

Metode i metodologija fizičkohemijskih istraživanja

Metode i metodologija u biofizičkoj hemiji

Ana Popović-Bijelić



10.12.2020.

Biofizička hemija proučava

Strukturu, oblik, konformaciju biomolekula

Konformacione promene i dinamiku tih promena

Interakcije između biomolekula

Mehanizme po kojima se odvijaju biološke funkcije molekula

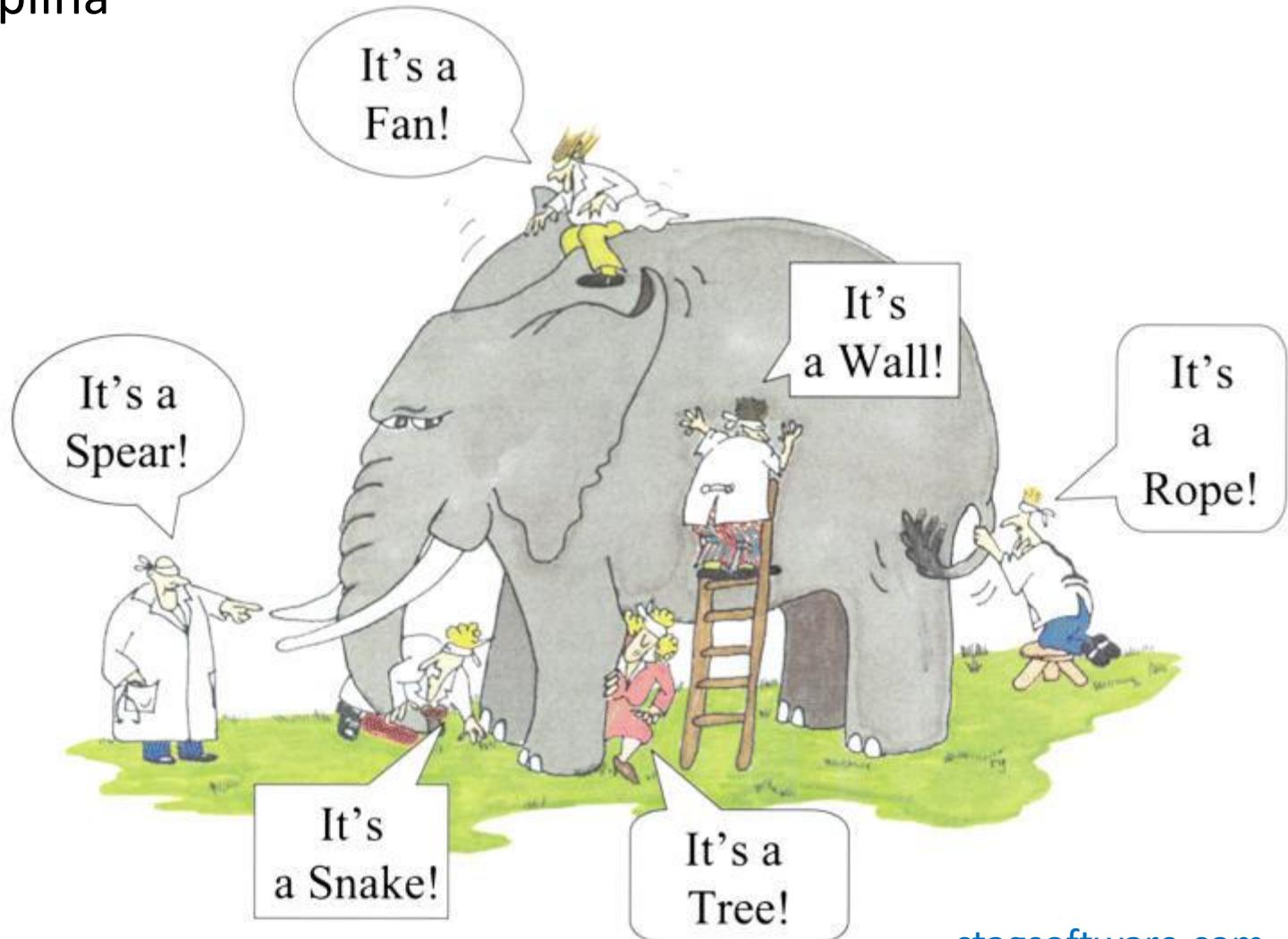
Efekte toplote, zvuka, zračenja, reaktivnih hemijskih vrsta itd.
na biosisteme

Šta je uzorak?

- Organizam
 - Tkivo
 - Ćelija
 - Ćelijska organela
 - Biomolekul
 - Biohemijska reakcija
-
- *In vivo*
 - *Ex vivo*
 - *In vitro*

Biofizička hemija – timski rad

Interdisciplinarna naučna oblast – integriše znanja i metode iz različitih disciplina

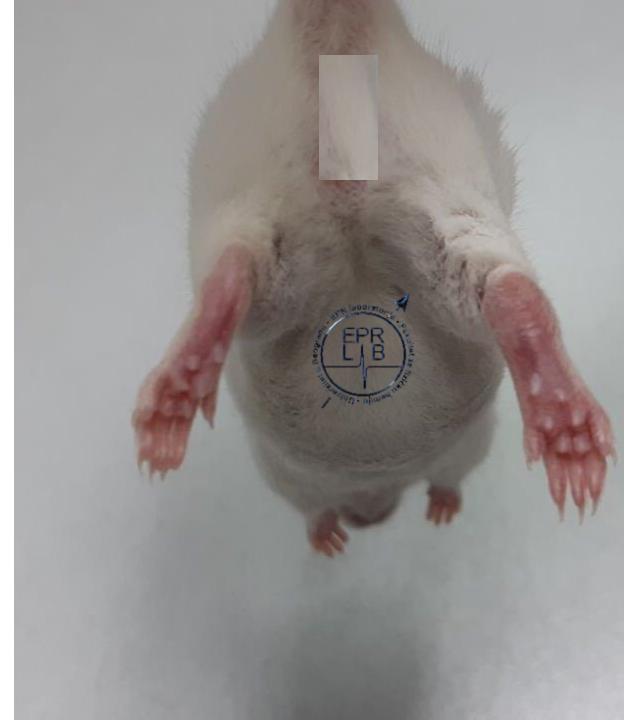


Etička pitanja

Direktiva 2010/63/EU - EU zakon o zaštiti životinja koje se koriste u naučno-istraživačke svrhe

„Dostupna su nova naučna saznanja u pogledu faktora koji utiču na dobrobit životinja kao i sposobnost životinja da oseća i izraže bol, patnju, stres i trajno oštećenje. Stoga je potrebno unaprediti dobrobit životinja koje se koriste u naučno-istraživačkim postupcima podizanjem minimalnih standarda za njihovu zaštitu u skladu s najnovijim razvojem nauke.“

„Iako je poželjno zameniti korišćenje živih životinja u postupcima drugim metodama koje ne uključuju žive životinje, korišćenje živih životinja i dalje je potrebno radi zaštite zdravlja ljudi, životinja i okoline.“



Procena:

- 1. Naučna opravdanost
 - 2. Primena 3R (*Replace, Reduce, Refine*)
 - 3. Korist (šta, za koga, kako, kada?)
 - 4. Šteta
 - 5. Verovatnoća uspeha
- !!!

Statistika

Najvažnije pitanje u radu sa eksperimentalnim životnjama:
Kako odrediti optimalan broj životinja?

Šta je optimalan broj?

Minimalan broj ali relevantan za statistiku

Premali broj dovodi do greške jer se ne uzima različitost biosistema
Preveliki broj dovodi do nepotrebnog žrtvovanja životinja

Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments
Using Laboratory Animals

Michael F. W. Festing and Douglas G. Altman

ILAR Journal, Volume 43, Issue 4, 2002, 244–258.

Neka pitanja i zadaci za biofizičara

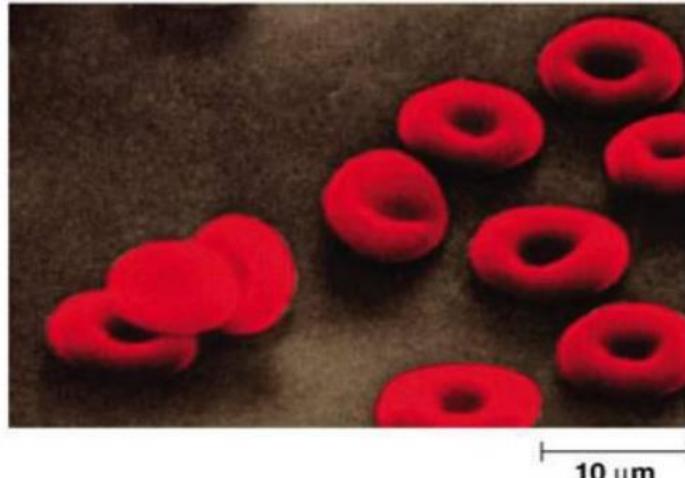
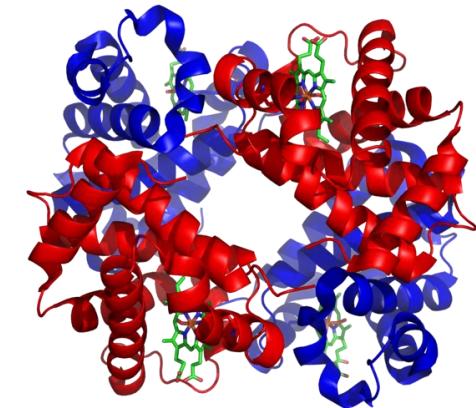
- Fundamentalna istraživanja
- Primena u medicini, farmaciji, ekologiji
- Najvažnije je znati odabrati odgovarajući model sistema i odgovarajuću metodu (tehniku)
- A to znači, stvarno razumeti:
 - Pitanje na koje treba odgovoriti
 - Biologiju/biohemiju/fizičku hemiju procesa koji se proučava
 - Princip rada tehnike

Neka pitanja i zadaci za biofizičara

- Odrediti **strukturu** biomolekula
- Povezati je sa njenom **funkcijom**
- Biohemski procesi – reaktanti, intermedijeri, produkti, aktivatori, inhibitori
- Kako rade **lekovi**, sa kojim biomolekulima interaguju, da li biomolekul ili reakcija mogu da budu meta
- Dizajn novih lekova – nove rute za isporuku lekova
- Pronalaženje **biomarkera** za bolesti

Zašto nas interesuje struktura biomolekula? Primer – protein hemoglobin

Samo jedna AK u primarnoj strukturi je pogrešna, izmenjen oblik Hb, izmenjen oblik eritrocita, srasta anemija



Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	...
1	2	3	4	5	6	7	

Normalni eritrociti i 1^o struktura Hb



Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	...
1	2	3	4	5	6	7	

Eritrociti kod srpaste anemije
i 1^o struktura njihovog Hb

Ciljana isporuka lekova - lipozomi



DEFICIENCY FORTIFERRUM®+ MEET FORTIFERRUM®+ ABOUT US CONTACT



WHAT IS FORTIFERRUM®+?

FORTIFERRUM®+ is a liposomal iron supplement indicated for iron deficiency states and increased needs of this mineral, such as occurs during pregnancy and lactation, as well as for conditions that can cause iron deficiency anemia (iron deficiency anemia) or other diseases associated with iron deficiency.

FORTIFERRUM®+ is a last generation liposomal iron with a complete formula designed to meet all daily needs of iron supplementation recommended by WHO and Medical Associations worldwide.

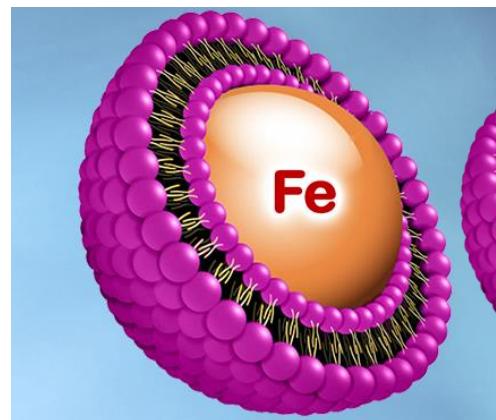
FORTIFERRUM®+ is presented in an innovative format of powder that can be taken directly without water, being indicated for all people but especially children's, pregnant women and vegetarians, because they don't eat meat, poultry or seafood and their needs of iron are almost twice than others.

FORTIFERRUM®+ HEALTH BENEFITS:

According to (EU) REGULATION No 432/2012 from EUROPEAN COMMISSION, the iron presents a group of healthy properties that contribute to a reduction of the risk related to the onset of diseases caused by deficiency of this mineral.

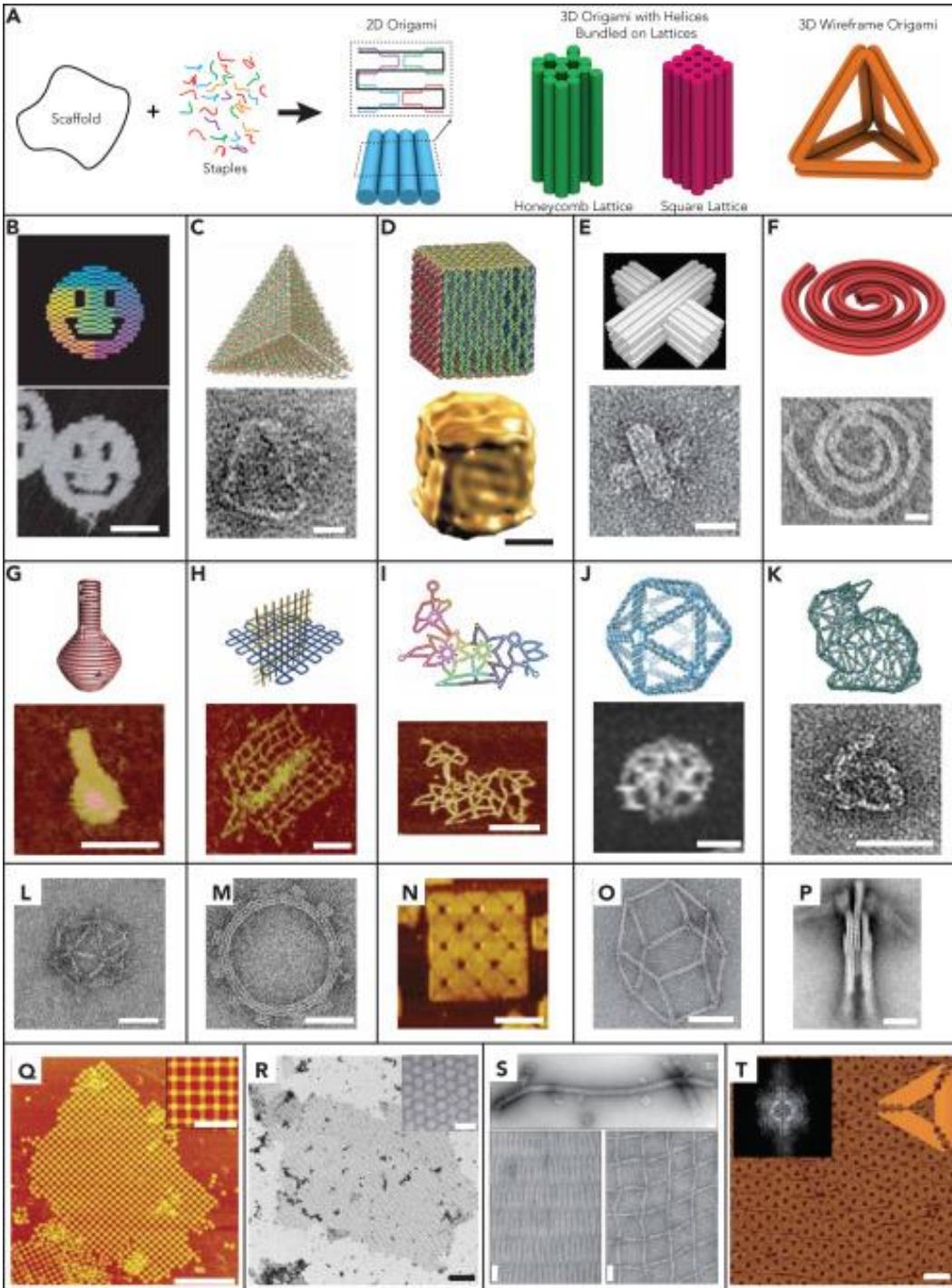
The benefits from FORTIFERRUM®+ for the health are:

- Contributes to the normal formation of red blood cells and hemoglobin;
- Contributes to normal oxygen transport in the body;
- Contributes to the normal functioning of the immune system;
- Contributes to the normal energy metabolism;
- Contributes to the normal cognitive function;
- Contributes to increase iron absorption;
- Contributes to the reduction of tiredness and fatigue.



Ciljana isporuka lekova DNK origami

Posebno važna
primena za ciljanu
dostavu **antikancer**
lekova koji su **slabo**
rastvorljivi, nestabilni,
citotoksični



Metode u biofizičkoj hemiji

Tehnike koje služe za proučavanje strukture, osobina i funkcije (dinamike) biomolekula na atomskom ili molekulskom nivou

Spektroskopije

Mikroskopije

Elektrofiziološke tehnike

....

Molekulsko modeliranje

Tehnike za pripremu uzorka

- Centrifugiranje
- Hromatografija
- Elektroforeza

Wet Lab

Fizičkohemiske metode u biofizičkoj hemiji

- UV/vis (ULj/vid) spektroskopija
- Infracrvena spektroskopija
- Ramanska spektroskopija
- Fluorescentna spektroskopija
- Cirkularni dihroizam
- Rendgeno-struktturna analiza (spektroskopija X-zracima)
- NMR/MRI
- EPR/EPRI
- Konfokalna mikroskopija
- SEM, TEM, AFM
- Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS)
- Masena spektrometrija
- Kalorimetrijske tehnike (DSC, ITC, termodinamička kalorimetrija)
- Peč-klemp tehnika (metoda nametnute voltaže)

...

Spektroskopije

Za bilo koju spektroskopiju su nam potrebni

Izvor zračenja

Uzorak

Detektor

Za magnetnu spektroskopiju nam još treba

Magnetno polje

U spektroskopijama, skeniramo po ν tj. λ

I u magnetnim, može da se varira ν (NMR, MCD)

a kod EPR: $\nu = \text{const}$, i skeniramo po B ("klasični" *continuous wave* spektrometri)

UV/vis

Neophodan u svim laboratorijama

Brza identifikacija

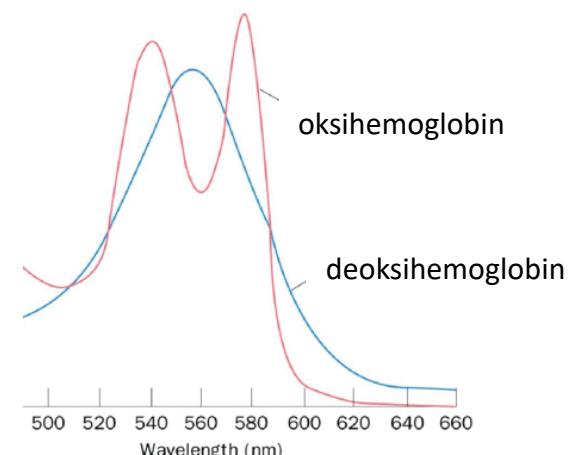
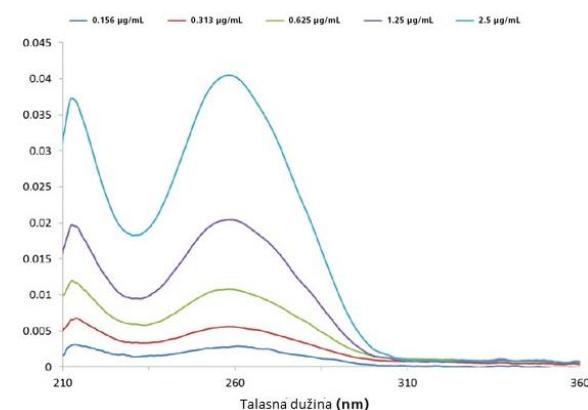
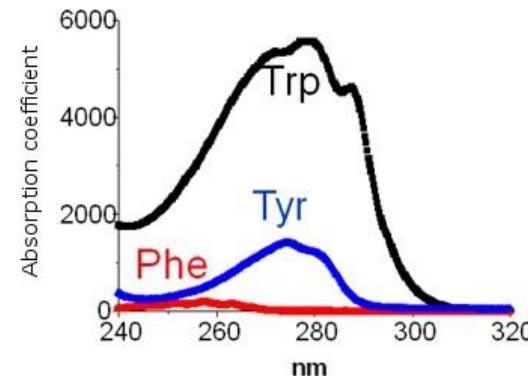
Može kvali ali uglavnom za kvanti

Proteini apsorbuju na **280 nm**

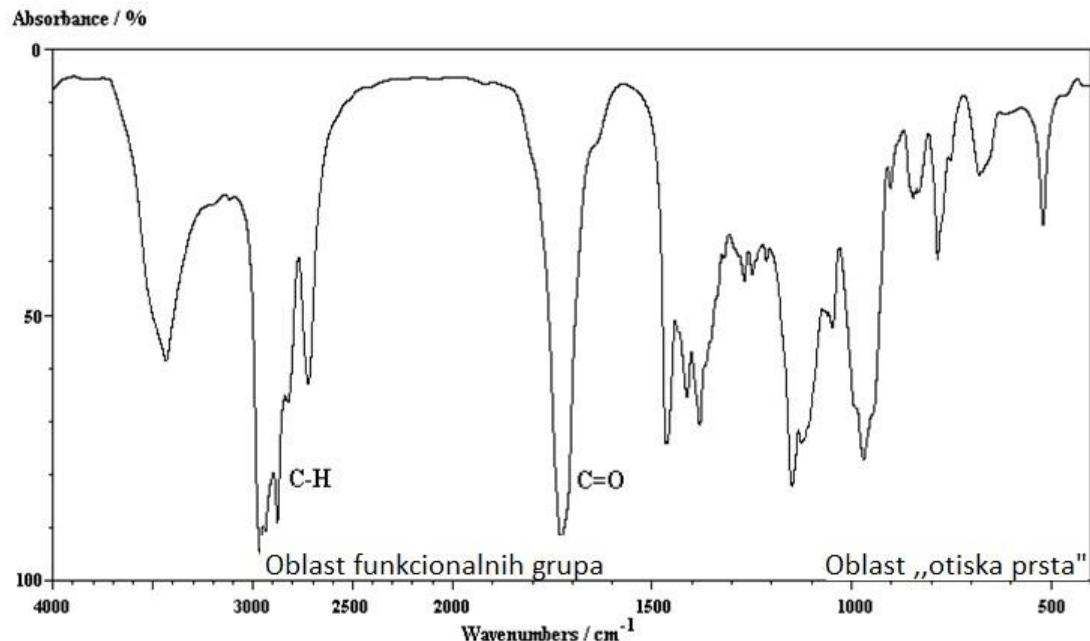
Nukleinske kiseline apsorbuju na **260 nm**

Biomolekuli koji sadrže metale (**vis**)

Sistemi sa konjugovanim = vezama (**UV**)



IC, FTIC



Srednja oblast

-CH3	1460 cm^{-1}
-CH2-	2930/2860 cm^{-1}
C-H	3300 cm^{-1}
-C-C-	1165 cm^{-1}
C=O	1730 cm^{-1} (zavisi od supstituenata)
Arom.	3060 cm^{-1} (fenilalanin, tirozin, triptofan)
SH	2580 cm^{-1} (cistein)
-C=N-	1600 cm^{-1}

Bliska (14000-4000 cm^{-1}) – za analizu proteina, nukleinskih kiselina, lipida, ugljenih hidrata

Srednja (4000-400 cm^{-1}) – najčešće korišćena oblast, osnovni modovi vibracija, jak intenzitet spekta

Daleka (400-10 cm^{-1}) – nije značajna, ali postoje rotacioni prelazi složenijih molekula, od male važnosti u analitici

Može kvali i kvanti.

