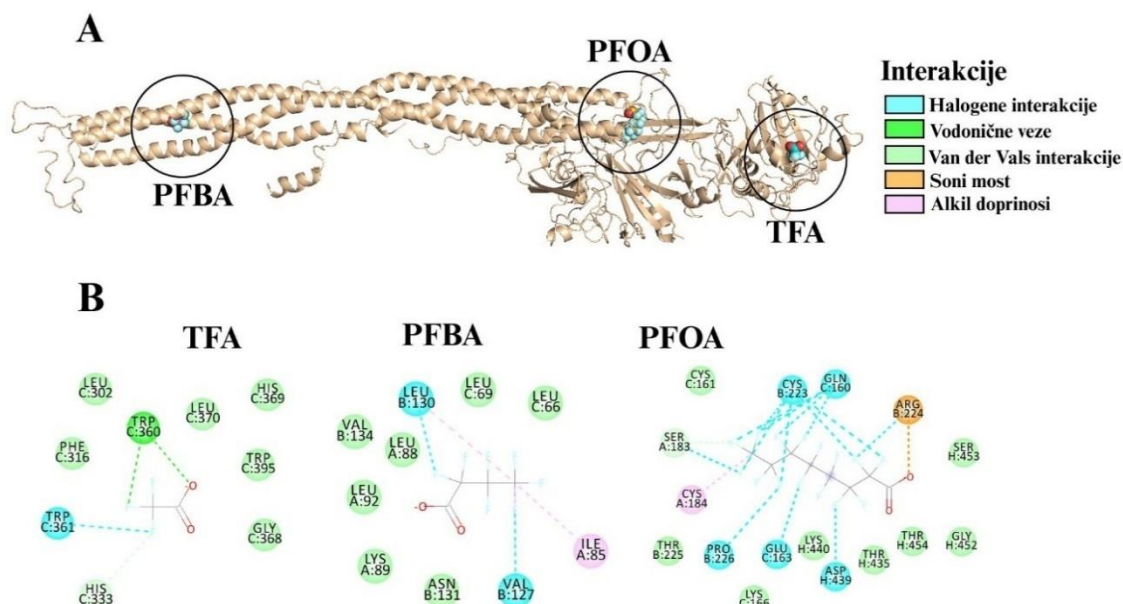
E region			Ceo molekul		
TFA	PFBA	PFOA	TFA	PFBA	PFOA
-4,3	-6,5	-8,9	-4,7	-6,1	-8,6
-4,1	-5,8	-6,9	-4,4	-5,6	-8,5
-4,0		-6,8	-4,4	-5,6	-7,8

Predviđene energije vezivanja (kcal/mol) liganda za protein su u skladu sa dužinom lanca liganda, budući da se svi vezuju za isto mesto E regiona (**Slika 31**). Uspostavljene su vodonične veze između kiseonika karboksilne grupe sva tri liganda i ostatka Thr22 na γ -lancu, dok su interakcije između fluora hidrofobnog lanca liganda uočene sa Pro20 na γ -lancu, kao i sa Pro77, Thr78 i Gly79 na β -lancu proteina, što je prikazano na 2D dijagramima na Slici 31B. Posmatranjem 2D dijagrama vezivnog mesta PFBA i PFOA uočavamo da se i hidrofobni rep ova dva liganda orijentisao na isti način u ovom vezivnom mestu, obzirom na ostvarene interakcije sa istim amino-kiselinama proteina.



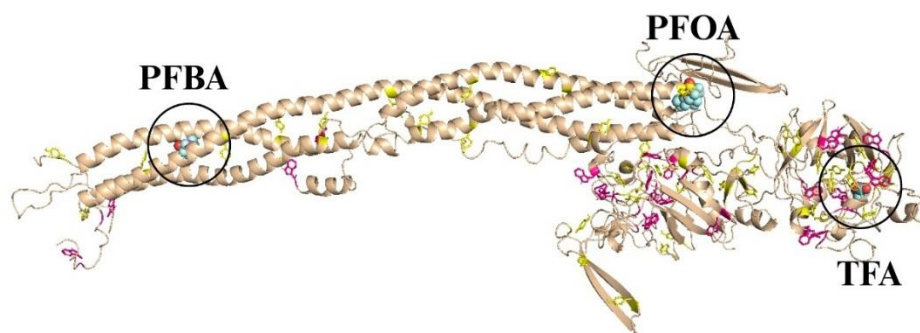
Slika 31. Prikaz vezivnog mesta sva tri liganda u E regionu fibrinogena. A) Slika je generisana u programu Pymol. Ligandi su prikazani kao štapići; B) 2D dijagrami interakcija koje se ostvaruju, sa legendom, prikazano pomoću programa Discovery Studio.

Na modelovanoj strukturi proteina su identifikovana dodatna mesta vezivanja visokog afiniteta za sva tri ispitivana liganda (**Tabela 6**, označeno kao „ceo molekul“). Novoidentifikovana mesta TFA i PFOA nalaze se u D regionu fibrinogena, dok PFBA ostaje vezan za E region, ali na drugačijem mestu u odnosu na prethodno određeno (**Slika 32**).



Slika 32. Prikaz vezivnih mesta liganada na modelovanoj strukturi fibrinogena: A) Slika je generisana u programu Pymol. Ligandi su prikazani kao sfere. B) 2D dijagrami interakcija koje se ostvaruju, sa legendom, prikazano pomoću programa Discovery studio.

Neophodno je osvrnuti se na interakcije koje se formiraju između TFA i modelovane strukture proteina, budući da se ovaj ligand vezuje u regiji koja uključuje dve aromatične amino-kiseline (Slika 32B), što je u skladu sa rezultatima dobijenim fluorimetrijskim merenjem, gde je zabeleženo gašenje fluorescencije fibrinogena u prisustvu vezanog liganda. Ostatak TrpC:360 formira vodonične veze i sa kiseonikom karboksilne grupe i sa fluorom iz TFA molekula. Takođe, TrpC:361 ostvaruje halogenu vezu sa fluorom iz repa molekula, dok HisC:333 formira C–H vezu sa istim fluorom. PFBA se vezuje za E region fibrinogena putem nepolarnih amino-kiselina, ostvarujući halogene interakcije sa ValB:127 i LeuB:130 iz β -lanca. Takođe, dva tirozinska ostatka su identifikovana i u blizini mesta vezivanja PFBA, dok u blizini mesta vezivanja PFOA nisu uočeni aromatični ostaci, **Slika 33**. PFOA pokazuje snažno vezivanje za D region fibrinogena, pri čemu je energija vezivanja niža za 0,3 kcal/mol u poređenju sa energijom vezivanja za E region. Uticaj dužine alifatičnog lanca ostaje očigledan, ali je u ovom slučaju dodatnu stabilizaciju omogućilo formiranje sonih mostova između ostatka ArgB:224 iz β -lanca i atoma fluora iz repa, kao i kiseonika iz karboksilne grupe PFOA. Vezivanje se dodatno stabilizuje brojnim halogenim interakcijama fluora sa amino-kiselinama iz β - i γ -lanca, što je prikazano na 2D dijagramima. Ovi rezultati potvrđuju da MST metoda predstavlja pouzdaniju procenu afiniteta vezivanja, pri čemu PFOA pokazuje nešto jači afinitet od TFA.

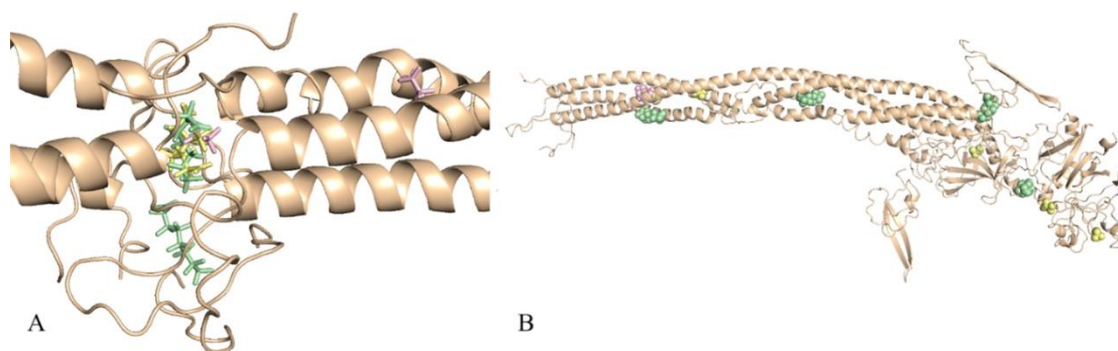


Slika 33. Prikazana je polovina modelovane strukture fibrinogena sa vezanim ligandima visoke energije vezivanja (TFA, PFBA i PFOA). Rezultati dobijeni fluorimetrijskim merenjem pokazuju korelaciju sa brojem tirozinskih (žuto) i triptofanskih ostataka (pink) u neposrednoj blizini liganada.

Pored ovih rezultata, važno je napomenuti da prikazana mesta vezivanja ne predstavljaju jedina moguća mesta interakcije između PFAS i fibrinogena. Dodatni rezultati o alternativnim mestima vezivanja prikazani su na **Slici 34** i u **Tabeli 7**. Kako nisu uočene značajne razlike u energijama vezivanja liganada na različitim mestima vezivanja (osim u slučaju PFOA koji se vezao za E region kristalne strukture), ukazala se potreba za dodatnim istraživanjem njihovog vezivanja za fibrinogen.

Tabela 7. Prikaz energija vezivanja PFAS predviđenih doking metodom, na obe strukture.

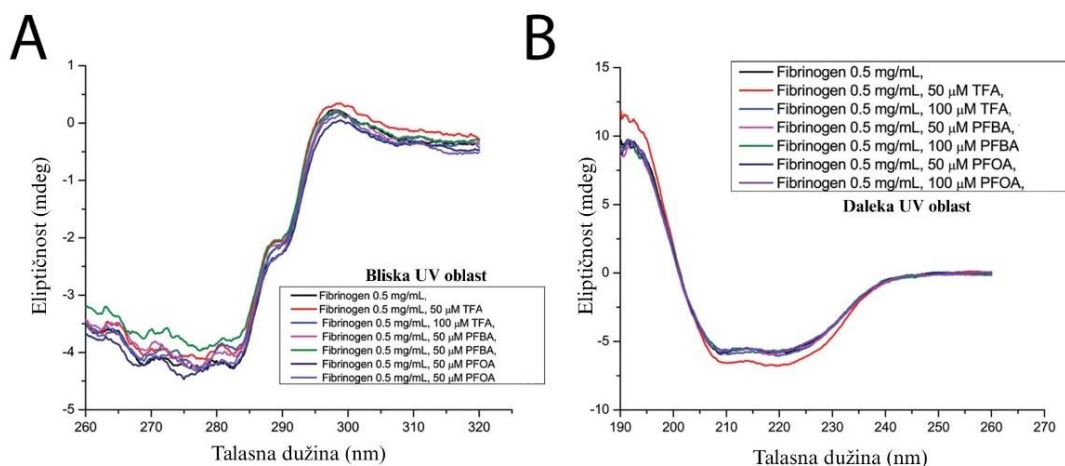
TFA	PFBA	PFOA
Vezivne energije predviđene molekulskim dokingom na E regionu (kcal/mol)		
-4,3	-6,5	-8,9
-4,1	-5,8	-6,9
-4,0	-5,8	-6,8
Vezivne energije predviđene dokingom na modelovanoj strukturi (kcal/mol)		
-4,7	-6,1	-8,6
-4,4	-5,6	-8,5
-4,4	-5,6	-7,8



Slika 34. (A) Dodatne pozicije visoke energije vezivanja PFAS u E regionu fibrinogena (TFA je označen žutom bojom, PFBA svetloružičastom, a PFOA svetlozelenom). (B) Dodatne pozicije visoke energije vezivanja PFAS u modelovanoj strukturi fibrinogena, sa istim oznakama boja za ligande koji su u prikazani kao grupacije malih sfera.

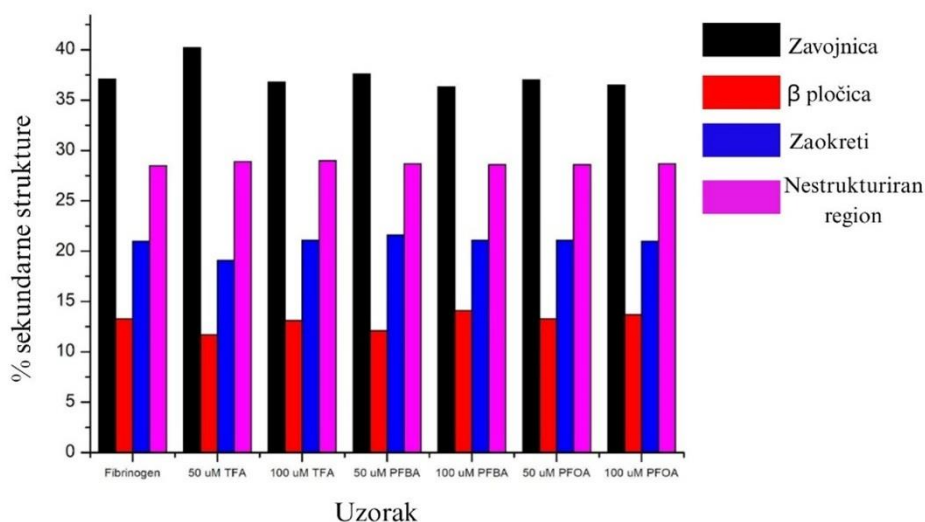
5.1.3. Uticaj vezanih liganada na strukturu fibrinogena

Nakon što je eksperimentalno i teorijski potvrđeno vezivanje PFAS za fibrinogen, bilo je neophodno ispitati njihov uticaj na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina. CD spektar snimljen u prisustvu sva tri liganda nije pokazao značajne promene ni u intenzitetu ni u obliku blisko-UV (near-UV) i daleko-UV (far-UV) spektra fibrinogena pri dve različite koncentracije PFAA (**Slika 35**).



Slika 35. Analiza sekundarne i tercijarne strukture fibrinogena u prisustvu dve različite koncentracije PFAS: A) CD spektri u bliskoj UV oblasti; B) CD spektri u dalekoj UV oblasti.

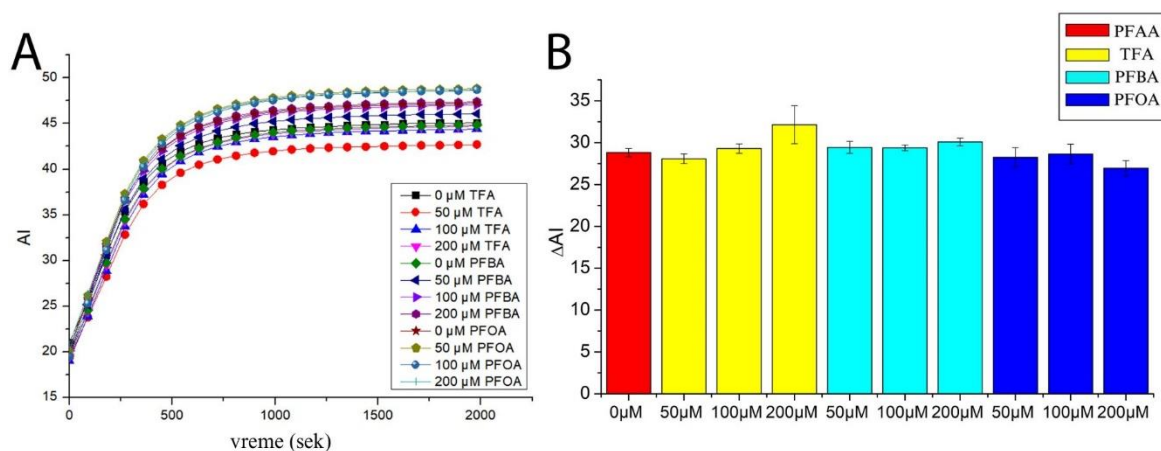
Kada je u pitanju sekundarna struktura proteina, procenat dominantnog strukturnog motiva fibrinogena, tj. α -heliksa, ostao je nepromenjen, kao i udeo manje zastupljenih β -pločica. Imajući u vidu da je fibrinogen veliki fibrilarni protein, ovakvi rezultati su očekivani, što je dodatno potvrđeno analizom izvršenom pomoću programa CD Pro (Slika 36). Analiza promena tercijarne strukture pokazuje da su varijacije u regijama koje odgovaraju triptofanu (Trp, 290–305 nm), tirozinu (Tyr, 275–282 nm) i fenilalaninu (Phe, 255–270 nm) minimalne, pri čemu su najizraženije promene uočene u tirozinskim i fenilalaninskim regijama. Ove promene ukazuju na delimično labavljenje tercijarne strukture u okruženju Tyr i Phe ostataka, što se ogleda u smanjenju eliptičnosti.



Slika 36. CD pro analiza sekundarne strukture fibrinogena u prisustvu liganada različitih koncentracija.

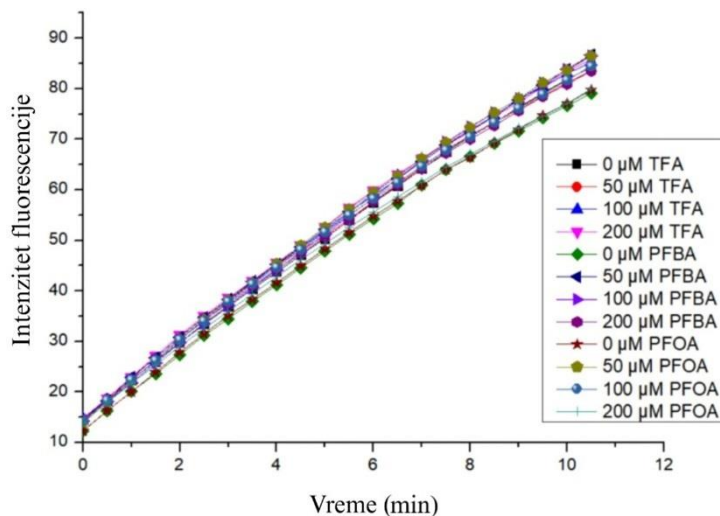
5.1.4. Uticaj vezanih liganada na funkciju formiranja krvnog ugruška

Fibrinogen je ključni protein u procesu koagulacije krvi, te je bilo neophodno ispitati njegovu funkcionalnost u prisustvu "većih hemikalija". Koeficijent agregacije (agregacioni indeks, AI) predstavlja važan parametar za procenu stabilnosti proteina i njegove sklonosti ka agregaciji [197]. Nakon iniciranja koagulacione reakcije, apsorbancija je praćena na talasnim dužinama od 350 nm i 280 nm, kako bi se u obzir uzele promene izazvane rasipanjem svetlosti. Agregacioni indeks izračunat je nakon 30 minuta kao odnos A_{350} i razlike u apsorbanciji na 280 i 350 nm, prikazano na Slici 37. U ovom eksperimentu nije uočena jasna zavisnost između prisustva PFAS i formiranja fibrinskih vlakana, odnosno njihove sposobnosti da utiču na formiranje krvnog ugruška.



Slika 37. Spektrofotometrijsko praćenje uticaja PFAS na fibrinogensku funkciju. A) Praćenje promene agregacionog indeksa (AI) fibrinogena u vremenu; B) Promena AI u prisustvu različitih koncentracija liganada.

Međutim, s obzirom na to da je trombin inicijator ove reakcije, bilo je neophodno dodatno ispitati da li PFAS utiču na njegovu aktivnost. I u ovom eksperimentu je pokazano da veće hemikalije nemaju uticaj na aktivnost trombina (**Slika 38**).



Slika 38. Praćenje uticaja različitih koncentracija PFAS na intenzitet fluorescencije, dobijen enzimskom aktivnošću trombina.

Iako naši rezultati pokazuju da PFAS ne ometaju direktno aktivnost trombina niti sposobnost fibrinogena da učestvuje u formiranju fibrinskih vlakana, to ne znači da su ove supstance bez rizika. Nakon što su uočene blage promene u strukturi fibrinogena nakon vezivanja PFAS i nakon što je potvrđeno vezivanje srednjeg afiniteta za fibrinogen, PFAS mogu značajno uticati na funkcionalnu dinamiku proteina, te možemo sugerisati uticaj na koagulaciju krvi.

Proces koagulacije krvi je složen proces koji podrazumeva primarnu i sekundarnu hemostazu, odnosno, stvaranje primarnog ugruška na mestu povrede od strane trombocita i čitavu kaskadu reakcija koje dovode do nastanka fibrinske mreže. Vezivanje PFAS za fibrinogen sa poluživotom od oko četiri dana može dugoročno promeniti njegove odnose sa drugim komponentama koagulationog sistema. Na taj način, prisustvo PFAS u organizmu može doprineti neželjenim efektima na formiranje krvnog ugruška, što potencijalno ugrožava normalan tok koagulacije. Pored toga, budući da su PFAS pokazali sposobnost integracije u membrane trombocita [214], postavlja se pitanje da li fibrinogen može poslužiti kao nosač koji omogućava direktan kontakt ovih štetnih supstanci sa trombocitima tokom procesa stvaranja ugruška, čime se dodatno povećava mogućnost toksičnih efekata. Osim toga, postavlja se pitanje razgradnje fibrinskog ugruška za koji su vezane perfluoralkil supstance. Poznato je da se fibrinski ugrušak razgrađuje plazminom, odnosno, plazminogenom koji da bi bio aktivan mora da se vezuje za dva mesta na fibrinu, α 148-160 i γ 312-324. Iz doking simulacije na modelovanoj strukturi proteina se može jasno videti da se PFAS vezuju baš u blizini tih regiona. S toga, još jedan dokaz u korist toga da PFAS potencijalno remete procese hemostaze i fibrinolize.

Posebno je značajno što smo pokazali da se i ultrakratkolančani i kratkolančani PFAS vezuju za fibrinogen, iako se o njima još uvek veoma malo zna kao o potencijalnim zdravstvenim rizicima, uprkos činjenici da oni nastaju kao produkti degradacije dugolančanih molekula. Sve to ukazuje da PFAS, uprkos odsustvu direktnog uticaja na određene funkcije fibrinogena i trombina, i dalje predstavljaju ozbiljnu pretnju po zdravlje i zahtevaju dalja istraživanja i pažljivo praćenje.

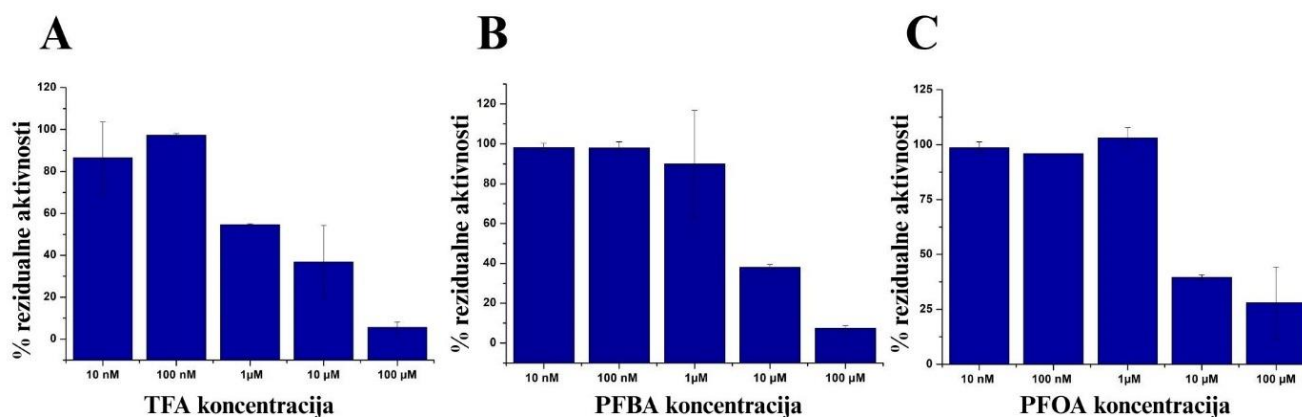
5.2. Uticaj PFAS na strukturu i funkciju α 2-makroglobulina

Kako bismo ispitali uticaj PFAS na ostale aspekte formiranja, odnosno, degradacije fibrina, odlučili smo da uzmemo u obzir i α 2-makroglobulin. Interakcija α 2-makroglobulina sa proteinazama pokazuje da ovaj inhibitor ne samo da inaktivira enzime, već deluje na njihovu supstratnu specifičnost [215]. Stoga α 2-makroglobulin i fibrinogen nisu izolovani elementi koagulationog sistema, već učestvuju u međusobno povezanoj mreži koja određuje stabilnost i razgradnju krvnog ugruška.

5.2.1. Antiproteazna aktivnost u prisustvu PFAS

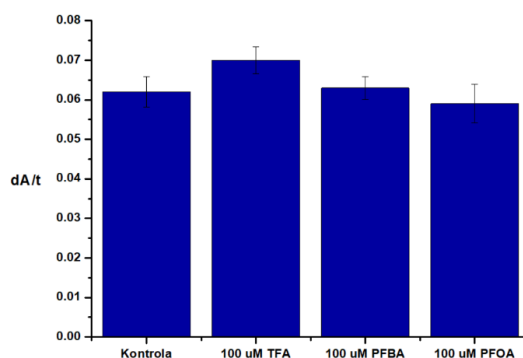
Antiproteazna aktivnost $\alpha 2M$ je određena spektrofotometrijskom analizom enzimske aktivnosti tripsina zarobljenog u $\alpha 2M$ „kavezu“. Za eksperimente je korišćena fiziološka koncentracija $\alpha 2M$ (3 μM), prethodno izolovanog i prečišćenog. Eksperiment se zasnivao na merenju aktivnosti tripsina u prisustvu $\alpha 2M$ i specifičnog inhibitora tripsina, pri čemu je dodat supstrat tripsina. U slučaju vezivanja tripsina za $\alpha 2M$, očekuje se da tripsin zadrži aktivnost i hidrolizuje supstrat, jer supstrat prolazi kroz „kavez“. Nasuprot tome, kada $\alpha 2M$ ne zarobi tripsin, inhibitor u potpunosti blokira enzimsku aktivnost i hidroliza supstrata se ne uočava. Na ovaj način je omogućeno poređenje sposobnosti $\alpha 2M$ da zarobi tripsin u prisustvu/odustvu različitih koncentracija PFAS.

Preliminarni rezultati *in vitro* ispitivanja pokazali da se pri nižoj koncentraciji TFA (10 μM) uočava pad rezidualne aktivnosti od oko 20 %, dok je na 100 μM došlo do snažnijeg suzbijanja aktivnosti. Za PFBA, aktivnost je opala za oko 40 % pri 10 μM , dok je pri 100 μM aktivnost skoro u potpunosti eliminisana, sa padom od oko 80 %. Sličan trend primećen je i kod PFOA, sa 40 % smanjenja aktivnosti na 10 μM i značajnim padom od 75 % pri 100 μM koncentraciji liganda, **Slika 39**. Iako je smanjenja aktivnosti uočena pri veoma visokim i nefiziološkim koncentracijama liganada, smatrali smo značajnim da dalje ispitamo mehanizme vezivanja. Dobijeni rezultati sugerisu da PFAS mogu snažno narušiti regulatornu ulogu $\alpha 2$ -makroglobulina, pre svega kroz smanjenje njegove sposobnosti da zarobi tripsin, čime se potencijalno ugrožava homeostaza.



Slika 39. Ispitivanje uticaja PFAS (TFA, PFBA, PFOA) na funkciju $\alpha 2$ -makroglobulina, Paneli A–C.

Takođe, ispitali smo potencijalni uticaj visoke koncentracije PFAS (100 μM), koja je u prethodnom ogledu pokazala izražen efekat, na samu aktivnost tripsina, kako bismo isključili mogućnost da se dobijeni rezultati odnose na direktno delovanje na enzim, a ne na antiproteaznu funkciju $\alpha 2$ -makroglobulina (**Slika 40**). Rezultati su pokazali da nije došlo do značajnog smanjenja enzimske aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak (35,55 IU/mL).

