

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Tamara Š. Janković

**GLIKOBIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
MOLEKULSKIH OBRAZACA KOJI SADRŽE
GAMA-GLUTAMIL TRANSFERAZU U
EKSTRACELULARNIM VEZIKULAMA I
SOLUBILNOM SUBPROTEOMU SEMENE
PLAZME ČOVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Tamara Š. Janković

**GLIKOBIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
MOLEKULSKIH OBRAZACA KOJI SADRŽE
GAMA-GLUTAMIL TRANSFERAZU U
EKSTRACELULARNIM VEZIKULAMA I
SOLUBILNOM SUBPROTEOMU SEMENE
PLAZME ČOVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Tamara Š. Janković

**GLYCOBIOCHEMICAL
CHARACTERISATION OF MOLECULAR
PATTERNS ASSOCIATED WITH GAMMA-
GLUTAMYL TRANSFERASE IN
EXTRACELLULAR VESICLES AND SOLUBLE
SUBPROTEOME OF HUMAN SEMINAL
PLASMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

Mentori doktorske disertacije:

Dr sc. Aleksandra Zeljković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Katedra za medicinsku biohemiju

Dr sc. Miroslava Janković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije - INEP

Odeljenje za imunohemiju i glikobiologiju

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Jelena Vekić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Katedra za medicinsku biohemiju

Dr sc. Sanja Goč, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije - INEP

Odeljenje za imunohemiju i glikobiologiju

Dr sc. Bato Korać, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Odeljenje za fiziologiju

Datum odbrane:_____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Institutu za primenu nuklearne energije-INEP, Univerziteta u Beogradu, u okviru istraživačke teme: „Kompleksnost humanog glikoma“, koji je finansiran od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.

Ova doktorska disertacija izrađena je pod rukovodstvom i uz pomoć dr Miroslave Janković, naučnog savetnika INEP-a, kojoj dugujem najveću zahvalnost na stručnoj pomoći i korisnim savetima, strpljenju i razumevanju tokom svih faza izrade ove disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. Aleksandri Zeljković, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na saradnji i korisnim savetima koji su značajno doprineli kvalitetu ove disertacije.

Želim da se zahvalim svojim kolegama i prijateljima iz laboratorije dr Sanji Goč, dr Ninoslavu Mitiću, dr Filipu Janjiću, dr Jeleni Danilović Luković i svim kolegama iz INEP-a, na nesebičnoj pomoći i razumevanju tokom godina.

Najveću zahvalnost dugujem suprugu Milošu, roditeljima Vesni i Špiri, bratu Aleksandru i kumi Ivi, koji su mi kroz sve ove godine bili najveći oslonac. Njihova ljubav, strpljenje i podrška, kako u najtežim, tako i u onim radonsim trenutcima, dali su mi snagu da nastavim i ne odustanem. Ovaj rad je, u svakom smislu, i njihov poduhvat, jer su bili uz mene na svakom koraku ovog puta.

Glikobiohemijska karakterizacija molekulskih obrazaca koji sadrže gama-glutamil transferazu u ekstracelularnim vezikulama i solubilnom subproteomu semene plazme čoveka

SAŽETAK

Gama-glutamil transferaza (GGT; EC 2.3.2.2) je enzim koji pokazuje strukturnu heterogenost nastalu usled tkivno-specifične glikozilacije i različitih mehanizama oslobađanja sa membrane. Cilj ovog rada bio je da se, na osnovu glikobiohemijske karakterizacije molekulskih obrazaca koji sadrže GGT, po prvi put, definišu referentni parametri za anotaciju različitih molekulskih formi enzima. Ovakav pristup omogućava povezivanje enzimске aktivnosti sa strukturnim svojstvima GGT i može biti dopuna standardnom određivanju njegove aktivnosti.