Voda je problem - apsorbuje IC

Ima trake na 3600 do 3200 cm^{-1} , 1645 cm^{-1}

Primena metoda IC spektroskopije u analizi bioloških uzoraka

- Mogu se ispitivati različiti tipovi uzoraka: krv, urin, znoj, pljuvačka, serum, amniotska tečnost, izolovane ćelije, brisevi, uzorci tkiva, bakterijske kulture.
- IC spektroskopija zahteva pripremu uzorka – brzo sušenje i oduzimanje spektra vode ili korišćenje ATR tehnikе, tkiva se presuju između pogodnih supstrata.
- Kod složenih sistema se može koristiti kombinacija D_2O i H_2O u analizi, ali ograničeno zbog bioloških uzoraka.

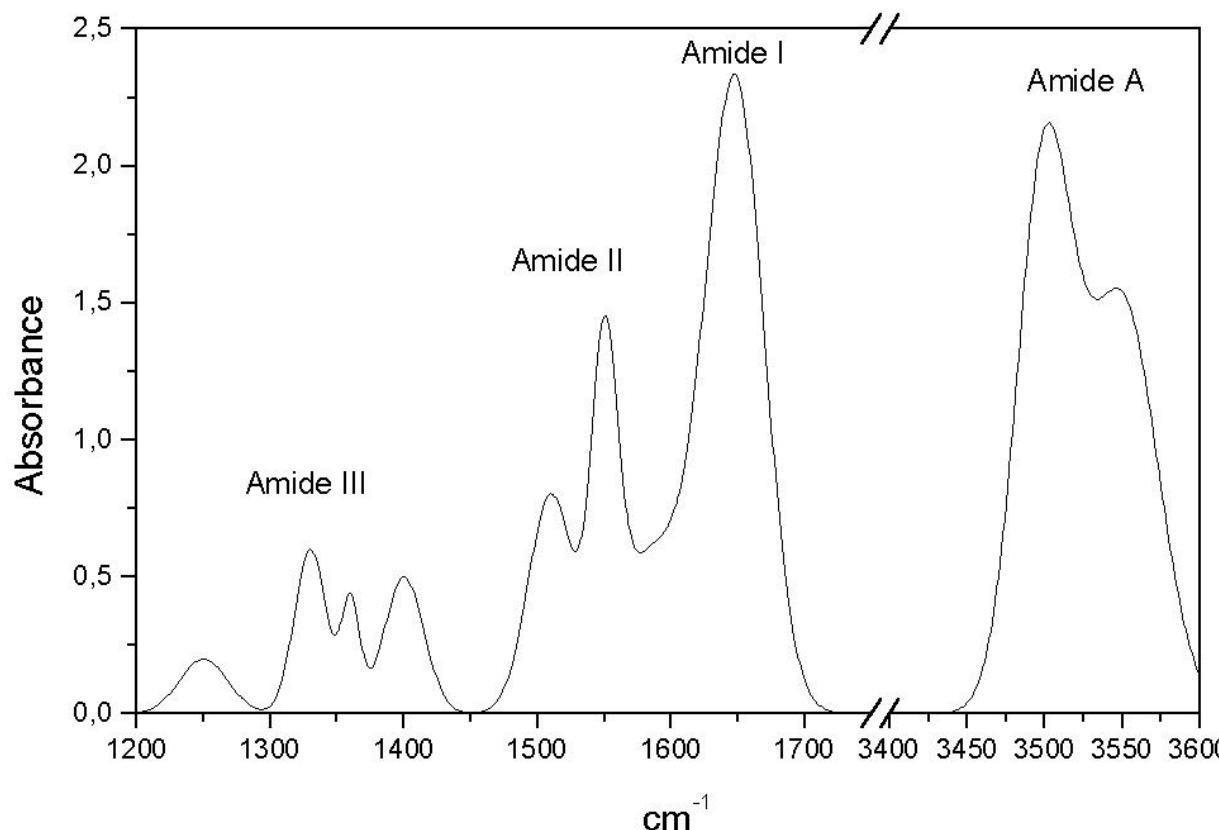
ATR (Attenuated Total Reflection) – primena kod čvrstih i tečnih uzoraka. Dobro za ispitivanje bioloških uzoraka zbog malog prolaska zraka u uzorak, tako da nema pripreme i oštećenja uzorka.

IC, FTIC - proteini

Najvažnije trake

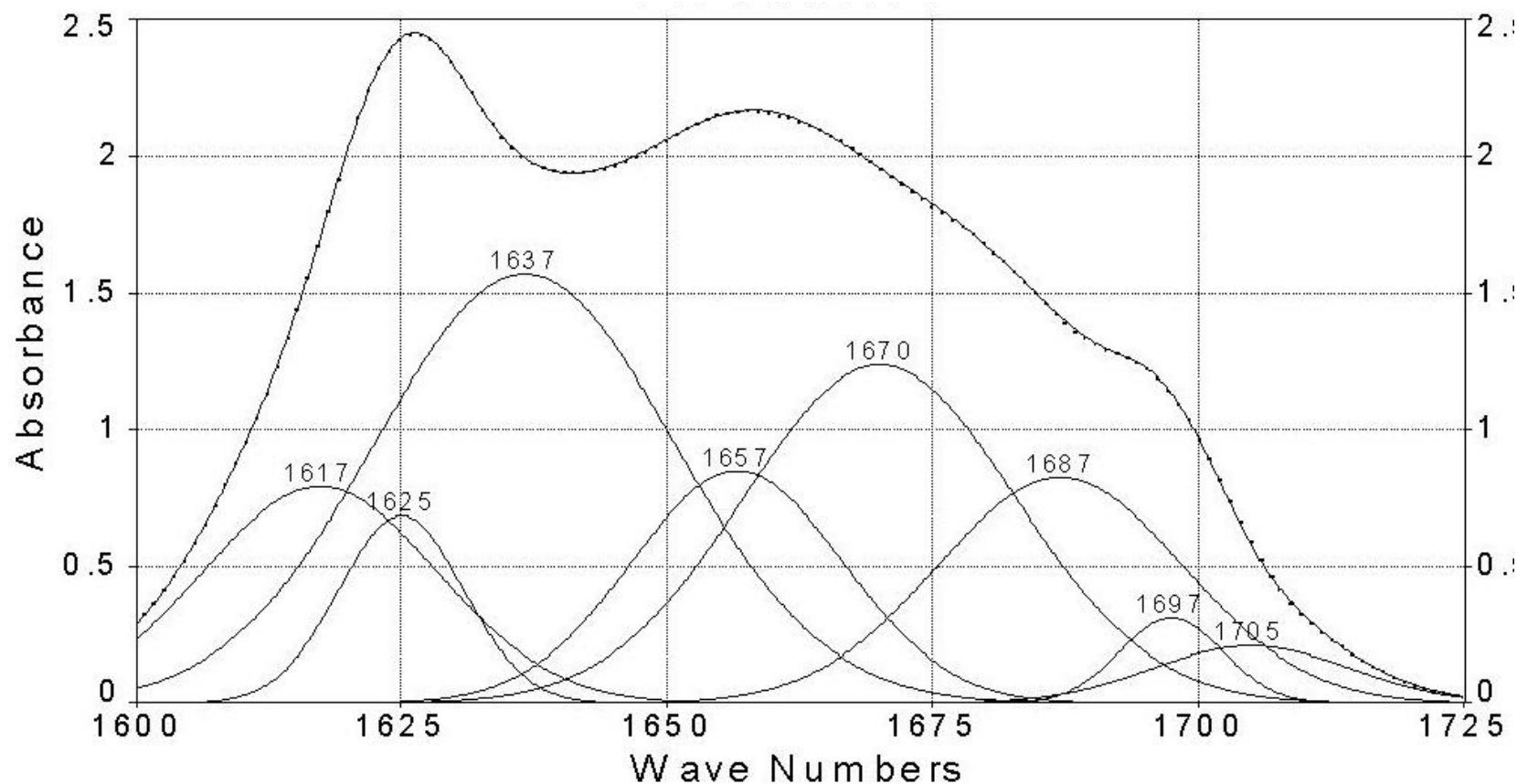
Sve 3 su apsorpcione
trake peptidne grupe

Vibracije	ν (cm ⁻¹) za α -heliks	ν (cm ⁻¹) za β -ravan
Amid A $N-H$ istezanje $\leftarrow N—H \rightarrow$	3290-3300	3280-3300
Amid I $(C=O$ istezanje) $\begin{array}{c} \leftarrow C=O \rightarrow \\ \\ H \end{array}$	1650-1660	1680-1700
Amid II $\begin{array}{c} \leftarrow C—N \rightarrow \\ \\ H \end{array}$	1540-1550	1520-1525



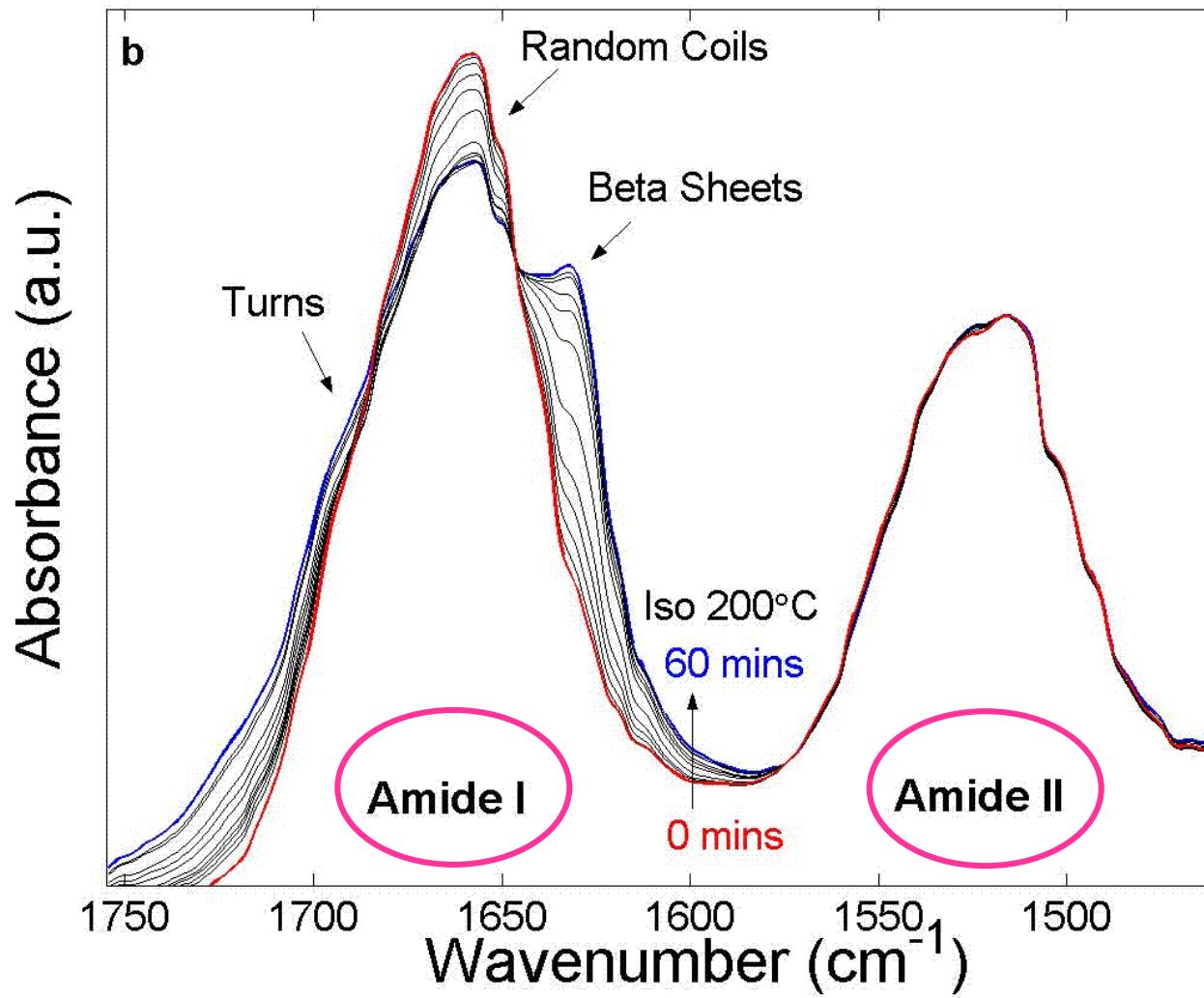
IC, FTIC - proteini

Dekonvolucija signala – exp. spektar lizozima

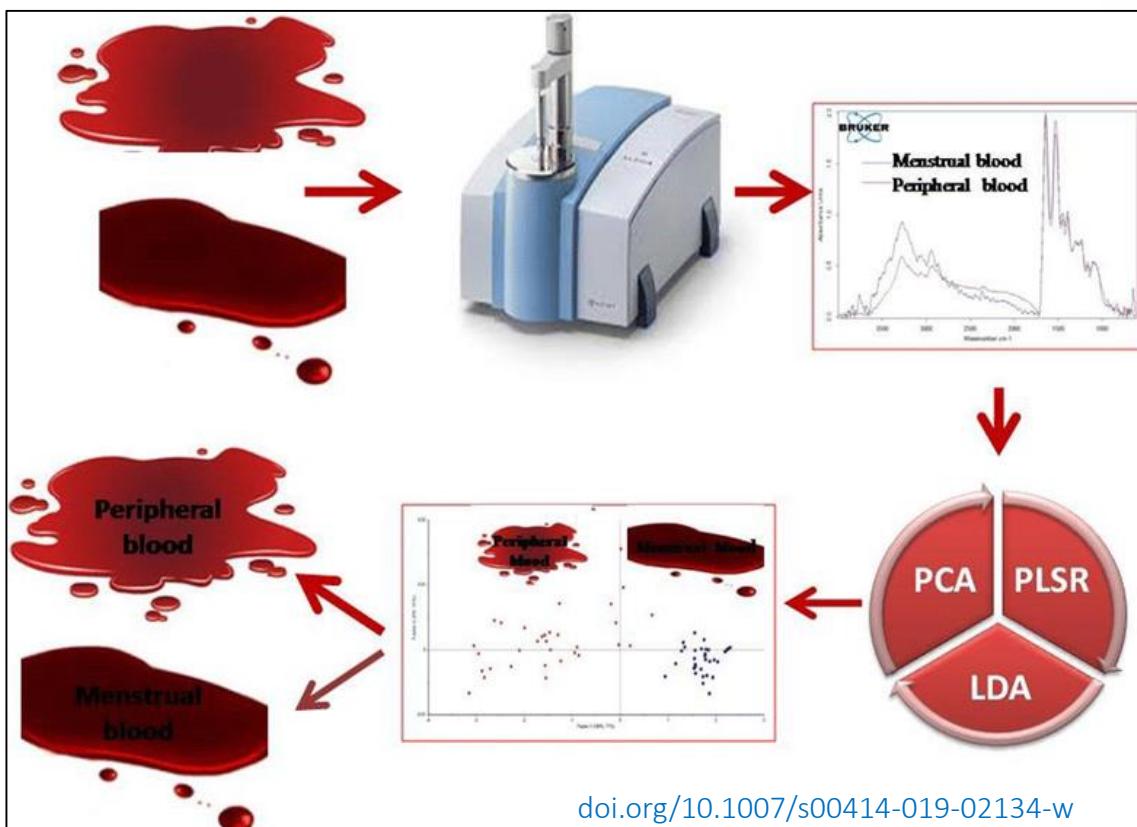
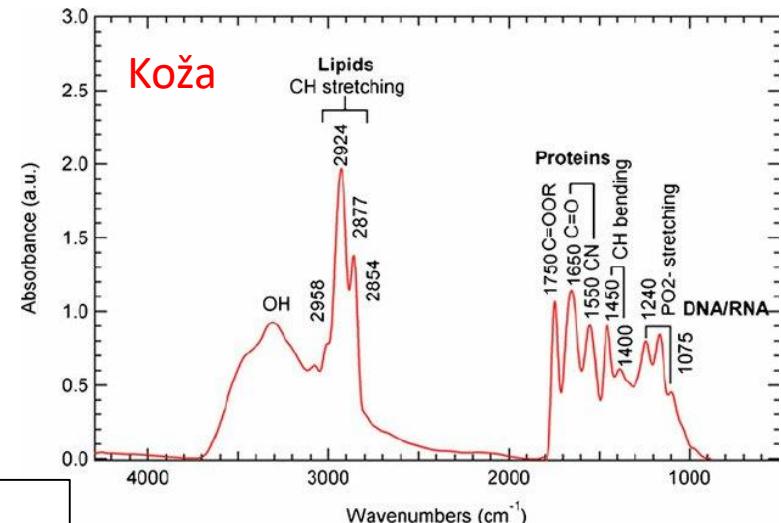
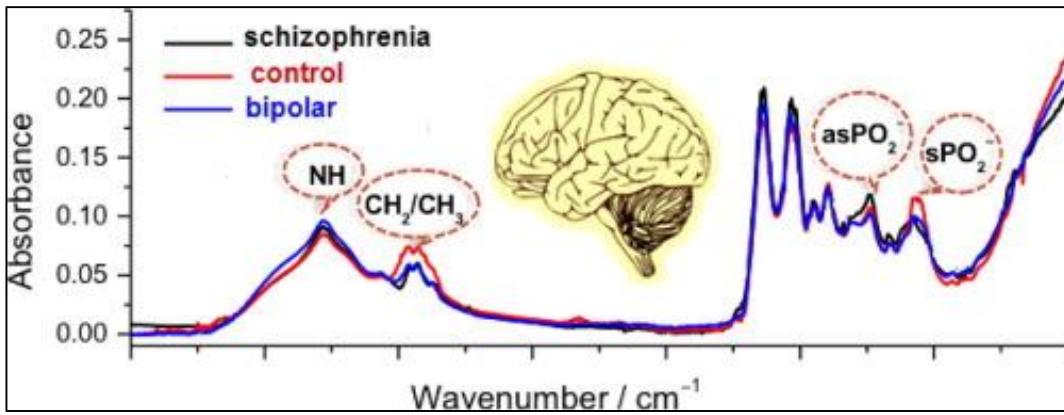