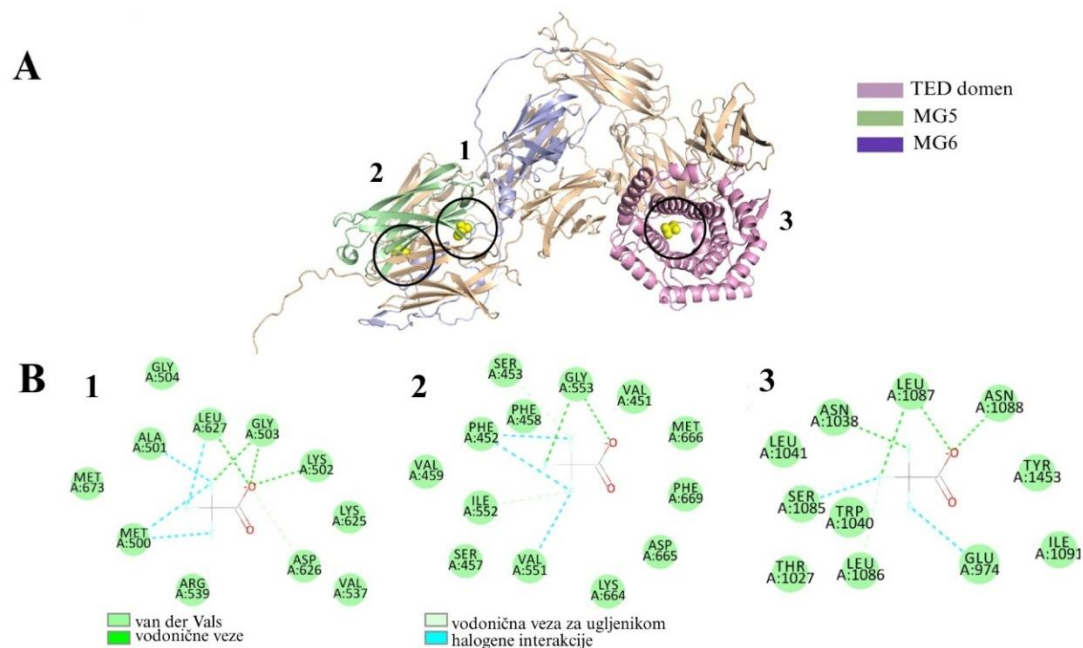


Slika 40. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti tripsina u prisustvu PFAS. Enzimska aktivnost izražena je kao promena absorbancije u jedinici vremena (dA/t) pri 405 nm. Prikazani su rezultati za kontrolni uzorak (bez PFAS) i u prisustvu TFA, PFBA i PFOA.

5.2.2. Predviđanje vezivnih mesta: doking proračun

S obzirom na to da dostupne kristalne strukture $\alpha 2M$ ne sadrže mamac region zbog njegove velike pokretljivosti i neuređenosti, za doking analizu izabrana su dva modela proteina: monomerni oblik dobijen putem AlphaFold predikcije i dimerni oblik baziran na kristalnoj strukturi, opisano u delu Materijal i metode 4.2.4. Doking proračun nije predvideo vezivanje TFA i PFBA za interfejs dimernog oblika proteina, ali jeste predvideo vezivanje sva tri liganda za monomerni oblik $\alpha 2M$. Interakcije između $\alpha 2M$ i liganada uglavnom su zasnovane na van der Valsovima silama i vodoničnim vezama, uključujući one sa atomima fluora.

Rezultati vezivanja TFA za monomerni $\alpha 2M$ su pokazale da postoje tri različita mesta vezivanja TFA, koje se razlikuju po lokaciji unutar tercijarne strukture (**Slika 41**).



Slika 41. Prikaz rezultata doking analize vezivanja TFA (označeno žuto) za monomer ljudskog $\alpha 2M$. A) Prikazane su moguće pozicije vezivanja (1, 2, 3) pomoću PyMOL programa; domeni proteina su označeni prema Garcia-Ferrer i saradnicima [216]; B) 2D dijagrami generisani Discovery Studio programom.

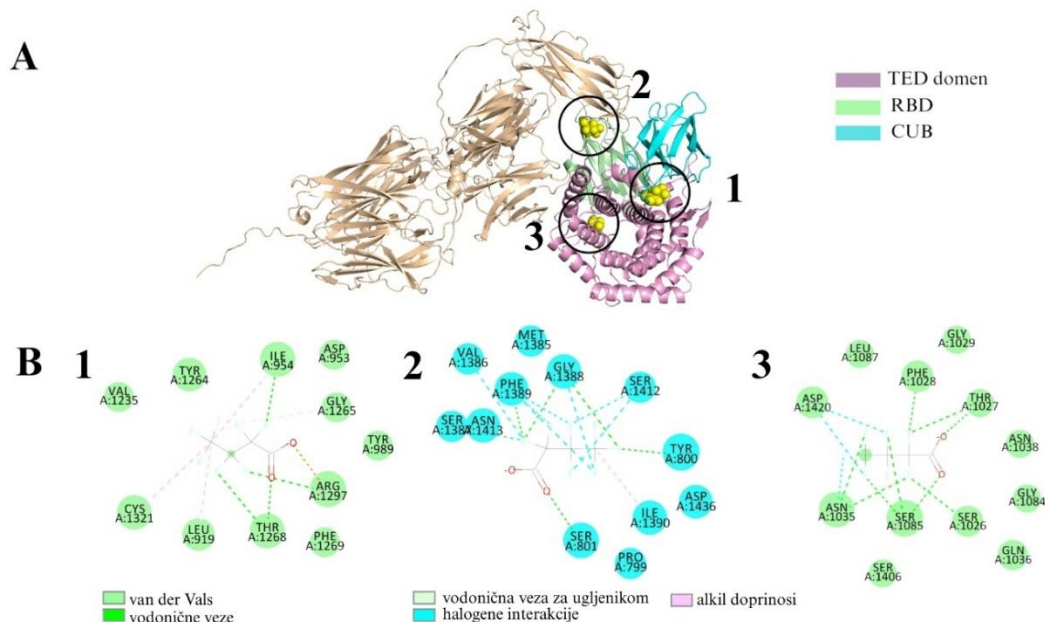
TFA je u tri različite vezivne pozicije ostvarila interakcije sa amino-kiselinama iz MG5, MG6 i TED domena monomera $\alpha 2M$, a energije vezivanja su prikazane u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Vrednosti energije vezivanja PFAS za $\alpha 2M$, predviđene molekulskim dokingom (kcal/mol).

TFA		PFBA		PFOA	
1	-4,7	1	-5,9	1	-8,0
2	-4,7	2	-5,8	2	-7,3
3	-4,6	3	-5,7	3 (dimer $\alpha 2M$)	-7,7

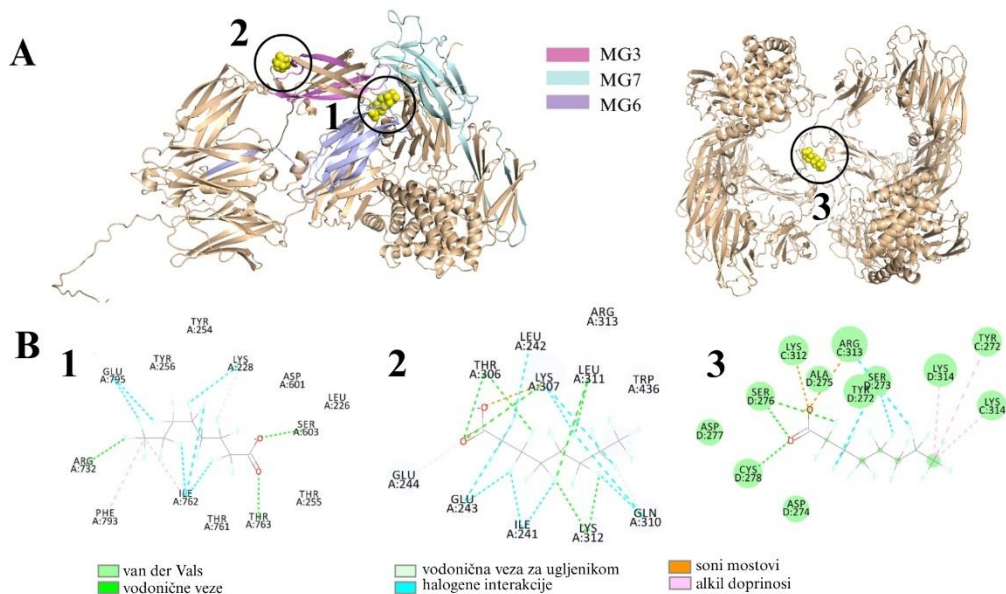
Slične vrednosti energije vezivanja ukazuju na to da protein poseduje više potencijalnih vezivnih mesta. TFA prema predikciji ostvaruje van der Valsove i vodonične interakcije putem svakog atoma fluora i atoma kiseonika sa različitim aminokiselinskim ostacima. Budući da se nekovalentne interakcije uspostavljaju i sa polarnim (npr. Lys502 i Gly503 iz MG5 domena, kao i Glu974 i Asn1088 iz TED domena) i sa nepolarnim amino-kiselinama (npr. Leu627 iz MG6, Met500 i Phe452 iz MG5, ili Leu1087 iz TED domena), ne može se zaključiti da TFA preferira određeni tip amino-kiselina. Ovakvi rezultati u skladu su sa hipotezom da mali molekul može da prolazi kroz različite strukturne regione proteina i da ostvari interakciju sa bar jednim atomom ciljanog makromolekula.

Za PFBA su u monomernom obliku $\alpha 2M$ uočene tri poze (Slika 42, Tabela 8). PFBA pokazuje afinitet prema CUB i RBD domenima, što ukazuje da dužina molekula nije dovoljna da prođe kroz TED domen, te je potencijalni uticaj PFBA na formiranje tiol-ester veze tokom reorganizacije molekula proteina zanemarljiv. PFBA može ostvariti vezivanje sa amino-kiselinskim ostacima putem atoma fluora iz svog lanca, kao i atoma kiseonika iz karboksilne grupe. Atomi kiseonika formiraju vodonične veze sa ostacima serina (Ser801 ili Ser1085), treonina (Thr1268 ili Thr1027) ili arginina (Arg1297). Interakcije ostalih atoma PFBA nisu pokazale jasno definisan obrazac.



Slika 42. Rezultati doking analize vezivanja PFBA za monomer ljudskog $\alpha 2M$. A) Prikaz predviđenih pozicija vezivanja (1–3) pomoću programa PyMOL; B) 2D dijagrami.

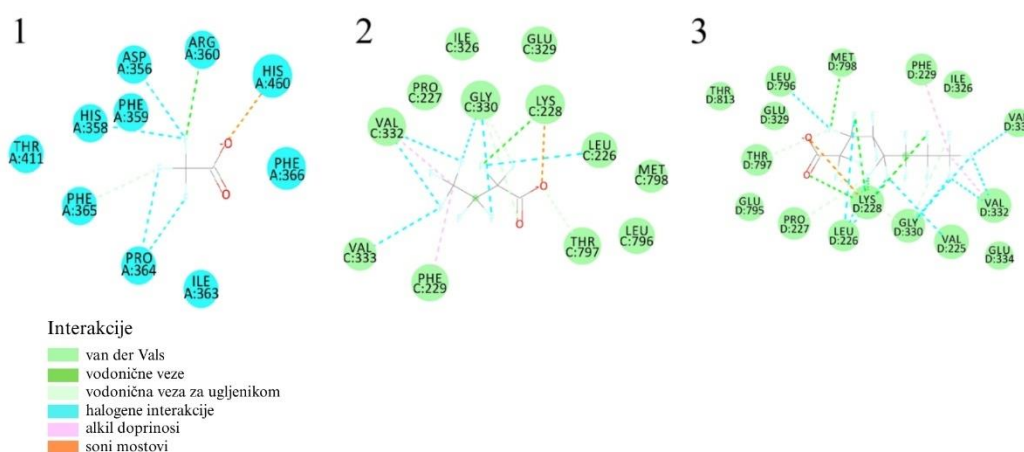
Doking analiza vezivanja PFOA za $\alpha 2M$ dala je najzanimljivije rezultate. Predviđeno je da se PFOA vezuje na interfejs između dve monomerne jedinice (lanci C i D), sa energijom vezivanja od -7,7 kcal/mol (pozicija 3 na Slici 43). Prethodne studije su pokazale da vezivanje PFOA na ovom mestu može uticati na proteinsku strukturu [217]. Vezivanje je uočeno u domenima MG3, MG4 i MG6. Takođe, identifikovani su i dodatni tipovi interakcija, uključujući alkil, π -alkil i sone mostove.



Slika 43. Prikaz rezultata doking analize vezivanja PFOA za monomerni (levo) i dimerni (desno) oblik $\alpha 2M$. A) Pymol prikaz pozicija vezivanja (1–3); B) Ostvarene interakcije između liganda i aminokiselinskih ostataka.

Dobijeni rezultati ukazuju na stabilno vezivanje PFOA za više domena $\alpha 2M$, što je u skladu sa njegovom molekulskom strukturom. Analiza interakcija pokazala je da se u svim identifikovanim vezivnim mestima javlja kombinacija vodoničnih veza, van der Valsovih interakcija i halogenih kontakata, što doprinosi stabilnosti kompleksa. U vezivnom mestu 1, dominantnu ulogu imaju vodonične veze sa ostacima Ser603, Thr762 i Glu795, uz prisustvo halogenih interakcija koje dodatno učvršćuju položaj liganda. Ovo mesto se karakteriše relativno visokim brojem konvencionalnih interakcija. U vezivnom mestu 2, posebno značajne su halogene interakcije sa ostacima Lys307 i Gln310, koje su udružene sa više vodoničnih veza. Ovakva kombinacija ukazuje da fluorovani rep PFOA može da ostvaruje specifične i stabilne kontakte sa proteinom, što je jedan od ključnih faktora za prepoznavanje i selektivno vezivanje PFAS. U vezivnom mestu 3, uočeni su soni mostovi sa ostatkom Lys312, kao i više vodoničnih veza sa Ser273, Asp274 i Asp277. Ovaj tip interakcija je poznat po svojoj izrazitoj stabilizaciji, pa se može pretpostaviti da je ovo mesto jedno od energetski najpovoljnijih za vezivanje. Pored toga, prisustvo alkil doprinosa (π -alkil i alkil interakcija) ukazuje na hidrofobni karakter ovog mesta, što dodatno podržava afinitet PFOA ka ovom regionu proteina.

Rezultati molekulskog dokinga pokazali su da se specifično vezivanje može ostvariti između sva tri PFAS različite dužine i humanog $\alpha 2M$. Dobijene energije vezivanja bile su niže od onih zabeleženih za antipsihotik klopazipin [206] i nutraceutik fikocijanobilin [217], ali više nego za pesticide [218]. Van der Valsove interakcije i vodonične veze bile su glavni tipovi interakcija odgovorne za interakciju između $\alpha 2M$ i liganada, a pokazano je i vezivanje za amino-kiselinske ostatke iz neuređenih regiona i β -pločica, dok je vezivanje za (ređe zastupljene) α -helikoidne regione proteina bilo manje izraženo. Slični rezultati ranije su dobijeni i za interakciju drugih liganada sa ovim funkcionalno pleotropnim proteinom [217]. S tim u vezi, ispitali smo još jedan aspekt vezivanja PFAS za $\alpha 2M$, protein koji sadrži jedinstvene peptide korišćene u kliničkoj proteomici (QGIPFFGQVR, FEVQVTVPK, itd. [218]). Rezultati pokazuju vezivanje svih liganada, pri čemu je za TFA predviđena energija vezivanja od $-4,3$ kcal/mol, za PFBA $-5,7$ kcal/mol, a za PFOA $-8,0$ kcal/mol (Slika 44). Uočeno je da se TFA vezuje za amino-kiseline (Pro364, Phe365) iz peptida QGIPFFGQVR, dok PFBA i PFOA ostvaruju interakcije sa Phe229 iz sekvence FEVQVTVPK.

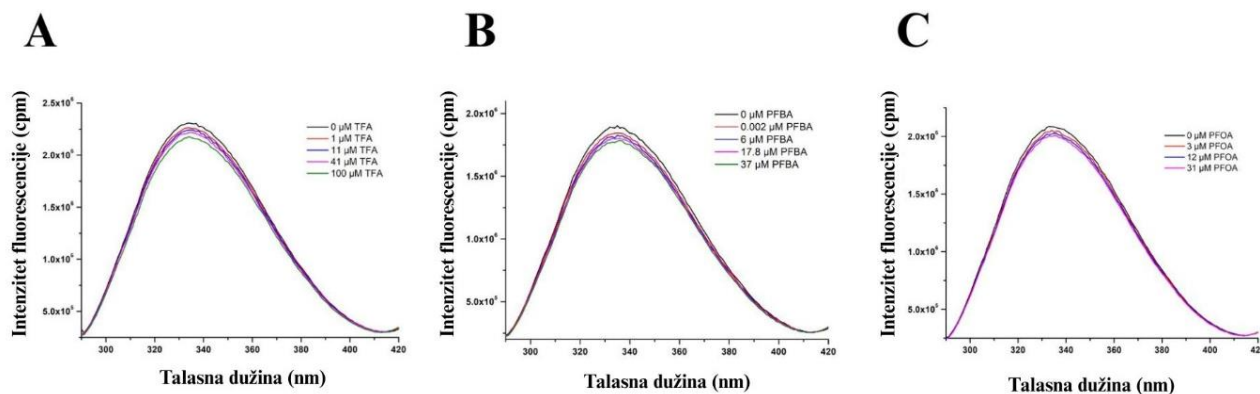


Slika 44. Vezivanje PFAS za aminokiselinske ostatke jedinstvenih peptida $\alpha 2M$. A) TFA; B) PFBA; C) PFOA.

Zaključujemo da se TFA, PFBA i PFOA mogu vezivati za aminokiselinske ostatke koji čine jedinstvene peptide $\alpha 2M$, a koji se inače koriste kao „signature“ peptidi u kliničkoj proteomici. Ovo vezivanje može imati višestruke posledice, kao što su sterno zaklanjanje mesta digestije, smanjenje efikasnosti enzimske hidrolize, promena izloženosti bočnih lanaca i uticaj na jonizacionu efikasnost tokom masene spektroskopije. Kao rezultat, prisustvo PFAS u biološkim uzorcima potencijalno može dovesti do smanjene pouzdanosti kvantifikacije $\alpha 2M$, pa čak i do netačnih procena njegove koncentracije. Ova zapažanja ukazuju na mogućnost da PFAS, pored toga što utiču na strukturu i funkciju proteina, dodatno remete i tačnost merenja biomarkera u kliničkim proteomskim analizama.

5.2.3. Konstante afiniteta

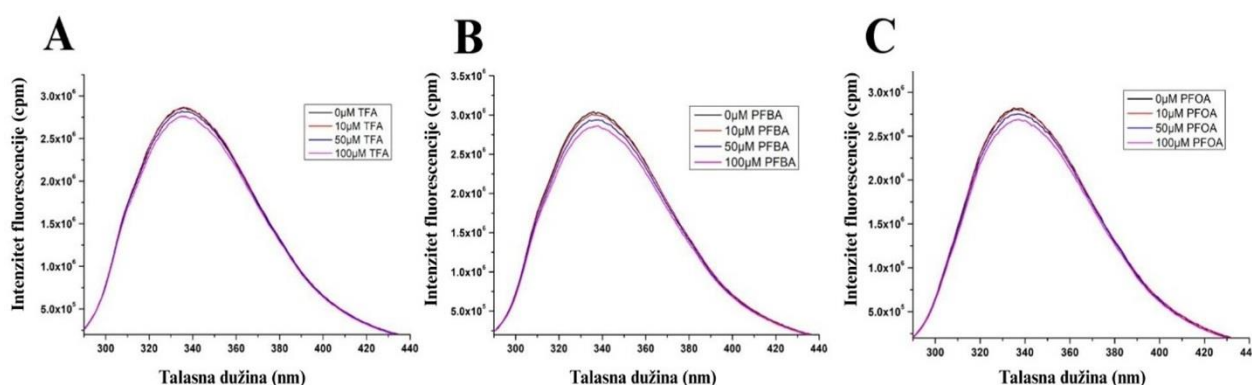
Teorijskim proračunima je uočeno da se ispitivane perfluoralkil supstance retko vezuju za ostatke aromatičnih amino-kiselina, koje su ključne za prenos fluorescentnog signala, što smo potvrdili fluorimetrijskim merenjem, **Slika 45**. Iako je fluorimetrijska analiza pružila ograničen uvid u potencijalnu interakciju PFAS sa $\alpha 2M$, važno je napomenuti da ovaj protein ne obiluje fluorescentnim aromatičnim amino-kiselinama, te se mogućnost detekcije malih promena u mikrosredini aromatskih ostataka pokazala ograničenom.



Slika 45. Praćenje promene unutrašnje fluorescencije proteina (3 μM) u prisustvu različitih koncentracija liganda. A) TFA; B) PFBA; C) PFOA.

Potom je za određivanje konstanti afiniteta primenjena MST metoda, budući da smo na primeru fibrinogena pokazali da ova metoda daje preciznije vrednosti konstanti afiniteta. Međutim, zbog velike molekulske mase $\alpha 2M$ proteina (720 kDa) ovom tehnikom nije bilo moguće detektovati vezivanje ovih malih liganada, te rezultati nisu prikazani.

Radi dodatne provere uticaja PFAS na tripsin, urađeno je praćenje promene unutrašnje fluorescencije proteina pri porastu koncentracija PFAS (10 μM -100 μM). Rezultati prikazani na **Slici 46** ukazuju da ligandi ne interaguju sa tripsinom, što potvrđuje pređašnja ispitivanja o nepromenjenoj enzimskoj aktivnosti u prisustvu liganada. Na graficima se može uočiti blago smanjenje fluorescencije što je posledica titracije, odnosno, razblaženja uzorka proteina.



Slika 46. Emisioni spektar tripsina (10 μM) titrovan različitim koncentracijama liganada, paneli A-C.

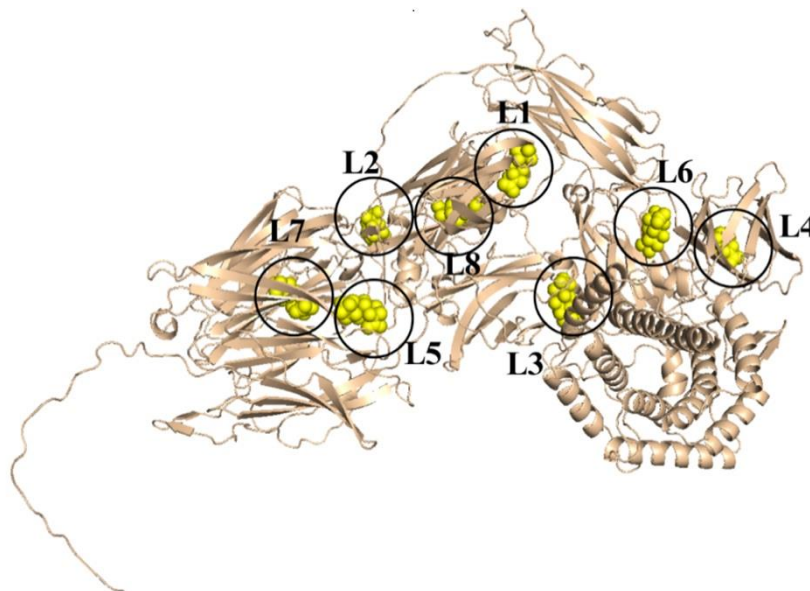
5.2.4. Molekulsko-dinamičke simulacije vezivanja PFOA za $\alpha 2M$

Budući da doking analiza nije pokazala vezivanje liganada u “bait” regionu, ključnom za antiproteaznu funkciju $\alpha 2M$, a istovremeno su eksperimentalni testovi ukazali na smanjenje antiproteazne sposobnosti proteina, sprovedene su molekulsko-dinamičke simulacije kako bi se dodatno razjasnila priroda ove interakcije. Za ovu analizu odabran je PFOA, budući da je pokazao najjači afinitet prema proteinu, kao i sposobnost da *in vitro* smanji antiproteaznu aktivnost $\alpha 2M$. Takođe, bio je jedini ligand koji se u doking analizi lokalizovao na interfejs dimernog oblika $\alpha 2M$.

Osam različitih doking poza, **Tabela 9** i **Slika 47**, iskorišćeno je za početne konfiguracije molekulsko-dinamičkih simulacija. Na osnovu pozicije vezivanja i predviđene energije interakcije nije bilo moguće isključiti nijednu od identifikovanih poza iz daljih analiza, budući da su vrednosti energija bile uporedive i nisu pokazale afinitet ka jednom specifičnom vezivnom mestu. Upravo iz tog razloga sve poze su dalje testirane tokom MD simulacija, kako bi se ispitala njihova stabilnost u dinamičkom kontekstu i procenilo da li određeni domeni $\alpha 2M$ favorizuju dugotrajnije i stabilnije vezivanje PFOA. Na ovaj način omogućeno je da se eventualne razlike, koje nisu bile vidljive na nivou doking proračuna, ispolje kroz duže vremenske skale i u prisustvu rastvarača.

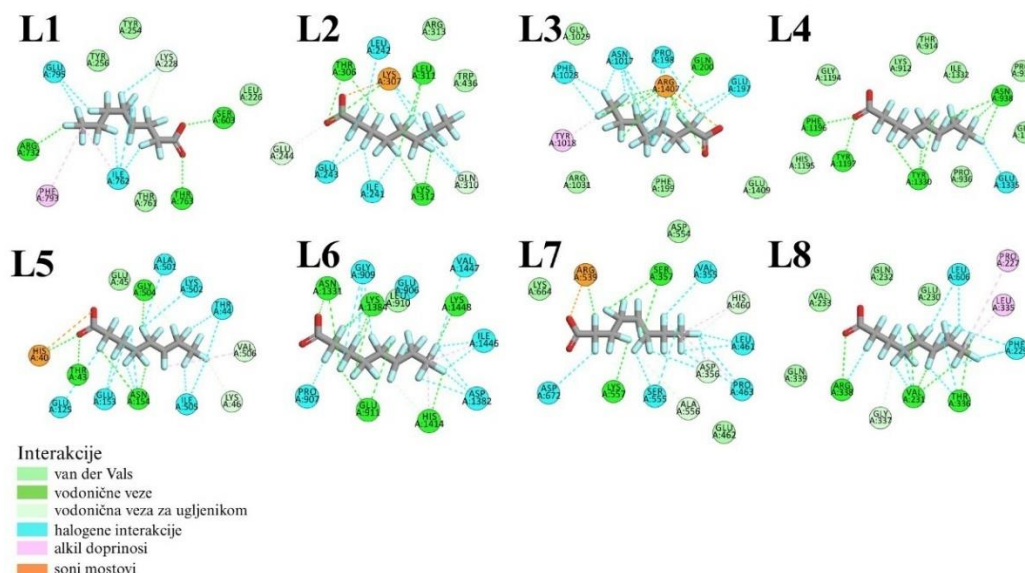
Tabela 9. Energije vezivanja PFOA za $\alpha 2M$ (AlfaFold) predviđene molekulskim dokingom.

Poza liganda	Energija vezivanja (kcal/mol)
L1	-8,0
L2	-7,3
L3	-7,2
L4	-7,2
L5	-7,1
L6	-7,0
L7	-7,0
L8	-6,7



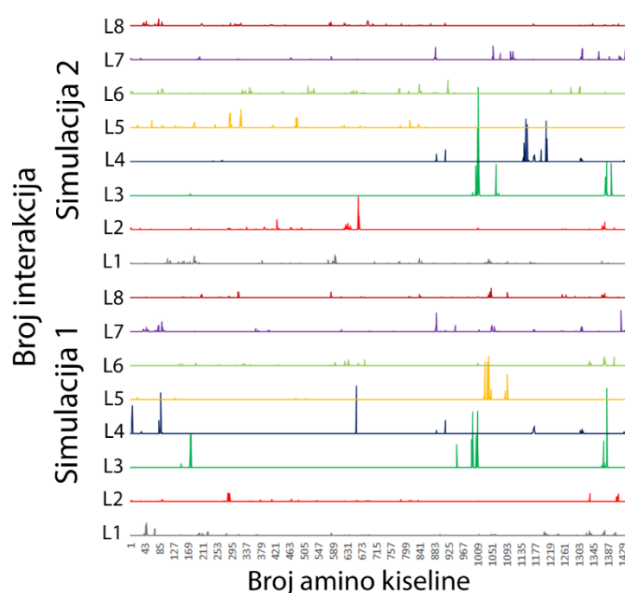
Slika 47. Prikaz osam liganada (L1–L8) vezanih za različite domene $\alpha 2M$ (AlfaFold proteina), identifikovanih doking analizom. Svi ligandi (žuto, sferni prikaz) izabrani su za dalje ispitivanje stabilnosti kompleksa korišćenjem MD.