Analizirani su pulovi normospermičnih i oligospermičnih uzoraka semene plazme, iz kojih su izdvojene ekstracelularne vezikule (EV; 100000 × *g* talog) i solubilni subproteom (sol-P; 100000 × *g* supernatant). Populacije EV su razdvojene lektinskom afinitetnom hromatografijom. Solubilizacija EV je vršena da bi se izolovali domen otporni na deterdžent. GGT forme u sol-P su razdvojene gel-filtracijom. Karakterizacija EV je obuhvatala određivanje ukupne i specifične aktivnosti GGT, lektinske- i imuno-reaktivnosti, analizu veličine, izgleda i elektroforetskog profila vezikula. Solubilne forme GGT okarakterisane su na osnovu aktivnosti enzima i ko-distribucije proteina, glikana i mucinskih antigena.

Definisani su referentni parametri za anotaciju GGT formi: glikanski potpis, solubilizacioni potpis i homologni/heterologni kompleks. Poređenje b-GGT (*big*-GGT) između normospermičnih i oligospermičnih uzoraka ukazalo je na razlike u kontekstu prezentacije WGA-reaktivnih membranskih glikana EV, kao i u distribuciji CD9 i galektina-3 u membranskim domenima EV otpornim na dejstvo deterdženta. U sol-P frakciji obe grupe najzastupljenija je bila s-GGT (*small*-GGT), a njeni obrasci se nisu razlikovali po ko-distribuciji proteina i glikoproteina.

Dobijeni rezultati proširuju saznanja o molekulskoj heterogenosti GGT i ukazuju da se ovaj enzim može posmatrati kao kompozitni biomarker. Uočene razlike u b-GGT formi predstavljaju potencijalne biomarkere koji zahtevaju dalju validaciju.

Ključne reči: gama-glutamil transferaza, b-GGT, semena plazma, ekstracelularne vezikule, solubilni subproteom

Naučna oblast: Medicinske nauke - Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

Glycobiochemical characterisation of molecular patterns associated with gamma-glutamyl transferase in extracellular vesicles and soluble subproteome of human seminal plasma

ABSTRACT

Gamma-glutamyl transferase (GGT; EC 2.3.2.2) is an enzyme that exhibits structural heterogeneity arising from tissue-specific glycosylation and different mechanisms of release from the membrane. The aim of this study was to define, for the first time, reference parameters for the annotation of different molecular forms of the enzyme, based on glyco-biochemical characterization of molecular patterns associated with GGT. This approach allows the integration of enzymatic activity with the structural features of GGT, representing an extension of the standard activity-based evaluation.

Pools of normospermic and oligospermic seminal plasma samples were analyzed, from which extracellular vesicles (EV; 100,000 × g pellet) and the soluble subproteome (sol-P; 100,000 × g supernatant) were isolated. EV populations were separated by lectin affinity chromatography. EV solubilization was performed in order to isolate detergent-resistant domains. GGT forms in sol-P were separated by gel filtration. EV characterization included determination of total and specific GGT activity, lectin and immunoreactivity, as well as analysis of vesicle size, morphology, and electrophoretic profile. Soluble GGT forms were characterized based on enzyme activity and the co-distribution of proteins, glycans, and mucin antigens.

Referent parameters for annotation of GGT forms were defined: glycan signature, solubilization signature, and homologous/heterologous complex. Comparison of b-GGT (big-GGT) between normospermic and oligospermic samples revealed differences in the presentation of WGA-reactive membrane glycans on EV, as well as in the distribution of CD9 and galectin-3 within membrane domains of EVs resistant to detergent treatment. In the sol-P fraction of both groups, s-GGT (small-GGT) was the most abundant form, and its patterns did not differ in terms of the co-distribution of proteins and glycoproteins.

The obtained results expand the understanding of the molecular heterogeneity of GGT and indicate that this enzyme can be viewed as a composite biomarker. The observed differences in the b-GGT form represent potential biomarkers that require further validation.