IC, FTIC - proteini

Primer: promena sekundarne strukture fibroina tokom kristalizacije



IC, FTIC - primena



Analiza biološkog uzorka - primena u forenzici

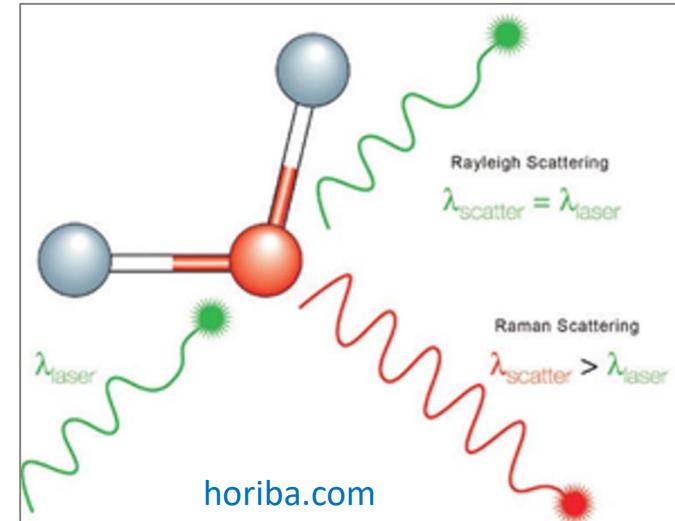
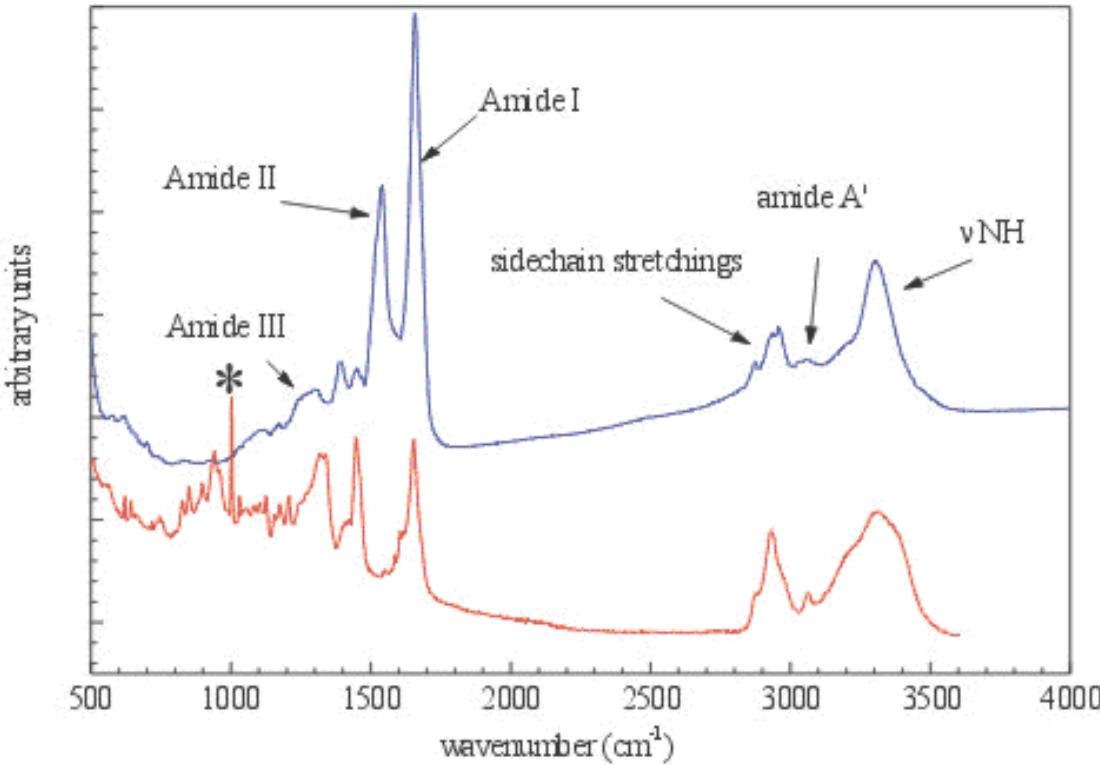
Statističke metode:
Principal component analysis (PCA)
Partial least squares regression (PLSR)
Latent Dirichlet Allocation (LDA)

Ramanska spektroskopija

Komplementarna sa IC

C-O , N-O , O-H (polarne) jake IC trake

C-C , C-H , C=C (nepolarne) jake Raman trake



Ramanska spektroskopija - laseri

UV: 244 nm, 257 nm, 325 nm, 364 nm

Vis: 457 nm, 473 nm, 488 nm, 514 nm, 532 nm, 633 nm, 660 nm

Bliska IC: 785 nm, 830 nm, 980 nm, 1064 nm

Izbor lasera utiče na rezultat:

Senzitivnost – intenzitet Ramanskog rasejanja $\sim \lambda^{-4}$

Prostorna rezolucija – prečnik *spot-a* zavisi od λ

Npr: za 0.90/100x objektiv, 532 nm laser će dati spot od 0,72 μm ,
dok će 785 nm laser dati spot od 1,1 μm

Problem kod Ramanske: **fluorescencija** (česta pojava u biološkim uzorcima,
ali primenom lasera veće talasne dužine se može kontrolisati) + fotoizbeljivanje

Poređenje

IC

Apsorpcija svetlosti

Promena dipolnog momenta

Ne može H_2O

Zahteva pripremu uzorka

Nije mnogo skupo

Raman

Rasipanje svetlosti

Promena polarizabilnosti

Može H_2O

Ne zahteva pripremu uzorka

Skupo je

Za molekule sa centrom simetrije:



Nema promene dipolnog
momenta
IC neaktivno

Promena polarizabilnosti
Raman aktivno

Promena dipolnog momenta
IC aktivno

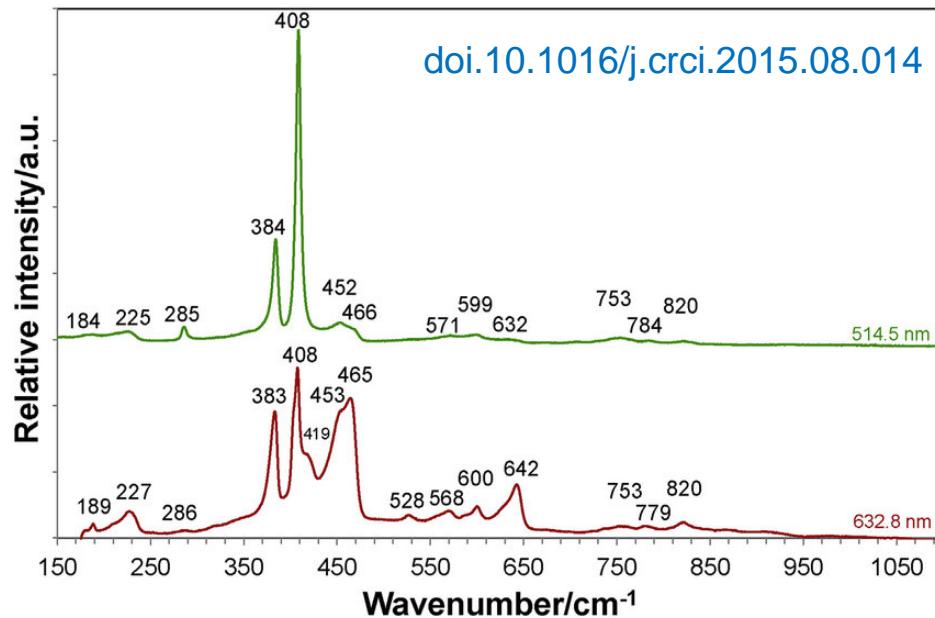
Nema promene polarizabilnosti
Raman neaktivno

Rezonantna ramanska spektroskopija

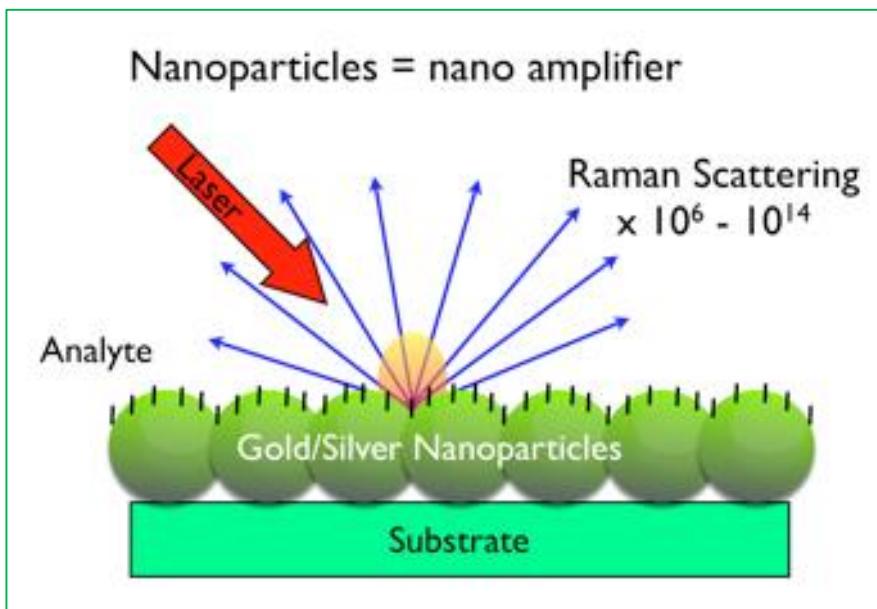
- Za proteine i nukleinske kiseline
- Primenom impulsnih lasera ispituju se **ultrabrzi procesi i intermedijeri**
- Koristi se laser sa frekvencijom koja odgovara elektronском prelazu odgovarajuće hromofore
- Trake simetričnih vibracija se intenziviraju i pojavljuju se trake koje se ne opažaju u običnoj ramanskoj spektroskopiji (**rezonantno pojačane**).

Prednosti:

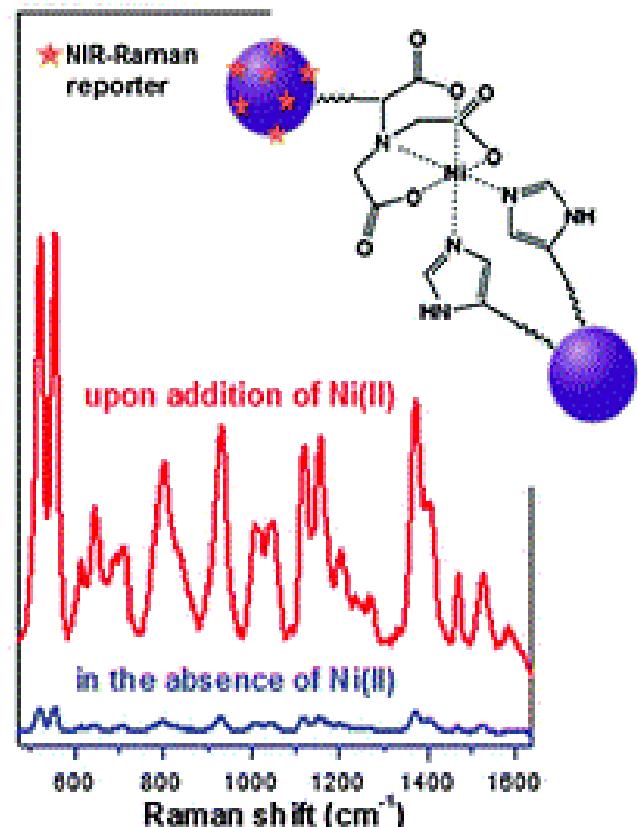
- ✓ sadrži trake samo hromofore koja apsorbuje zračenje
- ✓ granica detekcije do 10^{-6} mol/dm³



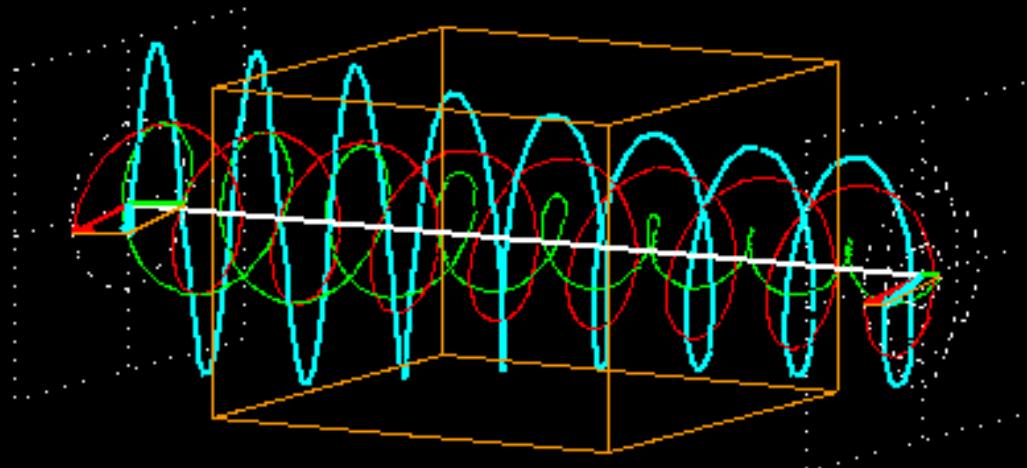
Površinski pojačana ramanska spektroskopija *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)*



- Biomolekule koje ispitujemo treba adsorbovati na površinu metala (obično Ag ili Au, koloidni rastvor)
- Pojačavanje signala do $10^{10}-10^{11}$ (naročito kod *Surface-enhanced resonant Raman scattering (SERRS)*).



Cirkularni dihroizam (CD)



Kada ravanski polarizovana svetlost prolazi kroz supstanciju koja poseduje osobinu cirkularnog dihroizma nastaje eliptično polarizovana svetlost.

Molarni apsorpcioni koeficijenti (ϵ) su različiti za levo i desno polarizovanu svetlosti.

Cirkularni dihroizam (CD)

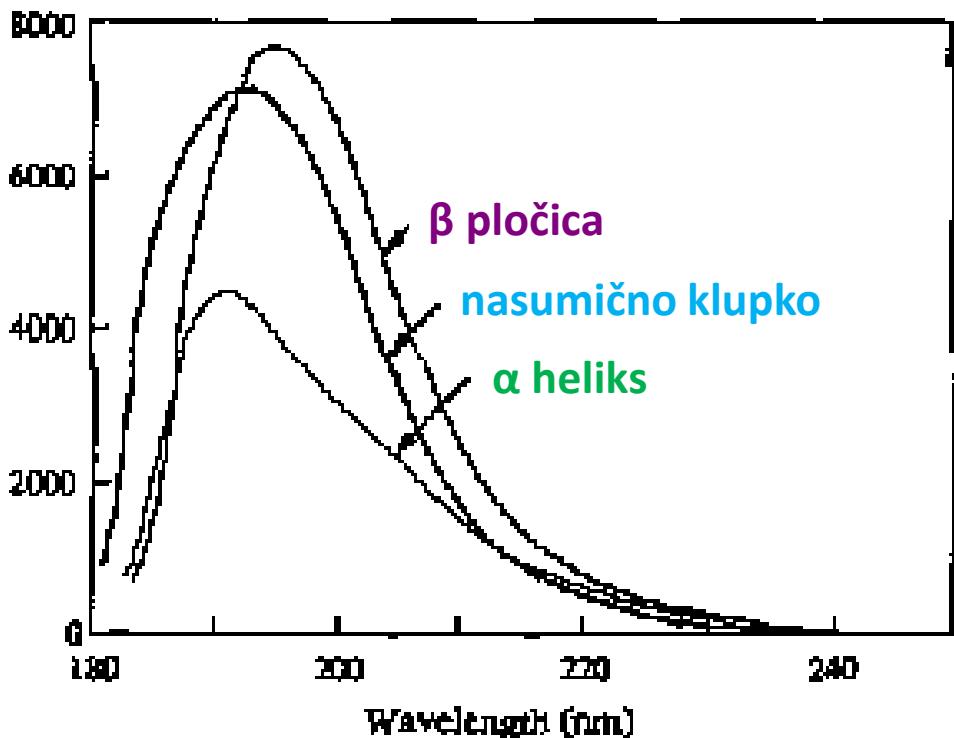
- **CD spektroskopija** meri razliku u apsorpciji levo i desno polarizovane svetlosti koja je posledica strukturne asimetrije
- **CD spektar** - grafički predstavljena zavisnost molarnog elipticiteta neke supstancije od talasne dužine upadnog zračenja, $[\theta] = f(\lambda)$

Proteini:

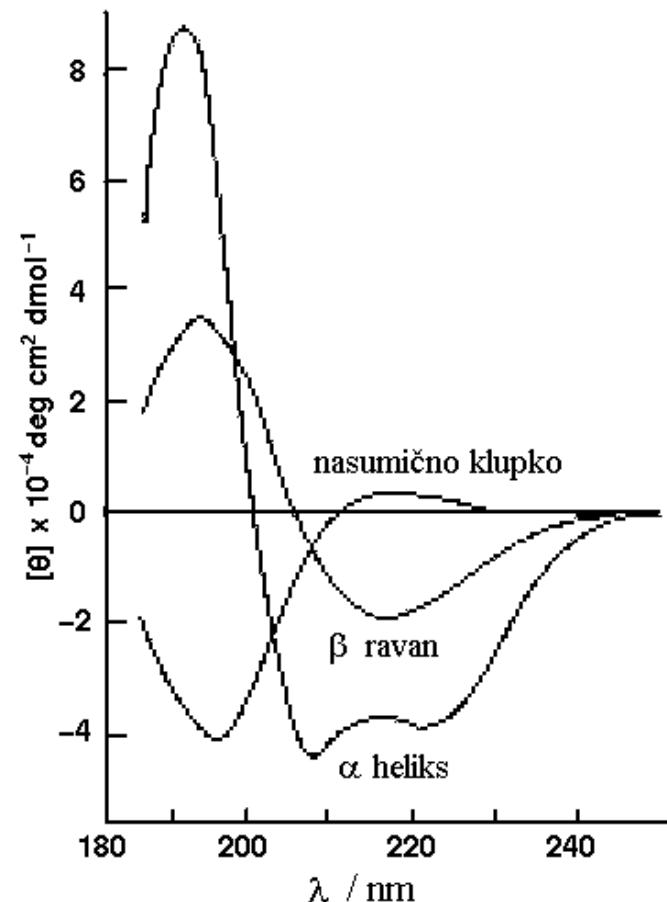
- Peptidna veza je optički aktivna
- CD spektar proteina je odraz njegove **sekundarne strukture** - uređene strukture imaju CD signale dok neuređene nemaju

Cirkularni dihroizam protaina

Apsorpcioni spektar



CD spektar



Peptidna hromofora:

$n \rightarrow \pi^*$ 210-220 nm

$\pi \rightarrow \pi^*$ 190 nm (najintenzivnija)

$n \rightarrow \sigma^*$ 175 nm

Cirkularni dihroizam proteina

Peptidna veza

170 nm

Aromatične amino kiseline

250 nm

350 nm

Identifikacija:

Alfa heliks

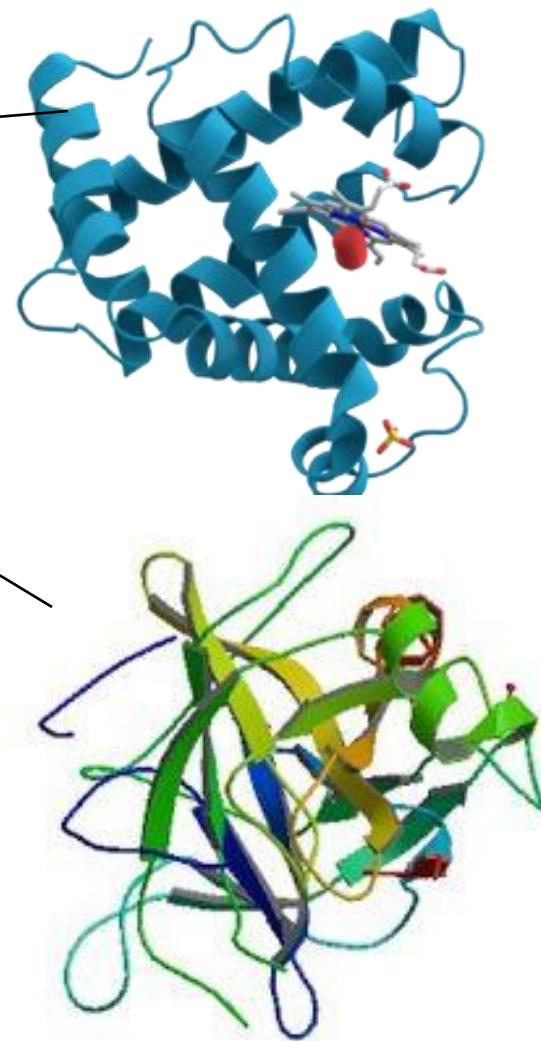
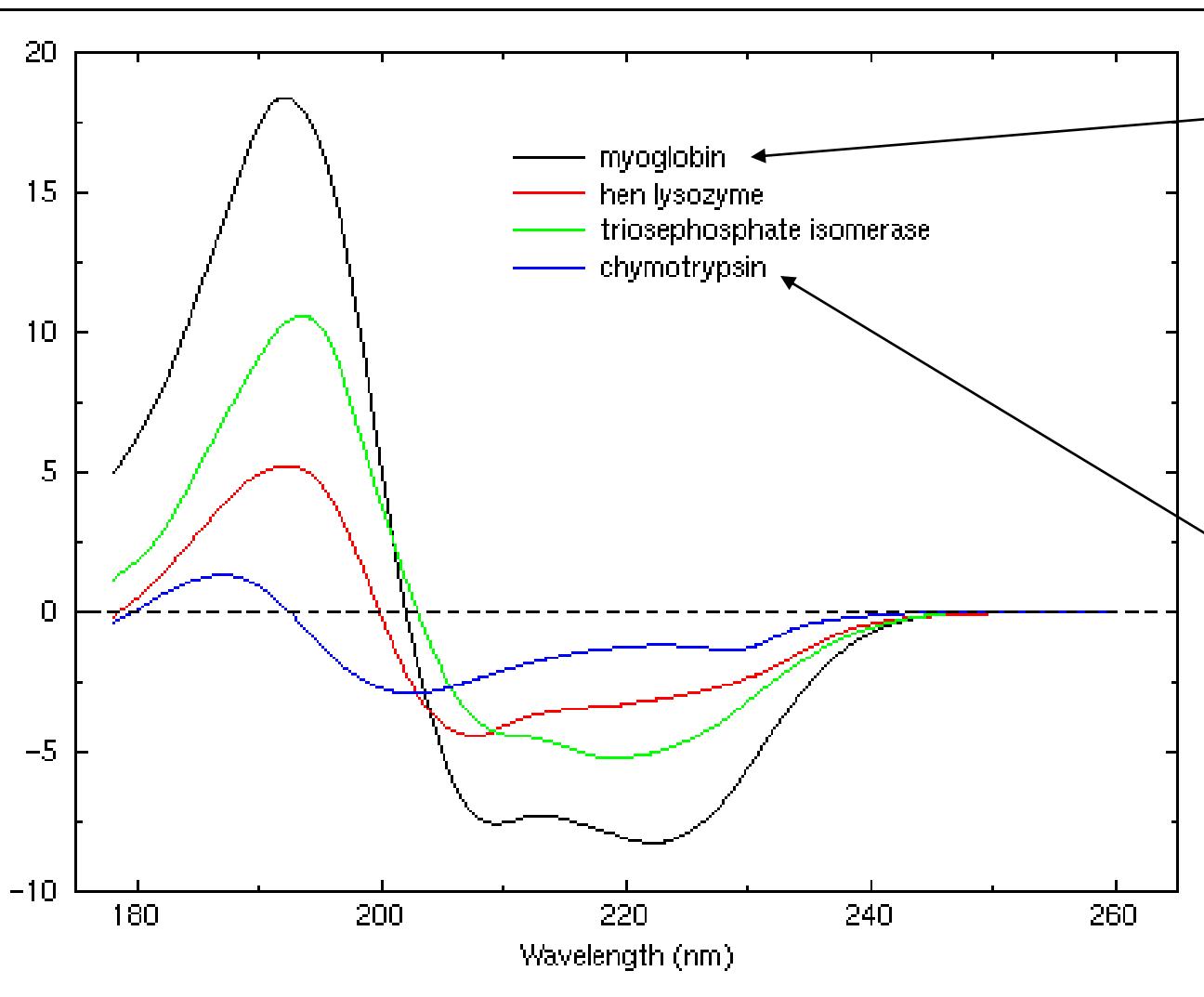
Beta ploča