Pomoću programa Discovery Studio, ispitan je tip ostvarenih interakcija između svih poza liganada (L1–L8) i proteina od interesa. Na **Slici 48** se uočava formiranje nekovalentnih interakcija, s posebnim akcentom na formiranje elektrostatičkih interakcija u vidu sonih mostova za pozicije liganada L2, L3, L5 i L7. Na osnovu pozicije vezivanja, uočeno je da je L3 vezan u blizini TED domena. Stabilizacija L3 obezbeđena je formiranjem vodoničnih veza sa Gln200, dok dodatnu stabilnost doprinosi formiranje jonske interakcije (sonog mosta) sa Arg1407. Pored toga, uočene su i van der Valsove interakcije sa Phe199, Glu1029, Arg1034, kao i halogene interakcije sa Glu197, Pro198, Asn1017 i Phe1028.



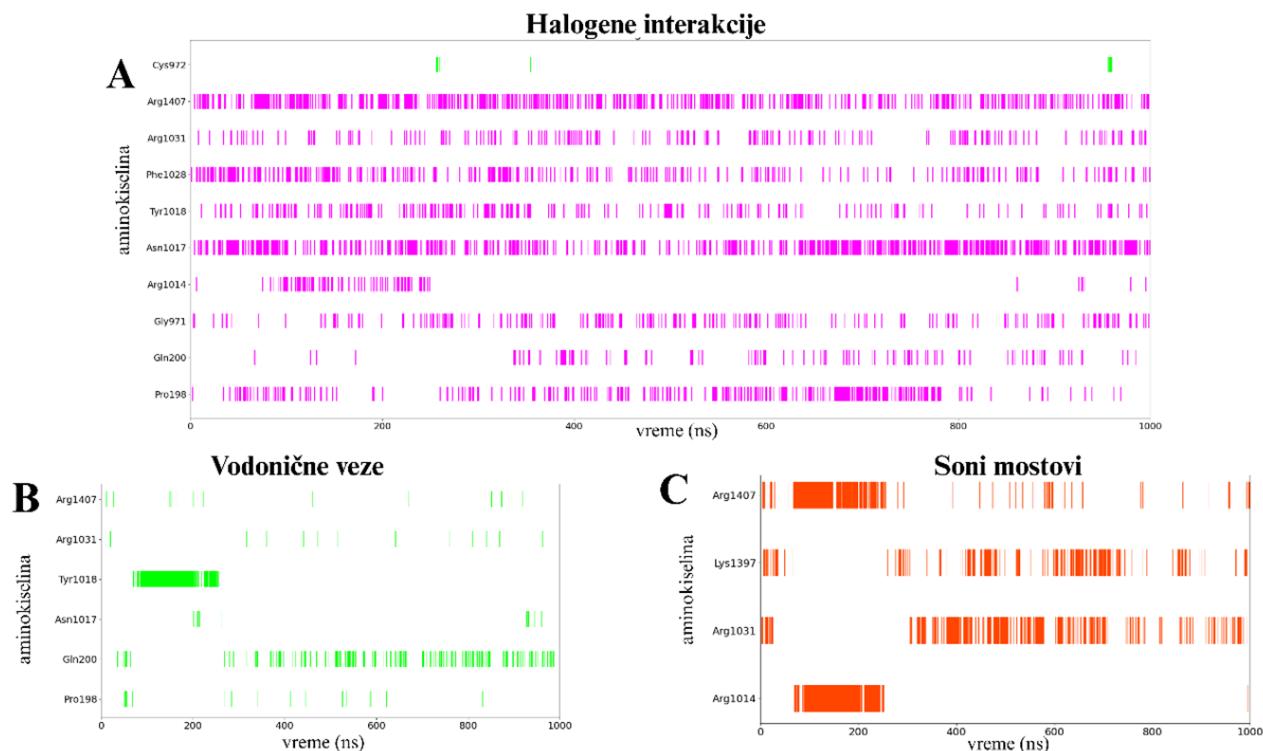
Slika 48. Mapa 2D interakcija osam udokovanih PFOA liganada (L1–L8) u okviru različitih vezivnih mesta na $\alpha 2M$ sa legendom. Svaki panel prikazuje aminokiselinne ostatke proteina koji učestvuju u stabilizaciji liganda putem različitih tipova nekovalentnih interakcija.

Nakon završetka MD simulacija u duplikatu, napravili smo mapu interakcija koja nam je služila za bolju procenu ostvarenih kontakata PFAS sa proteinom, **Slika 49**. Na osnovu učestalosti i intenziteta ponovljenih kontakata, kao i visine zabeleženih pikova, zajedno sa činjenicom da su isti rezultati dobijeni u dve nezavisne simulacije, može se zaključiti da poza L3 (prikazana zelenom bojom) ima najveći značaj u ovoj studiji.



Slika 49. Mapa interakcija za dve MD simulacije (simulacija 1, simulacija 2) u trajanju od 1 μs . Ligandi su prikazani na y-osi, a broj amino-kiseline sa kojima ligand interaguje se nalazi na x-osi.

Rezultati MD su potvrdili da ključni ostaci, Arg1407, Asn1017, Phe1028 i Tyr1018, ostvaruju stabilne i dugotrajne interakcije sa ligandom L3, **Slika 50**. Najizraženije su bile halogene interakcije i soni mostovi, dok su vodonične veze bile povremene i kraćeg trajanja, ali su doprinele dodatnoj stabilizaciji kompleksa. Upoređivanjem rezultata dokinga i dinamike može se zaključiti da se predviđeni kontakti zaista ostvaruju u realističnim uslovima simulacije, pri čemu halogeni i jonski doprinosi imaju presudnu ulogu u stabilizaciji vezivanja PFOA u L3 mestu, dok vodonične veze imaju sekundarnu, ali ne zanemarljivu ulogu.

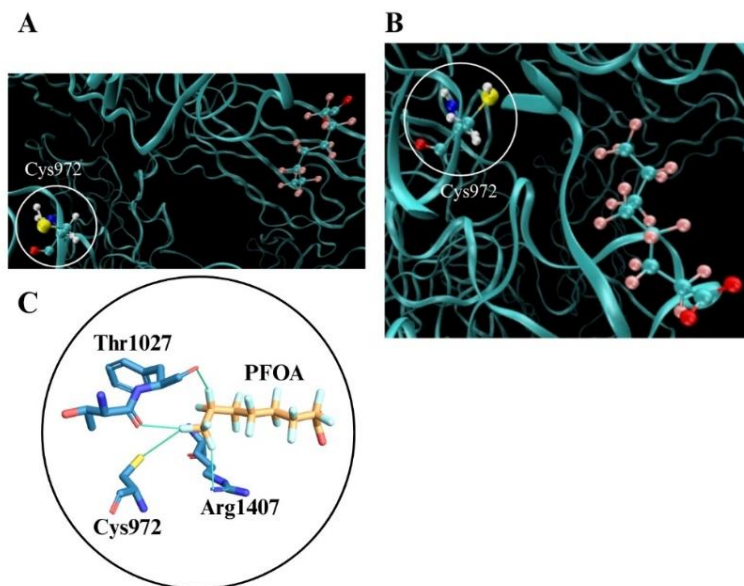


Slika 50. Dinamika interakcija liganda PFOA u vezivnom mestu L3 α 2M tokom 1000 ns MD simulacije. Prikazani su vremenski profili (trajanje i učestalost) različitih tipova nekovalentnih interakcija: A) halogene interakcije; B) vodonične veze; C) soni mostovi. Na y-osi su označeni aminokiselinski ostaci proteina koji ostvaruju kontakte sa ligandom, dok je na x-osi vreme simulacije izraženo u nanosekundama.

U malom procentu simulacije (u periodu između 200 i 400 ns) dolazi do direktne interakcije između PFOA (L3) i ostatka Cys972, koji zajedno sa Gln975 formira visoko reaktivnu tiol-estarsku vezu odgovornu za kovalentno hvatanje proteinaza, pokazano na Slici 50A. Vezivanje PFOA u ovoj oblasti TED domena moglo bi da dovede do sterne blokade pristupa proteinazama, kompeticije za interakciju sa reaktivnim grupama ili destabilizacije konformacionih promena koje su neophodne za pravilno zatvaranje α 2M „kaveza“. Na taj način, prisustvo PFOA može dovesti u pitanje efikasnost α 2M u antiproteaznoj zaštiti od širokog spektra proteolitičkih enzima.

Iako je učestalost ovakvog događaja u našim simulacijama bila mala, on sugerise postojanje potencijalnog puta kroz koji PFAS mogu ometati zaštitnu ulogu α 2M.

Na **Slici 51** prikazan je momenat tokom MD simulacije kada PFOA dolazi u neposrednu blizinu ostatka Cys972, nakon čega se postepeno orijentiše hidrofobnim repom prema njemu. U ovoj orijentaciji ligand ostvaruje dodatne interakcije sa Thr1027 i Arg1407, i to putem atoma fluora smeštenih u hidrofobnom repu PFOA.



Slika 51. Interakcija L3 sa $\alpha 2M$ u sa Cys972. A) Na početku simulacije, PFOA se nalazi u neposrednoj blizini Cys972 (zaokruženo i obeleženo; žuta sfera predstavlja atom sumpora), ali bočni lanac cisteina nije orijentisan ka ligandu; B) Tokom simulacije, Cys972 rotira ka PFOA; C) Mapa 2D interakcija.

Zajedničko razmatranje eksperimentalnih i teorijskih rezultata ukazuje na verovatnu funkcionalnu interakciju PFOA sa $\alpha 2M$, potencijalno u regiji od ključnog značaja za njegovu antiproteaznu funkciju. Ovakav zaključak podržavaju i preliminarni rezultati antiproteazne aktivnosti, u kojima je uočeno smanjenje sposobnosti $\alpha 2M$ da zarobi tripsin u prisustvu PFOA, kao i teorijska ispitivanja koja ukazuju da se molekul PFOA pozicionira u blizini Cys972, važnog amino-kiselinskog ostatka za antiproteazni mehanizam. Iako nismo pokazali vezivanje u blizini regiona mamca, ova zapažanja zajedno sugerišu da PFOA može remetiti interakcije $\alpha 2M$ sa proteinazama. Dodatna ispitivanja, uključujući masenu spektrometriju, ili eksperimente sa fluorescentno obeleženim ligandima, bila bi od velikog značaja za preciznije razjašnjenje ovog mehanizma.

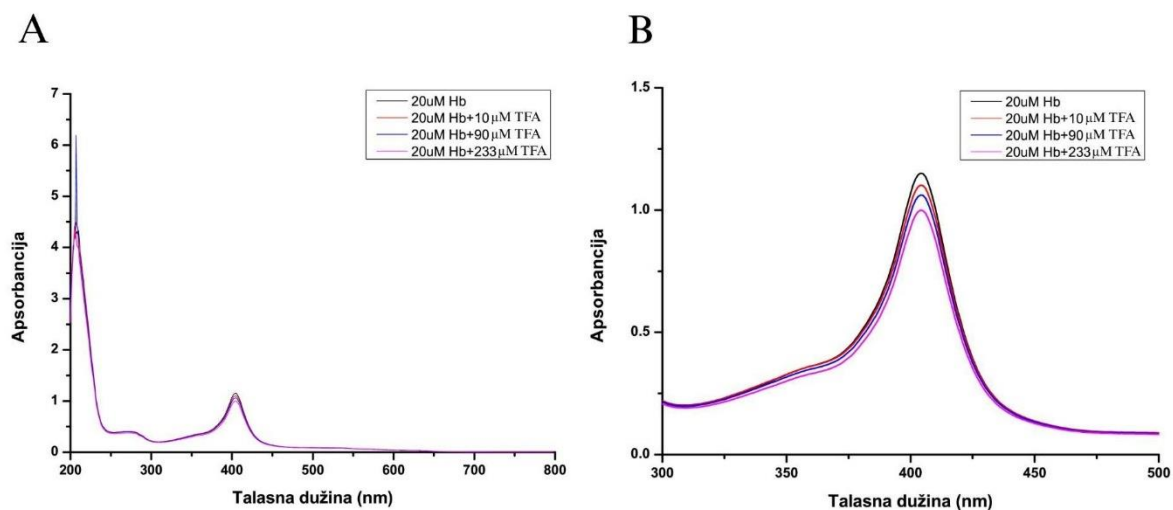
5.3. Uticaj PFAS na strukturu hemoglobina

Hemoglobin, centralni protein u transportu kiseonika, predstavlja ključnu komponentu krvotoka čija funkcionalnost zavisi od njegove tetramerne strukture i kooperativnog vezivanja liganada. PFAS zbog svoje izuzetne hemijske stabilnosti i prisustva u krvotoku, imaju potencijal da interaguju sa hemoglobinom i na taj način utiču na transport kiseonika ili stabilnost proteina. U ovom poglavlju biće prikazani eksperimentalni rezultati, ali i rezultati dokinga i molekulske dinamike, sa fokusom na identifikaciju potencijalnih vezivnih mesta PFAS i energetske stabilnost kompleksa.

5.3.1. Soretova traka hemoglobina

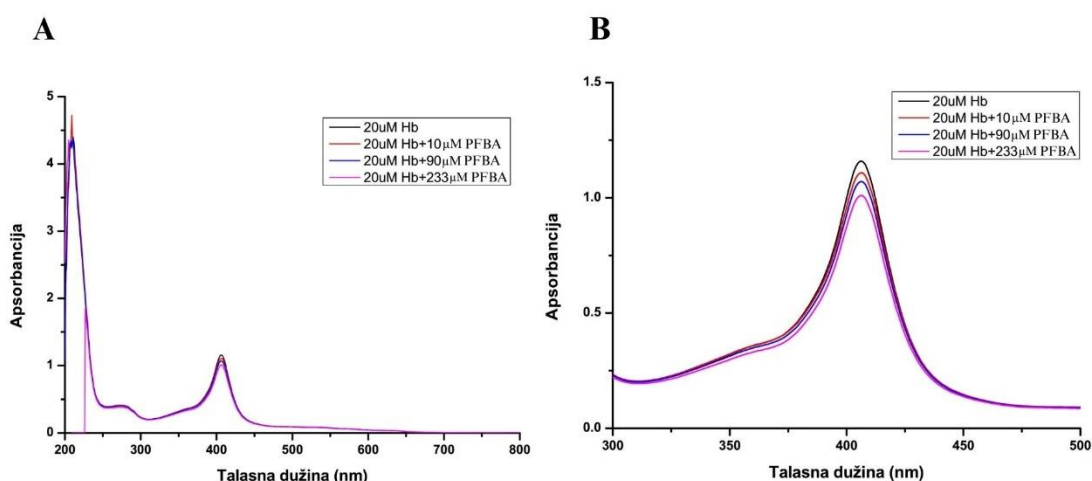
Ispitivan je uticaj PFAS na strukturu hemoglobina, sa fokusom na eventualne promene u porfirinskom delu proteina, koji se manifestuju kao promena apsorpcije u oblasti Soretove trake. Uprkos prethodnim izveštajima u literaturi koji ukazuju na značajne spektroskopske promene usled interakcije hemoglobina sa različitim ligandima, u našem eksperimentu nisu zabeležene tako izražene promene u intenzitetu niti poziciji Soretove trake, nakon inkubacije sa ispitivanim PFAS [120].

Dobijene srednje vrednosti tripplikata UV–Vis spektara hemoglobina pokazuju karakteristične apsorpcione maksimume u UV oblasti i izraženu Soretovu traku na oko 406 nm, što je u skladu sa poznatim spektralnim osobinama hemoproteina. Prisustvo TFA dovodi do postepenog smanjenja intenziteta Soretove trake (za oko 12 %) proporcionalno povećanju koncentracije liganda. Ovakav trend ukazuje na to da vezivanje TFA potencijalno utiče na mikrokruženje porfirinskog prstena i hema, koje bi moglo izazvati promene u interakcijama između gvožđa i okolnih aminokiselinskih ostataka. Blago smanjenje apsorpcije bez značajnog pomeranja maksimuma sugerise da TFA ne izaziva drastične konformacione promene u globalnoj strukturi hemoglobina, **Slika 52**.



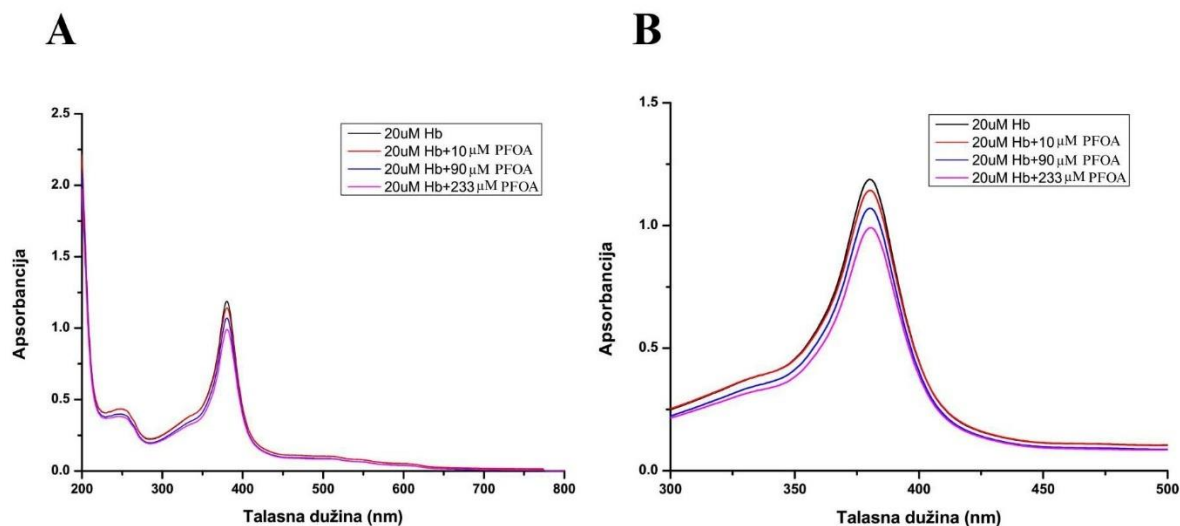
Slika 52. UV–Vis apsorpcioni spektri hemoglobina (Hb) u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija TFA. A) Spektri u širokom opsegu talasnih dužina (200–800 nm) za 20 μM Hb bez dodatka TFA (crna linija), sa 10 μM TFA (crvena linija), 90 μM TFA (plava linija) i 233 μM TFA (ljubičasta linija); B) Uvećan prikaz Soretove trake (max 406 nm) gde se uočava blago smanjenje intenziteta apsorpcije sa porastom koncentracije TFA.

U slučaju ispitivanja uticaja PFBA na Soretovu traku hemoglobina, najizraženija promena zabeležena je pri najvišoj testiranoj koncentraciji (233 μM PFBA), gde je apsorpcija smanjena za 13 % u odnosu na kontrolni uzorak (Hb bez PFBA), **Slika 53**. Ova promena se ne može smatrati velikom da bi tvrdili da ima uticaja na mikrokruženje porfirinskog prstena, ili je interakcija nedovoljno jaka da bi se reflektovala kroz UV-Vis spektar.



Slika 53. UV–Vis apsorpcioni spektri hemoglobina (Hb) u odsustvu i prisustvu rastućih koncentracija PFBA. A) Spektri u opsegu 200–800 nm; B) Uvećan prikaz Soretove trake pokazuje blago smanjenje intenziteta apsorpcionog maksimuma sa porastom koncentracije PFBA.

Najveća promena apsorbancije među testiranim ligandima, zabeležena je u eksperimentu titrovanja Hb sa PFOA, pri koncentraciji 233 μM PFOA, gde je apsorbancija smanjena za 17 % u odnosu na kontrolni uzorak bez liganda, **Slika 54**. Za razliku od TFA i PFBA, efekti PFOA su izraženiji, što se može povezati sa većom hidrofobnošću i dužim perfluorovanim repom, koji olakšava stabilnije vezivanje. Ovi rezultati sugerišu da PFOA ima jači afinitet prema hemoglobinu u poređenju sa kratkolančanim i ultrakratkolančanim predstavnicima.

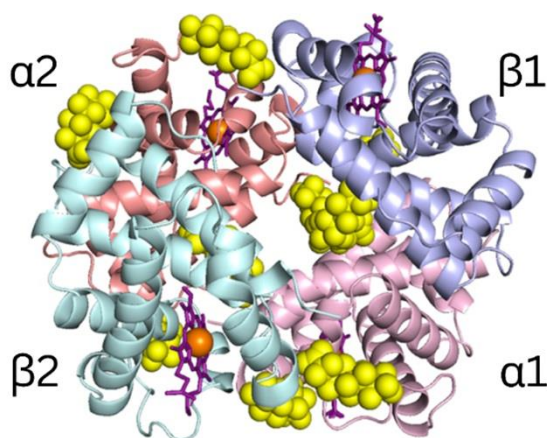


Slika 54. UV–Vis spektri hemoglobina u odsustvu i prisustvu tri koncentracije PFOA. A) Spektri u opsegu 200–800 nm sa legendom; B) Uvećan prikaz Soretove trake (λ_{max} 406 nm).

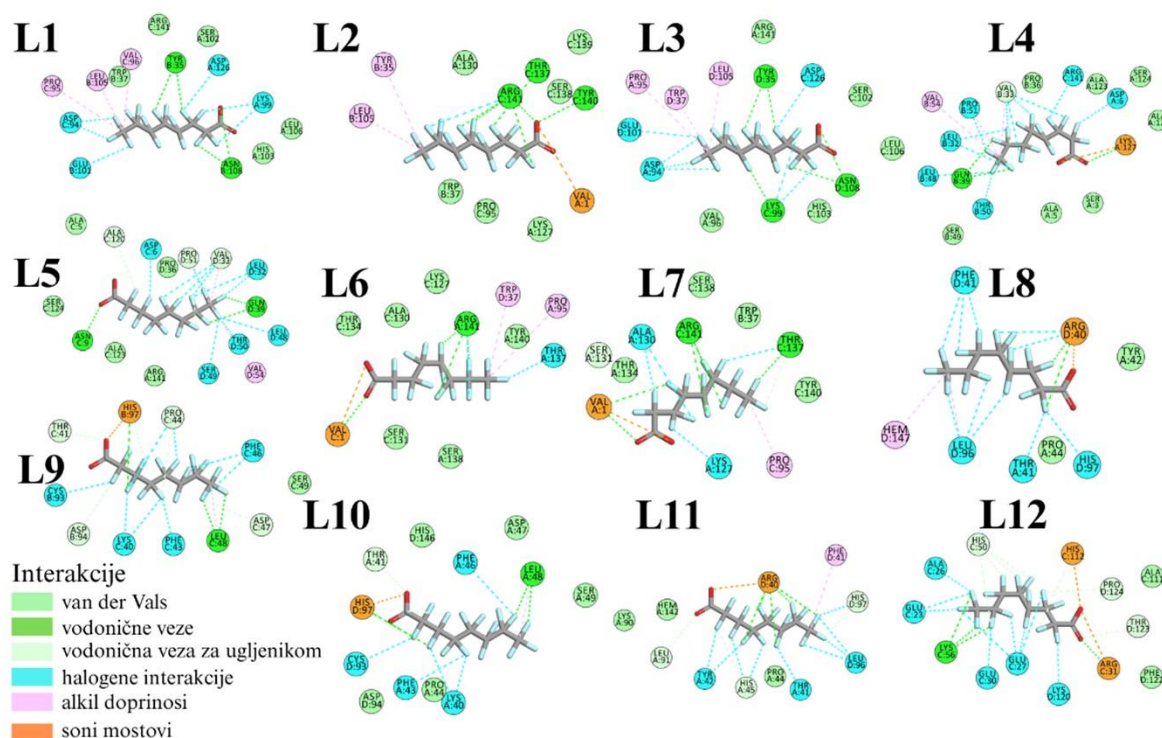
5.3.2. Predviđanje vezivnih mesta-molekulski doking

Kako bi se ispitao potencijal vezivanja PFOA za humani hemoglobin, sprovedena je molekulska doking analiza korišćenjem kristalne strukture hemoglobina (PDB kod: 2DN2).

Na **Slici 55** prikazan je 3D prikaz hemoglobina sa 12 najbolje rangiranih poza vezivanja PFOA, dok je na **Slici 56** prikazan 2D dijagram svih poza.



Slika 55. Strukturni prikaz humanog hemoglobina (PDB kod: 2DN2) u kompleksu sa 12 najbolje dokovanih liganada PFOA, koji su prikazani kao žute sfere. Protein je prikazan u obliku "cartoon" modela, sa obeleženim subjedinicama. Gvožđe vezano za hem prikazano je kao narandžasta sfera, dok je porfirinski prsten predstavljen ljubičastim štapićima. Slika je napravljena u programu PyMOL.



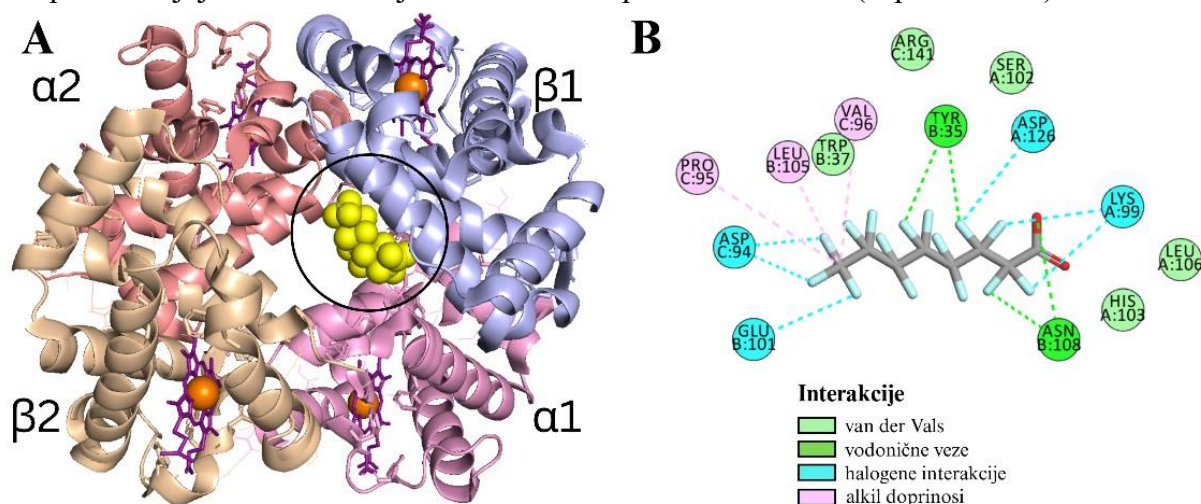
Slika 56. 2D dijagrami najbolje udokovanih poza (L1–L12) sa legendom.

U **Tabeli 10** su prikazane energije vezivanja (kcal/mol) predviđene doking metodom za najboljih deset pozicija. Rezultati dokinga pokazali su da se PFOA ne vezuje specifično za jedno mesto, već da zauzima više različitih regija na molekulu hemoglobina, uključujući prostore u blizini hem grupa, interfejs između α - i β -subjedinica, kao i površinske džepove proteina. Ovakva raspodela ukazuje na to da je vezivanje PFOA više difuznog karaktera, gde ligand ostvaruje interakcije sa celim proteinom, a ne jedno dominantno visokospecifično vezivno mesto. To implicira da PFOA može ostvarivati širok spektar interakcija sa hemoglobinom, što potencijalno može imati uticaj na stabilnost tetramera i dinamiku njegovih funkcionalnih prelaza.