Keywords: gamma-glutamyl transferase, b-GGT, seminal plasma, extracellular vesicles, soluble subproteome

Scientific field: Medical Sciences – Pharmacy

Specific scientific field: Medical Biochemistry

Lista skraćenica:

ABC	avidin-biotin kompleks	engl. <i>avidin-biotin complex</i>
AK	aminokiselina	engl. <i>amino acid</i>
Alix	protein X koji interaguje sa genom 2 povezanim sa apoptozom	engl. <i>apoptosis-linked gene 2-interacting protein X</i>
b-GGT	molekulska forma gama-glutamil transferaze velike molekulske mase	engl. <i>big gamma-glutamyl transferase</i>
BSA	goveđi serumski albumin	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CA19-9	ugljenohidratni antigen 19-9	engl. <i>carbohydrate antigen 19-9</i>
CA125	karcinomski antigen 125	engl. <i>cancer antigen 125</i>
CD	klaster diferencijacije	engl. <i>cluster of differentiation</i>
Con A	konkanavalin A	engl. <i>concanavalin A</i>
Con A - nEV-N	populacija EV normospermičnog uzorka semene plazme koju ne vezuje Con A	engl. <i>Con A-non-bound EV population from normospermic seminal plasma</i>
Con A- nEV-O	populacija EV oligospermičnog uzorka semene plazme koju ne vezuje Con A	engl. <i>Con A-non-bound EV population from oligospermic seminal plasma</i>
Con A - vEV-N	populacija EV normospermičnog uzorka semene plazme koju vezuje Con A	engl. <i>Con A-bound EV population from normospermic seminal plasma</i>
Con A - vEV-O	populacija EV oligospermičnog uzorka semene plazme koju vezuje Con A	engl. <i>Con A-bound EV population from oligospermic seminal plasma</i>
DNK	deoksiribonukleinska kiselina	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EC	Enzimska komisija	engl. <i>Enzyme Commission</i>
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ESCRT	endozomalni kompleks za sortiranje neophodan za transport	engl. <i>endosomal sorting complex required for transport</i>
EV	ekstracelularne vezikule	engl. <i>extracellular vesicles</i>
EV-N	izolat ekstracelularnih vezikula iz normospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>extracellular vesicles from normospermic samples of seminal plasma</i>
EV-O	izolat ekstracelularnih vezikula iz oligospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>extracellular vesicles from oligospermic samples of seminal plasma</i>
f-GGT	slobodna molekulska forma gama-glutamil transferaze	engl. <i>free gamma-glutamyl transferase</i>
FDA	Uprava za hranu i lekove	engl. <i>Food and Drug Administration</i>

Gal-3	galektin-3	engl. <i>galectin-3</i>
GGT	gama-glutamil transferaza	engl. <i>gamma-glutamyl transferase</i>
GPI	glikozilfosfatidilinozitol	engl. <i>glycosylphosphatidylinositol</i>
GSH	glutation (redukovani glutation)	engl. <i>glutathione (reduced glutathione)</i>
GTP	guanozin-trifosfat	engl. <i>guanosine triphosphate</i>
HSP70	protein toplotnog šoka 70	engl. <i>heat shock protein 70</i>
IgG	imunoglobulin G	engl. <i>immunoglobulin G</i>
ILV	intraluminalne vezikule	engl. <i>intraluminal vesicles</i>
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
ISEV	Međunarodno društvo za ekstracelularne vezikule	engl. <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
IU	internacionalne jedinice	engl. <i>International Units</i>
IUBMB	Međunarodna unija za biohemiju i molekularnu biologiju	engl. <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
LAH	lektinska afinitetna hromatografija	engl. <i>Lectin-affinity chromatography</i>
LEV	velike ekstracelularne vezikule	engl. <i>large extracellular vesicles</i>
miRNK	mikro ribonukleinska kiselina	engl. <i>micro ribonucleic acid</i>
m-GGT	molekulska forma gama-glutamil transferaze srednje molekulske mase	engl. <i>medium gamma-glutamyl transferase</i>
MVB	multivezikularno telo	engl. <i>multivesicular body</i>
Ntn	N-terminalna nukleofilna hidrolaza	engl. <i>N-terminal nucleophile hydrolase</i>
PBS	fiziološki rastvor puferisan fosfatima	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PEG	polietilen-glikol	engl. <i>polyethylene glycol</i>
RNK	ribonukleinska kiselina	engl. <i>ribonucleic acid</i>
S100-N	100000 x <i>g</i> supernatant, frakcija iz normospermičnih uzoraka semene plazme	enlg. <i>100,000 × g supernatant, fraction from normospermic seminal plasma samples</i>
S100-O	100000 x <i>g</i> supernatant, frakcija iz oligospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>100,000 × g supernatant, fraction from oligospermic seminal plasma samples</i>
SDS-PAGE	natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza	engl. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sEV	male ekstracelularne vezikule	engl. <i>small extracellular vesicles</i>