Nasumično klupko

Identifikacija:

Promene u tercijarnoj strukturi

Cirkularni dihroizam proteina



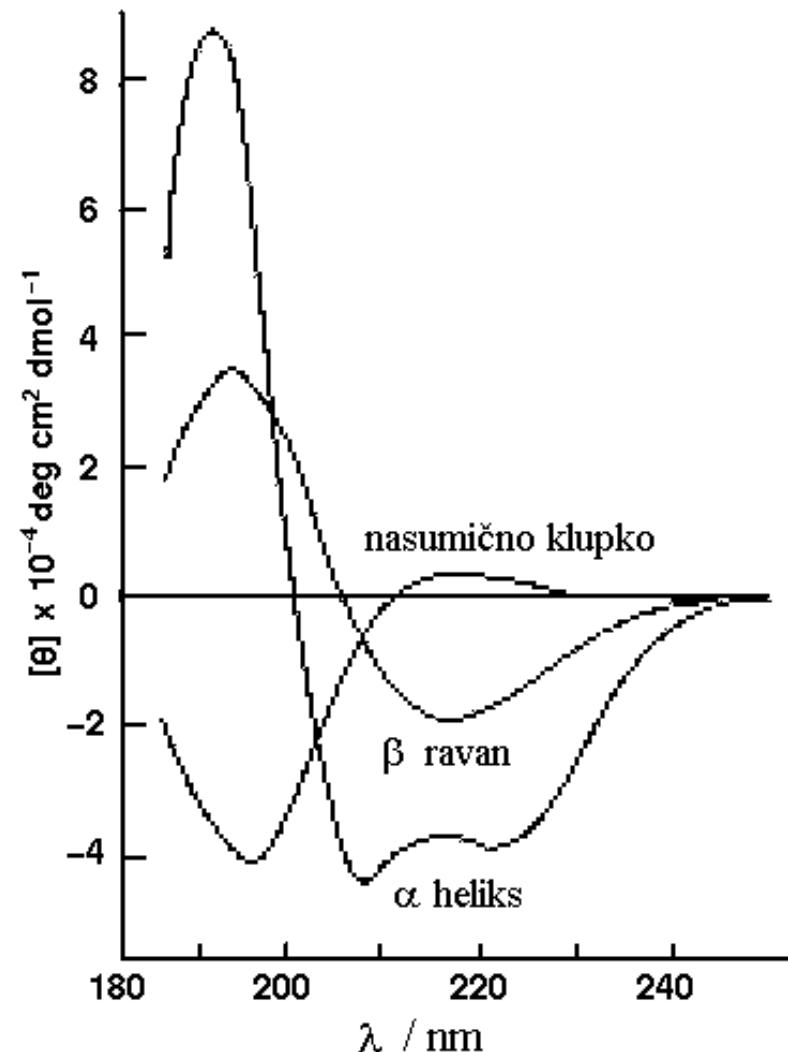
Pozitivne i negativne trake u CD spektru?

$$[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{levo}} - \epsilon_{\text{desno}}$$

Ako je $\epsilon_{\text{levo}} > \epsilon_{\text{desno}}$, supstancija više apsorbuje levo cirkularno polarizovanu svetlost, **pozitivna traka**

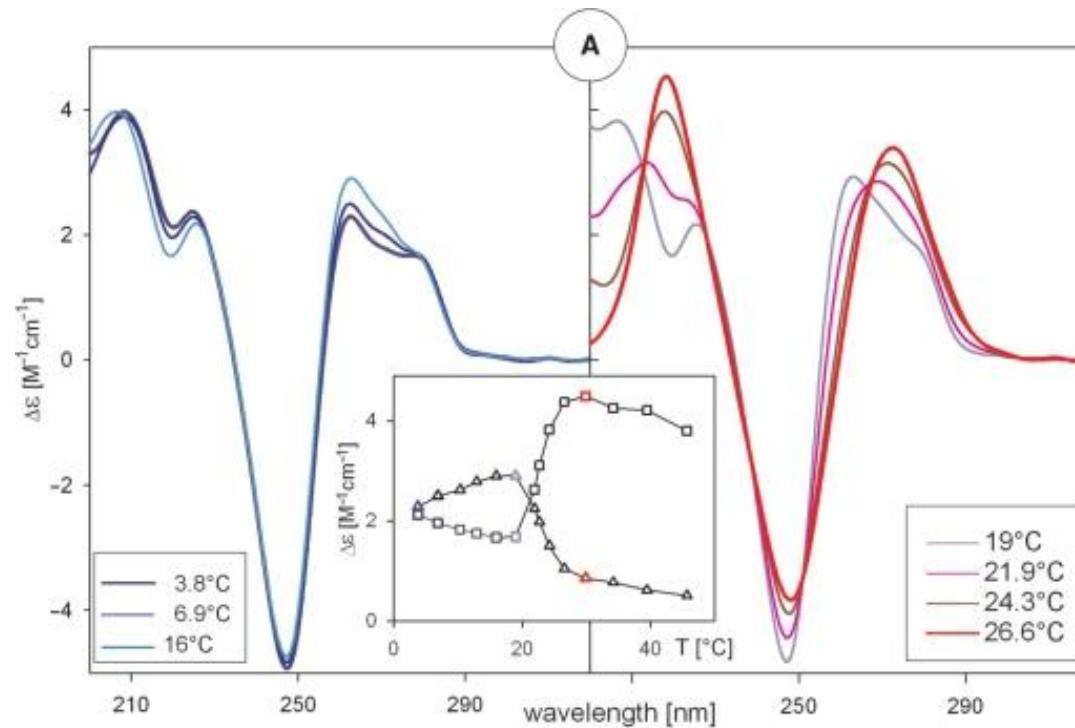
Ako je $\epsilon_{\text{desno}} > \epsilon_{\text{levo}}$, supstancija više apsorbuje desno cirkularno polarizovanu svetlost, **negativna traka**



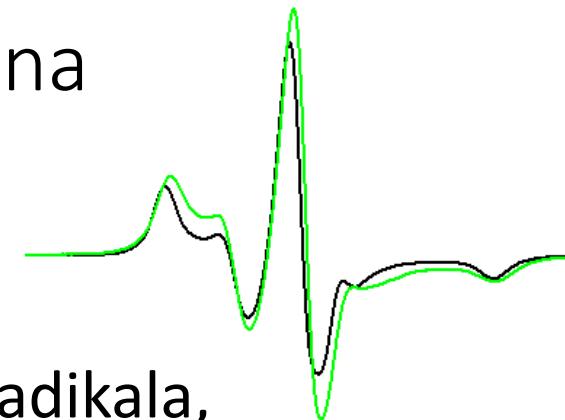
Cirkularni dihroizam nukleinskih kiselina

Denaturacija

Vezivanje liganada, lekova

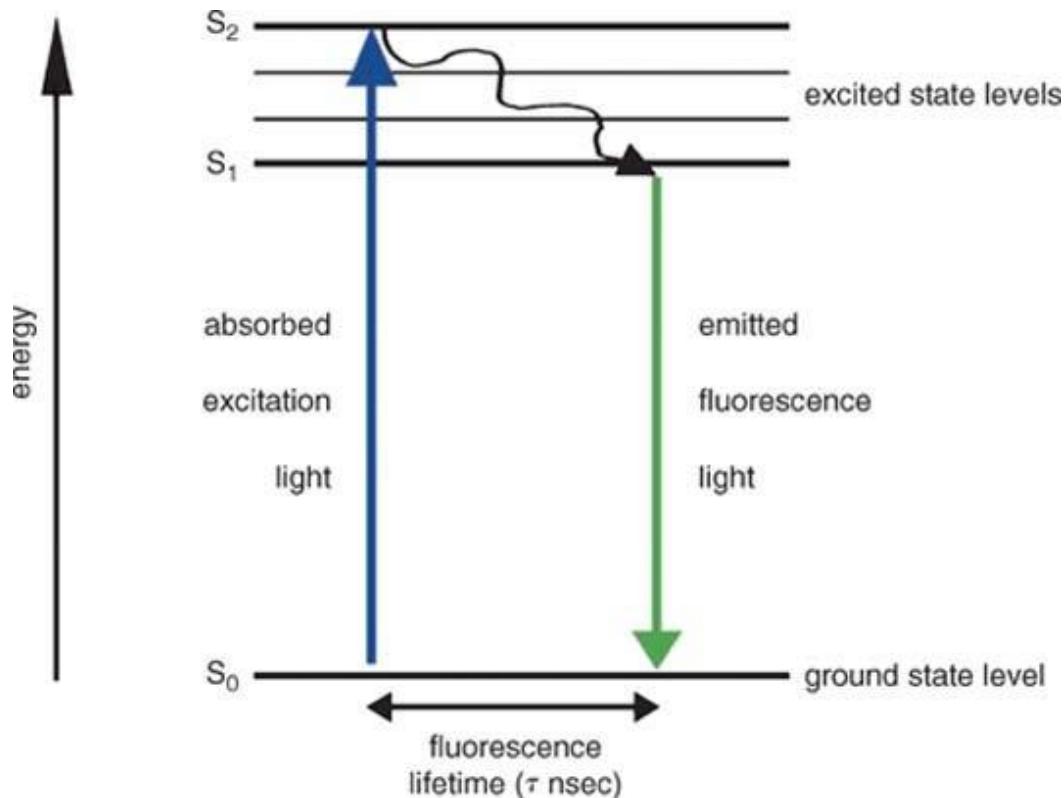


Elektronska paramagnethna rezonantna spektroskopija (EPR)



- Jedina tehnika za detekciju kratkoživećih radikala,
ROS i RNS
- Identifikacija oksidacionog stanja i geometrije kompleksa
paramagnetnih metala
- Određivanje **antioksidativnog** kapaciteta biomolekula
- Konformacione promene **proteina**
- Fluidnost **membrane**
- *In vivo* merenje **pO₂**
- *In vivo* određivanje **redoks statusa** - razlikovanje zdravog od bolesnog tkiva

Spektrofluorimetrija – fluorescentna spektroskopija



Fluorofore u
biomolekulima:

Aminokiseline
Trp, Tyr, Phe

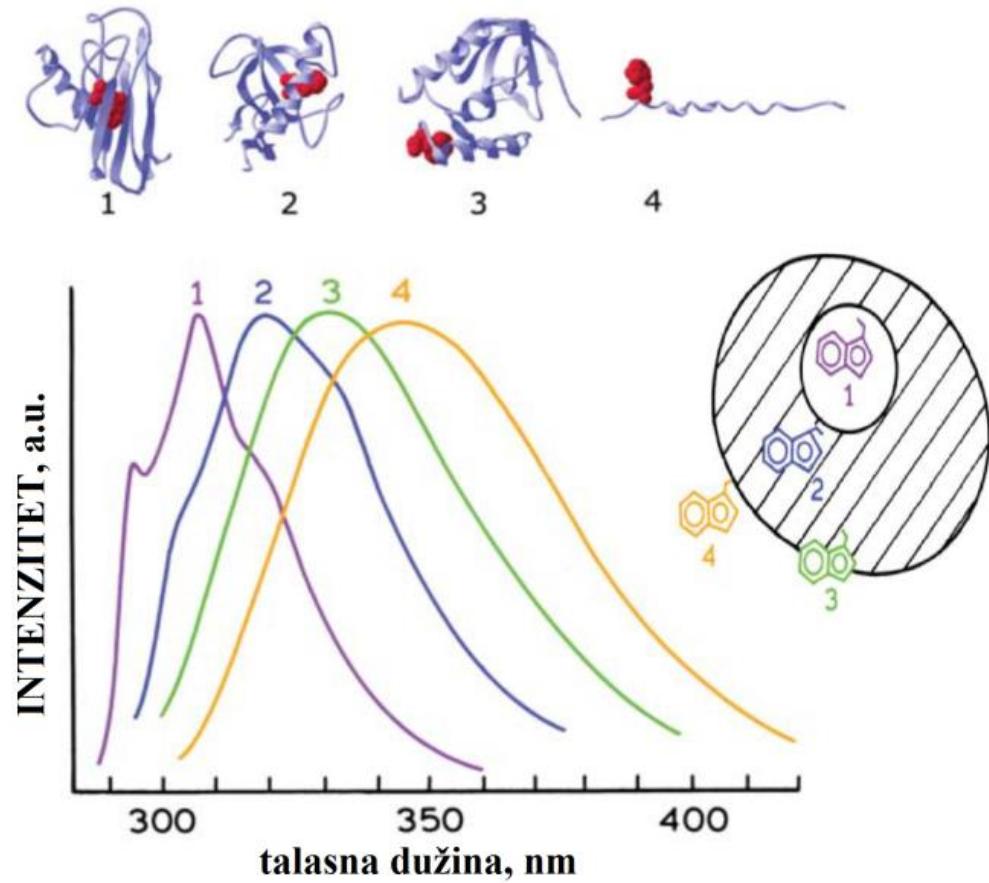
Nukleotidi
slaba fluorescencija

Spektrofluorimetrija proteina

Proučavanje strukture, funkcije, konformacionih promena,
ligand-protein interakcija

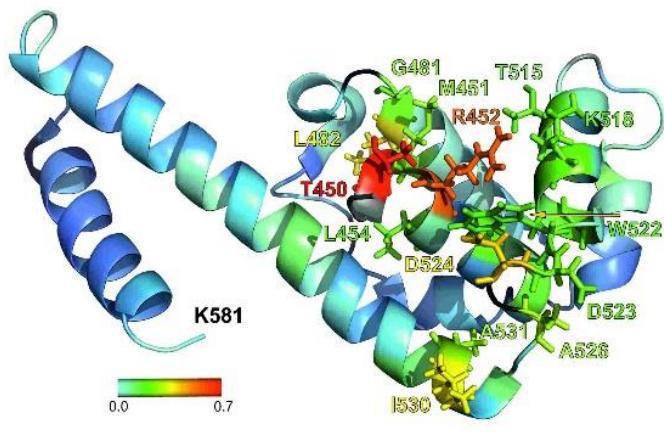
Uticaj okruženja Trp na
emisioni spektar

Methods Biochem. Anal., 1990,
35, 117–129.

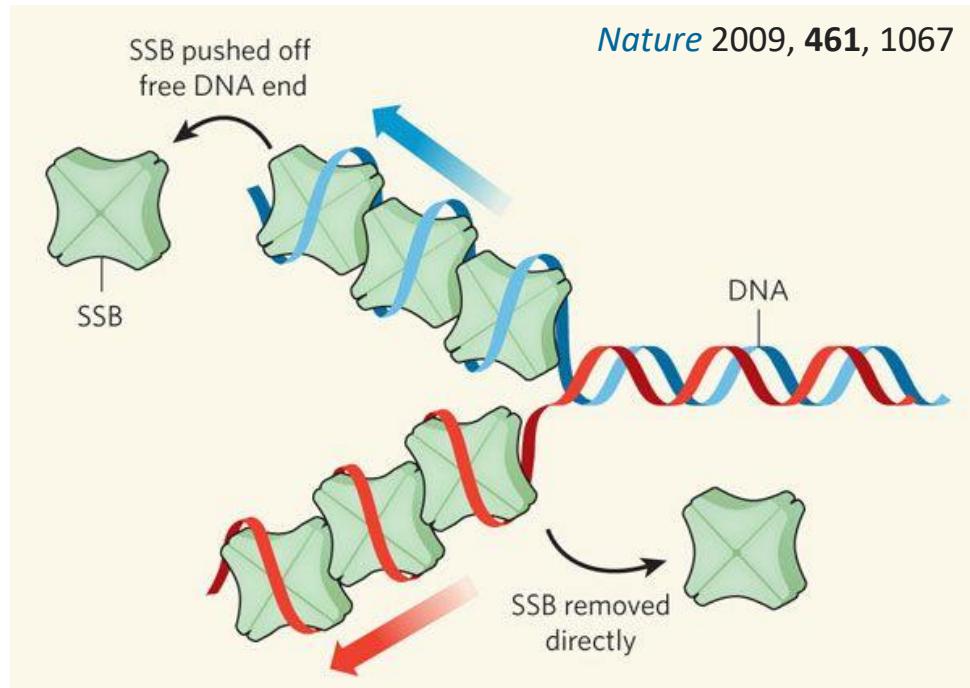


Spektrofluorimetrija - interakcije proteina i DNK

- Single-stranded protein (SSB) se vezuje za jednolančanu DNK i sprečava da se lanci ponovo spoje (iza DNK helikaze) u toku transkripcije
- Kada se SSB veže za DNK **gasi se fluorescencija triptofana**
- Smanjenje fluorescencije je direktno proporcionalno količini odmotanog dela DNK



<http://schmieder.fmp-berlin.info/research/ssb.htm>



Fluorescentno obeležavanje

- Fluorescentno bojenje proteina, nukleinskih kiselina
- Kada se specifična antitela ili drugi biomolekuli obeleže (hemijska veza) fluorescentnom bojom, postaju fluorescentne probe za detekciju ciljanih antigena.
- Ova metoda se koristi za ćelijski imidžing, citometriju (flow cytometry), Western-blot analizu i ELISA testove.