Tabela 10. Prikaz previđenih vezivnih enregija (kcal/mol) za dvanaest najbolje udokovanih PFOA u humani hemoglobin (PDB kod:2DN2).

Pozicija liganda	Vezivne energije (kcal/mol)
L1	-7,3
L2	-7,2
L3	-7,1
L4	-7,1
L5	-7,0
L6	-6,8
L7	-6,8
L8	-6,7
L9	-6,7
L10	-6,5
L11	-6,5
L12	-6,3

Najbolje rangirana poza pokazala je energiju vezivanja od $-7,3$ kcal/mol (L1), što ukazuje na povoljnu interakciju i dobro se uklapa u opseg vrednosti za vezivanje PFAS za druge hemoproteine. L1 ostvaruje interakcije sa aminokiselinskim ostacima iz tri različite subjedinice hemoglobina: $\alpha 1$, $\beta 1$ i $\alpha 2$ (Slika 57), odnosno, sa ostacima koji čine interfejs između $\alpha 2$ i $\beta 1$ subjedinice. Analizom interakcija identifikovane su vodonične veze između PFOA i $\beta 1$ lanca hemoglobina, pre svega sa Asn108, koji ostvaruje vezu sa karboksilnom grupom liganda, i sa Tyr35, koji stupa u interakciju sa repom molekula. Alkil doprinos je uočen između Leu105 ($\beta 1$) i Pro95 i Val96 ($\alpha 2$), dok su halogene interakcije detektovane između fluorovanog lanca PFOA i ostataka iz sve tri subjedinice Lys99 i Asp126 ($\alpha 1$), Glu101 ($\beta 1$) i Asp94 ($\alpha 2$). PFOA (L1) se vezuje za protein putem nekovalentnih interakcija, što je u skladu sa rezultatima rada Yang i sar. [219], koji su pokazali da PFOS ostvaruje interakcije sa goveđim hemoglobinom pretežno preko hidrofobnog repa, bez značajnog učešća hidrofilne grupe. Ovo dodatno potvrđuje da perfluorovani lanci mogu stabilno da se vežu za proteinsku strukturu nezavisno od direktnog angažovanja polarne glave. Posebno je značajno što PFOA ostvaruje interakcije sa Trp37 ($\beta 2$) i Pro95 ($\alpha 1$) dvema amino-kiselinama koje su poznate po međusobnoj interakciji i ključnoj ulozi u stabilizaciji hemoglobinskog tetramera, kako je već opisano u literaturi [220]. Prisustvo PFOA u ovoj regiji sugerise da bi njegovo vezivanje moglo narušiti ovu važnu vezu, potencijalno utičući na strukturni integritet tetramera. Važno je napomenuti da ovo nije jedina poza u kojoj PFOA ostvaruje kontakt sa oba pomenuta ostatka (Trp37 i Pro95).

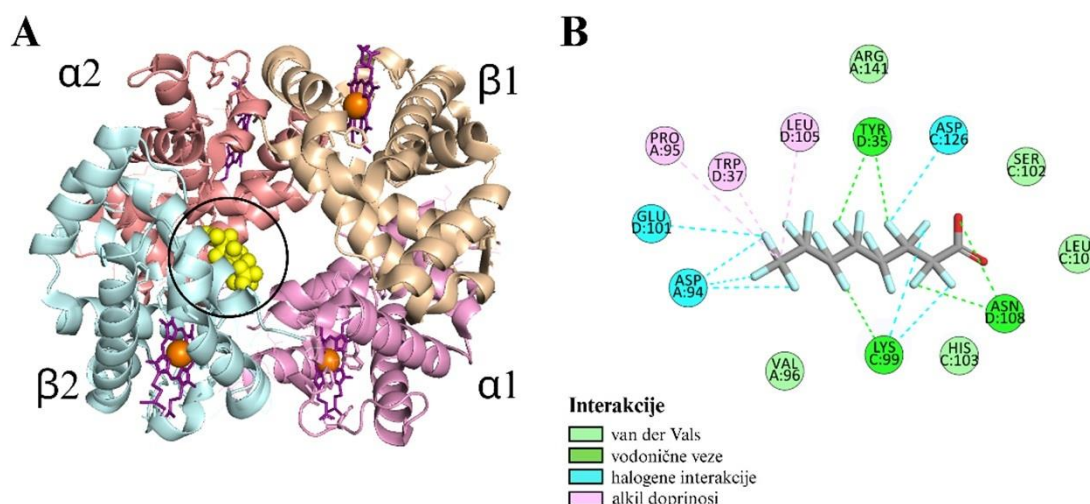


Slika 57. Prikaz liganda najniže energije (L1) koji je vezan za Hb. A) Mesto vezivanja PFOA sa najvišim afinitetom (prikazano kao žuta sfera) na humanom hemoglobinu, generisano u Pymol-u; B) 2D dijagram interakcija koji prikazuje ključne kontakte između PFOA i aminokiselinskih ostataka u mestu vezivanja, generisan u programu Discovery Studio.

Kako je ljudski Hb sastavljen od četiri subjedinice raspoređene kao $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$, njegova kvaternarna struktura se stabilizuje mrežom nekovalentnih elektrostatnih interakcija. Interfejs $\alpha 1\beta 1$ (i $\alpha 2\beta 2$) je posebno stabilan i uključuje oko 34 aminokiselinska ostatka, dok klizni interfejs $\alpha 1\beta 2$ (ili $\alpha 2\beta 1$) obuhvata samo 19 ostataka, što ga čini strukturno slabijim i podložnijim narušavanju.

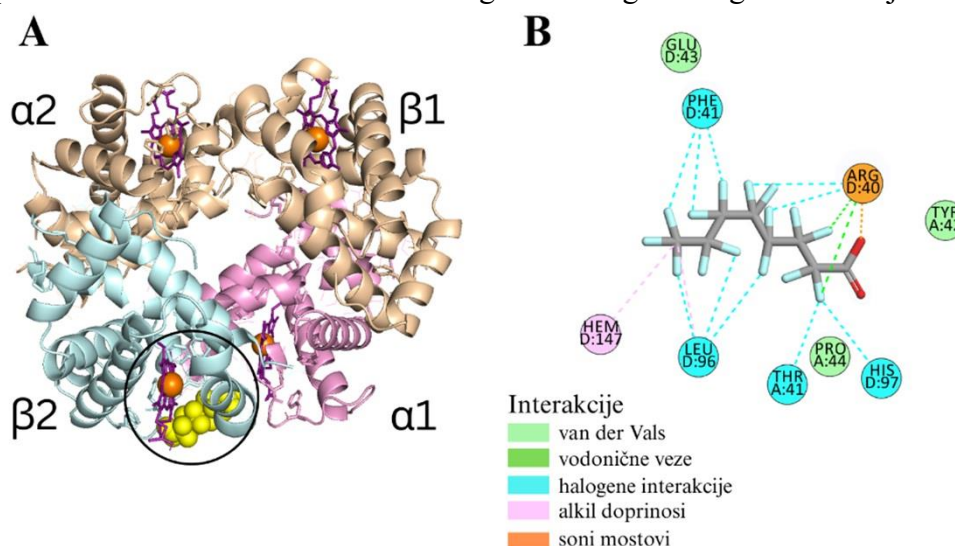
Daljom analizom vezivnih položaja sa najnižim energijama vezivanja, identifikovan je položaj sa energijom vezivanja $-7,1$ kcal/mol (L3), lociran u $\alpha 1\beta 2$ interfejsu. Ovaj položaj uključuje

iste amino-kiselinske ostatke kao i prethodno opisani. Drugim rečima, ukoliko bi se povukla osa simetrije duž $\alpha1\alpha2$ subjedinica, ova dva vezivna mesta bila bi strukturno ekvivalentna, **Slika 58**.



Slika 58. Prikaz pozicije L3 koji je vezan za Hb. A) Vezivno mesto L3 (žuta sfera, zaokruženo crnim obručem) na Hb, generisano u Pymol-u; B) 2D dijagram interakcija koji prikazuje ključne kontakte između PFOA i aminokiselinskih ostataka.

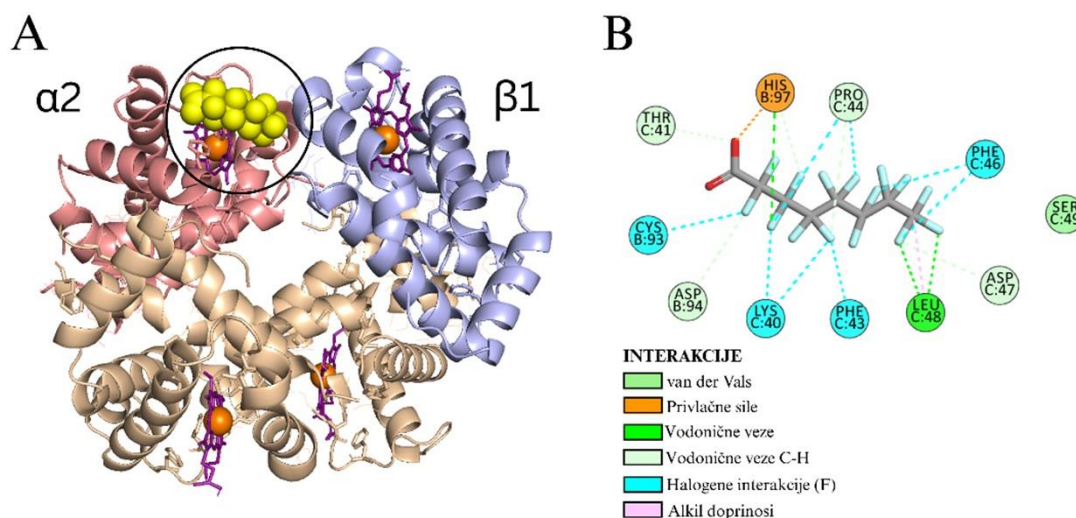
Pored pomenutih poza viših energija vezivanja, treba prodiskutovati jednu koja ima energiju vezivanja $-6,7$ kcal/mol (L8), **Slika 59**. U prikazanoj analizi interakcija uočava se da se PFOA pozicionira u neposrednoj blizini hem grupe hemoglobina, pri čemu ostvaruje čitav niz stabilizujućih veza sa aminokiselinskim ostacima iz tog regiona. Ključna interakcija jeste soni most sa Arg40, koji značajno doprinosi vezivanju liganda u ovoj regiji. Pored toga, formira se vodonična veza sa Thr41, dok su dodatnu stabilnost obezbedili halogeni kontakti fluorovanog repa PFOA sa Phe41, Leu96, Pro44 i His97. Značajno je i prisustvo interakcije sa hem grupom (Hem:147), što ukazuje da PFOA može da se pozicionira veoma blizu funkcionalnog centra odgovornog za vezivanje kiseonika.



Slika 59. Prikaz PFOA (žute sfere, u obručem) u poziciji L8 Hb. (A) Strukturni prikaz tetramera hemoglobina (subjedinice $\alpha1$, $\alpha2$, $\beta1$ i $\beta2$ prikazane su različitim bojama), sa PFOA vezanim u blizini hem grupe na $\alpha1\beta2$ interfejsu. (B) Dvodimenzionalna mapa interakcija liganda i ostataka proteina prikazuje stabilizujuće kontakte između PFOA i okolnih aminokiselinskih ostataka.

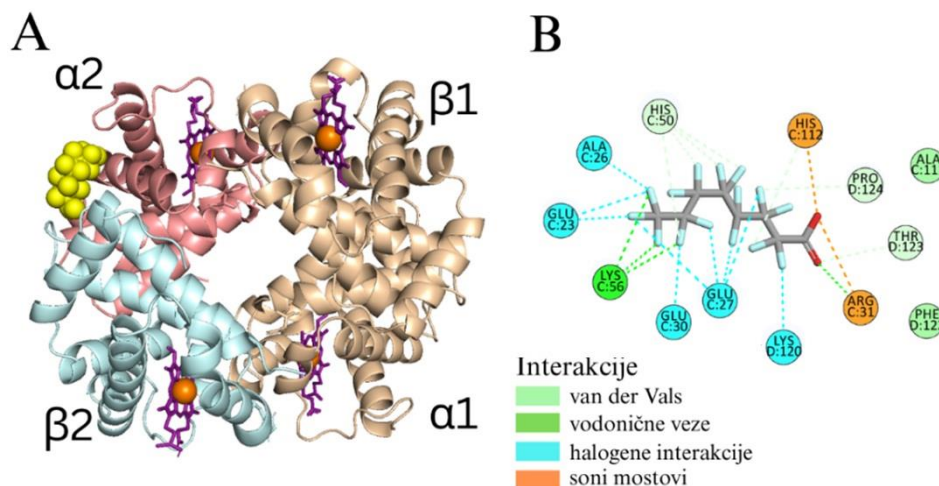
Interesantna vezivna poza, sa istom energijom vezivanja od $-6,7$ kcal/mol (L9), prikazuje PFOA pozicioniran na interfejsu između $\beta1$ i $\alpha2$ subjedinice hemoglobina u tzv. *switch* regionu. U ovoj pozi PFOA ostvaruje interakcije sa His97 iz C-terminalnog dela $\beta1$ subjedinice i sa nekoliko

ostataka $\alpha 2$ subjedinice, uključujući Lys40, Thr41 i Pro44. Prema literaturi, u T-stanju deoksihemoglobina His97 formira stabilizujuću interakciju sa Thr41, dok se u R-stanju pomera i vezuje za Thr38 [221]. S obzirom na to da se PFOA vezuje za Thr41, ova interakcija može biti narušena, što potencijalno može ometati prelaz iz T u R stanje (**Slika 60**). Sličan način vezivanja uočen je i na suprotnom interfejsu.



Slika 60. Struktura Hb sa pozicijom L9; prikazano na panelima A (Pymol predviđanje) i B (2D dijagram; generisano u Discovery Studio).

Pored toga, identifikovali smo vezivno mesto sa energijom vezivanja od $-6,3$ kcal/mol (L12), gde kiseonik iz karboksilne grupe formira soni most sa His112($\alpha 2$) i Arg31($\alpha 2$), koji se nalaze u okviru $\alpha 2$ subjedinice, **Slika 61**. His112 je vezan za Glu27 iz istog lanca, tako da vezivanje PFOA za oba aminokiselinska ostatka narušava native interakcije. Zanimljivo je da su mutacije na poziciji His112 povezane sa strukturnim abnormalnostima u α -globinskim lancima.



Slika 61. Pozicija L12 u strukturi Hb; prikazano na panelima A (Pymol predviđanje) i B (2D dijagram; generisano u Discovery Studio).

Pored pomenutih vezivnih mesta, identifikovane su i dodatne pozicije vezivanja (L2, L4, L5, L6, L7, L10 i L11), koje nisu posebno predstavljene jer nisu pokazale rezultate od većeg značaja, **Slika 56**. U poziciji L2, ligand ostvaruje interakcije sa lancem $\beta 1$, uključujući vodonične veze sa Gln310 i Glu244, kao i soni most sa Lys307, dok dodatnu stabilizaciju daju van der Vals kontakti sa hidrofobnim ostacima. U L4 mestu, koje se nalazi na lancu $\alpha 2$, PFOA formira bogatu mrežu vodoničnih i halogenih interakcija sa Glu i Gln ostacima, dok prisustvo sonog mosta sa Lys i Arg dodatno doprinosi stabilnosti. Pozicija L5 uključuje interakcije prvenstveno sa lancem $\alpha 1$, gde se ističe His40 kroz jonsku interakciju, dok halogeni kontakti sa Phe i Val, uz vodonične veze sa Glu,

Thr i Asn, učvršćuju vezivanje. Vezivno mesto L6, koje uključuje ostatke lanca $\beta 2$, karakteriše kombinacija vodoničnih veza, halogenih interakcija i sonog mosta sa Lys ostacima, uz doprinos van der Vals kontakata. U L7 mestu, takođe na lancu $\alpha 2$, dominiraju vodonične veze sa Ser i Asp, dok Arg539 učestvuje u formiranju sonog mosta, što ukazuje na značajnu jonsku stabilizaciju liganda. Za razliku od njih, L10 mesto, smešteno na lancu $\beta 1$, oslanja se gotovo isključivo na soni most sa Arg, uz manji broj van der Vals interakcija, što sugerise slabije stabilno vezivanje. Konačno, u L11 položaju, koji uključuje ostatke lanca $\alpha 2$, PFOA ostvaruje kombinaciju vodoničnih i halogenih kontakata, dopunjenih sonim mostom, čime se obezbeđuje umerena stabilnost.

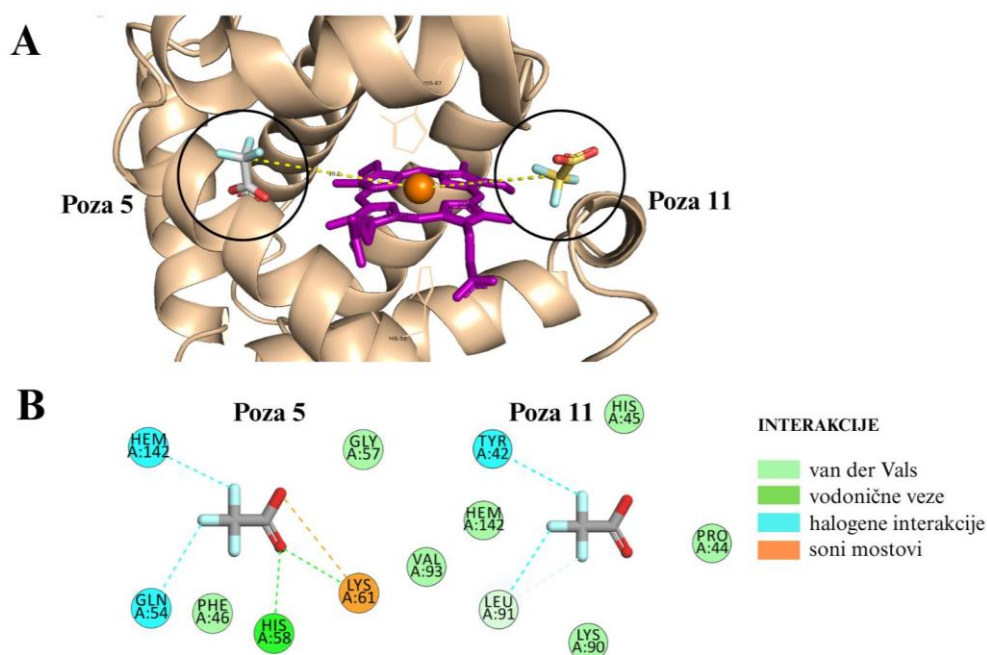
5.3.3. Doking na $\alpha 1$ subjedinici Hb

Nakon što smo zaključili da dolazi do vezivanja PFOA za Hb, zanimalo nas je da li se i kratkolančani (PFBA) i ultrakratkolančani (TFA) ligandi vezuju na sličan način, odnosno, da li se vezuju u blizini hema. Radi lakšeg poređenja i tumačenja rezultata, odlučeno je da se radi na istoj kristalnoj strukturi, ali na $\alpha 1$ subjedinici. Očekivano, vrednosti predviđene energije vezivanja nisu bile visoke (kcal/mol), a PFOA je pokazao najvišu energiju, **Tabela 11**. Uzete su u obzir sve pozicije niže za 1 kcal/mol u odnosu na najnižu energiju.

Tabela 11. Predviđene energije vezivanja (kcal/mol) liganada (TFA, PFBA, PFOA) za Hb.

TFA		PFBA		PFOA	
Poza	E(kcal/mol)	Poza	E(kcal/mol)	Poza	E(kcal/mol)
1	-3,9	1	-4,8	1	-6
2	-3,5	2	-4,6	2	-5,9
3	-3,4	3	-4,5	3	-5,8
4	-3,3	4	-4,4	4	-5,7
5	-3,2	5	-4,3	5	-5,7
6	-3,2	6	-4,2	6	-5,5
7	-3,2	7	-4,2	7	-5,5
8	-3,2	8	-4,2	8	-5,4
9	-3,1	9	-4,2	9	-5,3
10	-3,1	10	-4,1	10	-5,3
11	-3,1	11	-4,0	11	-5,2
12	-3,0	12	-4,0	12	-5,1
13	-3,0	13	-4,0	13	-5,1
14	-3,0	14	-3,9	14	-5,1
15	-2,9	15	-3,9	15	-5,0
16	-2,9	16	-3,9	16	-5,0
17	-2,9			17	-5,0
18	-2,9			18	-5,0

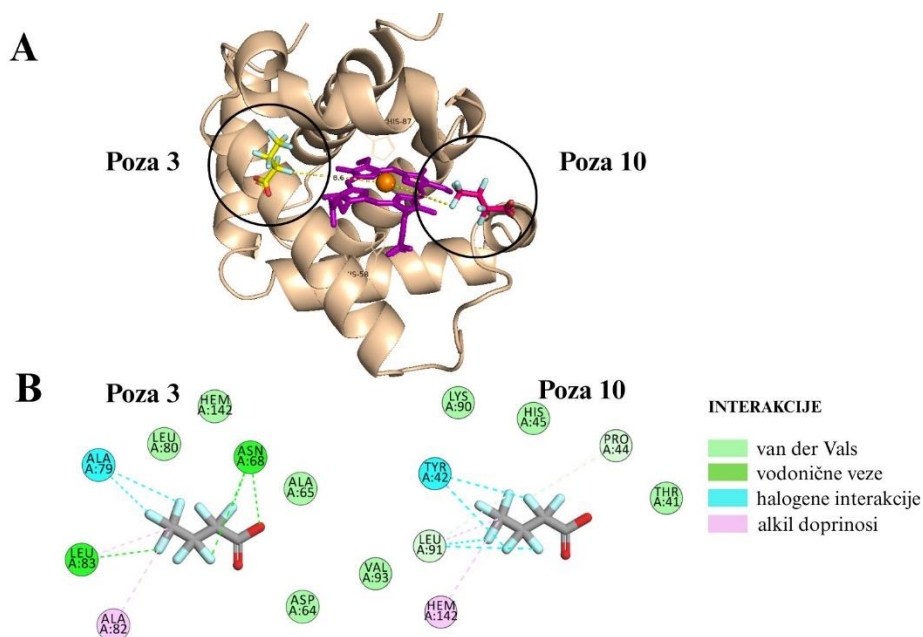
Analiziranjem vezivanja TFA za hemoglobin uočavamo sledeće: od svih pomenutih poza samo se dve poze vezuju u blizini hema (5 i 11, Tabela 11), **Slika 62**.



Slika 62. Vezivanje TFA u džepu hem grupe hemoglobina. A) 3D prikaz iz PyMOL-a: protein je prikazan kao „cartoon“ u boji pšenice, porfirinski prsten hema ljubičasto, a gvožđe kao narandžasta sfera. Crnim krugovima označene su poza 5 i poza 11 u okviru džepa hem grupe lanca $\alpha 1$ (A); B) 2D mape interakcija iz Discovery Studio za obe poze, sa legendom.

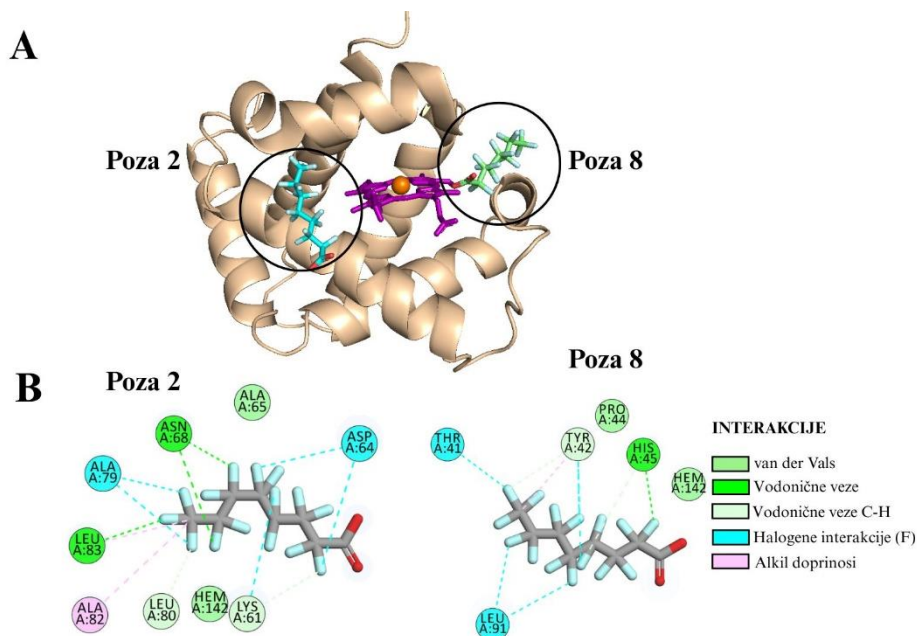
Obe poze nalaze se u džepu hem grupe lanca $\alpha 1$ (na 2D dijagramu označeno kao “A”), ali se razlikuju po mehanizmu stabilizacije. Poza 5 (-3,2 kcal/mol) poseduje jasno vezivanje preko sonog mosta sa Lys61, dopunjeno halogenim interakcijama sa Hem142 i Gln54, te van der Vals interakcijama sa Phe46 i vodoničnim vezama sa distalnim His58, što ukazuje na specifičnije i jače vezivanje TFA u blizini hema. Ova poza je udaljena oko 10,2 Å od centra porfirinskog prstena. Nasuprot tome, poza 11 (-3,1 kcal/mol) nema jonski par i oslanja se na halogene interakcije sa Tyr42, uz niz hidrofobnih kontakata sa Leu91, Val93, Pro44, Lys90, His45, što sugeriše slabije, hidrofobno vođeno vezivanje. Ova poza je udaljena oko 8,4 Å od centra porfirinskog prstena.

Kada tumačimo rezultate vezivanja PFBA u blizini porfirinskog prstena hemoglobina, dobijamo takođe dve poze koje su smeštene u blizini željenog mesta. Obe poze (3 i 10) smeštene su u džepu hem grupe lanca $\alpha 1$ i nalaze se relativno blizu centra metala (**Slika 63**), na udaljenosti oko 8,6 Å za pozu 3 i 8,2 Å za pozu 10, što ukazuje na pristup distalnom delu džepa, ali bez direktnog koordinovanja sa gvožđem. Predviđene energije dokinga (-4,5 i -4,1 kcal/mol) upućuju na slabije vezivanje u poređenju sa dugolančanim molekulima, što je u skladu sa manjom hidrofobnom površino repa liganda. Poza 3 je nešto povoljnija, jer sadrži jedinu jasno definisanu vodoničnu vezu (Asn68) uz kontakte sa porfirinom, dok se poza 10 oslanja pretežno na halogene i hidrofobne kontakte (Tyr42, Leu91, Pro44).



Slika 63. Vezivanje PFBA za $\alpha 1$ subjedinicu Hb. A) PyMOL predviđanje vezivnih mesta. Crnim krugovima označene su poza 3 i poza 10; B) 2D Discovery Studio mape interakcija sa legendom.

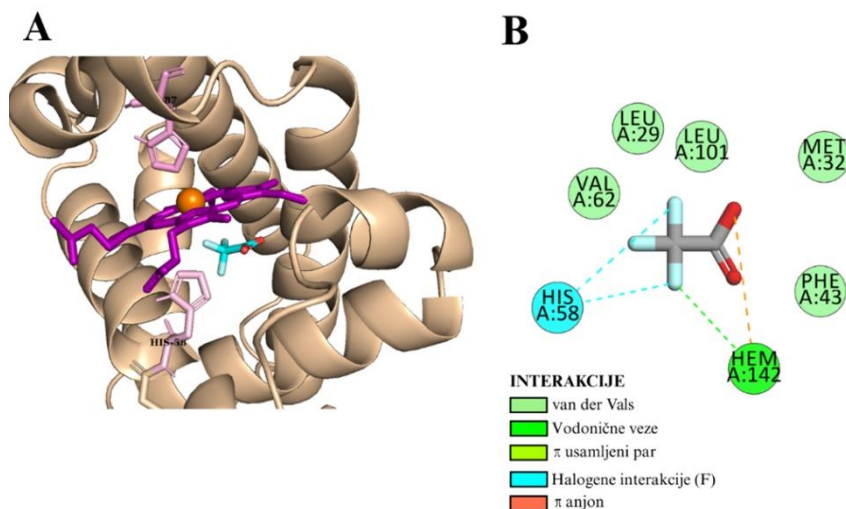
Vezivanje PFOA u blizini porfirinskog prstena je ukazalo da se PFOA slabije vezuje u tom region u odnosu na vezivanje na celom molekulu. Poza 2 i poza 8 ($-5,9$ i $-5,4$ kcal/mol) nisu pokazale visoke energije vezivanja, te ukazuju na slabo vezivanje, bez sonih mostova. Razlika od $\sim 0,5$ kcal/mol je mala i verovatno nije statistički značajna u okviru preciznosti dokinga, pa se obe poze mogu smatrati energetski sličnim, **Slika 64**. Ovaj rezultat je bio očekivan, usled veličine ovog molekula, s toga ne možemo smatrati da bi PFOA mogao da blokira vezivanje kiseonika za Hb.