s-GGT	molekulska forma gama glutamil transferaze male molekulske mase	engl. <i>small gamma-glutamyl transferase</i>
sol P	solubilni subproteom semene plazme	engl. <i>soluble subproteome of seminal plasma</i>
sol P-N	solubilni subproteom normospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>soluble subproteome of normospermic seminal plasma samples</i>
sol P-O	solubilni subproteom oligospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>soluble subproteome of oligospermic seminal plasma samples</i>
SP	semena plazma	engl. <i>seminal plasma</i>
T100-N	100000 x g talog, obogaćen EV iz normospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>100,000 × g pellet, enriched in EV from normospermic seminal plasma samples</i>
T100-O	100000 x g talog, obogaćen EV iz oligospermičnih uzoraka semene plazme	engl. <i>100,000 × g pellet, enriched in EV from oligospermic seminal plasma samples</i>
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija	engl. <i>transmission electron microscopy</i>
TRIS	tris(hidroksimetil)-aminometan	engl. <i>tris(hydroxymethyl) aminomethane</i>
TS	tetraspanini	engl. <i>tetraspanins</i>
TSG101	gen 101 povezan sa tumorskom osetljivošću	engl. <i>tumor susceptibility gene 101</i>
TX-100	Triton X-100	engl. <i>Triton X-100</i>
WGA	aglutinin pšeničnih klica	engl. <i>Wheat Germ Agglutinin</i>
WGA - nEV-N	populacija EV normospermičnog uzorka semene plazme koju ne vezuje WGA	engl. <i>WGA-non-bound EV population from normospermic seminal plasma</i>
WGA - nEV-O	populacija EV oligospermičnog uzorka semene plazme koju ne vezuje WGA	engl. <i>WGA-non-bound EV population from oligospermic seminal plasma</i>
WGA - vEV-N	populacija EV normospermičnog uzorka semene plazme koju vezuje WGA	engl. <i>WGA-bound EV population from normospermic seminal plasma</i>
WGA - vEV-O	populacija EV oligospermičnog uzorka semene plazme koju vezuje WGA	engl. <i>WGA-bound EV population from oligospermic seminal plasma</i>

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Gama-glutamil transferaza (GGT)	1
1.1.1. Enzimska aktivnost i biološka uloga GGT	1
1.1.2. Organizacija i ekspresija GGT gena čoveka.....	2
1.1.3. Sinteza i maturacija molekula GGT	3
1.1.3.1. Glikozilacija GGT.....	6
1.1.4. Molekulske forme GGT.....	7
1.1.5. GGT kao heterogeni analit: biomarkerski potencijal određivanja molekulskih formi GGT	8
1.1.6. GGT u semenoj plazmi.....	9
1.2. Ekstracelularne vezikule.....	10
1.2.1. Pojam i klasifikacija	10
1.2.2. Membrana EV.....	12
1.2.2.1. Tetraspanini	13
1.2.2.2. Enzimi.....	14
1.2.2.3. Galektini.....	14
1.2.2.4. Glikani.....	14
1.2.3. Intravezikularni sadržaj EV (engl. cargo)	15
1.2.4. Biomarkerski potencijal ekstracelularnih vezikula.....	15
1.2.4.1. EV kao heterogeni analiti u tečnoj biopsiji.....	15
1.2.4.2. Primena EV u in vitro dijagnostici	16
1.2.5. Ekstracelularne vezikule iz semene plazme	18
2. Ciljevi istraživanja	20
3. Materijal i metode	21
3.1. Materijal	21
3.1.1. Uzorci biološkog materijala.....	21
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Frakcionisanje ekstracelularnih vezikula i solubilnog subproteoma	21
3.2.2. Izolovanje EV	22
3.2.3. Imunodot blot.....	23
3.2.4. Određivanje aktivnosti gama-glutamil transferaze	23
3.2.5. Određivanje koncentracije proteina	23
3.2.6. Natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	23