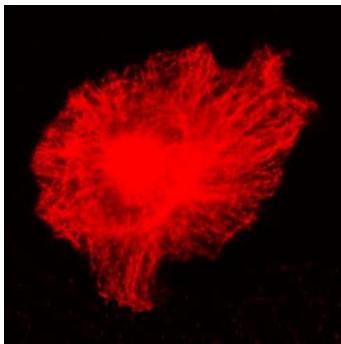


Transgenic mouse glowing because of green **fluorescent** protein from jellyfish
(U. Penn)



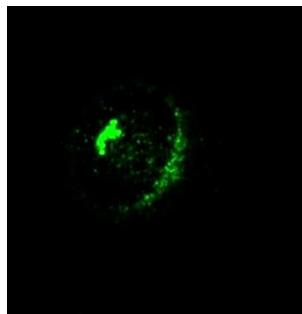
Fluorescentna mikroskopija

mikrotubule

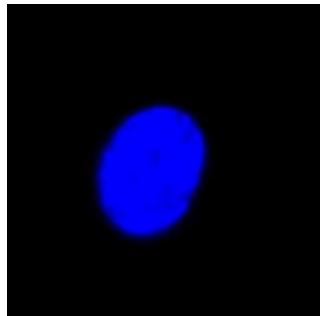


jezgro

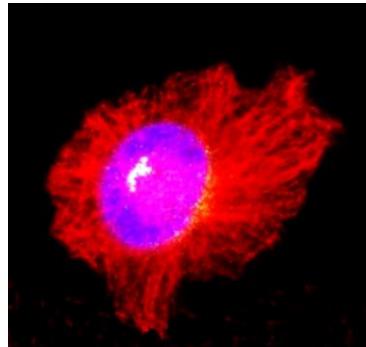
centrozomi



zajedno

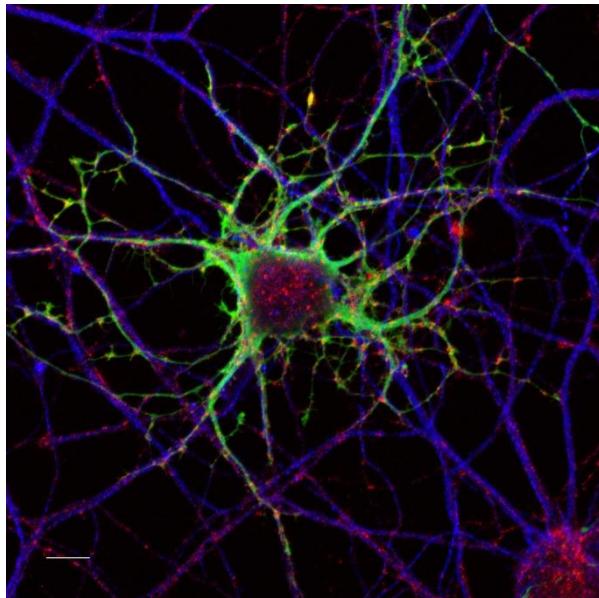


Za različite organele postoje specifične probe:
mitochondrije (MitoTracker)
lizozomi (LyoTracker)
goldžijev aparat (konjugati lektina)
jezgra (DAPI koji se vezuje za DNK)

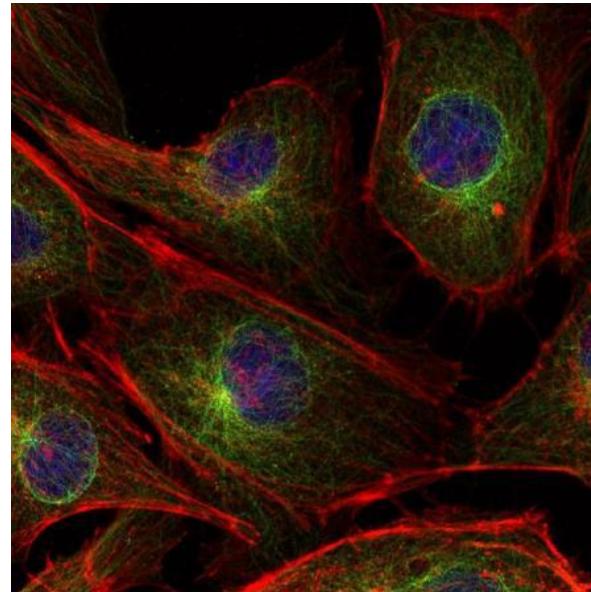


Konfokalna mikroskopija – optička imidžing tehnika

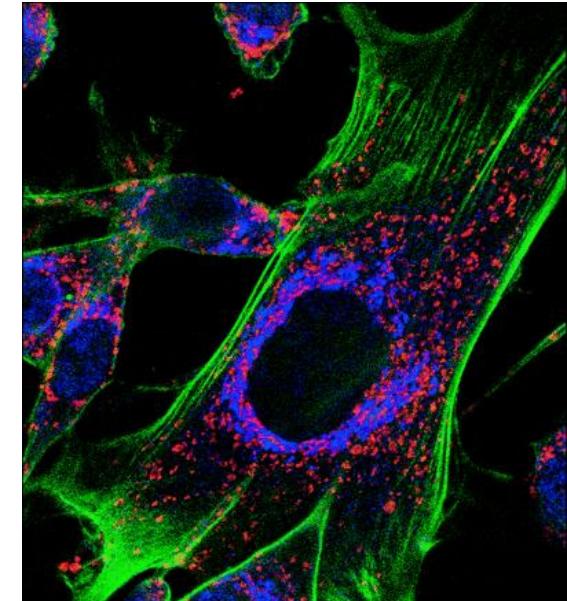
Dobija se slika visoke rezolucije u odnosu na fluorescentnu mikroskopiju



Neuron



Epitelijalne ćelije



Mitohondrije
(crveno) i Goldži
kompleks (plavo)

Single particle tracking mikroskopija

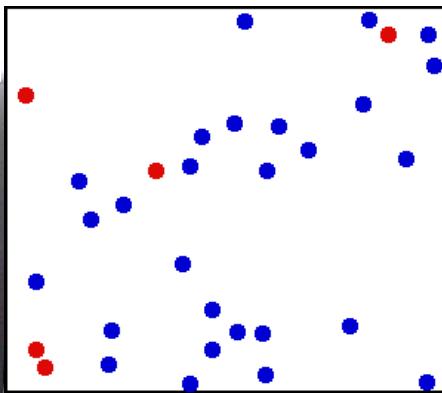
Real time gledate šta radi jedan (fluorescentno obeležen) molekul u fiziološkim uslovima

Kojom brzinom helikaza razmotava DNK

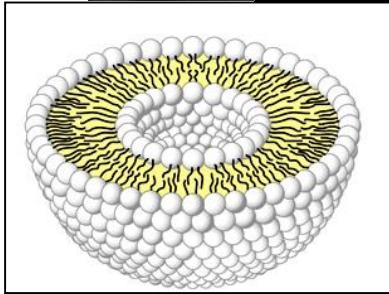
Prolaz jona/molekula kroz membranu

Dinamičko rasejanje svetlosti

uzorak

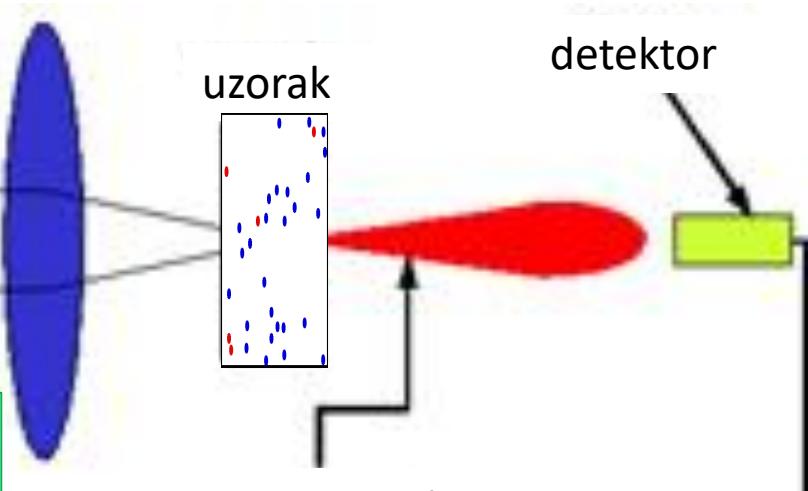


Određivanje dimenzije lipozoma
Određivanje zeta potencijala



HeNe laser

Stokes-Einstein
$$D = k_B T / 6\pi\eta R$$



D - koeficijent difuzije

k - Boltzmanova konstanta

T - temperatura

η - viskoznost sredine

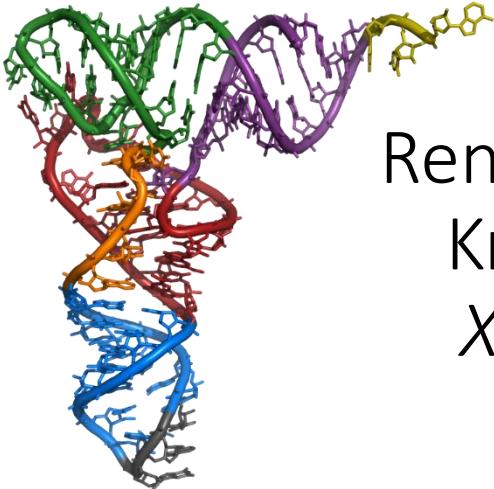
R_h - hidrodinamički radijus
sfernih čestica



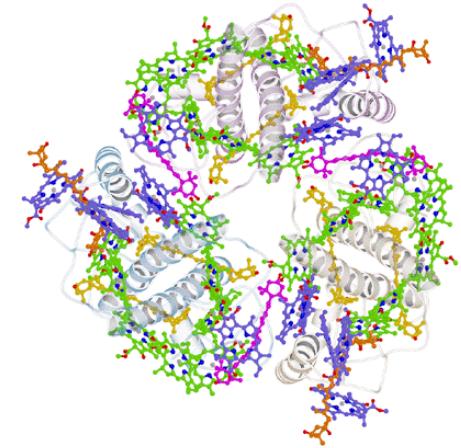
dekonvolucija



autokorelacija



Rendgenostrukturalna analiza Kristalografija X-zracima *XRD (X-Ray Diffraction)*



- Metoda za proučavanje trodimenzionalne, atomske strukture molekula
- Neophodno je imati monokristal
- Uslov za difrakciju: red veličine međuatomskog rastojanja u kristalu odgovara redu veličine λ zračenja
- Elektronski oblaci su mesta difrakcije X zraka (difrakciona rešetka)

NMR vs. XRD za određivanje 3D strukture proteina

NMR – **mnogo više informacija** od XRD (uglovi, rastojanja, konstante sprezanja, hemijski pomeraji, dinamički parametri - konstante brzina) ali teže za manipulaciju.

Mora se znati primarna struktura.

NMR

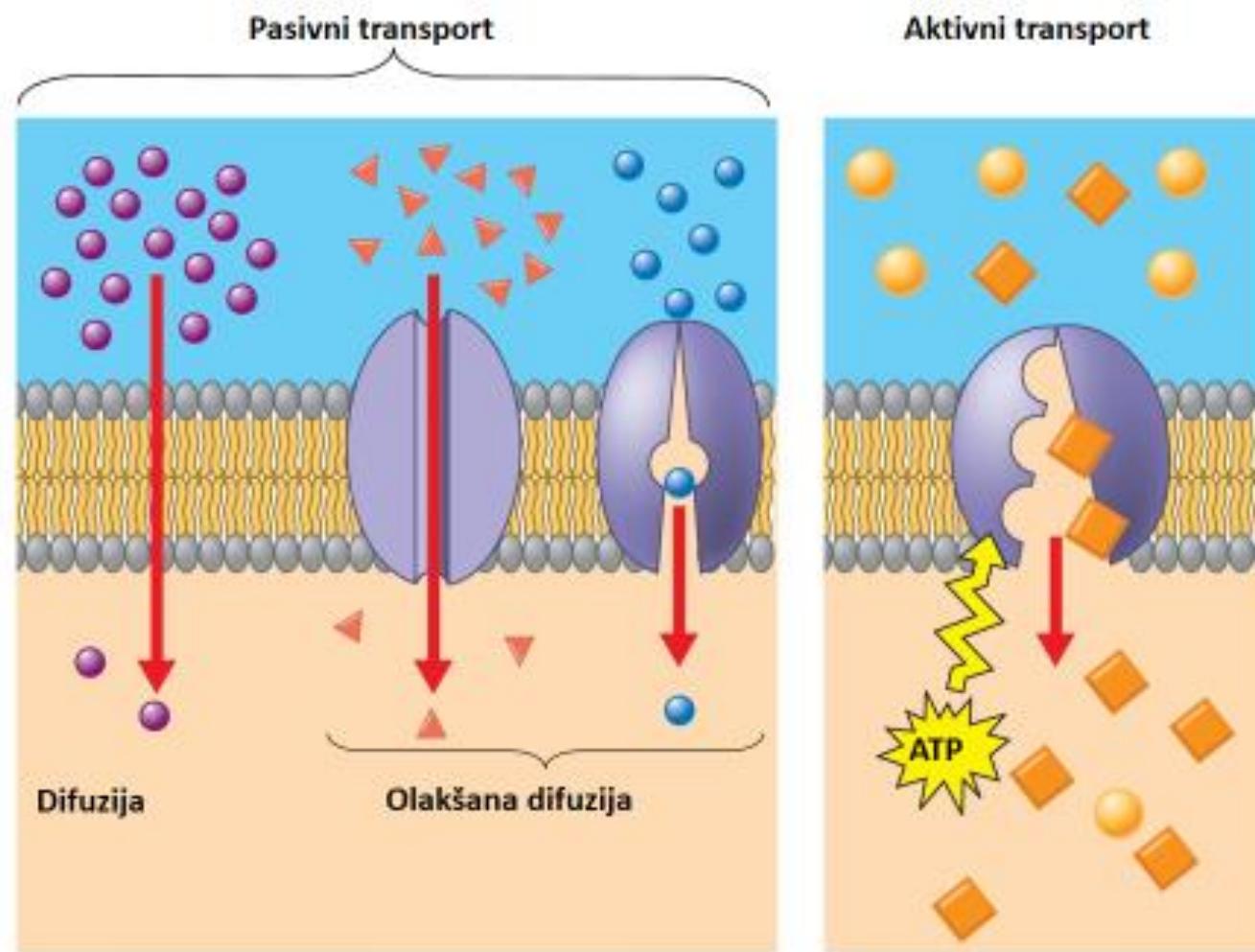


XRD

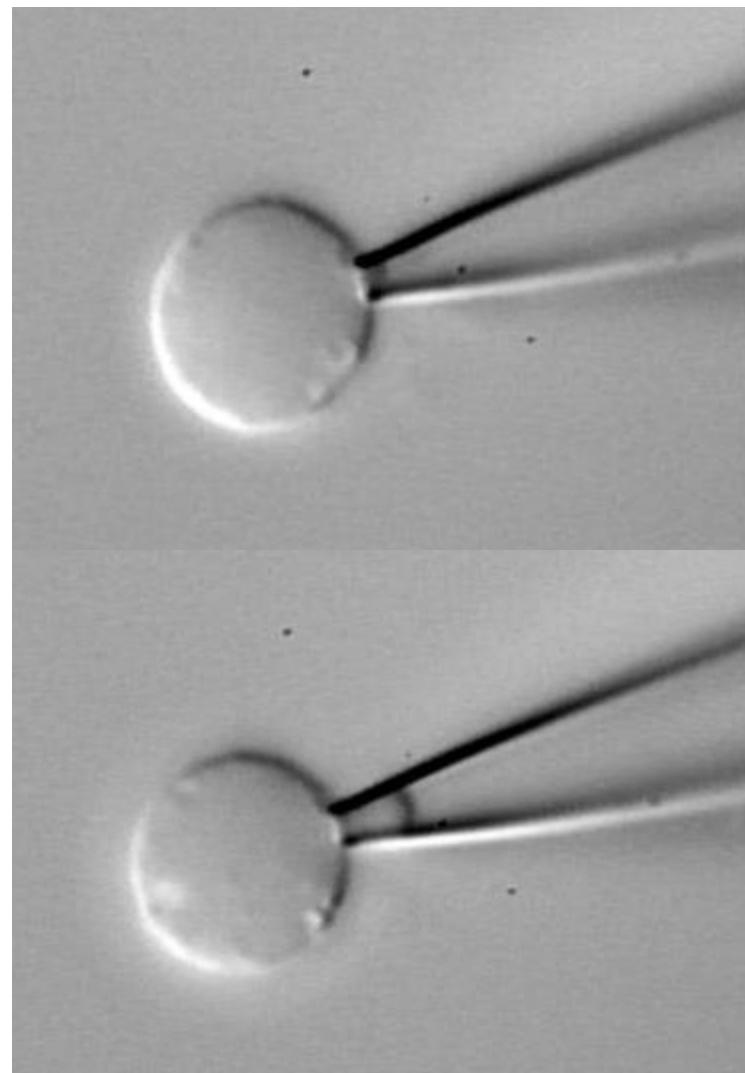
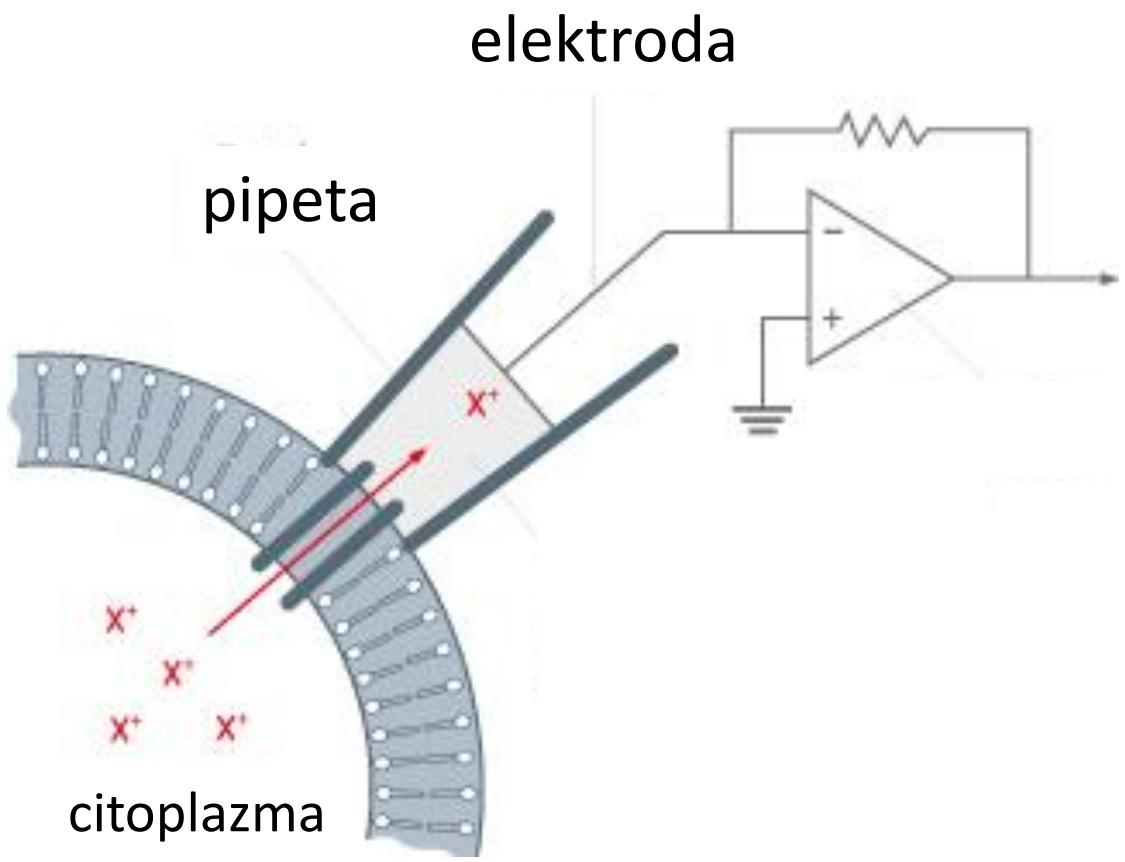


Patch-clamp tehnika

Elektrofiziološka metoda za ispitivanje jonskih kanala u ćelijskoj membrani

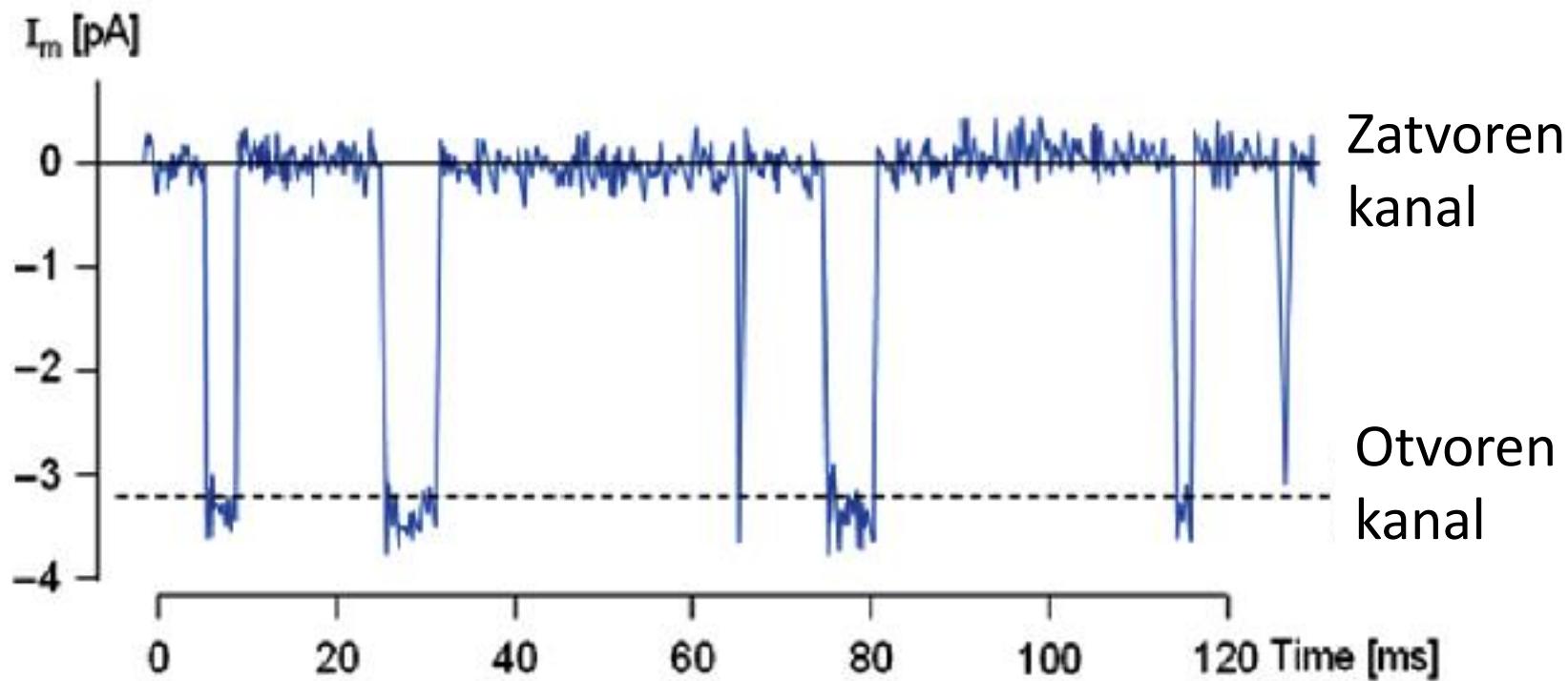


Patch-clamp tehnika



Patch-clamp tehnika

- Meri se struja stvorena prolaskom jona kroz kanale
- Prisustvo ili odsustvo struje govori o tome da li je kanal otvoren ili zatvoren