Slika 64. Poze PFOA u blizini porfirinskog prstena hemoglobina. A) PyMOL prikaz dva vezivna mesta; crnim krugovima označene poza 2 i poza 8; B) Discovery Studio 2D mape interakcija za obe poze, sa legendom.

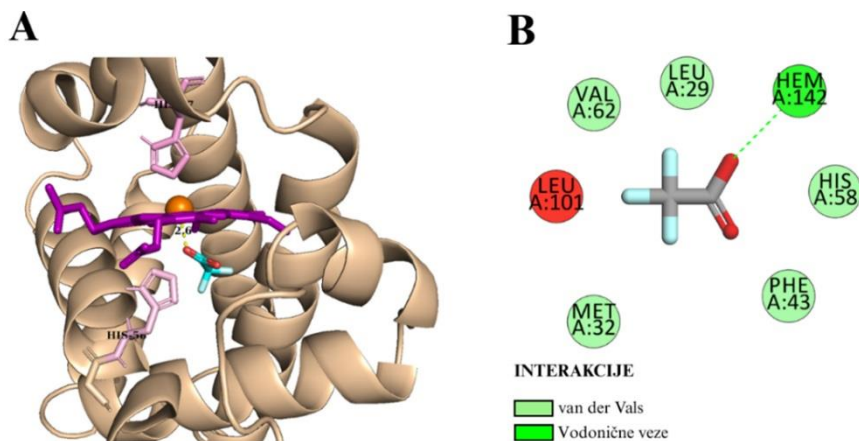
5.3.4. Vezivanje TFA u distalnom delu Hb

Ovde smo pošli od pretpostavke da mali molekul može da se veže u šupljini za vezivanje kiseonika (distalni deo hem džepa). Kao predstavnik ultrakratkolančanih PFAS izabrana je trifluorosirćetna kiselina. Pretraga vezivanja bila je ograničena na jednu, ciljano definisanu kutiju koja obuhvata distalni hem džep. Doking je izveden na kristalnoj strukturi hemoglobina u T-stanju (PDB kod: 2DND). Konformacija porfirinskog prstena odgovarala je „domeđ“ geometriji, što je potvrđeno analizom uz pomoć alata PyDISH [222]. Za atom gvožđa razmotrena su singletno, tripletno i kvintetno spinsko stanje. Na **Slici 65** je prikazan docking rezultat vezivanja TFA za protein. Identifikovane interakcije ukazuju da TFA može da se smesti u distalnom delu hema, gde ga stabilizuju kombinacija halogenih interakcija sa His58, vodoničnih veza sa Hem142, kao i van der Valsovih interakcija sa Leu29, Met32, Phe43, Val62, Leu101.



Slika 65. Vezivanje TFA u distalnom džepu hem grupe hemoglobina (subjedinica $\alpha 1$). A) PyMOL prikaz vezivnog mesta; B) 2D mapa sa interakcijama generisana pomoću Discovery Studio programa.

Takođe, u modelu 8 iste poze vezanog liganda, pokazano je da se karboksilna grupa liganda može okrenuti ka centru porfirinskog prstena, **Slika 66**.

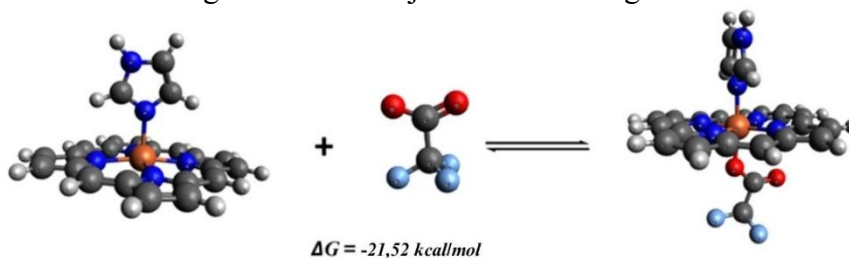


Slika 66. Model 8 iste poze. A) Pymol predviđanje vezivnog mesta; B) Mapa 2D interakcija.

U ovom modelu TFA se pozicionira u distalnom delu lanca $\alpha 1$, tako da je karboksilna glava okrenuta ka porfirinu, dok je fluorovani rep usmeren prema Leu101. Uočavamo moguć kontakt kiseonika iz karboksilne grupe sa hemom putem vodonične veze, pri čemu je rastojanje između kisonika liganda i gvožđa oko 2,5 Å. Istovremeno, mapa interakcija ukazuje na nefavorizovan kontakt sa Leu101 koji deluje suprotno stabilizaciji.

5.3.5. DFT analiza vezivanja TFA za hemoglobin

Kako bismo detaljnije ispitali potencijalno vezivanje TFA u distalnom delu hem grupe, sproveli smo DFT proračune. Dobijeni rezultati pokazali su da je slobodna energija vezivanja termodinamički povoljna ($\Delta G = -21,52$ kcal/mol) (Slika 66). Ovakav ishod bio je očekivan, budući da je u proračun uključen samo hem prsten sa vezanim imidazolom koji imitira proksimalni histidin, dok okolne amino-kiseline, koje bi u realnom proteinskom okruženju mogle da stvore sterne i elektrostatičke barijere za vezivanje, nisu uzete u obzir. Poređenja radi, kiseonik, koji predstavlja fiziološki ligand ovog mesta, znatno je manji od TFA, pa je jasno da u kontekstu kompletnog proteina prostorna ograničenja mogu imati presudnu ulogu. Ovi preliminarni DFT rezultati, iako dobijeni na izolovanom modelu, ukazuju da TFA može ostvariti povoljnu interakciju sa hem grupom, ali istovremeno naglašavaju potrebu za složenijim simulacijama koje uključuju i proteinsko okruženje, kako bi se razjasnila stvarna mogućnost vezivanja u distalnom regionu.

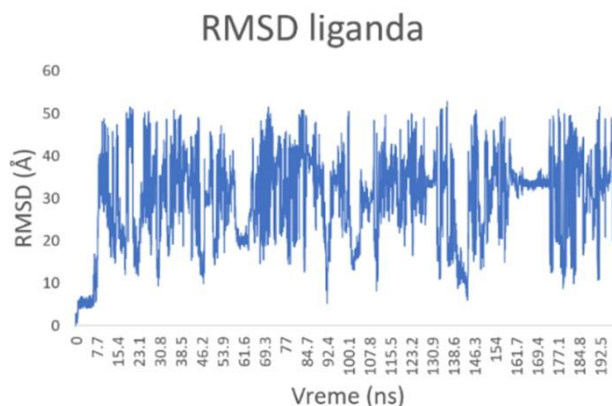


Slika 66. Prikaz formiranja kompleksa TFA sa hem–imidazol model sistemom. Porfirinski prsten je obojen sivo (*ball and sticks*), sa azotima koji su obojeni u plavo, gvožđe se nalazi u centru molekula i obojeno je u narandžasto, a proksimalni histidin je zamenjen imidazolom koji je takođe u “*ball and sticks*” obliku.

Kako literaturni DFT podaci pokazuju, vrednosti vezivanja kiseonika na pojednostavljenim hem modelima značajno variraju u zavisnosti od primenjenog funkcionala (oko $-28,6$ kcal/mol za BP86 i približno $+8,3$ kcal/mol za B3LYP) [223]. Ova razlika ukazuje na veliku zavisnost rezultata od izbora nivoa teorije. Prilikom poređenja naših vrednosti za TFA sa literaturnim podacima za O_2 , neophodno je imati u vidu da izolovani modeli bez proteinskog okruženja često daju povoljnije energije vezivanja od onih koje bi se mogle očekivati u realnim biološkim uslovima.

5.3.6. Analiza vezivnog mesta TFA primenom MD simulacija

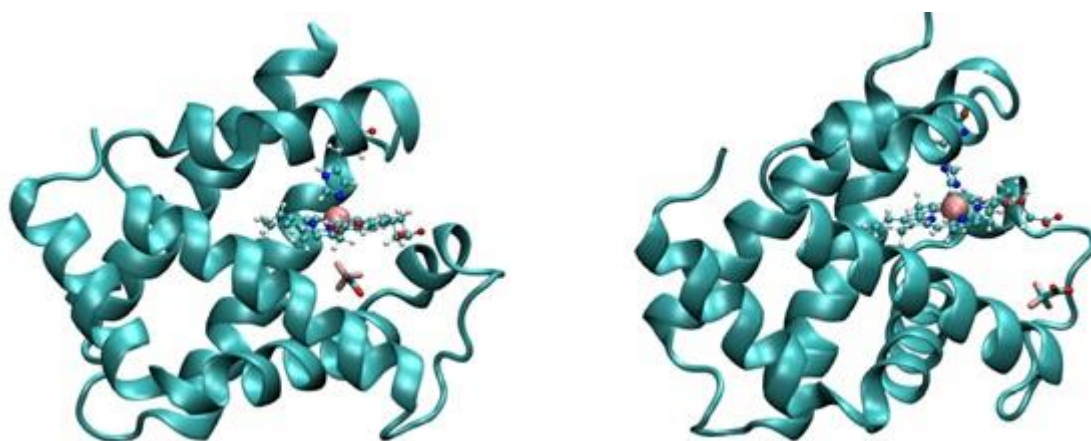
Rezultati molekulskog dokinga i DFT proračuna ukazali su na mogućnost formiranja stabilnog kompleksa između TFA i hema koordinovanog u $\alpha 1$ -lancu hemoglobina. Ipak, imajući u vidu ograničenja statičnih metoda, odlučili smo da sprovedemo MD simulacije. Početne koordinate proteina i liganda preuzete su iz prethodnih proračuna. U literaturi je opisano da PFOA dovodi do destabilizacije tetramera Hb, gubitka jedne subjedinice i oslobađanja hema [120], te se postavlja pitanje da li TFA može izazvati sličan efekat i koji mehanizam stoji iza tako značajnih rezultata, obzirom da je relativno mali molekul koji bi mogao da prodre do hema. Stabilnost liganda je praćena analizom RMSD vrednosti u odnosu na početnu konformaciju, Slika 67.



Slika 67. RMSD dijagram TFA tokom 200 ns molekulske dinamike.

RMSD analiza liganda tokom 200 ns simulacije otkrila je izrazite oscilacije, što ukazuje da ligand ne zadržava stabilan položaj u vezivnom mestu, te simulacije molekulske dinamike pokazuju da formiranje ovog kompleksa nije kinetički povoljno i da već u prvim nanosekundama ligand napušta vezivno mesto. Tokom početne faze simulacije može se primetiti blagi rast RMSD (do ~ 10 Å), nakon čega vrednosti naglo skaču i osciluju u širokom opsegu (20–50 Å). Ovakvo ponašanje sugerise da je TFA inicijalno stupio u interakciju sa hemom, ali da je interakcija bila nestabilna i da je ligand relativno brzo napustio vezno mesto.

Isto zapažanje se vidi i na **Slici 68**, koja pokazuje da se TFA pomera, reorijentiše i odlazi iz vezivnog mesta, što ukazuje na slab afinitet i nestabilnu interakciju u realnim uslovima. TFA se do kraja simulacije nije vezala ni na jednom drugom mestu na proteinu.



Slika 68. Rezultat molekulske dinamike TFA na $\alpha 1$ subjedinici hemoglobina, dobijen VMD programom. Slika levo prikazuje da ligand prilazi hemu, ali na slici desno on ipak odlazi usled nepovoljne energije vezivanja.

Kao što je navedeno, opsežni rezultati doking studije, kao i DFT proračuna, ukazuju na povoljno vezivanje TFA u regionu predviđenom za kiseonik. Ipak, statičke metode, bez obzira na to što je DFT sproveden na visokom teorijskom nivou, mogu pružiti samo dopunu dinamičkim istraživanjima i ne mogu se posmatrati izolovano. Naši rezultati molekulske dinamike pokazali su da je vezivanje TFA u distalnom delu hema kinetički nepovoljno, budući da ligand napušta vezivno mesto već u ranim fazama simulacije. Stoga možemo zaključiti da TFA, ultrakratkolančani PFAS, nema kapacitet da remeti funkciju hemoglobina u vezi sa vezivanjem kiseonika i da je za ovu funkciju od presudnog značaja dužina hidrofobnog lanca.

5.4. Karakterizacija vezivnih mesta PFOA na humanom serumu albuminu

U literaturi su do sada opisana različita vezivna mesta PFOA na HSA, kako na osnovu teorijskih tako i eksperimentalnih istraživanja. Dok su neka od tih mesta potvrđivana u više nezavisnih studija, druga su predstavljala nova otkrića. U našem istraživanju fokusirali smo se na detaljnu teorijsku analizu vezivnih mesta i odgovarajućih energija vezivanja, imajući u vidu da se značajan deo slobodnih perfluorovanih jedinjenja u krvotoku vezuje upravo za ovaj transportni protein. Iako postoji kristalna struktura proteina kokristalisana sa PFOA i miristinskom kiselinom, naš cilj je bio da razjasnimo način vezivanja PFOA u odsustvu miristinske kiseline. Na ovaj način moguće je sagledati stvarnu kompeticiju liganda za vezivna mesta, jer se u fiziološkim uslovima HSA nalazi u stalnoj interakciji sa masnim kiselinama različitih dužina lanca. Ovakav pristup omogućava bolje razumevanje mehanizama pomoću kojih PFAS mogu narušiti homeostazu vezivanja masnih kiselina i lekova, što je od posebnog značaja u toksikološkom i farmakološkom kontekstu.

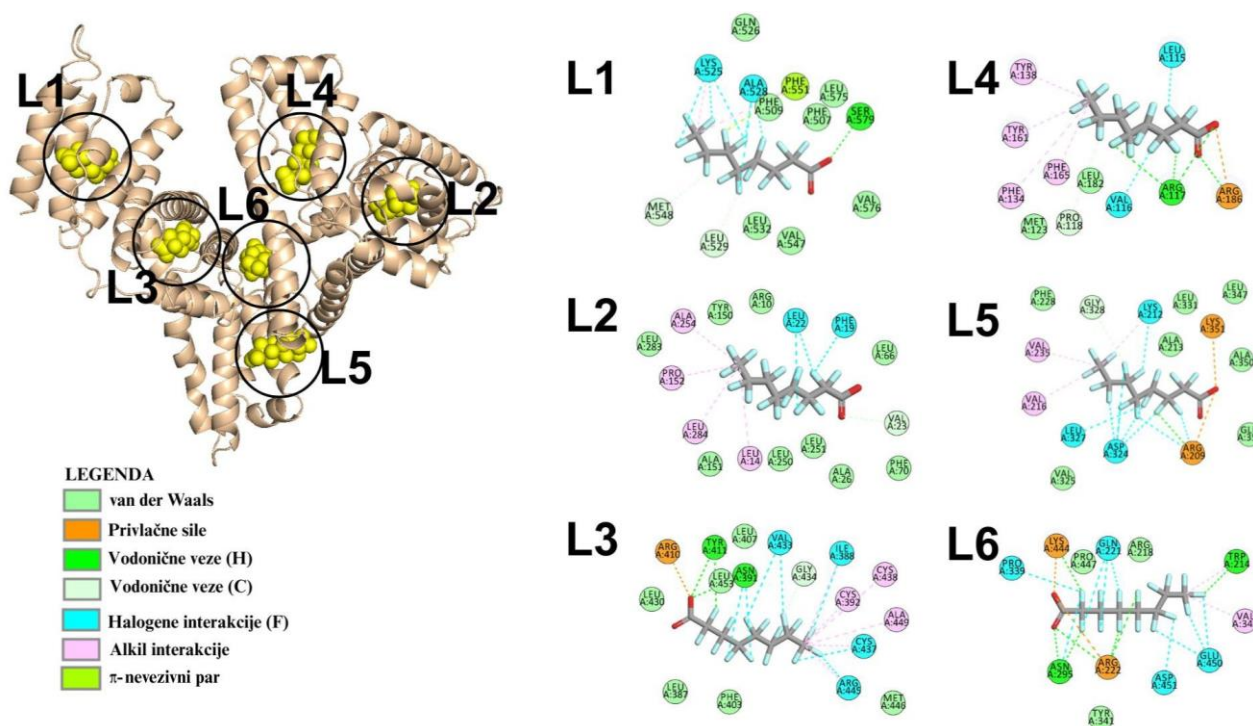
5.4.1. Predviđanje vezivnih mesta PFOA na HSA doking metodom

Rezultati doking proračuna ukazuju na postojanje više potencijalnih vezivnih mesta za PFOA na HSA. Na osnovu funkcije bodovanja (programa AutoDock Vina) izdvojeno je 12 pozicija koje se razlikuju po energijama vezivanja (**Tabela 12**).

Tabela 12. Prikaz vezivnih energija (kcal/mol) predviđenih molekulskim dokingom za dvanaest najbolje rangiranih poza liganada (L1-L12).

Pozicija liganda	Energija predviđena dokingom
L1	-9,8
L2	-9,0
L3	-8,8
L4	-8,6
L5	-8,4
L6	-8,0
L7	-7,7
L8	-7,3
L9	-6,8
L10	-6,5
L11	-6,4
L12	-6,2

Šest najpovoljnijih poza (L1–L6), kao i njihove interakcije sa amino-kiselinim ostacima HSA, prikazane su na **Slici 70**. Kao što je istaknuto u odeljku 2.2.1.4. HSA sadrži više vezujućih mesta masnih kiselina (engl. *fatty acid*, *FA*), a doking analiza je potvrdila da PFOA ostvaruje vezivanje upravo u tim regijama.



Slika 70. Prikaz šest najpovoljnijih vezivnih mesta PFOA u okviru humanog serum albumina (levo), uz detaljan prikaz ostvarenih međumolekulskih interakcija (desno). Legenda za tipove interakcija data je ispod prikaza kristalne strukture HSA (PDB: 1N5U).

Najpovoljnija poza PFOA je L1 za koju je predviđena energija vezivanja $-9,8$ kcal/mol, pripada vezivnom mestu za masne kiseline 5 (FA5) i IIIb subdomenu. Halogene interakcije ostvarene su između atoma fluora na repu PFOA i bočnih lanaca Lys525 i Ala528. Karboksilna grupa PFOA formira vodoničnu vezu sa Ser579, dok se C–H veze ostvaruju sa bočnim lancima Met548 i Leu529. Dodatnu stabilizaciju pruža π –nevezivni par interakcija između Phe551 i atoma fluora, kao i π –alkil interakcija između Phe551 i terminalnog atoma ugljenika PFOA. Alkil interakcije su ostvarene između Lys525 i terminalnog ugljenikovog atoma PFOA (**Slika 70–L1**). Met548 je ranije opisan u radu Wu i saradnika kao amino-kiselinski ostatak koji učestvuje u vezivanju PFOA, iako drugi interagujući ostaci nisu navedeni [224].

Kristalna strukutra HSA, PFOA i miristinske kiseline je pokazala da miristinska kiselina zauzima FA5, što sugerise da kompetitivno vezivanje može uticati na detekciju i karakterizaciju ovog mesta [114]. Pozicija L2 sa proračunatom energijom vezivanja od $-9,0$ kcal/mol je u domenu Ia, blizu N-terminusa i u neposrednoj blizini mesta FA2. Ovo mesto karakteriše vodonična veza između Val23 i karboksilne grupe PFOA, koju dodatno stabilizuju alkil interakcije sa Leu14, Pro152, Ala254 i Leu284; halogene interakcije sa Leu22 i Phe19; kao i van der Valsovi kontakti sa Arg10, Leu66, Tyr150, Ala151, Leu251 i Leu283 (**Slika 70–L2**). Iako ovo mesto vezivanja do sada nije opisano, ono je zauzeto miristinskom kiselinom u kristalnoj strukturi koju su prikazali Maso i saradnici.

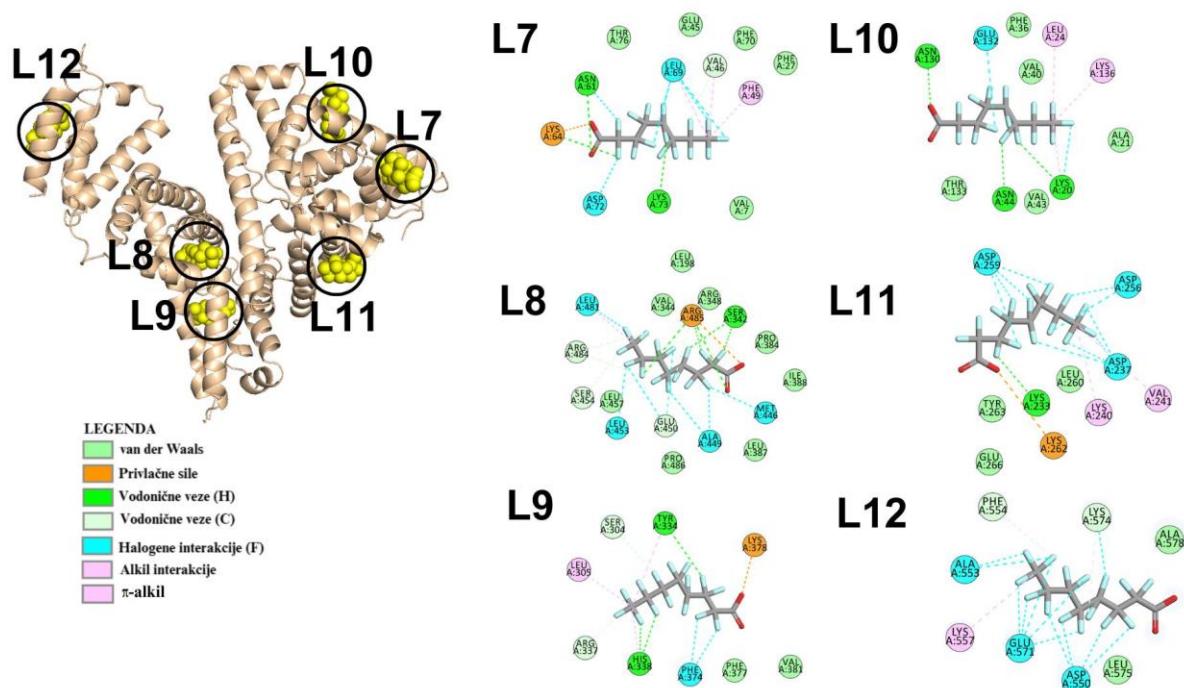
Treće mesto vezivanja PFOA, obeleženo kao L3, opisano u više studija i identifikovano kao visokoafinitetno mesto od strane Maso i saradnika, odgovara trećem po redu najpovoljnijem položaju u našim doking simulacijama ($-8,8$ kcal/mol). Pripada Sudlovom mestu II, koje se preklapa sa mestom vezivanja masnih kiselina 4 (FA4). Na ovom položaju karboksilna grupa PFOA formira soni most sa Arg410 i vodonične veze sa Tyr411 i Asn391, koji su u prethodnim istraživanjima dosledno identifikovani kao ključni ostaci. Dodatnu stabilizaciju obezbeđuju halogene interakcije sa Val433, Ile388, Cys437 i Arg445, kao i alkil interakcije sa Cys392, Cys438 i Ala449 (**Slika 70–L3**).

Četvrto mesto vezivanja PFOA za HSA identifikovano u našim doking simulacijama ($-8,6$ kcal/mol) nalazi se na mestu vezivanja masnih kiselina 1 (FA1), a koje je su opisali Salvalaglio i saradnici. Ovo mesto je zauzeto miristinskom kiselinom u kristalnoj strukturi prikazanoj kod Maso i saradnika. Vezivanje PFOA se pretežno ostvaruje preko interakcija njegove karboksilne grupe sa Arg186 i Arg117. Dodatna stabilizacija potiče od halogenih kontakata sa Leu115 i Val116, π –alkil interakcija sa Phe134, Tyr138, Tyr161 i Phe165, kao i C–H veze sa Pro118 (**Slika 70–L4**).

Sledeće mesto vezivanja (L5), sa predviđenom energijom vezivanja od $-8,4$ kcal/mol, poklapa se sa mestom vezivanja masnih kiselina 6 (FA6) i ranije je opisano kao mesto niskog afiniteta za PFOA (**Slika 70–L5**). Ključne stabilizujuće interakcije uključuju sone mostove sa Lys351 i Arg209, zajedno sa halogenim interakcijama koje obuhvataju Lys212, Asp324 i Leu327. Dodatnu stabilizaciju obezbeđuju alkil interakcije sa Val216 i Val235.

L6 mesto vezivanja PFOA, ranije opisano u literaturi od strane Maso i saradnika, kao i Crisali i saradnika, odgovara narednom položaju (po afinitetu vezivanja) identifikovanom u našim doking simulacijama, sa predviđenom energijom vezivanja od $-8,0$ kcal/mol. Ovo mesto se nalazi u blizini mesta vezivanja masnih kiselina 7 (FA7), gde karboksilna grupa PFOA formira sone mostove sa Arg222 i Lys444. Stabilizacija je dodatno postignuta halogenim interakcijama sa Gln221, Pro339, Glu450 i Asp451; vodoničnim vezama sa Trp214 i Asn295; kao i alkil interakcijom sa Val343 (**Slika 70–L6**). Ovo mesto je, takođe, primećeno u kristalnim strukturama i okarakterisano kao mesto niskog afiniteta za vezivanje PFOA.

Naša analiza je identifikovala šest dodatnih mesta vezivanja PFOA nižeg afiniteta, prikazana na **Slici 71**, vezivne energije od -7,7 kcal/mol do -6,2 kcal/mol. Ova mesta do sada nisu bila opisana u ranijim studijama.



Slika 71. Prikaz doking poza sa energijama vezivanja nižim od $-8,0$ kcal/mol. Poze L7–L12 prikazane su na molekulu HSA (levo), dok desni paneli predstavljaju interakcije za svaku pozu, generisane u programu Discovery Studio. Legenda za tipove interakcija data je ispod prikaza kristalne strukture HSA (PDB: 1N5U) sa vezanim ligandima.

Ligand obeležen kao L7 se vezuje u domenu I humanog seruma albumina. L7 ostvaruje halogene interakcije sa Leu69 i Asp72, takođe, halogeni rep interaguje sa Val46, Asn61 i Lys73 vodoničnim vezama. Dodatnu stabilizaciju vezivanja postiže pomoću van der Valsovih interakcija sa Val7, Phe27, Glu45, Thr76 i Leu198. Osim toga, Lys64 vezuje karboksilnu grupu privlačnim interakcijama, prikazano na **Slici 71-L7**.

Mesto obeleženo kao L8 nije prikazano u kristalnoj strukturi kao mesto visokog afiniteta za PFOA. Odsustvo ovog mesta iz literaturnih podataka verovatno se može pripisati visokoj konformacionoj pokretljivosti između domena, što može onemogućiti stabilno vezivanje liganda na toj poziciji. Najvažnije amino-kiseline za vezivanje ovog liganda su Arg485, Ser342 koje ostvaruju privlačne sile, odnosno, vodonične veze sa karboksilnom glavom ili fluorisanim repom liganda. Ostvarene halogene interakcije dodatno podržavaju vezivanje PFOA, a najvažnije amino-kiseline iz ove grupe ostvarenih veza su Met446, Ala449, Leu453 i Leu481. Takođe, Glu450 i Arg484 učestvuju u vezivanju putem vodoničnih veza, a Val344, Arg348, Pro384, Leu 387, Ile388, Pro486 i Leu 457 ostvaruju van der Vals interakcije sa PFOA (**Slika 71-L8**).