3.2.7. Elektrotransfer proteina (Western blot)	24
3.2.7.1. <i>Imunoblot</i>	24
3.2.7.2. <i>Lektinski blot</i>	24
3.2.8. Transmisionalna elektronska mikroskopija (TEM).....	24
3.2.9. Lektinska afinitetna hromatografija.....	25
3.2.9.1. <i>Lektinska afinitetna hromatografija na Con A-Sepharose 4B</i>	25
3.2.9.2. <i>Lektinska afinitetna hromatografija na WGA - Sepharose 4B</i>	25
3.2.10. Solubilizacija EV i razdvajanje membranskih domena	26
3.2.11. Test vezivanja lektina na čvrstoj fazi.....	26
3.2.12. Određivanje neholesterolskih sterola (NHS) u EV izolatima.....	26
3.2.13. Gel filtracija solubilnog subproteoma semene plazme	27
3.2.14. Precipitacija solubilnog subproteoma semene plazme pomoću polietilen-glikola (PEG).....	27
3.2.15. Određivanje koncentracije CA19-9 i CA125 antigena	27
4. Rezultati	28
4.1. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u ekstracelularnim vezikulama semene plazme	28
4.1.1. Frakcionisanje i izolovanje ekstracelularnih vezikula iz semene plazme	28
4.1.2. Prezentacija b-GGT na membrani EV	31
4.1.2.1. <i>Lektinska afinitetna hromatografija EV-N</i>	32
4.1.2.2. <i>Lektinska afinitetna hromatografija EV-O</i>	35
4.1.3. Distribucija b-GGT na membrani EV	38
4.1.3.1. <i>Solubilizacija EV</i>	38
4.1.3.2. <i>b-GGT na membranskim domenima otpornim na dejstvo deterdženta</i>	40
4.2. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u solubilnom subproteomu semene plazme.....	43
4.2.1. Distribucija GGT u solubilnom subproteomu semene plazme.....	43
4.2.2. Proteinski i glikoproteinski profil frakcija koje sadrže solubilne molekulske forme GGT.....	45
4.3. Referentni parametri za anotaciju molekulskih formi GGT	48
5. Diskusija.....	50
5.1. Definisanje referentnih parametara i anotacija molekulskih formi GGT	50
5.2. Koncept glikobiohemijske karakterizacije	53
5.2.1. Molekulski obrazac i ključne komponente	53
5.2.2. Metode i analitički parametri	55

5.3. Biomarkerski potencial anotiranih molekularnih oblik GGT	56
6. Zaključci.....	58
7. Literatura.....	59

1. Uvod

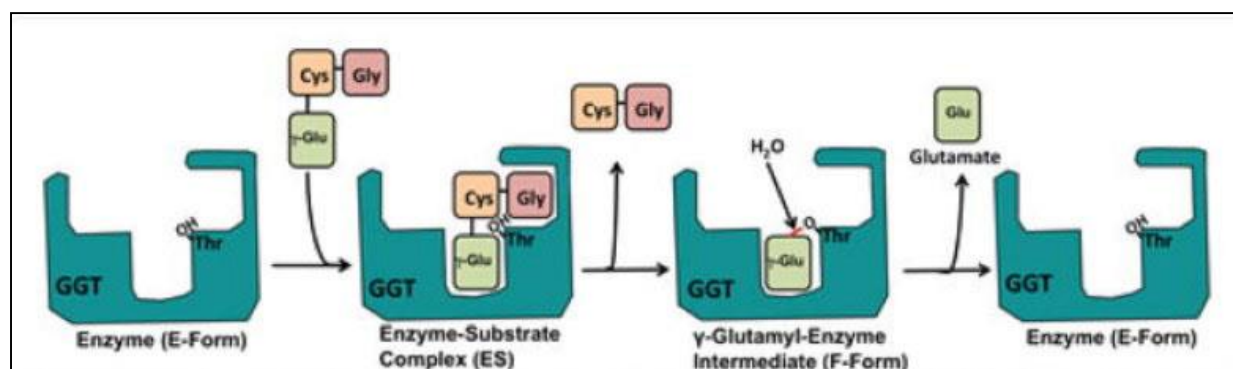
1.1. Gama-glutamil transferaza (GGT)