Masena spektrometrija

Razdvajanje jona pri prolasku kroz magnetno ili električno polje, na osnovu njihovog odnosa mase i naielktrisanja (m/z)

1. Jonizator
2. Analizator masa
3. Detektor

Jonizator

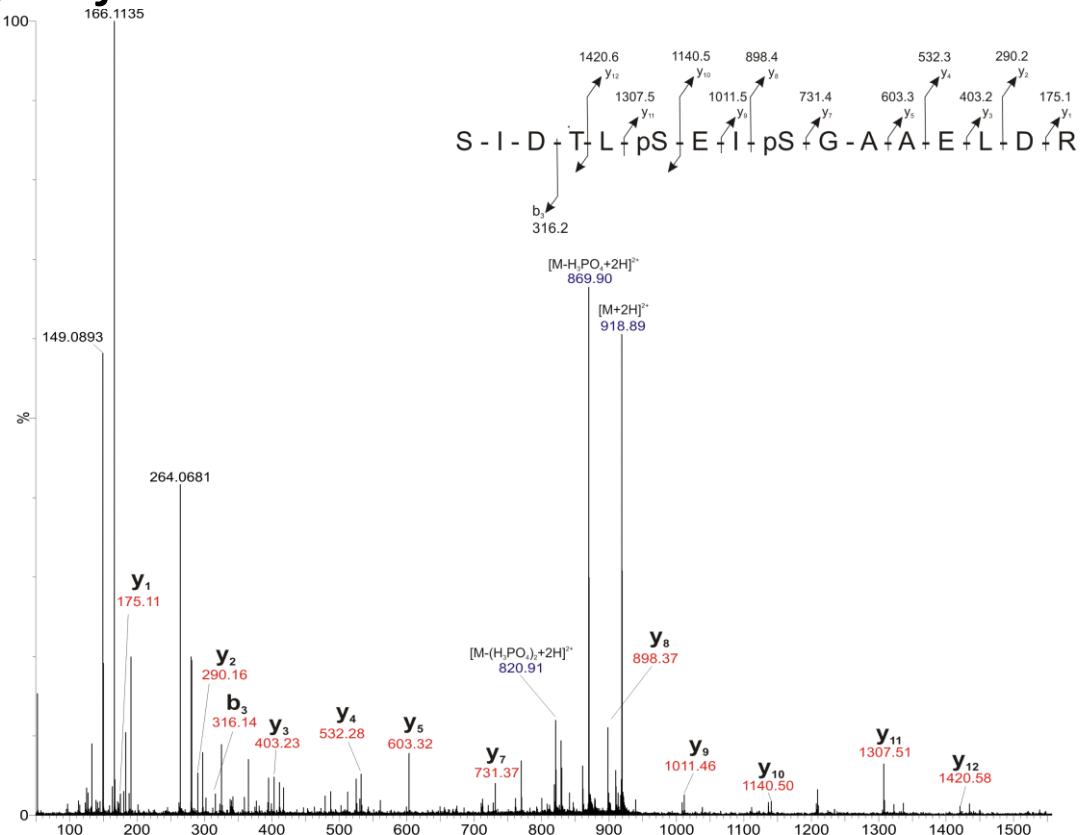
FAB <i>fast atom bombardment</i>	7-25 kDa	nmol	Naisparljiv rastvarač	Ne može za teško jonizujuće molekule
ESI <i>electrospray ionization</i>	70-200 kDa	fmol	Voda	Ne može za smeše
MALDI <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>	300 kDa	fmol	Mikrokristal	Ne može za fotosenzitivne molekule

Masena spektrometrija

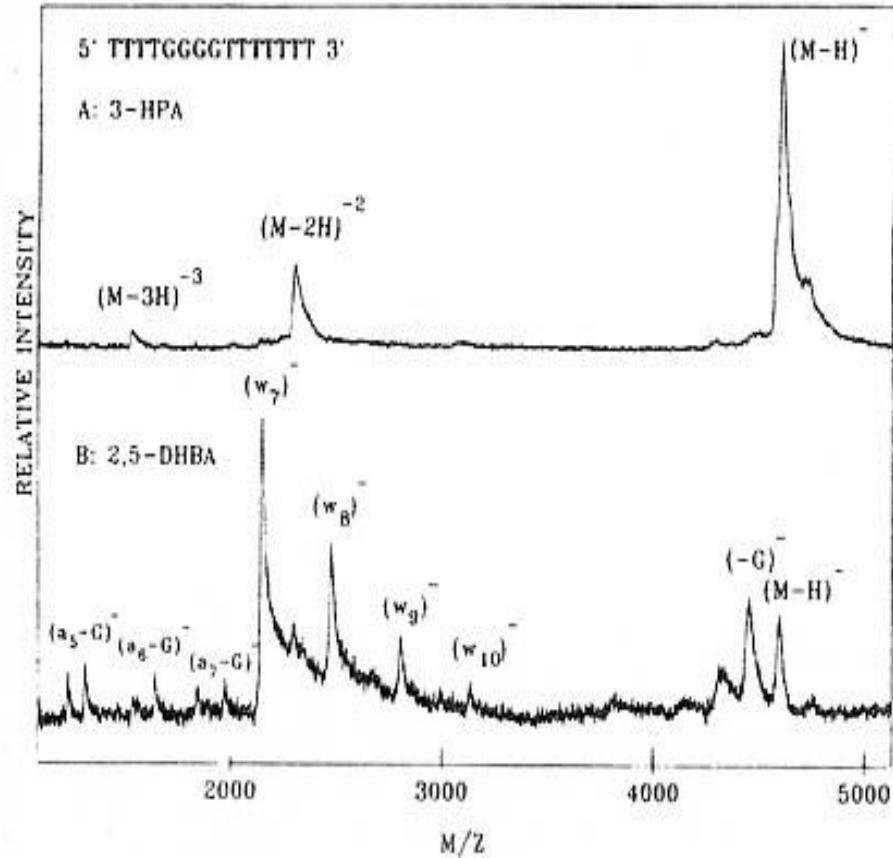
Komponenta	Metoda jonizacije	Mehanizam jonizacije
Peptidi	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje
Proteini	MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje
Ugljenihidrati	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija
Oligonukleotidi	MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija
Mali biomolekuli	FAB, MALDI i ESI	Protonovanje, deprotonovanje, katjonizacija, izbacivanje e ⁻

Masena spektrometrija – proteini

- Rutinska tehnika za određivanje primarne strukture proteina i molekulske mase
- Potrebno 5-100 μM rastvora
- Prethodi tečna hromatografija



Masena spektrometrija – nukleinske kiseline



Najčešće analize:
ispitivanje lekova, mesto
modifikacije, stvaranje
kompleksa, dijagnostika
bolesti

Mikroskopija atomskih sila

Atomic Force Microscopy (AFM)

- 3D topografska tehnika visoke rezolucije
- Ispitivanje na vazduhu i u tečnosti
- Dobijaju se informacije o mehaničkim osobinama ćelija i silama između molekula
- AFM je bolje od SEM jer:

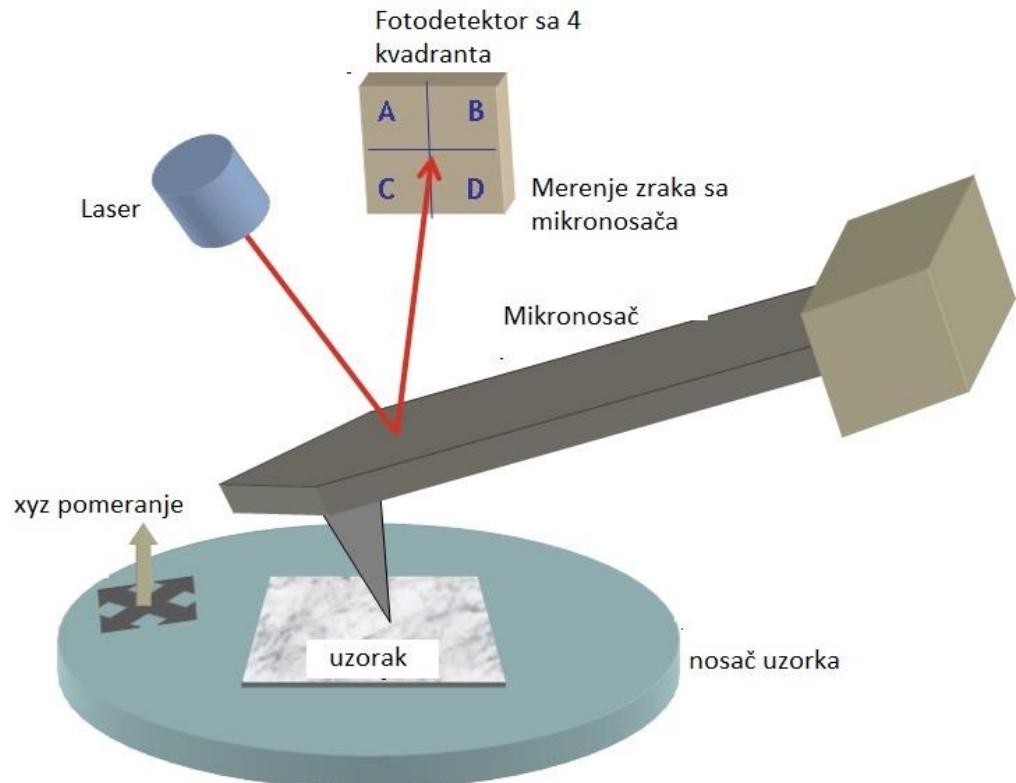
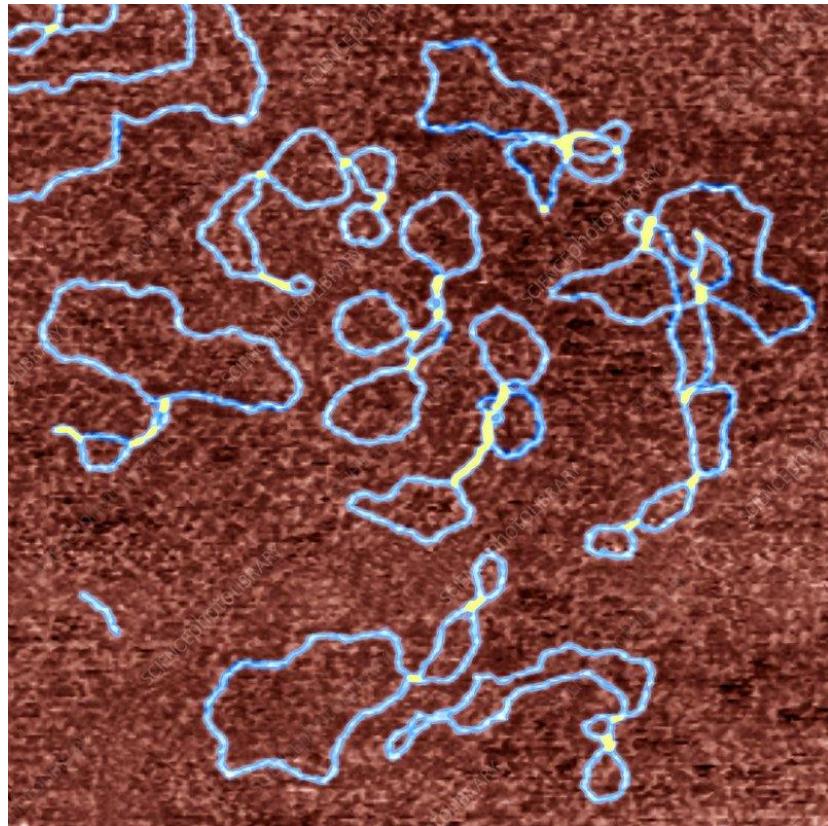
Realni 3D prikaz površine uzorka

Mogu dielektrični uzorci

Mogu uzorci koji ne smeju u vakuum

Ali, ne daje hemijski sastav

AFM



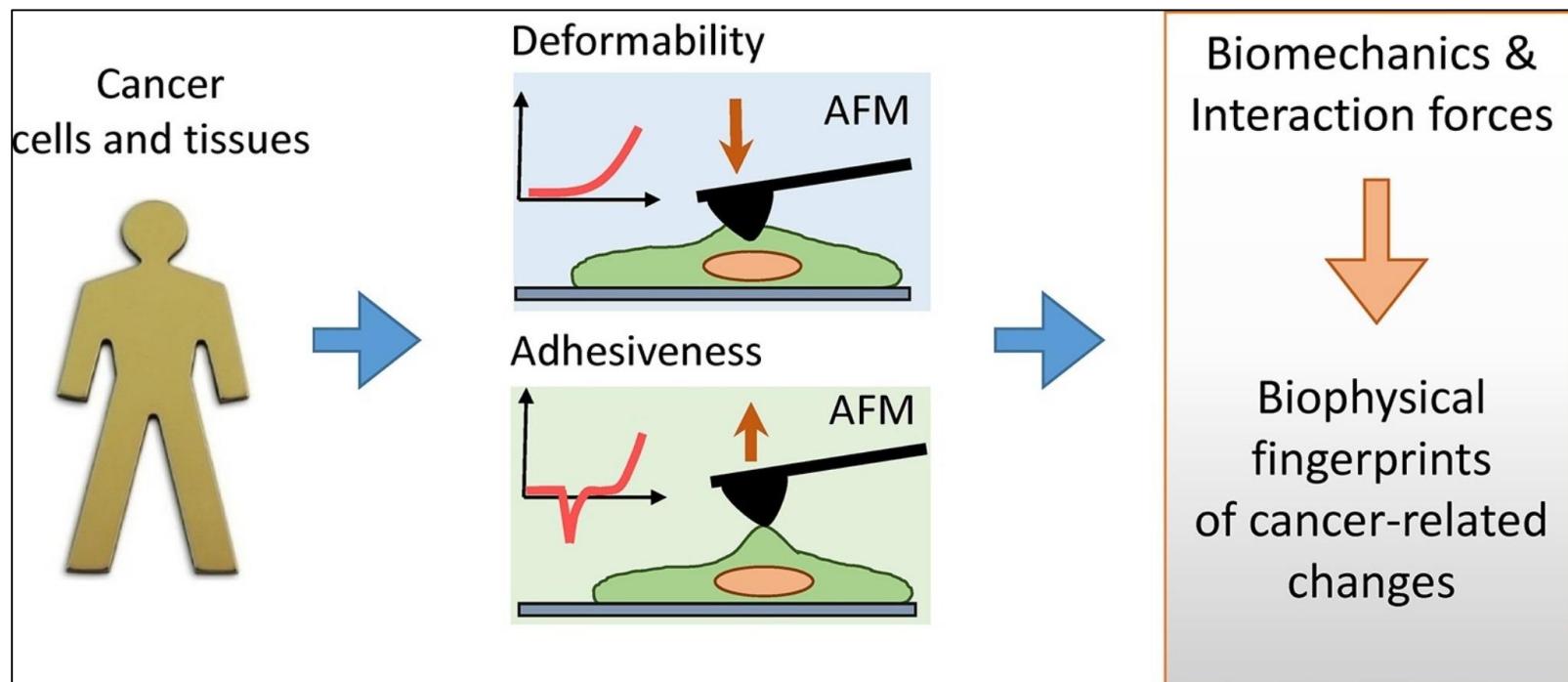
Kompleksi DNK – antikancer lek
©Torunn Berge

Primer: Elastičnost virusa animacija
<https://www.youtube.com/watch?v=MZb8C0f7Kdg>

AFM – ispitivanje tumora na nivou jedne ćelije

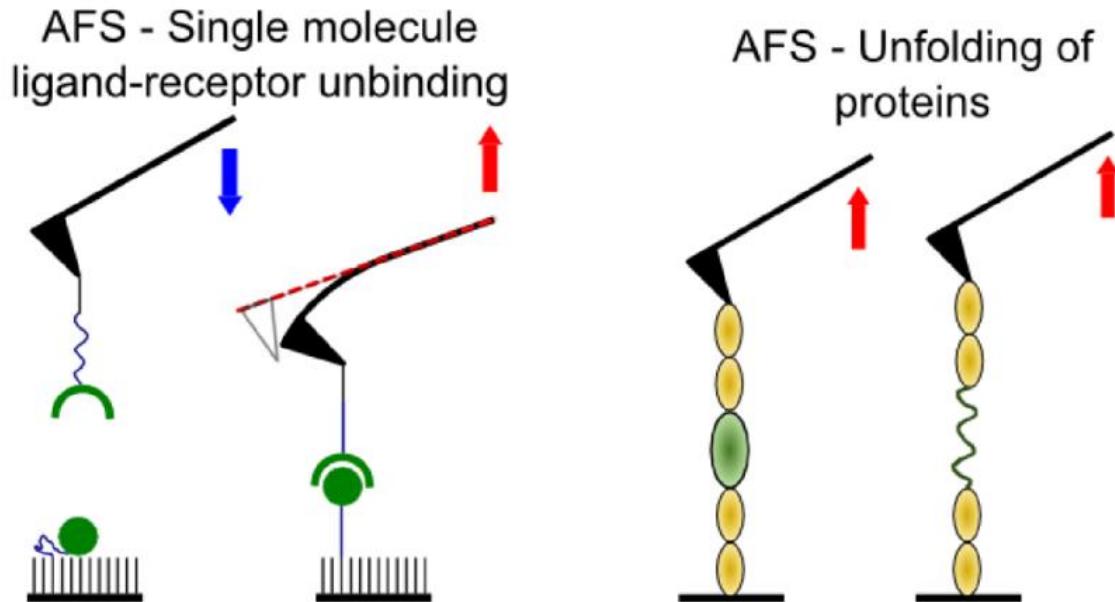
Tumor dovodi do promena u strukturi, mehaničkim osobinama, rastu, morfologiji, interakcija na nivou ćelija, ćelijskoj membrani i citoskeletu

Zdrave i bolesne ćelije se razlikuju u elastičnim i athezivnim osobinama – AFM može da detektuje



AFM – interakcija između dva molekula, razvijanje proteina

- Jedan molekul je na površini, drugi molekul je zakačen na vrh AFM igle
- Meri se rastojanje na kome se raskidaju veze između molekula



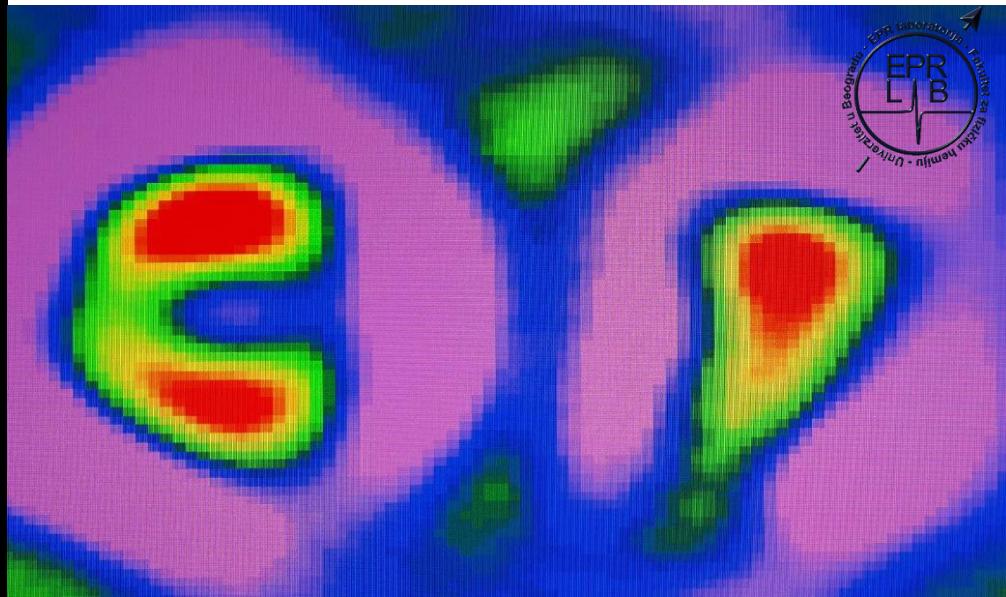
Kalorimetrijske tehnike

Merenje toplotnih promena koje prate:

- Stabilnost i konformacione promene proteina i nukleinskih kiselina
- Interakcije između subjedinica u molekulu proteina
- Vezivanje liganda/supstrata
- Fazne prelaze u membranama

1. **DSC** – diferencijalna skanirajuća kalorimetrija, meri ΔC_p uzorka u funkciji T
2. **ITC** – izotermalna titraciona kalorimetrija, meri količinu toplote koja se otpušta/apsorbuje u toku titracije proteina ligandom ili u toku hemijske reakcije
3. **Termodinamička kalorimetrija** – NEMA kalorimetra, meri temperatursku zavisnost konstante ravnoteže nekom FH metodom (CD, NMR, fluorescencija)