Ligand označen kao L9 (**Slika 71-L9**) vezivne energije -6,8 kcal/mol, ostvaruje interakcije preko karboksilne grupe sa polarnom aminokiselinom Lys378. Hidrofobni rep liganda se vezuje halogenim interakcijama za Phe374, vodoničnim vezama za Ser304, Tyr334, Arg337 i His338. Pozicija ovog liganda pripada IIb subdomenu humanog seruma albumina.

Još jedno prethodno neobjavljeno mesto je L10 sa vezivnom energijom -6,5 kcal/mol. Relativno niske vezivne energije, ovaj ligand ostvaruje halogene interakcije sa Glu132. Takođe, uočavamo vezivanje PFOA preko vodoničnih veza sa Lys20, Asn44, Asn130. Nekoliko van der Vals interakcija dodatno stabilizuju pozu (**Slika 71-L10**).

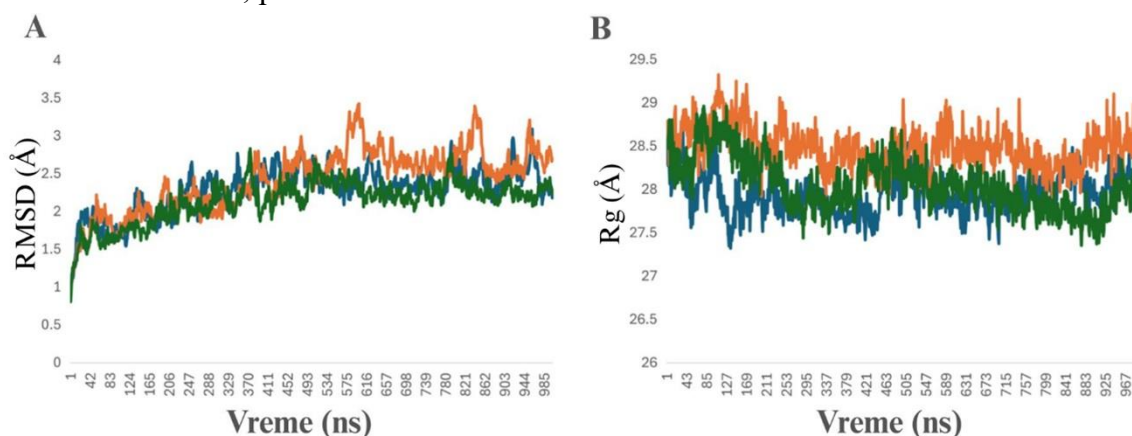
Poza koja se nalazi blizu FA7 vezujućeg mesta, obeležen kao L11 ostvaruje sedam interakcija preko hidrofobnog repa, od kojih su tri sa aspartatom i dve sa lizinom i samo jednu sa kiseonikom iz karboksilne grupe (Lys262). Dodatna stabilizacija je postignuta van der Valsovim interakcijama preko Leu260, Glu266 i Tyr263 (Slika 71-L11).

Poslednji po rangiranju vezivne energije, L12, se vezuje blizu L1 vezivnog mesta. Vezivanje ove dve poze je relativno slično, čak se osvaruju interakcije preko istih amino-kiselina. Zbog odsustva vezivanja između karboksilne grupe i amino-kiselina proteina uočava se razlika od više od 3 kcal/mol. Sve interakcije su formirane između hidrofobnog repa liganda halogenim interakcijama sa Asp550, Ala553 i Glu571, kao i vodoničnim vezama sa Phe554 i Lys574 (Slika 71-L12).

Ranije kristalografske analize u prisustvu miristinske kiseline identifikovale su jedno mesto visokog afiniteta i tri mesta niskog afiniteta, dok je naš pristup otkrio dvanaest različitih poza vezivanja, uključujući šest koje do sada nisu bile opisane.

5.4.2. Molekulska dinamika vezivnih mesta identifikovanih doking metodom

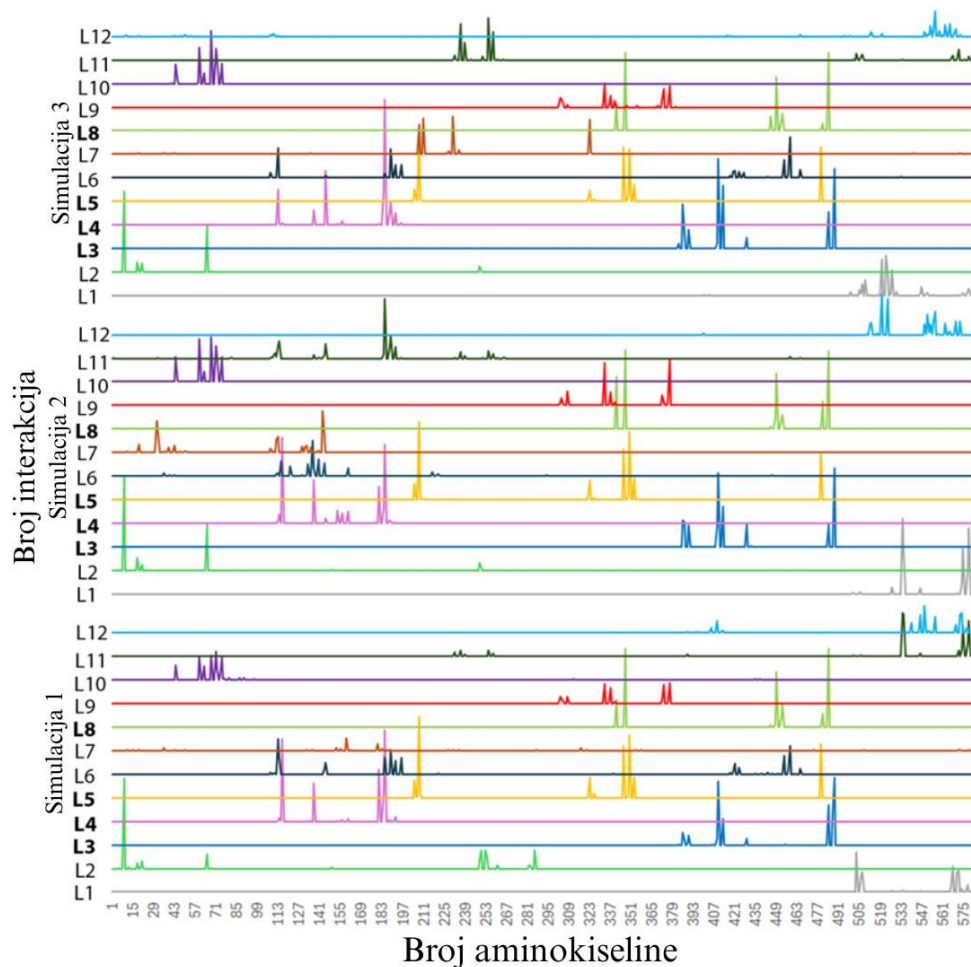
Molekulska dinamika je primenjena za detaljniju analizu vezivanja PFOA za HSA, kako bi se utvrdila prava vezivna mesta. MD simulacije su urađene sa 12 liganada istovremeno kako bi se obezbedila kompeticija za mesta vezivanja i imitiranje ponašanja HSA u fiziološkim uslovima. Prednost ovog pristupa je što omogućava istovremenu procenu stabilnosti svih identifikovanih mesta i eliminaciju potencijalno nestabilnih poza. Pozicije liganada su dobijene molekulskim dokingom, a potom iskorišćene za simulaciju na protein koji je bio stabilan tokom proračuna, te se ne uočavaju promene u toku 1000 ns, prikazano na Slici 72.



Slika 72. Stabilnost HSA tokom MD. A) Vrednosti RMSD proteina tokom molekuldinamičke simulacije u trajanju od 1000 ns; B) Promene radijusa giracije (R_g) HSA tokom tri nezavisne simulacije iste dužine. Plavom bojom je označena simulacija 1, narandžastom simulacija 2 i zelenom simulacija 3.

Da bismo dodatno ispitali stabilnost i ponašanje ostvarenih interakcija u vremenu, pratili smo kontakte između PFOA i HSA tokom MD simulacija. U tu svrhu korišćen je program PLIP [225] (engl. *protein ligand interaction profiler*) za identifikaciju interakcija između liganda i aminokiselinskog ostatka u svakom okviru MD trajektorije. Dobijeni podaci dalje su korišćeni za generisanje mapa interakcija ligand–amino-kiselinski ostatak (engl. *ligand-residue interaction maps*, *LRIM*), za svih 12 pozicija vezivanja kroz simulacije u triplikatu (Slika 73). Visina pika označava intenzitet interakcije ostvarene sa određenom amino-kiselinom proteina (prikazano na horizontalnoj osi). Višestruke istovremene interakcije između jednog liganda i iste amino-kiseline takođe su moguće i obuhvaćene su dijagramima. Na osnovu dva kriterijuma su određeni najstabilnije vezani ligandi. Prvi kriterijum je bio da li je ligand ostao vezan za iste ili slične amino-kiseline tokom sve tri simulacije, a drugi je bio da li je ligand ostvarivao interakcije sa najmanje tri različite amino-kiseline tokom polovine ukupnog vremena simulacije. Na osnovu ovoga su definisana četiri mesta L3, L4, L5 i L8.

Tumačenjem LRIM dijagrama se može zaključiti da pozicija L3 ostvaruje interakcije sa amino-kiselinama iz regiona 365 do 491 i da odgovara mestu visokog afiniteta identifikovanom u kristalografskim studijama HSA sa PFOA i miristinskom kiselinom, a locirana je u Sudlovom mestu II (FA4). Pozicija L4 ostvaruje interakcije sa amino-kiselinskim ostacima u regionu proteina koji obuhvata sekvencu 113–225, a koji odgovara FA1 vezivnom mestu za masne kiseline, poznatom po tome da je u kristalnoj strukturi zauzeto miristinskom kiselinom. Pozicija L5 ostvaruje interakcije sa amino-kiselinama iz oblasti sekvence 221–365, te odgovara FA6 vezujućem mestu koje je u kristalnoj strukturi bilo zauzeto PFOA. Takođe, za poziciju L8 se može tumačiti da ostvaruje interakcije sa amino-kiselinama iz oblasti proteinske sekvence 337–505. Pozicija L8 do sada nije bila opisana kao mesto vezivanja PFOA, ali odgovara FA3 mestu, koje je u kristalnoj strukturi zauzeto miristinskom kiselinom. Pored toga, FA3 se nalazi u blizini Sudlovog mesta II.

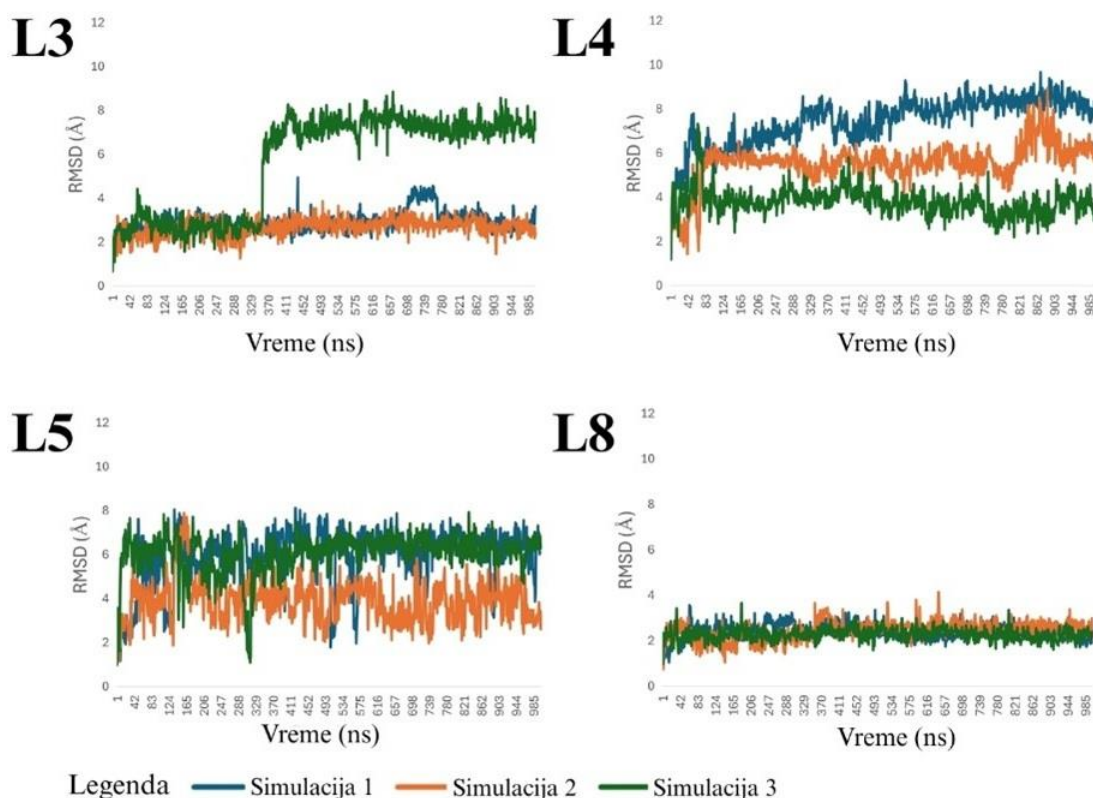


Slika 73. LRIM dijagram. Na x-osi su pozicije amino-kiselina (ak); y-osa prikazuje broj pozicije u kojima se javljaju kontakti između liganda i ak ostataka. Svaki pozicija liganda predstavljena je različitom bojom. Intenzitet pikova odgovara ostacima koji učestvuju u interakcijama (L3, L4, L5 i L8 su podebljani zbog najjačeg intenziteta interakcija).

Za razliku od L3, L4, L5 i L8, ostali ligandi (L1, L2, L6, L7, L9, L10, L11, L12) nisu ispoljili stabilno vezivanje tokom tri nezavisne MD simulacije, niti značajan intenzitet interakcionih pikova, što se može uočiti na drugim primerima prikazanim na LRIM dijagramu.

Na osnovu obrađenih rezultata, odlučeno je da se provere i moguće promene u položaju ili orijentaciji liganada tokom simulacija.

U svrhu analize mogućih promena u položaju/orijentaciji liganada tokom MD simulacije, izračunate su i prikazane RMSD vrednosti za sve tri simulacije u intervalu od 1000 ns, za četiri liganda (L3, L4, L5, L8), **Slika 74**.



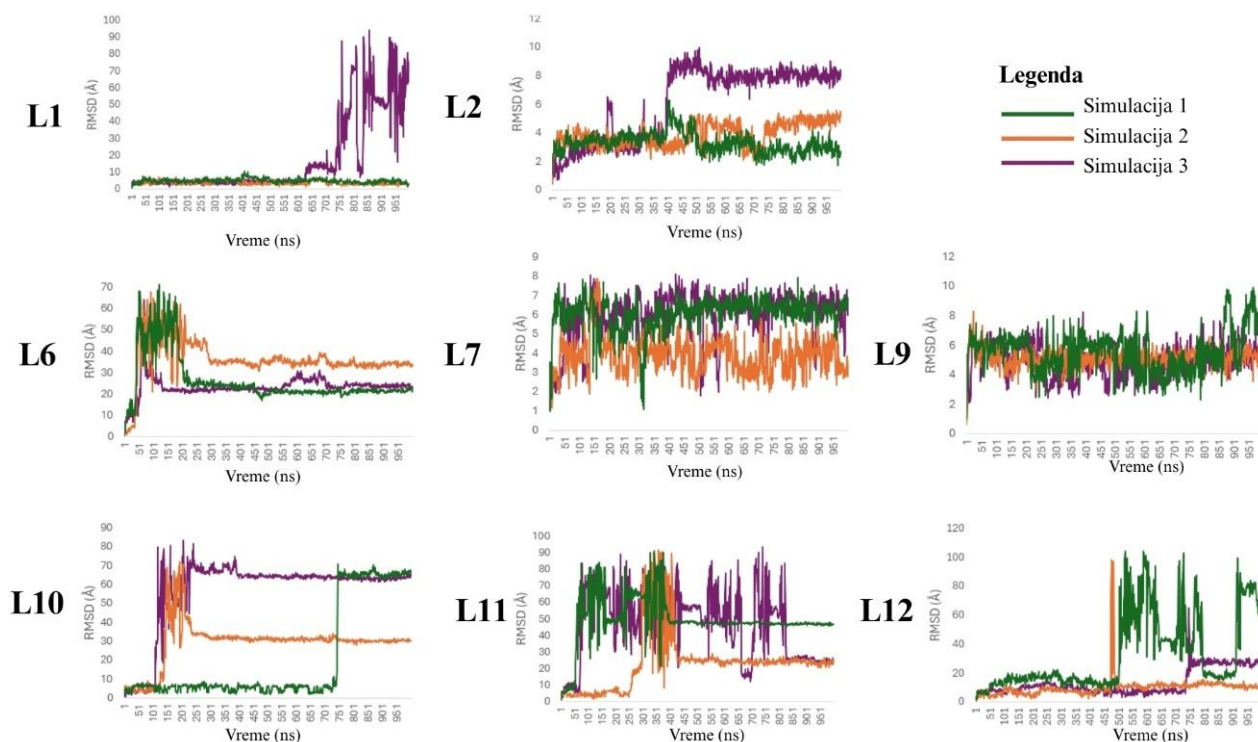
Slika 74. RMSD dijagrami za četiri liganda (L3, L4, L5, L8) koja su pokazala najveću stabilnost i najveći procenat interakcija sa proteinom tokom tri molekularno-dinamičke simulacije u trajanju od 1000 ns.

Na RMSD dijagramima se može videti da PFOA na pozicijama L3 i L8 zadržava gotovo identičnu orijentaciju unutar vezivnog mesta tokom čitave simulacije, sa niskim RMSD vrednostima od približno 2 Å; ali, zabeležena je promena orijentacije liganda na poziciji L3 u trećoj simulaciji (obeleženo zelenom bojom) nakon 350 ns.

Kao što je ranije istaknuto, pozicija L3 nalazi se u Sudlovom mestu II i prostorno je bliska poziciji L8, ova dva mesta dele zajednički stabilizujući ostatak Arg485. Uočena promena orijentacije liganda na poziciji L3, prethodno okarakterisanoj kao mesto sa najvišim afinitetom za PFOA, povezana je sa konformacionom promenom bočnog lanca Arg485, koji u našim simulacijama ostvaruje interakcije sa ligandima na obe pozicije. Arg485 se pokazao kao važna amino-kiselina za vezivanje ostalih liganada, imajući u vidu delokalizovano pozitivno naelektrisanje gvanidinijske grupe koje favorizuje elektrostatičko privlačenje sa negativno naelektrisanom karboksilnom grupom poreklom sa liganda i predstavlja konzerviranu amino-kiselina u albuminoidnoj familiji proteina.

Vezivanje PFOA na pozicijama L4 i L5 pokazuje više RMSD vrednosti, u rasponu od 5 do 8 Å, što ukazuje na manje organizovana vezivna mesta i veću konformacionu slobodu liganada. RMSD rezultati sva četiri mesta vezivanja identifikovana pomoću interakcionih dijagrama su stabilna mesta vezivanja PFOA za HSA.

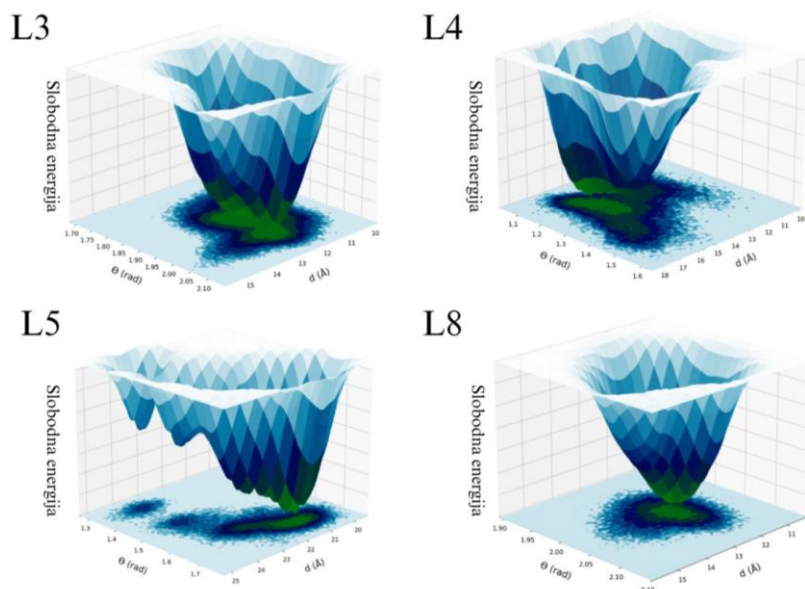
Analiza RMSD profila za ligande L1, L2, L6, L7, L9, L10, L11 i L12 pokazala je značajne razlike u stabilnosti vezivanja tokom simulacija, **Slika 75**.



Slika 75. RMSD dijagrami nestabilnijih pozicija vezivanja PFOA, sa legendom, za tri MD simulacije. Na x-osi je prikazano vreme trajanja simulacije; na y-osi je prikazan RMSD (Å).

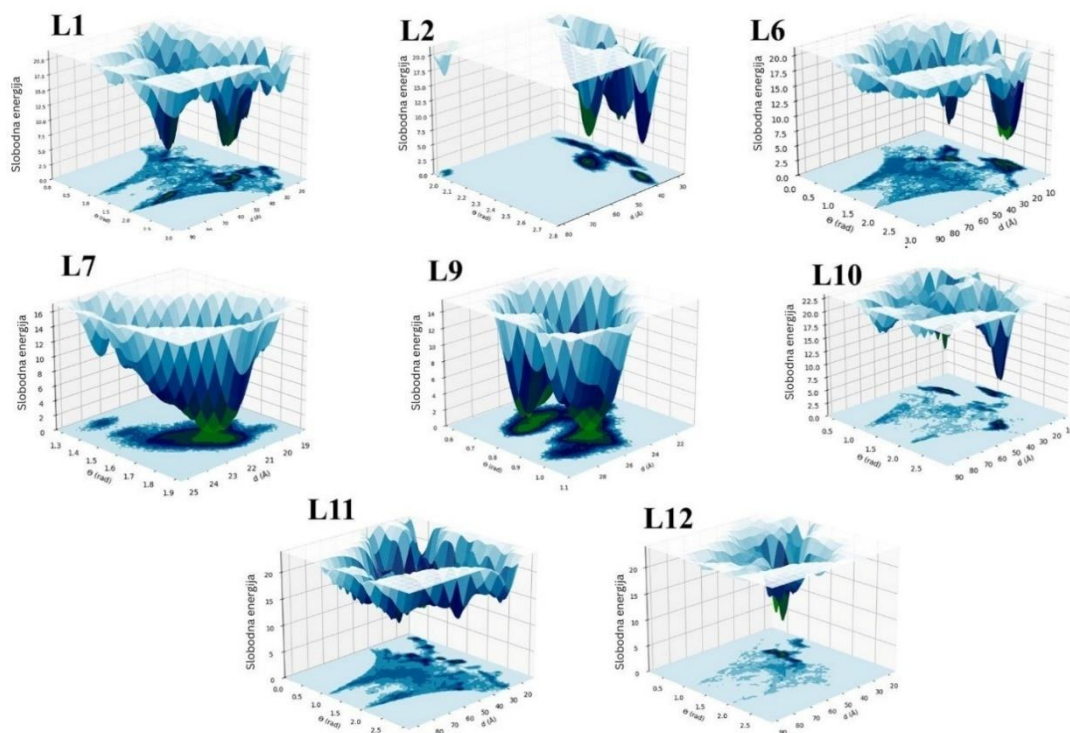
Ligandi L2, L7 i L9 zadržali su relativno niske RMSD vrednosti (u rasponu od 2 do 8 Å) kroz sve tri simulacije, izuzev u slučaju L2 koji u trećoj simulaciji dostiže 10 Å. Ligand L1, takođe, pokazuje stabilnost u većem delu simulacija, ali u trećoj simulaciji dolazi do naglih porasta RMSD vrednosti (dostiže 90 Å), što sugerise delimičnu destabilizaciju ili promenu orijentacije u vezivnom mestu. Takođe, L9 zadržava stabilnost u gotovo sve tri simulacije, u prihvatljivom odstupanju RMSD od početne konfiguracije. Ali, nasuprot ovim rezultatima, ukoliko se vratimo na analiziranje LIRM možemo zaključiti da L2 ostvaruje interakcije sa amino-kiselinama na terminusu proteina, L7 nije pokazao konstantnost formiranja istih interakcija u tri simulacije, dok L9 jeste, ali je visina pika bila izrazito mala. S toga, ove pozicije nisu mogle biti prihvaćene kao potencijalna vezivna mesta. Suprotno tome, ligandi L6, L10, L11 i L12 ispoljili su izrazitu nestabilnost u sve tri MD simulacije. Uočeni su nagli skokovi RMSD vrednosti koji dostižu i preko 60–100 Å, što jasno ukazuje na napuštanje vezivnih mesta i difuziju liganda ka površini proteina ili ka okolnom rastvaraču. Ovi rezultati su potvrda rezultata LIRM dijagrama sa kog se može videti da L6 ne pokazuje konstantnost vezivanja u tri simulacije, L10 i L12 se vezuju za amino-kiseline iz terminalnog dela sekvence proteina, dok L11 gotovo da ne pokazuje pikove na LIRM. Ovi rezultati potvrđuju da svi pomenuti ligandi (L1, L2, L6, L7, L9, L10, L11 i L12) ne ostvaruju trajne interakcije sa HSA.

Da bi se bolje razumelo ponašanje liganda u potencijalnim vezivnim mestima, izračunate su površine slobodne energije (engl. *free energy landscape, FEL*), **Slika 76**. Grafici prikazuju distribuciju slobodne energije kao funkciju dve kolektivne promenljive (udaljenost d i ugao θ), čime se opisuje stabilnost PFOA u odabranim mestima vezivanja. Pri tumačenju ovih rezultata posebno se izdvaja pozicija L8. Za tu poziciju uočen je jasno definisan minimum, što ukazuje na jedinstveno i stabilno vezivanje. Nasuprot tome, multidimenziona površina potencijalne energije za poziciju L3 sadrži dva lokalna minimuma, koji odražavaju konformacione promene bočnog lanca Arg485, ključnog ostatka u stabilizaciji vezivanja. Multidimenziona površina potencijalne energije za pozicije L4 i L5 pokazuju šire i difuznije lokalne minimume, što ukazuje na povećanu fleksibilnost liganda i manju stabilnost vezivanja u poređenju sa L3 i L8.



Slika 76. Površine slobodne energije za ligande na pozicijama L3, L4, L5 i L8.