1.1.1. Enzimsko aktivnost i biološka uloga GGT

Hejns i saradnici su 1950. godine, prvi put opisali reakciju glutaciona sa aminokiselinama, u kojoj nastaju peptidi koji sadrže glutaminsku kiselinu (1). Ovo je dovelo do zapažanja da enzim lokalizovan u bubregu katalizuje prenos gama-glutamil grupe iz glutaciona što rezultira formiranjem nekoliko vrsta gama-glutamil aminokiselina. Utvrđeno je da je i hidrolitička reakcija katalizovana istim enzimom koji prenosi gama-glutamil grupu na molekul vode (2). Ovaj enzim je prvobitno nazvan gama-glutamil transpeptidaza (g-GTP), a potom i gama-glutamil transferaza (GGT) (2–4).

Prema klasifikaciji Komiteta za nomenklaturu, Međunarodne unije za biohemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB), gama-glutamil transferaza (GGT; EC 2.3.2.2) pripada porodici transferaza, odnosno podklasi aminoacil transferaza (5). Transferaze su enzimi koji katalizuju prenos funkcionalnih grupa sa jednog molekula (donora) na drugi molekul (akceptor). Pored toga, GGT pripada i porodici N-terminalnih nukleofilnih (Ntn) hidrolaza (6).

GGT katalizuje hidrolizu i transfer γ -glutamil grupe sa γ -glutamil supstrata (pre svega glutaciona), na različite akceptore kao što su L-aminokiseline (najčešće glicilglicin, glutamin, izoleucin i cistein), dipeptidi i voda (Slika 1) (7). Pored oksidovanog i redukovanog glutaciona, supstrati GGT su i glutation S-konjugati lekova (ksenobiotika), leukotrijen C4, kao i S-nitrozoglutation (glutation S-nitrozitol) (7–9). U zavisnosti od hemijske prirode supstrata i akceptora, GGT ispoljava različite enzimsko aktivnosti koje uključuju glutation γ -glutamat hidrolaznu aktivnost, leukotrijen C4-glutamiltransferaznu i leukotrijen C4 hidrolaznu aktivnost kao i peptidil-transferaznu aktivnost.



Slika 1. Reakcija hidrolize i transpeptidacije koju katalizuje GGT. (Preuzeto iz: Hanigan, MH. Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance. *Adv Cancer Res.* 2014;122:103–141.). Enzyme (E-Form): Enzim (E-forma); Cys: Cistein; Gly: Glicin; μ -Glu: μ -Glutamil; Thr: Treonin; Glutamate: glutamate; Enzyme-Substrate Complex (ES): Enzim-supstrat kompleks (ES); μ -Glytamyl-Enzyme Intermediate (F-Form): μ -glutamil enzim prelazna forma (F-forma).

Osnovni katalitički mehanizam GGT ostao je, uglavnom, nepromenjen od jednoćelijskih organizama do ljudi (10). Uprkos strukturnoj očuvanosti, specifična fiziološka uloga GGT varira u zavisnosti od evolutivne loze: dok bakterije često koriste ovaj enzim za akviziciju hranljivih materija i sintezu specijalizovanih polimera, viši eukarioti ga primarno upotrebljavaju za razgradnju ekstracelularnog glutaciona i homeostazu / reciklažu cisteina (10).