Imidžing tehnike magnetne rezonancije: MRI i EPRI

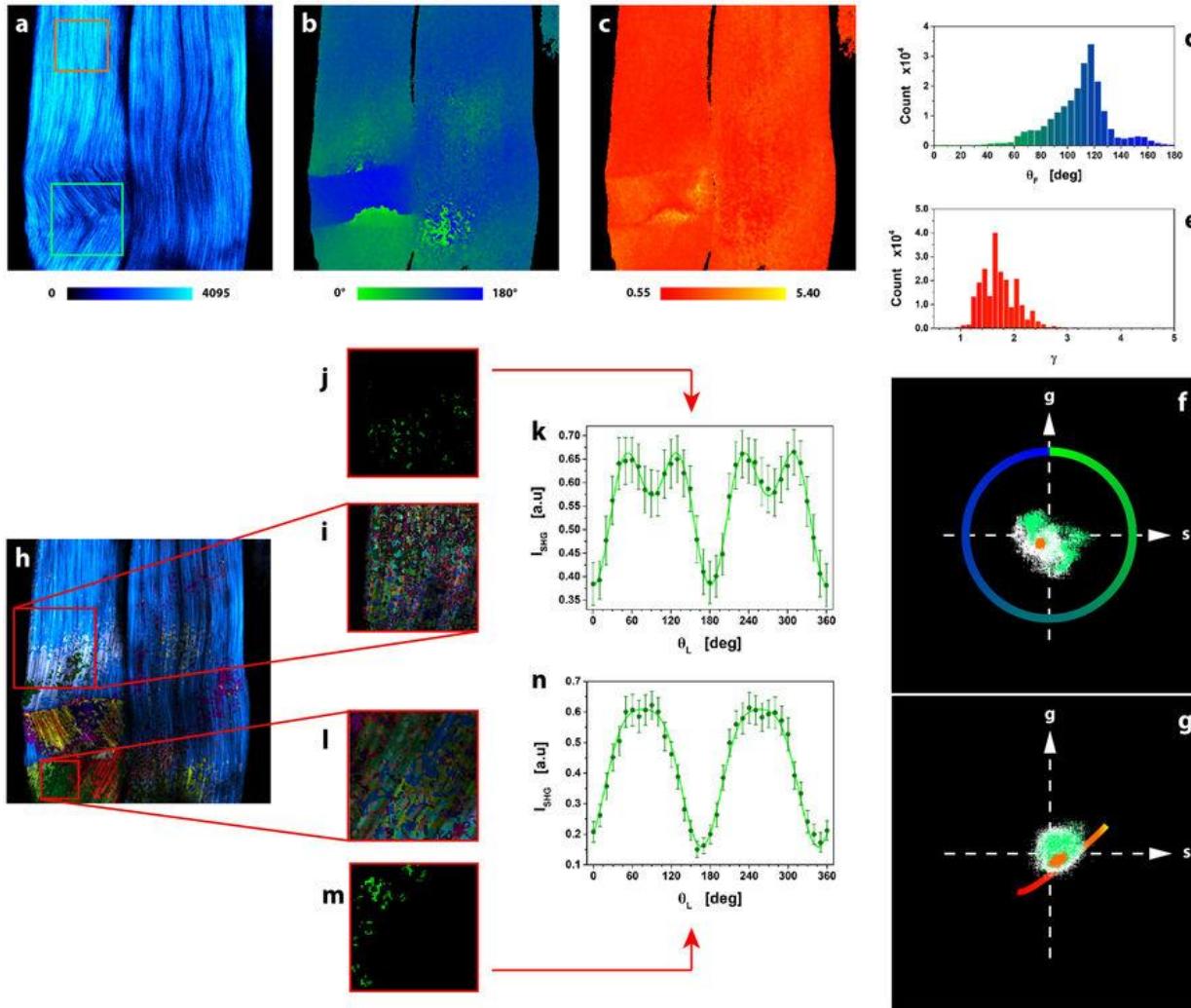


Neke nove metode u BFH

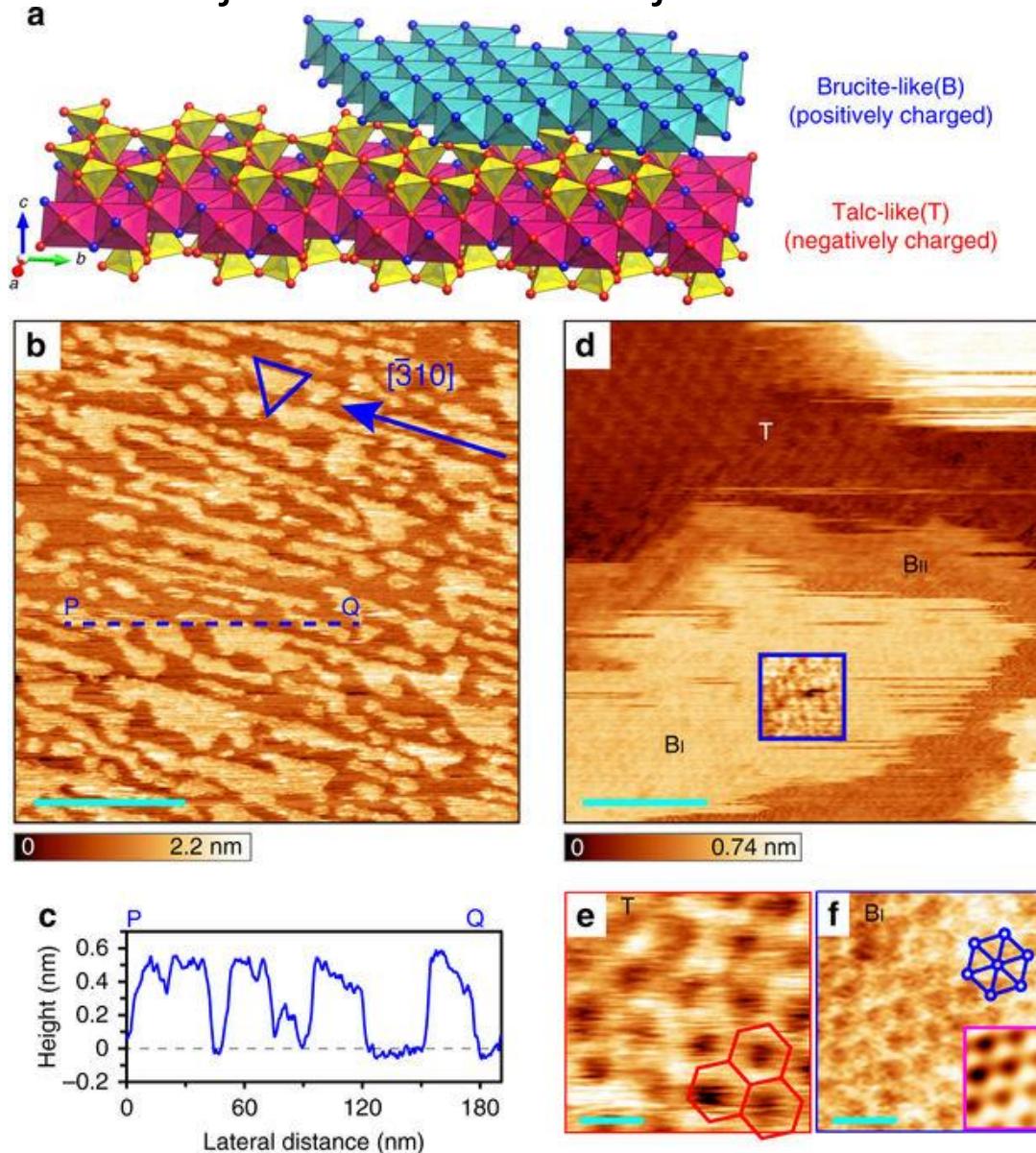


Second Harmonic Generation (SHG) microscopy za proučavanje strukture kolagena kod oštećenih tkiva, posle operacije tumora

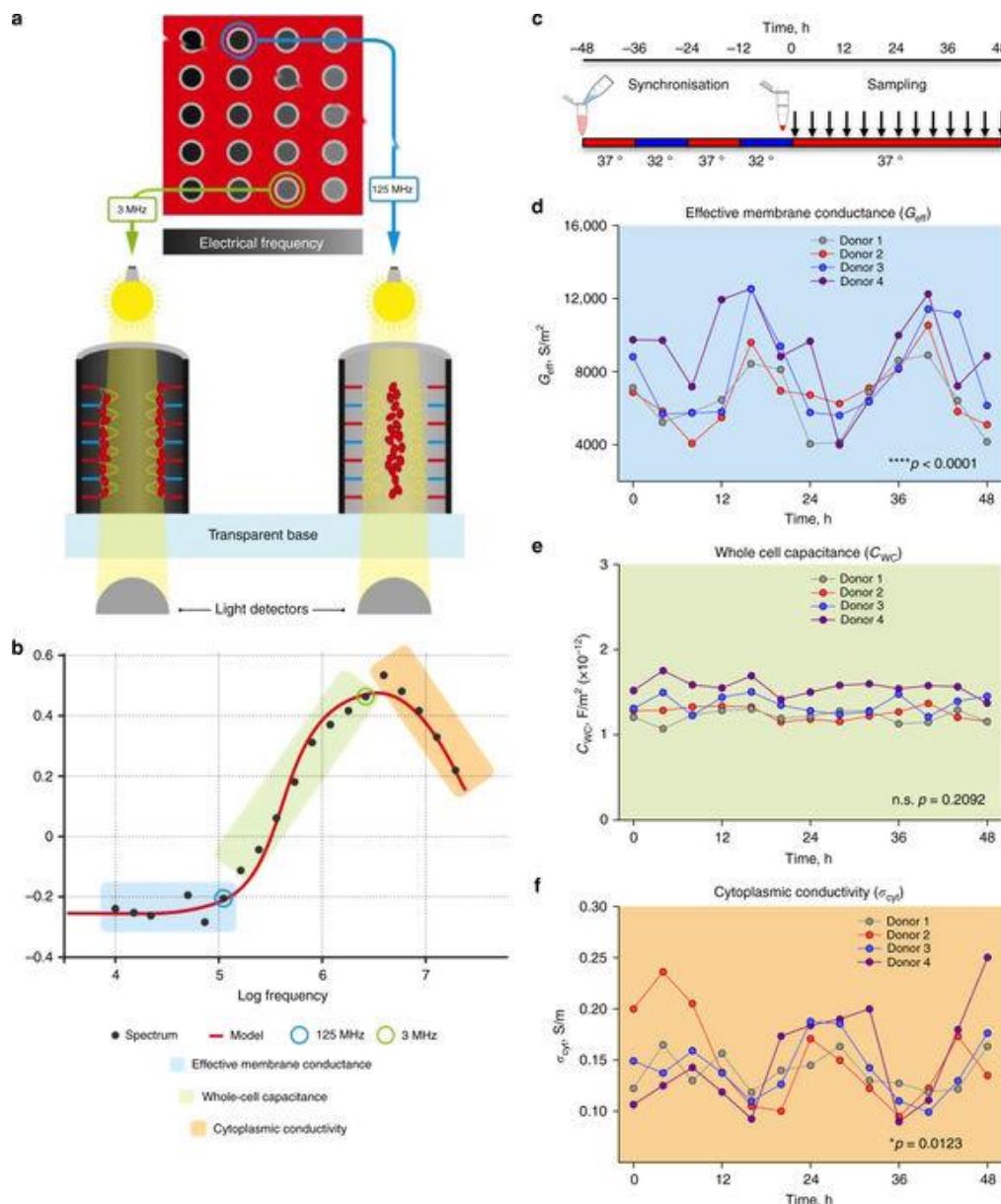
Nelinearna koherentna optička mikroskopija



Ultra-low noise frequency-modulation atomic force microscopy (FM-AFM) – detektuje lokalnu hidrataciju



Dielektroforeza za detekciju cirkadijalnog ritma u crvenim krvnim zrcicima



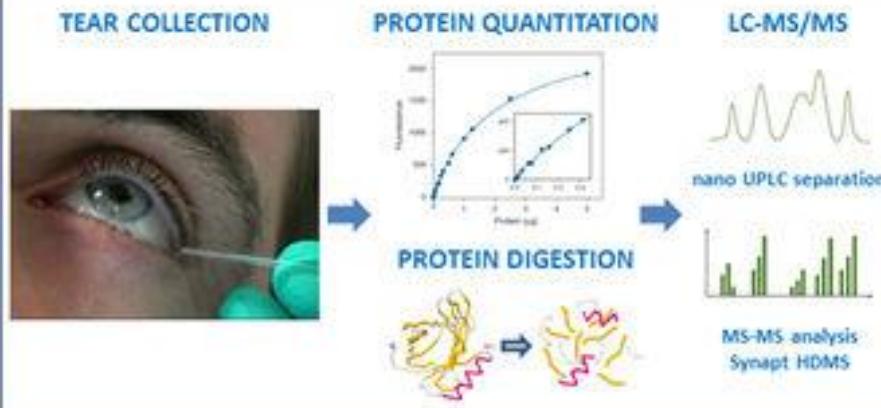
Dva primera istraživanja u BFH

#1

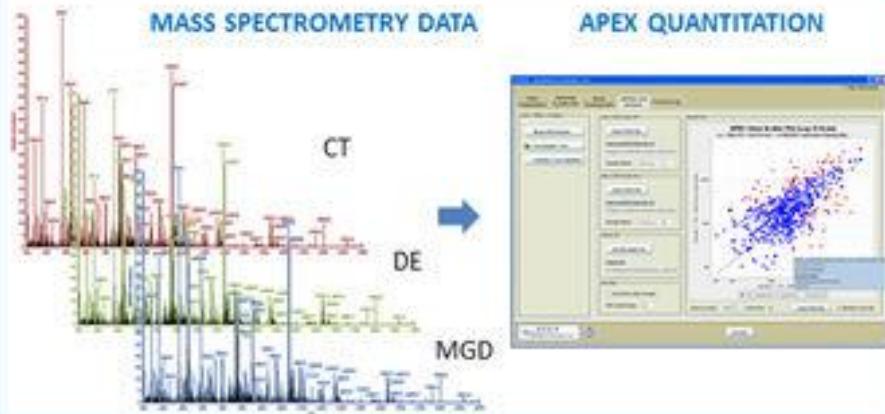
Detekcija ranih biomarkera određenih bolesti u suzama

Scientific Reports 7, Article number: 17478(2017)

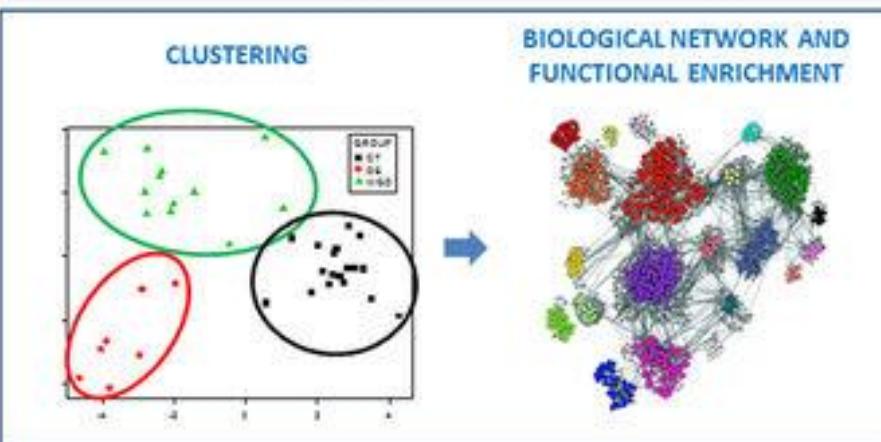
1. TEAR COLLECTION AND SAMPLE PROCESSING



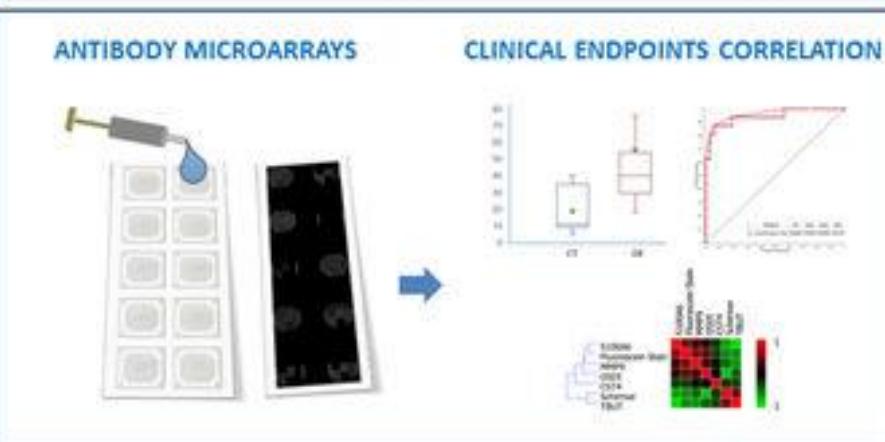
2. DATA PROCESSING AND QUANTITATION



3. STATISTICS AND BIOINFORMATICS



4. BIOMARKER VALIDATION





Mitohondrijalni Fe-S klasteri u neurodegenerativnim bolestima

Ana Popović-Bijelić

Iz predavanja sa 4. međunarodnog kongresa Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, 28.9.2018.

Neurodegenerativne bolesti

- Alzheimer-ova
- Parkinson-ova
- Huntington-ova
- Amiotrofijačna lateralna skleroza (ALS)
- Prionska bolest
- Spinocerebelarna ataxia
- Spinalna muskularna atrofija

...

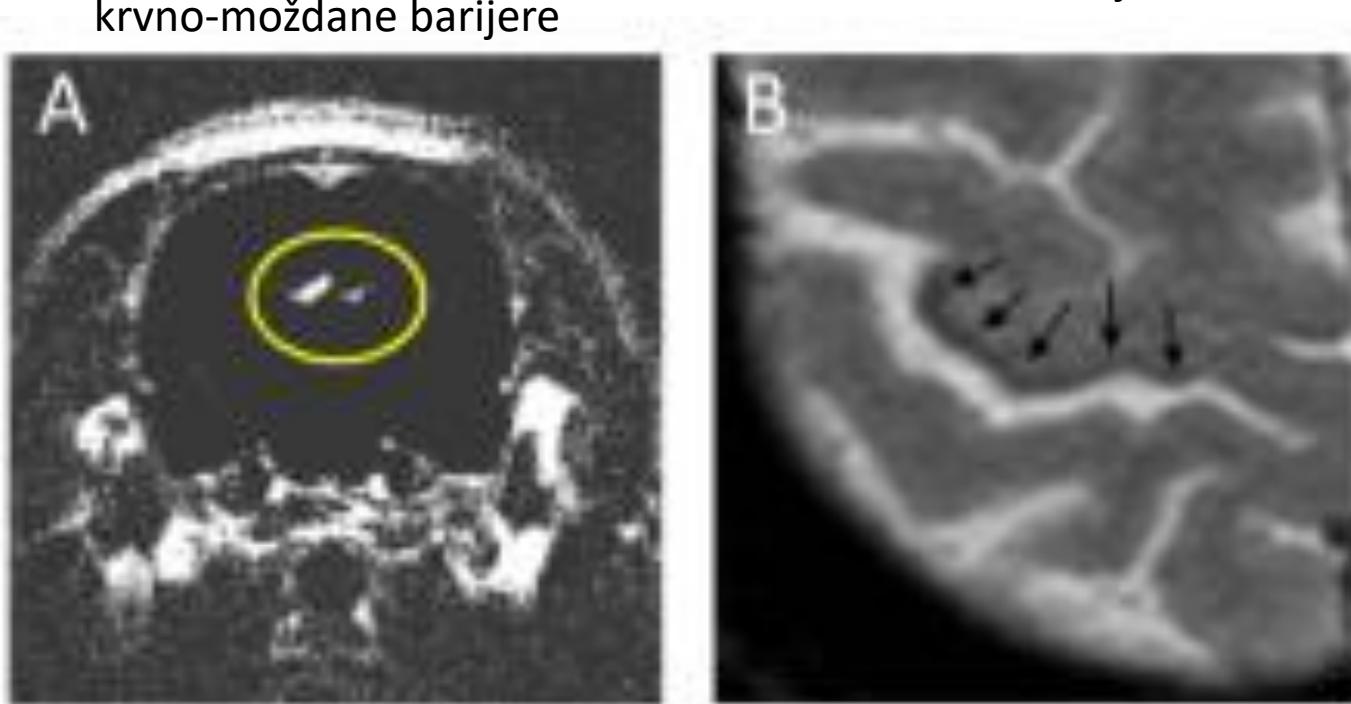
Neurodegenerativne bolesti – mitohondrijalna disfunkcija

- Akumulacija i intracelularna agregacija pogrešno savijenih proteina
ALI RAZLIČITI PROTEINI KOD RAZLIČITIH ND
- Metali
ALI NE SAMO REDOKS AKTIVNI
- ROS / RNS

ND se veoma razlikuju klinički i patofiziološki, ali izgleda da postoji zajednički mehanizam nastanka/progresije bolesti koji ima veze sa **metabolizmom gvoždja**

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)