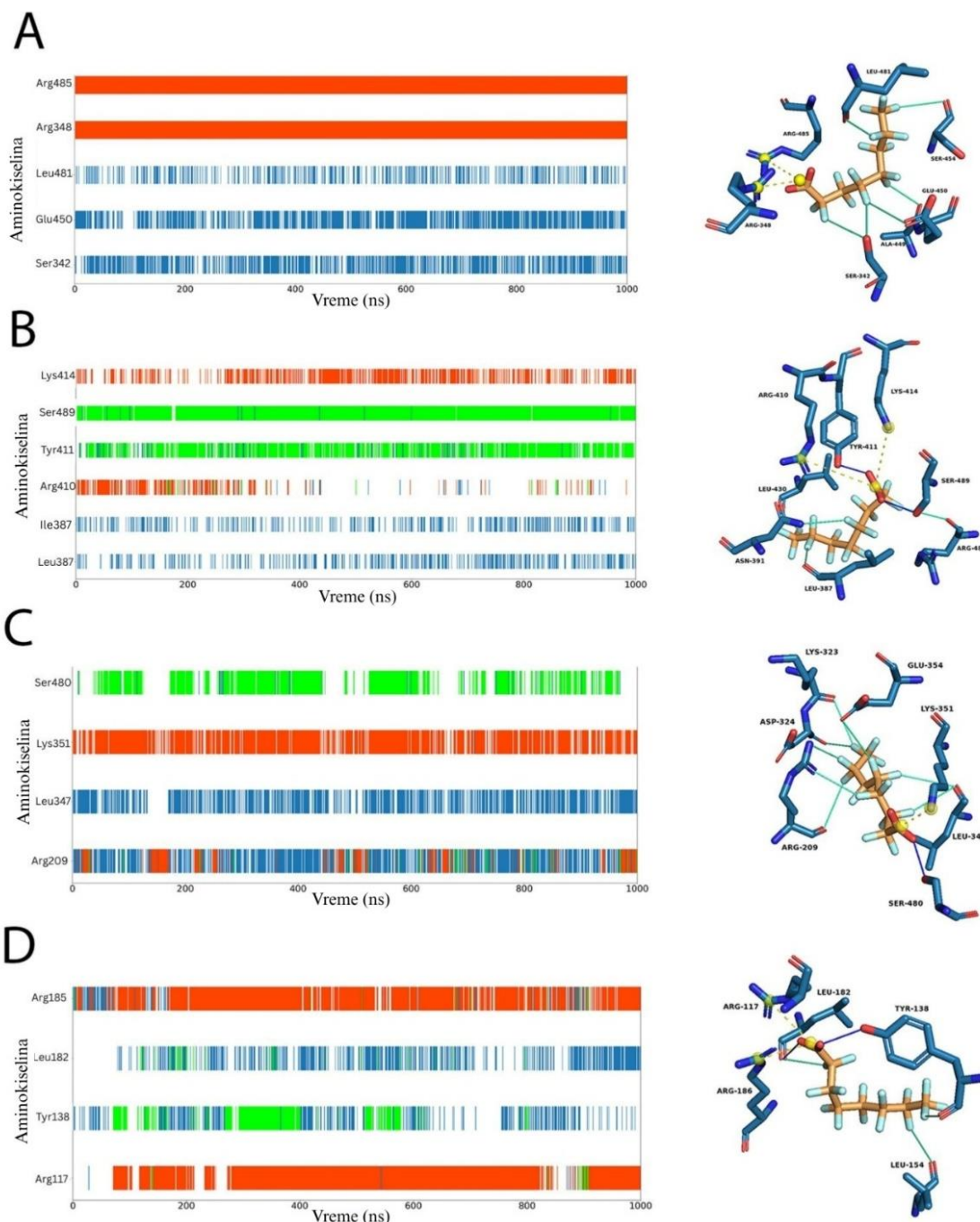
Za razliku od liganada L3, L4, L5 i L8 koji su imali jasno definisane lokalne minimume, ostali ligandi (L1, L2, L6, L10-12) su pokazali više minimuma, manje energije, što odražava nestabilnost liganda u vezivnom mestu i prolazni karakter vezivanja, **Slika 77**. U slučaju pozicija L7 i L9 multidimenzionalna površina potencijalne energije je imala bolje definisan lokalni minimum, ali, na osnovu LIRM i RMSD dijagrama su isključeni iz finalne, PLIP, analize.



Slika 77. Površine slobodne energije za ligande koji nisu pokazali stabilnost tokom MD simulacija.

Analiza interakcija dobijena PLIP programom četiri najvažnija mesta vezivanja (L3, L4, L5, L8) je prikazana na **Slici 78**. Najpovoljnije vezivno mesto (L8) stabilizovano je prvenstveno putem dva sona mosta sa Arg347 i Arg485, koji su zadržani u svim okvirima tokom čitave simulacije. Ova interakcija, poznata i kao *arginine clamp* („argininska viljuška“), predstavlja ključni faktor stabilnosti kompleksa. Dodatnu stabilizaciju pružaju halogene interakcije sa Ser342, Glu450 i Leu481.

L3 pozicija, ranije označeno kao mesto visokog afiniteta, ostvaruje vezivanje za Arg410 i Lys414 preko sonog mosta, uz stabilne vodonične veze sa Tyr411 i Ser489 koje vezuju karboksilnu grupu liganda. Na L4 poziciji, PFOA je stabilizovan preko sonog mosta sa Lys351 i dinamičke izmene vodonične veze sa Ser480 i soli sa Arg209, pri čemu Arg209, kada ne formira jonsku vezu, učestvuje u halogenim interakcijama. Konačno, na L5 stabilnost proizilazi iz elektrostatičkih interakcija sa Arg117 i Arg185, uz prateće vodonične i halogene kontakte sa Tyr138 i Leu182.



Slika 78. Profili interakcija i 3D prikazi veza za četiri najstabilnija mesta vezivanja PFOA na HSA. A) FA3 (L8); B) FA4 (L3); C) FA6 (L4) i D) FA1 (L5). Levo su prikazani dijagrami interakcija ligand–amino-kiselina tokom 1000 ns MD simulacija, pri čemu su prikazane samo one amino-kiseline koje ostvaruju interakcije duže od 40 % ukupnog vremena simulacije. Boje označavaju tip interakcije (narandžasta boja predstavlja sone mostove, zelena boja vodonične veze, plava boja halogene interakcije). Desno su dati reprezentativni 3D prikazi interakcija za svako mesto vezivanja.

5.4.3. Rezultati MM-PBSA analize

Kako bismo dodatno potvrdili da četiri mesta identifikovana MD analizom zaista predstavljaju pozicije vezivanja PFOA na HSA u odsustvu konkurentskih liganada, izračunate su slobodne energije vezivanja za svih 12 pozicija MM-PBSA metodom. Rezultati prikazani u **Tabeli 13** omogućavaju poređenje energija vezivanja PFOA za HSA dobijenih metodama molekulskog dokinga i MM-PBSA proračuna. Doking proračuni su predložili dvanaest mogućih mesta vezivanja, sa energijama u rasponu od $-9,8$ do $-6,2$ kcal/mol, dok su dodatne analize zasnovane na MD simulacijama i MM-PBSA metodologiji pružile precizniju procenu njihove stabilnosti.

Tabela 13. MM-PBSA kalkulacije. Najniže (najpovoljnije) energije, koje ukazuju na najstabilnija mesta vezivanja, označene su podebljano.

Pozicija liganda	Vezivne energije izračunate MM-PBSA (kcal/mol)
L1	$-8,32 \pm 0,50$
L2	$-8,027 \pm 1,03$
L3	$-15,27 \pm 1,09$
L4	$-20,82 \pm 1,39$
L5	$-10,13 \pm 1,38$
L6	$-2,19 \pm 0,87$
L7	$-1,51 \pm 0,57$
L8	$-35,63 \pm 0,77$
L9	$-5,81 \pm 0,54$
L10	$1,04 \pm 0,42$
L11	$-0,30 \pm 1,64$
L12	$-3,42 \pm 0,46$

Posebnu pažnju privlače četiri pozicije (L3, L4, L5 i L8), kod kojih su dobijene najniže (najpovoljnije) energije vezivanja, istaknute podebljano u Tabeli. Dobijena energija vezivanja za poziciju L3, koja je u prethodno opisana kao mesto sa najvišim afinitetom za PFOA, bila je ispod -15 kcal/mol, što ukazuje na veoma snažno vezivanje. Za poziciju L5, ranije karakterisanu kao mesto sa nižim afinitetom, vrednost energije bila je oko -10 kcal/mol, što je u saglasnosti sa prethodnim izveštajima koji su pokazali da se PFOA vezuje na oba mesta, ali sa većim afinitetom za L3. Energije vezivanja za pozicije L4 i L8 bile su -20 kcal/mol, odnosno, -35 kcal/mol. Energije za pozicije L4 i L8 su čak 20 kcal/mol povoljnije u odnosu na L3. Iako kristalografski podaci ukazuju da se miristinska kiselina jače vezuje od PFOA na ovim mestima, naši rezultati pokazuju da, u odsustvu miristinske kiseline, PFOA zapravo ostvaruje jače vezivanje u FA1 (pozicija L4) i FA3 (pozicija L8) nego u FA4 (pozicija L3). Ostale pozicije su pokazale znatno nepovoljnije energije, što potvrđuje da se ligandi u tim mestima vezuju nestabilno i bez trajne interakcije. Ipak, vrednosti dobijene za pozicije L1 (FA5) i L2 (FA2) nagoveštavaju da i ova mesta mogu povremeno služiti kao dodatna vezivna mesta, posebno u uslovima viših koncentracija liganda.

Sveukupno, kombinacija dokinga i MM-PBSA proračuna omogućila je izdvajanje četiri ključna mesta vezivanja PFOA na HSA (L3, L4, L5 i L8), pri čemu naši rezultati naglašavaju značaj FA1 i FA3 vezivnih mesta, koje do sada nisu bile potvrđene kao vezivna mesta PFOA u kristalografskim istraživanjima zbog prisustva miristinske kiseline.

6. ZAKLJUČCI

PFAS su sintetska grupa jedinjenja koja su, zbog svoje stabilnosti i hemijskih karakteristika, široko primenjena u različitim granama industrije. Međutim, otpornost PFAS na degradaciju dovela je do akumulacije ovih molekula u životnoj sredini, a posledično i u ljudskom organizmu. Veliki broj studija pokazao je da dugolančane perfluorkarboksilne kiseline, najčešće korišćena klasa ovih jedinjenja, u ljudskom organizmu mogu da dovedu do različitih oboljenja, pa je shodno tome njihova upotreba regulisana. Uvođenje ove regulative, međutim, dovelo je do povećane upotrebe perfluorkarboksilnih kiselina kraćeg lanca, za koje se smatralo da su manje bioakumulativne. Kako se perfluorkarboksilne kiseline kraćeg lanca primenjuju svega nekoliko godina, postoji izuzetno mali broj studija koje govore o njihovom uticaju na ljudsko zdravlje. S obzirom na to da njihova koncentracija u životnoj sredini, ali i u ljudskoj krvi, značajno raste, ovakve studije su neophodne za procenu rizika i eventualno uvođenje novih regulatornih mera.

Shodno tome, tema ove doktorske disertacije bila je proučavanje uticaja perfluorkarboksilnih kiselina različite dužine lanca na ključne proteine ljudske krvi, uključujući glavni protein u procesu koagulacije krvi – fibrinogen; dva najznačajnija transportna proteina krvi – humani serum albumin (transport malih molekula) i hemoglobin (transport kiseonika i ugljen-dioksida); i glavni antiproteazni protein krvi uključen u regulaciju velikog broja fizioloških procesa – α 2-makroglobulin. Kao predstavnici sve tri klase perfluorkarboksilnih kiselina uzete su: PFOA (dugolančana), PFBA (kratkolančana) i TFA (ultrakratkolančana).

Primenom eksperimentalnih i računarskih metoda utvrđeno je da se sva tri predstavnika perfluorkarboksilnih kiselina različitih dužina lanca vezuju umerenim afinitetom za humani fibrinogen u različitim regionima proteina, ali ne dovode do značajnih promena u njegovoj strukturi. Vezivanje ovih molekula ne utiče na biološku funkciju fibrinogena, već ovaj protein može imati ulogu u transportu PFAS kroz ljudski organizam.

Rezultati merenja aktivnosti α 2-makroglobulina u prisustvu visokih koncentracija perfluorkarboksilnih kiselina različitih dužina lanca ukazuju na značajno smanjenje antiproteazne aktivnosti proteina. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim računarskim metodama, koje ukazuju na stabilno vezivanje PFOA u blizini ostatka Cys972, koji je ključan za formiranje tioestarske veze sa proteazom čija se aktivnost u ovom procesu inhibira.

Objavljena eksperimentalna studija pokazala je da vezivanje PFOA dovodi do disocijacije jedne subjedinice hemoglobina i disocijacije hema. Ovo je u skladu sa rezultatima molekulskog dokinga PFOA na tetramernoj strukturi hemoglobina, koji ukazuju na veliki broj vezivnih mesta lokalizovanih između subjedinica. Pored toga, rezultati molekulskog dokinga perfluorkarboksilnih kiselina kraćeg lanca ukazali su na potencijalno vezivanje ovih molekula u neposrednoj blizini hema. Takođe, rezultati DFT proračuna TFA sa izolovanim hem–imidazol sistemom pokazuju mogućnost formiranja stabilnog oktaedarskog hem–imidazol–TFA kompleksa, gde TFA zauzima poziciju na koju se vezuje molekul kiseonika. Ipak, molekulsko-dinamičke simulacije pokazale su da ulazak TFA u distalni džep hemoglobina nije kinetički povoljan.

Humani serum albumin, kao glavni transportni protein masnih kiselina u krvi, sadrži veliki broj potencijalnih vezivnih mesta za perfluoroktansku kiselinu. Da bi se utvrdila stabilna vezivna mesta za PFOA u ovom proteinu, razvijena je nova metodologija za praćenje interakcija liganda sa amino-kiselinama proteina tokom molekulsko-dinamičkih simulacija. Ovo je omogućeno konstrukcijom mapa interakcija ligand–amino-kiselinski ostatak (LRIM). Stabilno vezivanje pronađeno je na četiri pozicije, a određena je i energija vezivanja za svaku poziciju. Po izračunatoj jačini vezivne energije i stabilnosti liganda tokom simulacija posebno se izdvojilo vezivno mesto u subdomenu IIIa. Ovo vezivno mesto prisutno je i u drugim proteinima albuminoidne familije i potencijalno može poslužiti kao osnov za dizajn sintetskih peptida za uklanjanje PFAS iz životne sredine.

Sveopšti zaključak koji je proizašao iz rezultata ove doktorske disertacije jeste da se sva tri predstavnika perfluorkarboksilnih kiselina vezuju za četiri ključna humana proteina krvi: fibrinogen, $\alpha 2$ -makroglobulin, hemoglobin i humani serum albumin. Na ovaj način potvrđeno je da PFAS mogu uticati na strukturu i funkciju različitih proteina krvi, što predstavlja značajan rizik za zdravlje ljudi. Neselektivno vezivanje PFAS ukazuje na širok spektar mogućih posledica, uključujući poremećaje u održavanju osmotske ravnoteže, antiproteaznoj zaštiti, transportu malih molekula ili koagulacionoj funkciji krvi. Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za dodatnim i sistematičnim istraživanjima koja bi razjasnila mehanizme njihovog delovanja. Posebno je važno naglasiti da su ulaganja u razvoj metoda detekcije PFAS u hrani, vodi i vazduhu od izuzetnog značaja, kao i da je neophodno razmotriti uvođenje zakonske regulative kojom bi se ograničila proizvodnja i upotreba ovih jedinjenja, uključujući i ultrakratkolančane i kratkolančane perfluoralkil supstance, koje do sada nisu bile dovoljno istražene niti adekvatno regulisane.

7. LITERATURA

- [1] Gaines, L. G. (2023). Historical and current usage of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review. *American Journal of Industrial Medicine*, 66(5), 353-378.
- [2] Ateia, M., Maroli, A., Tharayil, N., & Karanfil, T. (2019). The overlooked short-and ultrashort-chain poly-and perfluorinated substances: A review. *Chemosphere*, 220, 866-882.
- [3] Buck, R. C., Korzeniowski, S. H., Laganis, E., & Adamsky, F. (2021). Identification and classification of commercially relevant per-and poly-fluoroalkyl substances (PFAS). *Integrated environmental assessment and management*, 17(5), 1045-1055.
- [4] Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., De Voogt, P., ... & Van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated environmental assessment and management*, 7(4), 513-541.
- [5] OECD. (2018). Toward a new comprehensive global database of per- polyfluoroalkyl substances (PFASs): Summary report on updating the OECD 2007 list of per and polyfluoroalkyl substances (PFASs). Series on Risk Management No. 39. OECD.
- [6] Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., ... & Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(12), 2345-2373.
- [7] Brase, R. A., Mullin, E. J., & Spink, D. C. (2021). Legacy and emerging per-and polyfluoroalkyl substances: analytical techniques, environmental fate, and health effects. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 995.
- [8] Al Amin, M., Sobhani, Z., Liu, Y., Dharmaraja, R., Chadalavada, S., Naidu, R., ... & Fang, C. (2020). Recent advances in the analysis of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review. *Environmental technology & innovation*, 19, 100879.
- [9] Phelps, D. W., Connors, A. M., Ferrero, G., DeWitt, J. C., & Yoder, J. A. (2024). Per-and polyfluoroalkyl substances alter innate immune function: evidence and data gaps. *Journal of immunotoxicology*, 21(1), 2343362.
- [10] Zhang, Y., Zhou, Y., Dong, R., Song, N., Hong, M., Li, J., ... & Kong, D. (2024). Emerging and legacy per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in fluorochemical wastewater along full-scale treatment processes: Source, fate, and ecological risk. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133270.
- [11] Kissa, E. (Ed.). (2001). *Fluorinated surfactants and repellents* (Vol. 97). CRC Press.
- [12] Langberg, H. A., Breedveld, G. D., Slinde, G. A., Grønning, H. M., Høisæter, Å., Jartun, M., ... & Hale, S. E. (2020). Fluorinated precursor compounds in sediments as a source of perfluorinated alkyl acids (PFAA) to biota. *Environmental Science & Technology*, 54(20), 13077-13089.
- [13] Burns, D. C., Ellis, D. A., Li, H., McMurdo, C. J., & Webster, E. (2008). Experimental p K a determination for perfluorooctanoic acid (PFOA) and the potential impact of p K a concentration dependence on laboratory-measured partitioning phenomena and environmental modeling. *Environmental science & technology*, 42(24), 9283-9288.
- [14] Panieri, E., Baralic, K., Djukic-Cosic, D., Buha Djordjevic, A., & Saso, L. (2022). PFAS molecules: a major concern for the human health and the environment. *Toxics*, 10(2), 44.
- [15] Björnsdotter, M. K., Yeung, L. W., Kärrman, A., & Ericson Jogsten, I. (2020). Challenges in the analytical determination of ultra-short-chain perfluoroalkyl acids and implications for environmental and human health. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(20), 4785-4796.

- [16] Arp, H. P. H., Gredelj, A., Gluge, J., Scheringer, M., & Cousins, I. T. (2024). The global threat from the irreversible accumulation of trifluoroacetic acid (TFA). *Environmental Science & Technology*, 58(45), 19925-19935.
- [17] Jensen, A. A., & Warming, M. (2015). Short-chain polyfluoroalkyl substances (PFAS). The Danish Environmental Protection Agency.
- [18] Min, X., & Wang, Y. (2023). Enhanced adsorption of short-chain perfluorobutanoic acid by functionalized periodic mesoporous organosilica: Performance and mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 449, 131047.
- [19] Evich, M. G., Davis, M. J., McCord, J. P., Acrey, B., Awkerman, J. A., Knappe, D. R., ... & Washington, J. W. (2022). Per- and polyfluoroalkyl substances in the environment. *Science*, 375(6580), eabg9065.
- [20] Wang, R., Zhang, J., Yang, Y., Chen, C. E., Zhang, D., & Tang, J. (2022). Emerging and legacy per- and polyfluoroalkyl substances in the rivers of a typical industrialized province of China: Spatiotemporal variations, mass discharges and ecological risks. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 986719.
- [21] Leuthner, T. C., Zhang, S., Kohn, B. F., Stapleton, H. M., & Baugh, L. R. (2025). Structure-specific variation in per- and polyfluoroalkyl substances toxicity among genetically diverse *Caenorhabditis elegans* strains. *Toxicological Sciences*, 205(1), 205-219.
- [22] Meegoda, J. N., Kewalramani, J. A., Li, B., & Marsh, R. W. (2020). A review of the applications, environmental release, and remediation technologies of per- and polyfluoroalkyl substances. *International journal of environmental research and public health*, 17(21), 8117.
- [23] Cordner, A., Goldenman, G., Birnbaum, L. S., Brown, P., Miller, M. F., Mueller, R., ... & Trasande, L. (2021). The true cost of PFAS and the benefits of acting now. *Environmental science & technology*, 55(14), 9630-9633.
- [24] Newland, A., Khyum, M. M., Halamek, J., & Ramkumar, S. (2023). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—Fibrous substrates. *TAPPI J*, 22(9), 559-572.
- [25] Lai, F. Y., Rauert, C., Gobelius, L., & Ahrens, L. (2019). A critical review on passive sampling in air and water for per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121, 115311.
- [26] Nahar, K., Zulkarnain, N. A., & Niven, R. K. (2023). A review of analytical methods and technologies for monitoring per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in water. *Water*, 15(20), 3577.
- [27] Meegoda, J. N., Bezerra de Souza, B., Casarini, M. M., & Kewalramani, J. A. (2022). A review of PFAS destruction technologies. *International journal of environmental research and public health*, 19(24), 16397.
- [28] Leung, S. C. E., Shukla, P., Chen, D., Eftekhari, E., An, H., Zare, F., ... & Li, Q. (2022). Emerging technologies for PFOS/PFOA degradation and removal: A review. *Science of The Total Environment*, 827, 153669.
- [29] Chetverikov, S. P., Sharipov, D. A., Korshunova, T. Y., & Loginov, O. N. (2017). Degradation of perfluorooctanyl sulfonate by strain *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(5), 533-538.
- [30] Gagliano, E., Sgroi, M., Falciglia, P. P., Vagliasindi, F. G., & Roccaro, P. (2020). Removal of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) from water by adsorption: Role of PFAS chain length, effect of organic matter and challenges in adsorbent regeneration. *Water research*, 171, 115381.

- [31] Bonato, M., Corrà, F., Bellio, M., Guidolin, L., Tallandini, L., Irato, P., & Santovito, G. (2020). PFAS environmental pollution and antioxidant responses: an overview of the impact on human field. *International journal of environmental research and public health*, 17(21), 8020.
- [32] Abunada, Z., Alazaiza, M. Y., & Bashir, M. J. (2020). An overview of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the environment: Source, fate, risk and regulations. *Water*, 12(12), 3590.
- [33] Yu, C. H., Riker, C. D., Lu, S. E., & Fan, Z. T. (2020). Biomonitoring of emerging contaminants, perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS), in New Jersey adults in 2016–2018. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 34-44.
- [34] Jian, J. M., Chen, D., Han, F. J., Guo, Y., Zeng, L., Lu, X., & Wang, F. (2018). A short review on human exposure to and tissue distribution of per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *Science of the Total Environment*, 636, 1058-1069.
- [35] Alves, A., Jacobs, G., Vanermen, G., Covaci, A., & Voorspoels, S. (2015). New approach for assessing human perfluoroalkyl exposure via hair. *Talanta*, 144, 574-583.
- [36] Poothong, S., Thomsen, C., Padilla-Sanchez, J. A., Papadopoulou, E., & Haug, L. S. (2017). Distribution of novel and well-known poly-and perfluoroalkyl substances (PFASs) in human serum, plasma, and whole blood. *Environmental science & technology*, 51(22), 13388-13396.
- [37] Sundström, M., Ehresman, D. J., Bignert, A., Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., Chang, S. C., & Bergman, Å. (2011). A temporal trend study (1972–2008) of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in pooled human milk samples from Stockholm, Sweden. *Environment international*, 37(1), 178-183.
- [38] Cao, Y., & Ng, C. (2021). Absorption, distribution, and toxicity of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the brain: a review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(11), 1623-1640.
- [39] Pérez, F., Nadal, M., Navarro-Ortega, A., Fàbrega, F., Domingo, J. L., Barceló, D., & Farré, M. (2013). Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment international*, 59, 354-362.
- [40] Grandjean, P., Andersen, E. W., Budtz-Jørgensen, E., Nielsen, F., Mølbak, K., Weihe, P., & Heilmann, C. (2012). Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *Jama*, 307(4), 391-397.
- [41] Looker, C., Luster, M. I., Calafat, A. M., Johnson, V. J., Burleson, G. R., Burleson, F. G., & Fletcher, T. (2014). Influenza vaccine response in adults exposed to perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate. *toxicological sciences*, 138(1), 76-88.
- [42] Wang, T., Wang, P., Meng, J., Liu, S., Lu, Y., Khim, J. S., & Giesy, J. P. (2015). A review of sources, multimedia distribution and health risks of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in China. *Chemosphere*, 129, 87-99.
- [43] Jensen, A. A., & Warming, M. (2015). Short-chain polyfluoroalkyl substances (PFAS). The Danish Environmental Protection Agency.
- [44] Han, X., Nabb, D. L., Russell, M. H., Kennedy, G. L., & Rickard, R. W. (2012). Renal elimination of perfluorocarboxylates (PFCAs). *Chemical research in toxicology*, 25(1), 35-46.
- [45] Ostadfar, A. (2016). *Fluid Mechanics and Biofluids Principles*. 31–32.
- [46] Brunning, R. D. (1995). Hematology: basic principles and practice. *JAMA*, 274(21), 1722-1723.
- [47] Varpit, F., & Galama, V. (2022). Human Blood. In *Blood Groups-More than Inheritance of Antigenic Substances*. IntechOpen.

- [48] Morera, D., & MacKenzie, S. A. (2011). Is there a direct role for erythrocytes in the immune response?. *Veterinary research*, 42(1), 89.
- [49] Kellum, J. A. (2000). Determinants of blood pH in health and disease. *Critical care*, 4(1), 6.
- [50] Schaller, J., Gerber, S., Kaempfer, U., Lejon, S., & Trachsel, C. (2008). Human blood plasma proteins: structure and function. John Wiley & Sons.
- [51] Allison, A. C. (Ed.). (1974). Structure and function of plasma proteins (Vol. 1). London, New York: Plenum Press.
- [52] Potter, B. J. (2014). Liver-plasma protein synthesis☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- [53] Jaros, J. A., Guest, P. C., Bahn, S., & Martins-de-Souza, D. (2013). Affinity depletion of plasma and serum for mass spectrometry-based proteome analysis. In *Proteomics for Biomarker Discovery* (pp. 1-11). Totowa, NJ: Humana Press.
- [54] Bailey, K., Astbury, W. T., & Rudall, K. M. (1943). Fibrinogen and fibrin as members of the keratin-myosin group. *Nature*, 151(3843), 716-717.
- [55] Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2017). Fibrin formation, structure and properties. *Fibrous proteins: structures and mechanisms*, 405-456.
- [56] Wolberg, A. S. (2023). Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(11), 3005-3015.
- [57] Fuss, C., Palmaz, J. C., & Sprague, E. A. (2001). Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 12(6), 677-682.
- [58] Mosesson, M. W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 3(8), 1894-1904.
- [59] Lowe, G. D., Rumley, A., & Mackie, I. J. (2004). Plasma fibrinogen. *Annals of clinical biochemistry*, 41(6), 430-440.
- [60] JZ, Z. (1996). Fibrinogen assembly and secretion. *J Bio Chem*, 271, 30083-30088.
- [61] Tsurupa, G., Tsonev, L., & Medved, L. (2002). Structural organization of the fibrin (ogen) α C-domain. *Biochemistry*, 41(20), 6449-6459.
- [62] Veklich, Y. I., Gorkun, O. V., Medved, L. V., Nieuwenhuizen, W., & Weisel, J. W. (1993). Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13577-13585.
- [63] Protopopova, A. D., Barinov, N. A., Zavyalova, E. G., Kopylov, A. M., Sergienko, V. I., & Klinov, D. V. (2015). Visualization of fibrinogen α C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(4), 570-579.
- [64] Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., & Doolittle, R. F. (2009). Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 48(18), 3877-3886.
- [65] Zhmurov, A., Brown, A. E., Litvinov, R. I., Dima, R. I., Weisel, J. W., & Barsegov, V. (2011). Mechanism of fibrin (ogen) forced unfolding. *Structure*, 19(11), 1615-1624.
- [66] Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., & Meh, D. A. (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936(1), 11-30.