Evolutivna konzerviranost GGT proističe iz njene važne uloge u metabolizmu glutationa i održavanju redoks homeostaze, i ona deluje kao fundamentalni mehanizam antioksidativne odbrane kod različitih vrsta (11).

Kod čoveka, GGT zauzima centralno mesto u gama-glutamil-ciklusu tako što razgrađuje ekstracelularni glutation i stvara komponente koje ćelija unosi i koristi za njegovu ponovnu sintezu, što je ključno za održavanje ravnoteže tiola (12). Tokom razgradnje glutationa, nastaju metaboliti bogati cisteinom, koji u prisustvu jona gvožđa stvaraju slobodne radikale koji iniciraju procese lipidne peroksidacije. GGT, zbog toga, paradoksalno, ima i prooksidativnu ulogu (13).

1.1.2. Organizacija i ekspresija GGT gena čoveka

Gen koji kodira GGT je evolutivno konzerviran i eksprimiran je u sva tri domena života: arhejama, bakterijama i eukariotima (10). Dok jednostavni organizmi poseduju jedan *GGT* gen, sisari su razvili složene multigenske porodice sa više promotora (14). Kod čoveka, ova porodica uključuje aktivne gene i pseudogene, što omogućava složenu regulaciju koja je specifična za tkivo u kom se enzim eksprimira (14,15).

Kod čoveka, *GGT1* gen kodira kompletan i funkcionalan enzim koji je poznat kao GGT1 (16). Pored *GGT1* gena, identifikovano je još 13 srodnih gena od kojih je za šest gena potvrđena ekspresija proteinskog produkta, a za produkt samo jednog gena je pokazano da ima enzimsku aktivnost (14).

Osam gena označenih od *GGT1* do *GGT8* kodiraju protein pune dužine (prekursor sa sekvencama regiona teške i lake subjedinice). Među njima, *GGT3*, *GGT4* i *GGT8* nisu funkcionalni i svrstani su u pseudogene i prema tome označeni kao *GGT3P*, *GGT4P* i *GGT8P* (14).

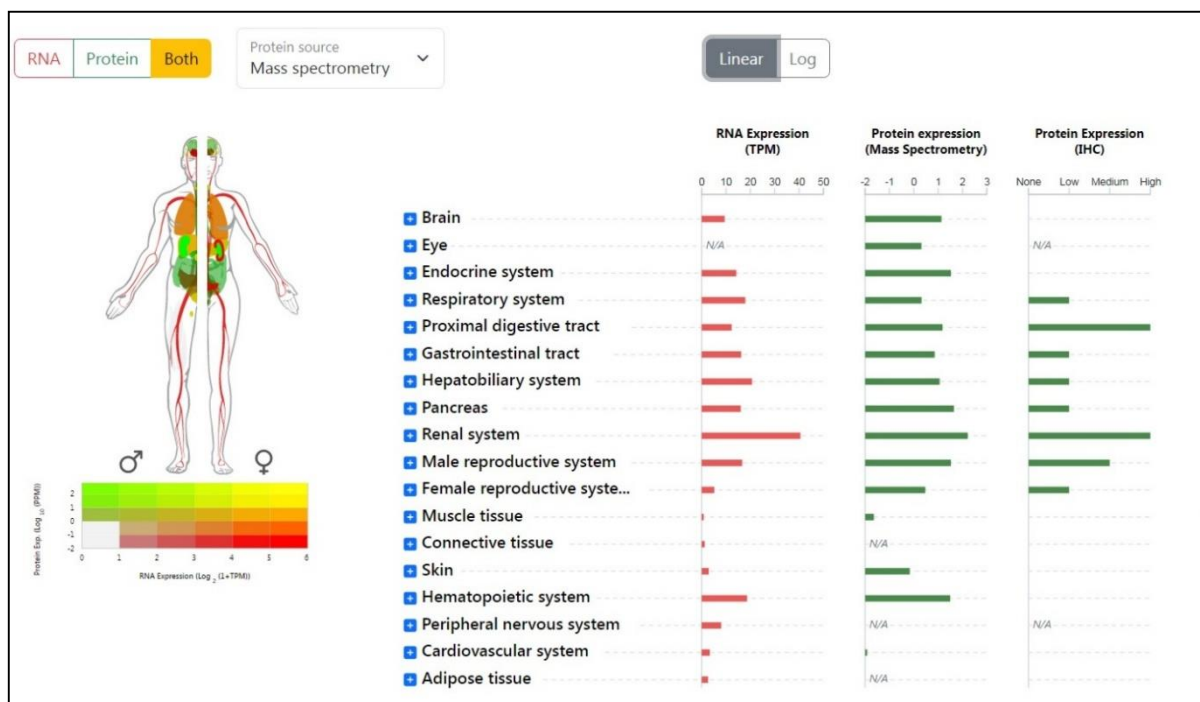
GGT2 gen ima 97% sličnosti u nukleotidnoj sekvenci sa *GGT1* genom, ali njegov proteinski produkt ne poseduje autokatalitičku aktivnost i brzo se degradira (14). Geni *GGT5*, *GGT6* i *GGT7*, takođe, imaju sličnost u sekvenci sa *GGT1* genom. *GGT5* gen kodira enzim koji se razlikuje po strukturi i funkciji od GGT koju kodira *GGT1* gen. *GGT5* pokazuje oko 40% homologije sa *GGT1* ali ima znatno nižu katalitičku aktivnosti kao i drugačiju supstratnu specifičnost (15). Razlike u ekspresiji *GGT1* i *GGT5*, u različitim tipovima ćelija unutar istog tkiva, mogu biti odgovorne su za njihovu supstratnu specifičnost (16). Geni *GGT6* i *GGT7* kodiraju proteine koji nemaju potvrđenu enzimsku aktivnost, a njihova funkcionalna uloga još uvek nije u potpunosti razjašnjena (14).