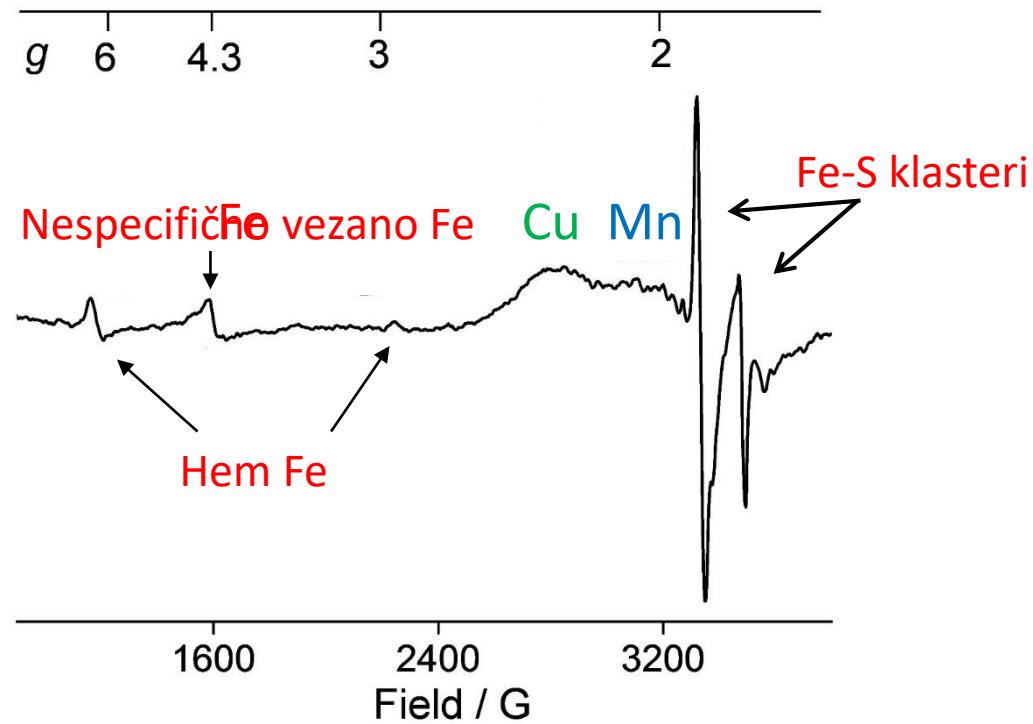
MRI studije: 2009, 2013. god



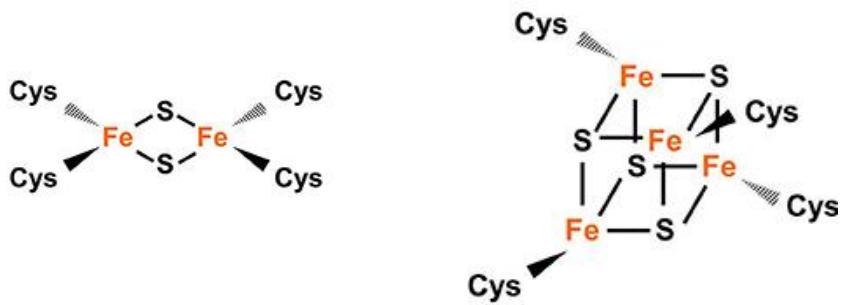
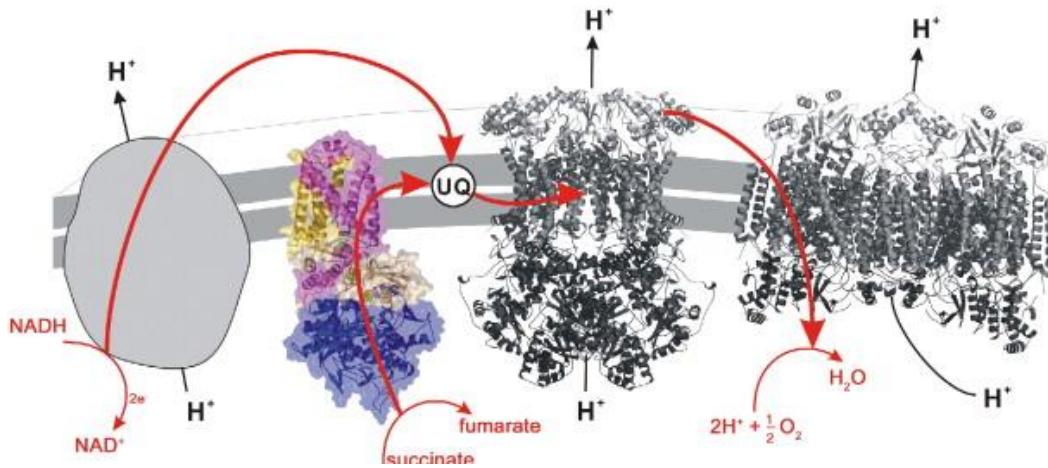
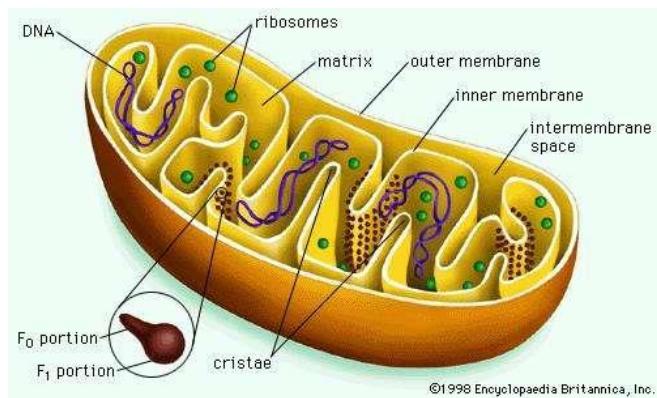
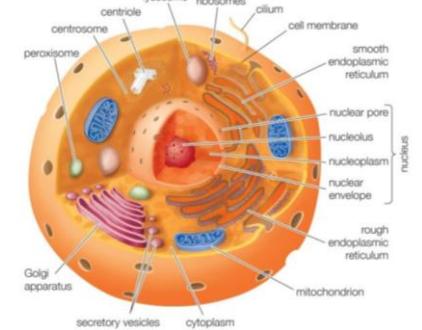
Andjus, P. et al. Anatomical Rec (2009) 292:1882–1892

Ignjatović A. et al. J Magn Reson Imaging (2013) 38:1472-1479

Ex vivo EPR spektroskopija pacovskog mozga @15K

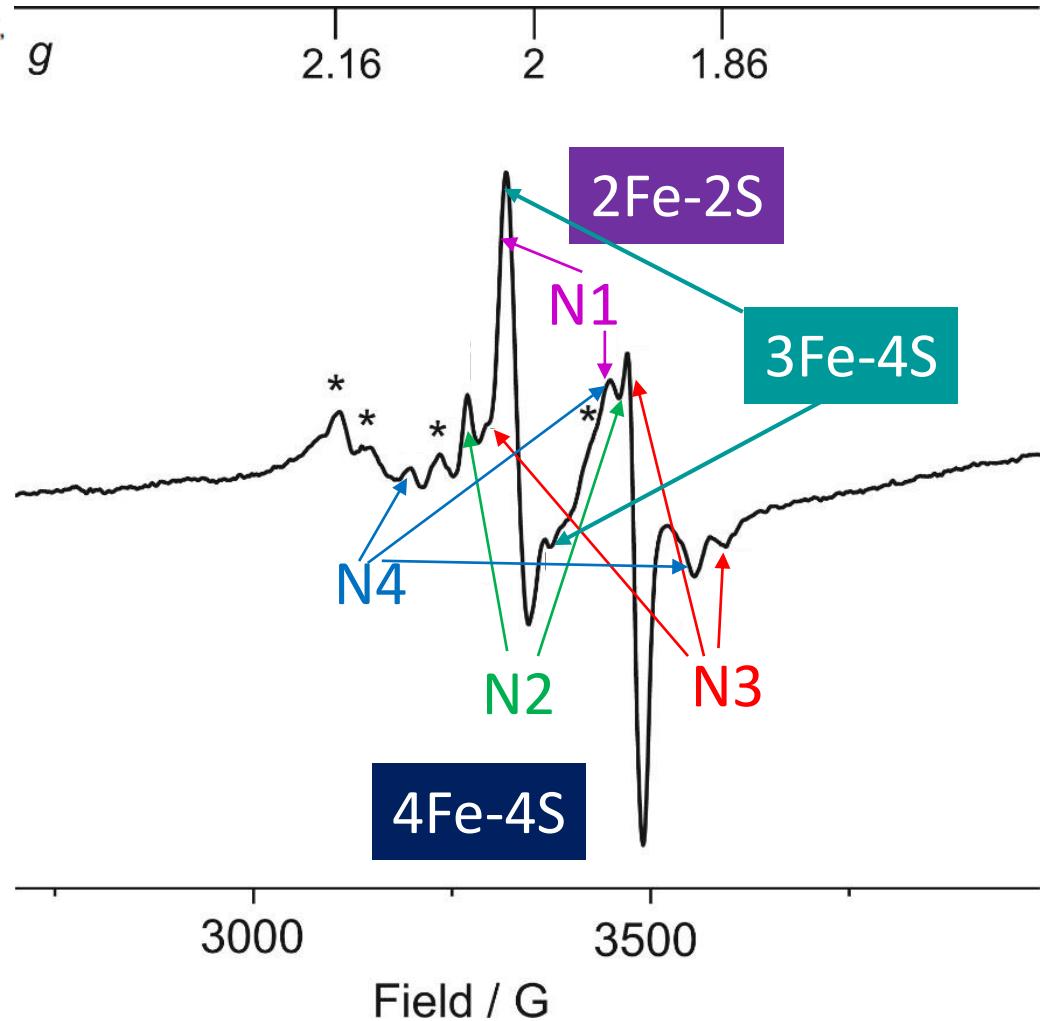


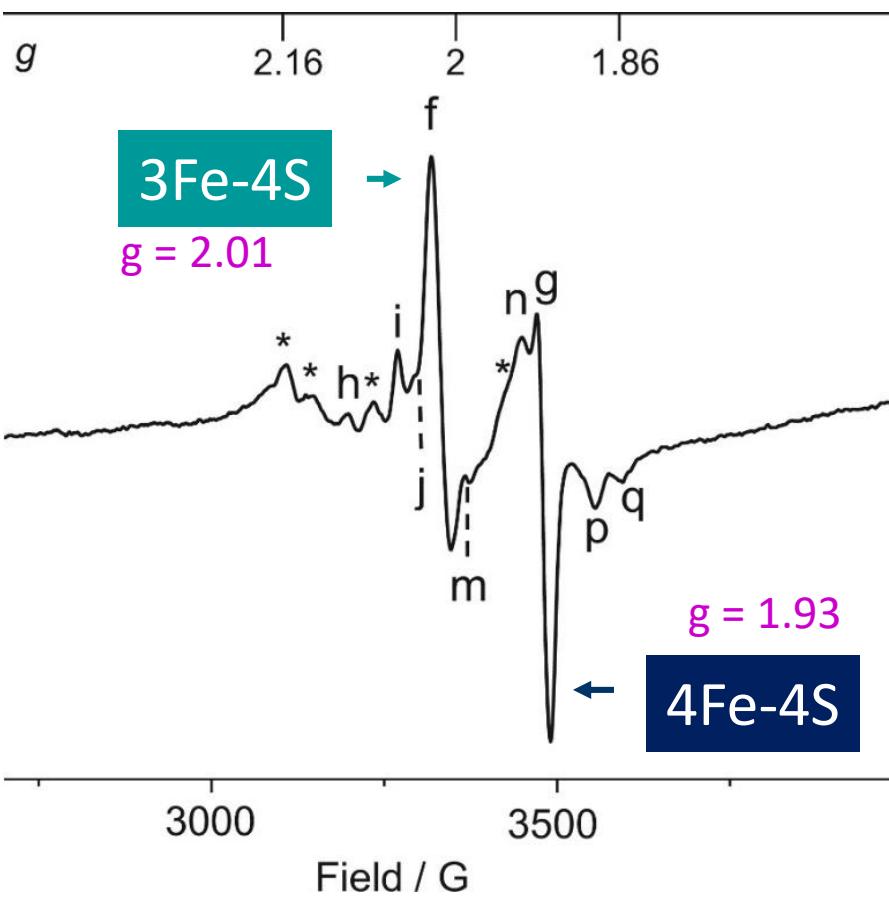
EPR istraživanja su trajala dve godine, 2014-2015.





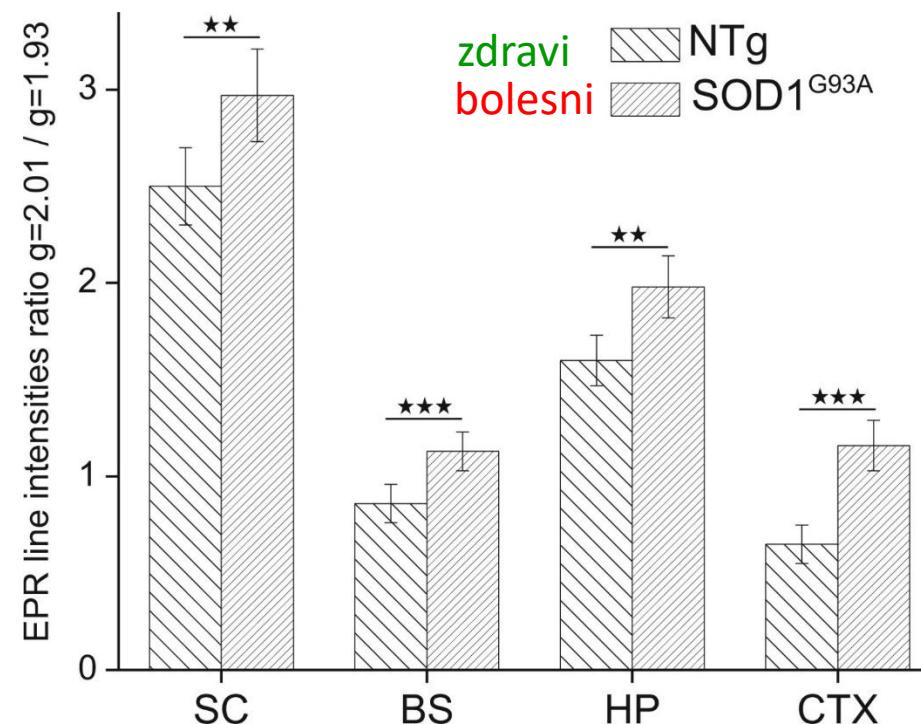
Original article

Iron-sulfur cluster damage by the superoxide radical in neural tissues of the SOD1^{G93A} ALS rat modelAna Popović-Bijelić ^{a,*}, Miloš Mojović ^a, Stefan Stamenković ^b, Miloš Jovanović ^b, Vesna Selaković ^c, Pavle Andjus ^b, Goran Bačić ^a

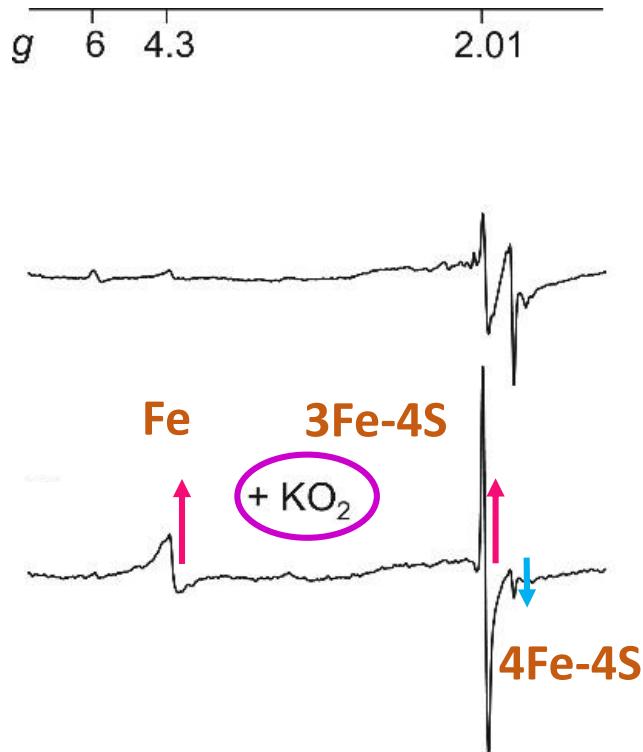


Različiti odnosi intenziteta pikova na $g=2.01$ i $g=1.93$

A to znači različite količine $3\text{Fe}-4\text{S}$ i $4\text{Fe}-4\text{S}$



Zašto je taj odnos povećan kod bolesnih pacova?



Detektovali smo veće oksidativno oštećenje kod bolesnih nego kod zdravih

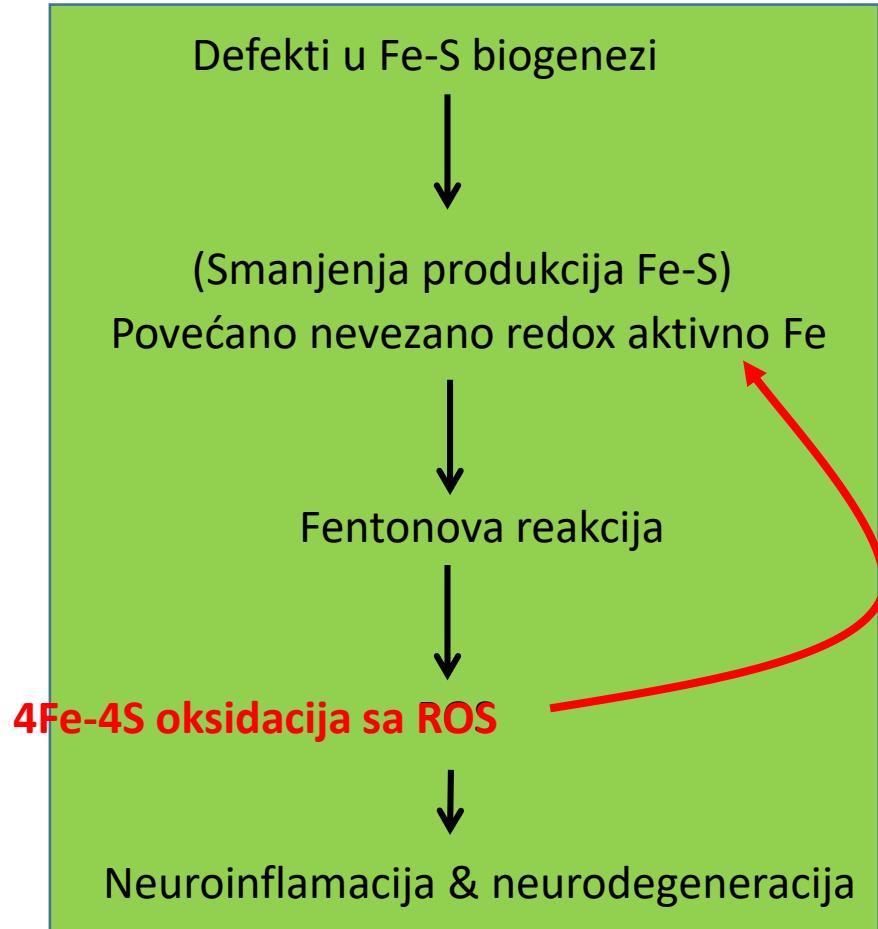
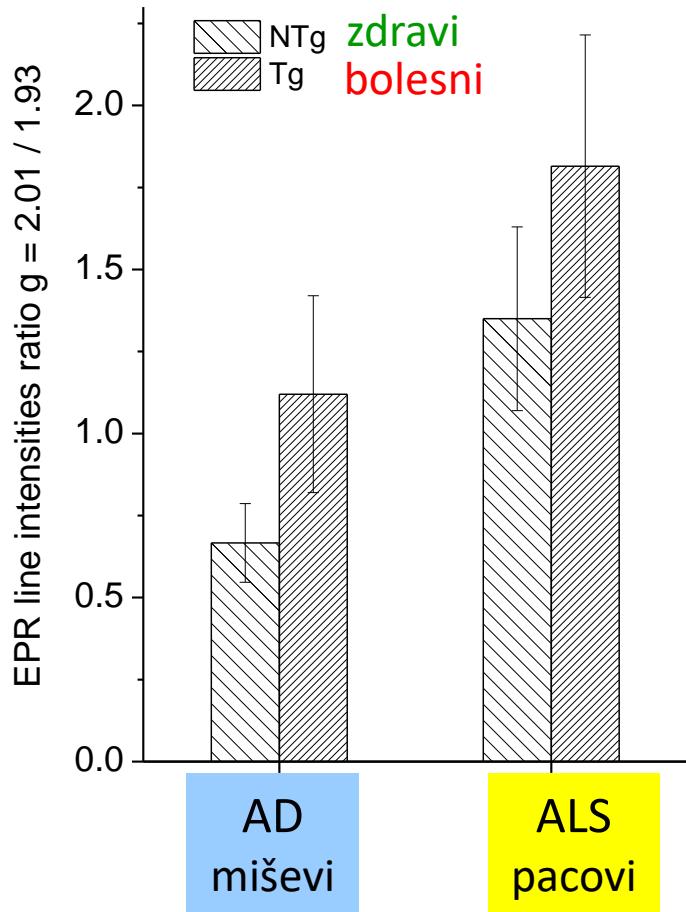
Predložili smo da je **4Fe-4S** izvor nevezanog (slobodnog) **Fe**

Ako ima slobodnog Fe u ćeliji to znači da ima više OH[•]

Nama se činilo da ovo ima smisla

Pa smo zato pogledali i mozgove miševa koji boluju od Alchajmera...

Mišji model Alchajmerove bolesti



Čemu služe ovi rezultati, šta smo zaključili?

- Neophodno je razumeti biomolekularne mehanizme za nastanak ili progresiju neke bolesti
- Neophodno je pronaći pravu metu gde šaljete lek
- Neophodno je dizajnirati lekove koji su selektivni
- Mitohondrije su definitivno mete u ranoj patogenezi ND bolesti
- Iako esencijalno različite, ND bolesti imaju isti „potpis“, mitohondrijalnu disfunkciju i oksidativno oštećenje
- Nevezano redoks aktivno **Fe i ROS** su možda idealne terapeutske mete
- Ipak, činjenica je da trenutno postoji veliki broj lekova i tretmana ali nijedan nije dovoljno efikasan



Istraživački tim – fizikohemičari, biolozi, i veterinari
Fakultet za fizičku hemiju
Biološki fakultet
Veterinarski fakultet
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“