- [67] Medved, L., Weisel, J.W. (2009) Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), 355-359.
- [68] Everse, S. J., Spraggon, G., Veerapandian, L., Riley, M., & Doolittle, R. F. (1998). Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 37(24), 8637-8642.
- [69] Litvinov, R. I., Gorkun, O. V., Owen, S. F., Shuman, H., & Weisel, J. W. (2005). Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. *Blood*, 106(9), 2944-2951.
- [70] Yang, Z., Mochalkin, I., & Doolittle, R. F. (2000). A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14156-14161.
- [71] Vandooren, J., & Itoh, Y. (2021). Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. *Frontiers in immunology*, 12, 803244.
- [72] Straight, D. L., & McKee, P. A. (1982). Effect of protease binding by. alpha. 2-macroglobulin on intrinsic fluorescence. *Biochemistry*, 21(19), 4550-4556.
- [73] Feldman, S. R., Gonias, S. L., & Pizzo, S. V. (1985). Model of alpha 2-macroglobulin structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(17), 5700-5704.
- [74] Matthijs, G., Devriendt, K., Cassiman, J. J., Van den Berghe, H., & Marynen, P. (1992). Structure of the human alpha-2 macroglobulin gene and its promotor. *Biochemical and biophysical research communications*, 184(2), 596-603.
- [75] Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Kristensen, T., Lønblad, P. B., Jones, C. M., Wierzbicki, D. M., ... & Lundwall, A. (1985). Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(1), 9-13.
- [76] Janssen, B. J., Huizinga, E. G., Raaijmakers, H. C., Roos, A., Daha, M. R., Nilsson-Ekdahl, K., ... & Gros, P. (2005). Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, 437(7058), 505-511.
- [77] Facchiano, F., D'Arcangelo, D., & Facchiano, A. (2024). Alpha-2-Macroglobulin Is a Novel Anticancer Agent. *Oncology*, 102(7), 641-645.
- [78] Lee, J., Park, H. S., Han, S. R., Kang, Y. H., Mun, J. Y., Shin, D. W., ... & Park, J. (2022). Alpha-2-macroglobulin as a novel diagnostic biomarker for human bladder cancer in urinary extracellular vesicles. *Frontiers in Oncology*, 12, 976407.
- [79] Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., ... & Tanzi, R. E. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics*, 19(4), 357-360.
- [80] Marrero, A., Duquerroy, S., Trapani, S., Goulas, T., Guevara, T., Andersen, G. R., ... & Gomis-Rüth, F. X. (2012). The crystal structure of human α 2-macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(14), 3340-3344.
- [81] Jenner, L., Husted, L., Thirup, S., Sottrup-Jensen, L., & Nyborg, J. (1998). Crystal structure of the receptor-binding domain of α 2-macroglobulin. *Structure*, 6(5), 595-604.
- [82] Arimura, Y., & Funabiki, H. (2022). Structural mechanics of the alpha-2-macroglobulin transformation. *Journal of molecular biology*, 434(5), 167413.
- [83] Hill, R. & Konigsberg, W., D. (1962). The Structure of Human Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 237(8), 2547-2561.

- [84] Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: structure, function and allostery. *Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins*, 345-382.
- [85] Safo, M. K., Abdulmalik, O., Lin, H. R., Asakura, T., & Abraham, D. J. (2005). Structures of R- and T-state hemoglobin Bassett: elucidating the structural basis for the low oxygen affinity of a mutant hemoglobin. *Biological Crystallography*, 61(2), 156-162.
- [86] Yuan, Y., Tam, M. F., Simplaceanu, V., & Ho, C. (2015). New look at hemoglobin allostery. *Chemical reviews*, 115(4), 1702-1724.
- [87] Lukin, J. A., & Ho, C. (2004). The structure– function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. *Chemical reviews*, 104(3), 1219-1230.
- [88] Winter, P. M., & Miller, J. N. (1976). Carbon monoxide poisoning. *Jama*, 236(13), 1502-1504.
- [89] Lonergan, G. J., Cline, D. B., & Abbondanzo, S. L. (2001). Sick cell anemia. *Radiographics*, 21(4), 971-994.
- [90] Pelley, J. W. (n.d.). *Protein structure and function*. In *Elsevier's integrated review: Biochemistry*. Elsevier.
- [91] Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 12(1), 88-118.
- [92] Koshland Jr, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1), 365-385.
- [93] Fanali, G., Di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular aspects of medicine*, 33(3), 209-290.
- [94] Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, 12(6), 439-446.
- [95] Carter, D. C., He, X. M., Munson, S. H., Twigg, P. D., Gernert, K. M., Broom, M. B., & Miller, T. Y. (1989). Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, 244(4909), 1195-1198.
- [96] Guizado, T. C. (2014). Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of molecular modeling*, 20(10), 2450.
- [97] Sudlow, G. D. J. B., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, 11(6), 824-832.
- [98] Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., ... & Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB life*, 57(12), 787-796.
- [99] Simard, J. R., Zunszain, P. A., Hamilton, J. A., & Curry, S. (2006). Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *Journal of molecular biology*, 361(2), 336-351.
- [100] Fujiwara, S. I., & Amisaki, T. (2008). Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method. *Biophysical journal*, 94(1), 95-103.
- [101] G.I. Nordby, J.M. Luck. (1956). PFOA interactions with HSA, *Journal of Biological Chemistry* 219.
- [102] Liu, X., Fang, M., Xu, F., & Chen, D. (2019). Characterization of the binding of per-and poly-fluorinated substances to proteins: A methodological review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 177-185.

- [103] B Fortela, D. L., Mikolajczyk, A. P., Carnes, M. R., Sharp, W., Revellame, E., Hernandez, R., ... & Zappi, M. E. (2024). Predicting molecular docking of per-and polyfluoroalkyl substances to blood protein using generative artificial intelligence algorithm DiffDock. *Biotechniques*, 76(1), 14-26.
- [104] Starnes, H. M., Jackson, T. W., Rock, K. D., & Belcher, S. M. (2024). Quantitative cross-species comparison of serum albumin binding of per-and polyfluoroalkyl substances from five structural classes. *Toxicological Sciences*, 199(1), 132-149.
- [105] Fischer, F. C., Ludtke, S., Thackray, C., Pickard, H. M., Haque, F., Dassuncao, C., ... & Sunderland, E. M. (2024). Binding of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) to serum proteins: implications for toxicokinetics in humans. *Environmental science & technology*, 58(2), 1055-1063.
- [106] van der Vusse, G. J. (2009). Albumin as fatty acid transporter. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(4), 300-307.
- [107] Forsthuber, M., Kaiser, A. M., Granitzer, S., Hassl, I., Hengstschläger, M., Stangl, H., & Gundacker, C. (2020). Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environment international*, 137, 105324.
- [108] Zhang, X., Chen, L., Fei, X. C., Ma, Y. S., & Gao, H. W. (2009). Binding of PFOS to serum albumin and DNA: insight into the molecular toxicity of perfluorochemicals. *BMC molecular biology*, 10(1), 16.
- [109] Wang, Y., Zhang, H., Kang, Y., & Cao, J. (2016). Effects of perfluorooctane sulfonate on the conformation and activity of bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 66-73.
- [110] Bischel, H. N., MacManus-Spencer, L. A., Zhang, C., & Luthy, R. G. (2011). Strong associations of short-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin and investigation of binding mechanisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(11), 2423-2430.
- [111] Alesio, J. L., Slitt, A., & Bothun, G. D. (2022). Critical new insights into the binding of poly-and perfluoroalkyl substances (PFAS) to albumin protein. *Chemosphere*, 287, 131979.
- [112] Chen, Y. M., & Guo, L. H. (2009). Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Archives of toxicology*, 83(3), 255-261.
- [113] Salvalaglio, M., Muscionico, I., & Cavallotti, C. (2010). Determination of energies and sites of binding of PFOA and PFOS to human serum albumin. *The journal of physical chemistry B*, 114(46), 14860-14874.
- [114] Maso, L., Trande, M., Liberi, S., Moro, G., Daems, E., Linciano, S., ... & Angelini, A. (2021). Unveiling the binding mode of perfluorooctanoic acid to human serum albumin. *Protein Science*, 30(4), 830-841.
- [115] Crisalli, A. M., Cai, A., & Cho, B. P. (2023). Probing the interactions of perfluorocarboxylic acids of various chain lengths with human serum albumin: Calorimetric and spectroscopic investigations. *Chemical research in toxicology*, 36(4), 703-713.
- [116] D'eon, J. C., Simpson, A. J., Kumar, R., Baer, A. J., & Mabury, S. A. (2010). Determining the molecular interactions of perfluorinated carboxylic acids with human sera and isolated human serum albumin using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1678-1688.
- [117] Perera, N. D., Betancourt, J., Miksovská, J., & O'Shea, K. E. (2023). Detail study on the interaction between perfluorooctanoic acid (PFOA) with human hemoglobin (Hb). *Current research in toxicology*, 5, 100130.

- [118] Qin, P., Liu, R., & Teng, Y. (2011). Perfluorodecanoic acid binding to hemoproteins: new insights from spectroscopic studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 3246-3252.
- [119] Yang, Y. D., Lu, N., & Tian, R. (2024). The interaction of perfluorooctane sulfonate with hemoproteins and its relevance to molecular toxicology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 128069.
- [120] Trousdale, R. C., Tokmina-Lukaszewska, M., Bothner, B., & Walker, R. A. (2025). Perfluorooctanoic Acid Destabilizes Hemoglobin Structure at Submicromolar Concentrations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 129(21), 5217-5223.
- [121] Hu, X. Z., & Hu, D. C. (2009). Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Archives of toxicology*, 83(9), 851-861.
- [122] Xu, M., Cui, Z., Zhao, L., Hu, S., Zong, W., & Liu, R. (2018). Characterizing the binding interactions of PFOA and PFOS with catalase at the molecular level. *Chemosphere*, 203, 360-367.
- [123] Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp. 365-382). Totowa, NJ: Humana Press.
- [124] Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89.
- [125] Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in medicinal chemistry*, 60, 273-343.
- [126] Jain, A. N., & Nicholls, A. (2008). Recommendations for evaluation of computational methods. *Journal of computer-aided molecular design*, 22(3), 133-139.
- [127] Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., & DesJarlais, R. L. (2005). Docking: successes and challenges. *Current pharmaceutical design*, 11(3), 323-333.
- [128] Audie, J., & Scarlata, S. (2007). A novel empirical free energy function that explains and predicts protein-protein binding affinities. *Biophysical chemistry*, 129(2-3), 198-211.
- [129] Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 409-443.
- [130] Dias, R., de Azevedo, J., & Walter, F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, 9(12), 1040-1047.
- [131] Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical reviews*, 6(1), 75-87.
- [132] Li, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). An overview of scoring functions used for protein-ligand interactions in molecular docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11(2), 320-328.
- [133] Brooijmans, N., & Kuntz, I. D. (2003). Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 32(1), 335-373.
- [134] Pearce, B. C., Langley, D. R., Kang, J., Huang, H., & Kulkarni, A. (2009). E-novo: an automated workflow for efficient structure-based lead optimization. *Journal of chemical information and modeling*, 49(7), 1797-1809.
- [135] Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., & Corbeil, A. C. (2008). Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S7-S26.

- [136] Huang, S. Y., Grinter, S. Z., & Zou, X. (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 12899-12908.
- [137] Seyyedattar, M., Zendejboudi, S., & Butt, S. (2019). Molecular dynamics simulations in reservoir analysis of offshore petroleum reserves: A systematic review of theory and applications. *Earth-science reviews*, 192, 194-213.
- [138] Gromiha, M. M., Yugandhar, K., & Jemimah, S. (2017). Protein–protein interactions: scoring schemes and binding affinity. *Current opinion in structural biology*, 44, 31-38.
- [139] Graves, A. P., Brenk, R., & Shoichet, B. K. (2005). Decoys for docking. *Journal of medicinal chemistry*, 48(11), 3714-3728.
- [140] Meng, E. C., Shoichet, B. K., & Kuntz, I. D. (1992). Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of computational chemistry*, 13(4), 505-524.
- [141] Shoichet, B. K., Leach, A. R., & Kuntz, I. D. (1999). Ligand solvation in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 34(1), 4-16.
- [142] Goodsell, D. S., Morris, G. M., & Olson, A. J. (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of molecular recognition*, 9(1), 1-5.
- [143] Trott, O., & Olson, A. J. J. J. O. C. C. (2009). Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function. *Effic. Optim. Multithreading*, 31, 455-461.
- [144] Sarkar, A., Concilio, S., Sessa, L., Marrafino, F., & Piotto, S. (2024). Advancements and novel approaches in modified AutoDock Vina algorithms for enhanced molecular docking. *Results in Chemistry*, 7, 101319.
- [145] Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), 3891-3898.
- [146] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235-242.
- [147] Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 45(1), 177-182.
- [148] Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. (2016). The Cambridge structural database. *Structural Science*, 72(2), 171-179.
- [149] Ghasemi, J. B., Abdolmaleki, A., & Shiri, F. (2017). Molecular docking challenges and limitations. In *Pharmaceutical sciences: Breakthroughs in research and practice* (pp. 770-794). IGI Global Scientific Publishing.
- [150] Teodoro, M. L., Phillips, G. N., & Kavraki, L. E. (2001, May). Molecular docking: A problem with thousands of degrees of freedom. In *Proceedings 2001 ICRA. IEEE International Conference on Robotics and Automation* (Cat. No. 01CH37164) (Vol. 1, pp. 960-965). IEEE.
- [151] Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *International journal of molecular sciences*, 11(8), 3016-3034.
- [152] Hsieh, J. H., Yin, S., Wang, X. S., Liu, S., Dokholyan, N. V., & Tropsha, A. (2012). Cheminformatics meets molecular mechanics: a combined application of knowledge-based pose scoring and physical force field-based hit scoring functions improves the accuracy of structure-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 52(1), 16-28.

- [153] Issa, N. T., Badiavas, E. V., & Schürer, S. (2019). Research techniques made simple: Molecular docking in dermatology-A foray into in silico drug discovery. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(12), 2400-2408.
- [154] Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating p K prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic acids research*, 40(W1), W537-W541.
- [155] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., & Scalmani, G. (2016). Barone, GA Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, AV Marenich, J. Bloino, BG Janesko, R.
- [156] Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology*, 9(9), 646-652.
- [157] Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., ... & Shaw, D. E. (2006, November). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. In *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing* (pp. 84-es).
- [158] Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.
- [159] McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *nature*, 267(5612), 585-590.
- [160] Karplus, M., & Kuriyan, J. (2005). Molecular dynamics and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 6679-6685.
- [161] Osuna, S., Jimenez-Oses, G., Noey, E. L., & Houk, K. N. (2015). Molecular dynamics explorations of active site structure in designed and evolved enzymes. *Accounts of chemical research*, 48(4), 1080-1089.
- [162] Sinha, S., Tam, B., & Wang, S. M. (2022). Applications of molecular dynamics simulation in protein study. *Membranes*, 12(9), 844.
- [163] Allen, M. P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, 23(1), 1-28.
- [164] Salomon-Ferrer, R., Gotz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C. (2013). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *Journal of chemical theory and computation*, 9(9), 3878-3888.
- [165] Stone, J. E., Hallock, M. J., Phillips, J. C., Peterson, J. R., Luthey-Schulten, Z., & Schulten, K. (2016, May). Evaluation of emerging energy-efficient heterogeneous computing platforms for biomolecular and cellular simulation workloads. In *2016 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium Workshops (IPDPSW)* (pp. 89-100). IEEE.
- [166] Anderson, J. A., Lorenz, C. D., & Travesset, A. (2008). General purpose molecular dynamics simulations fully implemented on graphics processing units. *Journal of computational physics*, 227(10), 5342-5359.
- [167] Gajula, M. P., Kumar, A., & Ijaq, J. (2016). Protocol for molecular dynamics simulations of proteins. *Bio-protocol*, 6(23), e2051-e2051.
- [168] Netz, P., Hermes, LNdA.(2008). *Molecular Dynamics Simulations of Proteins: Theory and Applications*.

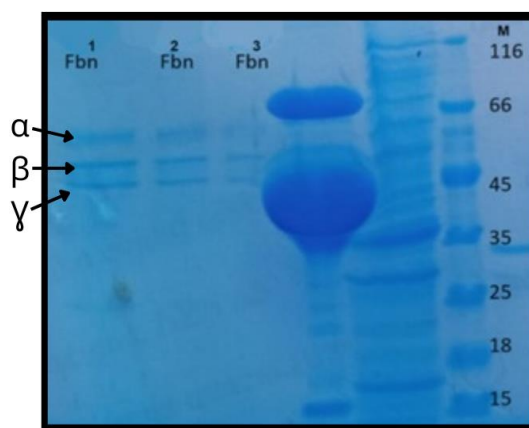
- [169] Solov'yov, A. V., Verkhovtsev, A. V., Mason, N. J., Amos, R. A., Bald, I., Baldacchino, G., ... & Solov'yov, I. A. (2024). Condensed matter systems exposed to radiation: multiscale theory, simulations, and experiment. *Chemical reviews*, 124(13), 8014-8129.
- [170] Senn, H. M., & Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198-1229.
- [171] Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling: principles and applications*. Pearson education.
- [172] Verlet, L. (1967). Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review*, 159(1), 98.
- [173] Riniker, S. (2018). Fixed-charge atomistic force fields for molecular dynamics simulations in the condensed phase: An overview. *Journal of chemical information and modeling*, 58(3), 565-578.
- [174] Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, 106(5), 1589-1615.
- [175] Wu, W., Owino, J., Al-Ostaz, A., & Cai, L. (2014, May). Applying periodic boundary conditions in finite element analysis. In *SIMULIA community conference*, Providence (pp. 707-719).
- [176] Bogetti, A. T., Mostofian, B., Dickson, A., Pratt, A. J., Saglam, A. S., Harrison, P. O., ... & Chong, L. T. (2019). A suite of tutorials for the WESTPA rare-events sampling software [Article v1.0]. *Living journal of computational molecular science*, 1(2), 10607.
- [177] Katiyar, R. S., & Jha, P. K. (2018). Molecular simulations in drug delivery: Opportunities and challenges. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 8(4), e1358.
- [178] Roe, D. R., & Brooks, B. R. (2020). A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, 153(5).
- [179] Ruymgaart, A. P., & Elber, R. (2012). Revisiting molecular dynamics on a CPU/GPU system: Water kernel and shake parallelization. *Journal of chemical theory and computation*, 8(11), 4624-4636.
- [180] Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25.
- [181] Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1781-1802.
- [182] Kollman, P., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Pearlman, D. A., Case, D. A., DeBolt, S., ... & Seibel, G. (2002). AMBER: a program for simulation of biological and organic molecules. *Encyclopedia of computational chemistry*, 1.
- [183] Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. A., & Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.
- [184] Gajula, M. P., Kumar, A., & Ijaq, J. (2016). Protocol for molecular dynamics simulations of proteins. *Bio-protocol*, 6(23), e2051-e2051.
- [185] Benson, N. C., & Daggett, V. (2012). A comparison of multiscale methods for the analysis of molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(29), 8722-8731.
- [186] Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery*, 10(5), 449-461.

- [187] Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Piana, S., Eastwood, M. P., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2012). Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PloS one*, 7(2), e32131.
- [188] Goh, G. B., Hulbert, B. S., Zhou, H., & Brooks III, C. L. (2014). Constant pH molecular dynamics of proteins in explicit solvent with proton tautomerism. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 82(7), 1319-1331.
- [189] Miao, Y., Feher, V. A., & McCammon, J. A. (2015). Gaussian accelerated molecular dynamics: unconstrained enhanced sampling and free energy calculation. *Journal of chemical theory and computation*, 11(8), 3584-3595.
- [190] Pang, Y. T., Miao, Y., Wang, Y., & McCammon, J. A. (2017). Gaussian accelerated molecular dynamics in NAMD. *Journal of chemical theory and computation*, 13(1), 9-19.
- [191] Vidal-Limon, A., Aguilar-Toalá, J. E., & Liceaga, A. M. (2022). Integration of molecular docking analysis and molecular dynamics simulations for studying food proteins and bioactive peptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(4), 934-943.
- [192] Aci-Sèche, S., Ziada, S., Braka, A., Arora, R., & Bonnet, P. (2016). Advanced molecular dynamics simulation methods for kinase drug discovery. *Future medicinal chemistry*, 8(5), 545-566.
- [193] Bussi, G., & Laio, A. (2020). Using metadynamics to explore complex free-energy landscapes. *Nature Reviews Physics*, 2(4), 200-212.
- [194] Laio, A., & Parrinello, M. (2002). Escaping free-energy minima. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(20), 12562-12566.
- [195] Gligorijević, N., Minić, S., Robajac, D., Nikolić, M., Veličković, T. Ć., & Nedić, O. (2019). Characterisation and the effects of bilirubin binding to human fibrinogen. *International journal of biological macromolecules*, 128, 74-79.
- [196] Bi, S., Ding, L., Tian, Y., Song, D., Zhou, X., Liu, X., & Zhang, H. (2004). Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 703(1-3), 37-45.
- [197] Barinov, N. A., Pavlova, E. R., Tolstova, A. P., Matveeva, A. G., Moskalets, A. P., Dubrovin, E. V., & Klinov, D. V. (2022). Myeloperoxidase-induced fibrinogen unfolding and clotting. *Microscopy Research and Technique*, 85(7), 2537-2548.
- [198] Klykov, O., Van Der Zwaan, C., Heck, A. J., Meijer, A. B., & Scheltema, R. A. (2020). Missing regions within the molecular architecture of human fibrin clots structurally resolved by XL-MS and integrative structural modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(4), 1976-1987.
- [199] Rehman, A. A., Sarwar, T., Arif, H., Ali, S. S., Ahsan, H., Tabish, M., & Khan, F. H. (2017). Spectroscopic and thermodynamic studies on ferulic acid- α -2-macroglobulin interaction. *Journal of Molecular Structure*, 1144, 254-259.
- [200] Bonner, J. C., Goodell, A. L., Lasky, J. A., & Hoffman, M. R. (1992). Reversible binding of platelet-derived growth factor-AA,-AB, and-BB isoforms to a similar site on the "slow" and "fast" conformations of α 2-macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12837-12844.
- [201] Kotlarz, N., McCord, J., Collier, D., Lea, C. S., Strynar, M., Lindstrom, A. B., ... & Hoppin, J. A. (2020). Measurement of novel, drinking water-associated PFAS in blood from adults and children in Wilmington, North Carolina. *Environmental health perspectives*, 128(7), 077005.

- [202] Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Olsen, G. W., Chang, S. C., & Butenhoff, J. L. (2007). Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals. *Environmental research*, 103(2), 176-184.
- [203] Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.
- [204] Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., ... & Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439-D444.
- [205] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* 596 (2021) 583–589.
- [206] Šunderić, M., Vasović, T., Milčić, M., Miljević, Č., Nedić, O., Nikolić, M. R., & Gligorijević, N. (2021). Antipsychotic clozapine binding to alpha-2-macroglobulin protects interacting partners against oxidation and preserves the anti-proteinase activity of the protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 502-512.
- [207] Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., & Kollman, P. A. (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(40), 10269-10280.
- [208] Li, P., & Merz Jr, K. M. (2016). MCPB. py: A python based metal center parameter builder.
- [209] Li, P., & Merz Jr, K. M. (2020). Parameterization of a dioxygen binding metal site using the MCPB. py program. In *Structural Genomics: General Applications* (pp. 257-275). New York, NY: Springer US.
- [210] Seminario, J. M. (1996). Calculation of intramolecular force fields from second-derivative tensors. *International journal of quantum chemistry*, 60(7), 1271-1277.
- [211] Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
- [212] Roe, D. R., & Cheatham III, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of chemical theory and computation*, 9(7), 3084-3095.
- [213] Arp, H. P. H., Gredelj, A., Gluge, J., Scheringer, M., & Cousins, I. T. (2024). The global threat from the irreversible accumulation of trifluoroacetic acid (TFA). *Environmental Science & Technology*, 58(45), 19925-19935.
- [214] De Toni, L., Radu, C. M., Sabovic, I., Di Nisio, A., Dall'Acqua, S., Guidolin, D., ... & Foresta, C. (2020). Increased cardiovascular risk associated with chemical sensitivity to perfluoro-octanoic acid: role of impaired platelet aggregation. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 399.
- [215] Rinderknecht, H., & Geokas, M. C. (1973). On the physiological role of α 2-macroglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 295(1), 233-244.
- [216] Garcia-Ferrer, I., Marrero, A., Gomis-Rüth, F. X., & Goulas, T. (2017). α 2-macroglobulins: structure and function. *Macromolecular protein complexes: structure and function*, 149-183.

- [217] Šunderić, M., Gligorijević, N., Milčić, M., Minić, S., Nedić, O., & Nikolić, M. (2024). Phycocyanobilin is a new binding partner of human alpha-2-macroglobulin that protects the protein against oxidative stress. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(17), 8761-8771.
- [218] Yildiz, P., & Ozcan, S. (2023). A single protein to multiple peptides: Investigation of protein-peptide correlations using targeted alpha-2-macroglobulin analysis. *Talanta*, 265, 124878.
- [219] Yang, Y. D., Lu, N., & Tian, R. (2024). The interaction of perfluorooctane sulfonate with hemoproteins and its relevance to molecular toxicology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 128069.
- [220] Baldwin, J., & Chothia, C. (1979). Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *Journal of molecular biology*, 129(2), 175-220.
- [221] Perutz, M. F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem-haem interaction and the problem of allostery. *Nature*, 228(5273), 726-734.
- [222] Kondo, H. X., Kanematsu, Y., Masumoto, G., & Takano, Y. (2023). PyDISH: database and analysis tools for heme porphyrin distortion in heme proteins. *Database*, 2023, baaa066.
- [223] Maréchal, J. D., Maseras, F., Lledós, A., Mouawad, L., & Perahia, D. (2006). A DFT study on the relative affinity for oxygen of the α and β subunits of hemoglobin. *Journal of computational chemistry*, 27(12), 1446-1453.
- [224] Wu, Y., Bao, J., Liu, Y., Wang, X., Lu, X., & Wang, K. (2024). In vitro and in silico analysis of the bindings between legacy and novel per-and polyfluoroalkyl substances and human serum albumin. *Toxics*, 12(1), 46.
- [225] Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, 43(W1), W443-W447.

8. PRILOZI



Slika P1. SDS elektroforeza humanog fibrinogena. U prvom bunaru (s leva nadesno) je uzorak fibrinogena razblažen 10x (10xR), u drugom 25xR, a u trećem 50xR; sve tri subjednice proteina su označene kao α , β , γ ; u poslednjem obeleženom bunaru su proteinski markeri, označenih molekulskih masa (15–116 kDa).

Biografija autora

Aleksandra (Milan) Đurđević Đelmaš rođena je 21. oktobra 1992. godine. Osnovnu školu „Ujedinjene nacije“ završila je u Beogradu kao nosilac Vukove diplome. Srednju medicinsku školu „Zvezdara“ završila je 2011. godine sa odličnim uspehom.

Osnovne akademske studije upisala je 2011. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek Biohemija, a završila ih je 2016. godine sa prosečnom ocenom 8,39 (osam i 39/100). Iste godine upisala je master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemija, koje je završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,80 (devet i 80/100).

Doktorske akademske studije upisala je 2017. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Tokom 2018. godine boravila je kao istraživač na Fraunhofer institutu u Ahenu (Nemačka), kao stipendista FEBS programa za saradnju u Centralnoj i Istočnoj Evropi. Od oktobra iste godine bila je zaposlena na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, a od 2019. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač-pripravnik.

Tokom 2020. godine bila je član tima na projektu *SMART Repurposing*, finansiranom od strane Fonda za nauku Republike Srbije. Tokom doktorskih studija bila je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetima: Hemija prirodnih proizvoda, Regulacija biohemijskih procesa, Biohemija metabolizma i Ogledi u nastavi biohemije. Doktorske studije na studijskom programu Hemija, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je 2023. godine.

Aleksandra Đurđević Đelmaš je koautor šest radova publikovanih u časopisima kategorija M21a (1), M21 (3), M22 (1) i M23 (1), kao i četiri saopštenja prezentovana na međunarodnim skupovima, štampana u izvodu M34.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора **Александра М. Ђурђевић Ђелмаш**

Број индекса **ДХ20/2023**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена молекулског моделовања и експерименталних метода у циљу проучавања утицаја перфлуоралкилованих супстанци на хумане протеине крви

- 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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Александра М. Ђурђевић Ђелмаш**
Број индекса **ДХ20/2023**
Наслов рада **Примена молекулског моделовања и
експерименталних метода у циљу проучавања утицаја
перфлуоралкилованих супстанци на хумане протеине крви**

Ментор **Проф. др Милош Милчић**

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.

Потпис аутора

У Београду, _____

Образац 7.

Изјава о коришћењу

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

Примена молекулског моделовања и експерименталних метода у циљу проучавања утицаја перфлуоралкилованих супстанци на хумане протеине крви 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).

Потпис аутора

У Београду, _____

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.