Pored gena koji kodiraju protein pune dužine, identifikovani su i geni koji imaju potencijal kodiranja lanca lake subjedinice GGT i oni su označeni od *GGTLC2* do *GGTLC5*. *GGTLC1* do *GGTLC3* su funkcionalni geni ali nije poznata uloga proteina koji oni kodiraju. *GGTLC4* i *GGTLC5* su svrstani u pseudogene i prema tome označeni kao *GGTLC4P* i *GGTLC5P* (14).

Familija GGT gena čoveka (geni i pseudogeni) je raspoređena na hromozomima 2, 13, 20 i 22 (15). *GGT1* gen je lokalizovan na dugom kraku hromozoma 22 u regionu 11.23 (22q11.23). *GGT1* gen, dužine 16 kb, sadrži 12 egzona. Intron 7 (3.9 kb) sadrži funkcionalni alternativni promotor. Opisano je postojanje više alternativnih promotora i različitih transkripata koji se razlikuju u 5'-nekodirajućim regionima, ali kodiraju isti protein (17).

Ekspresija gena *GGT1* regulisana je na izuzetno složen i tkivno-specifičan način, i zavisi od aktivacije različitih promotora (16). Podaci iz relevantnih baza podataka, kao što je *GeneCards*, otkrivaju da nivoi ekspresije informacione ribonukleinske kiseline, iRNK (engl. *messenger ribonucleic acid*, *mRNA*) i samog proteina, variraju između organa, pri čemu je najviša ekspresija

GGT zabeležena u tkivima sa sekretornom i apsorptivnom funkcijom, prvenstveno u bubrezima, jetri, prostati, pankreasu i duodenumu (Slika 2) (18).



Slika 2. Specifična tkivna distribucija i nivoi ekspresije GGT gena (Preuzeto: GeneCards, The Human Gene Database. GGT1 Gene Page; pristupljeno 8. juna 2026. www.genecards.org). Brain: mozak; Eye: oko; Endocrine system: endokrini sistem; Respiratory system: respiratorni sistem; Proximal digestive tract: proksimalni digestivni trakt; Gastrointestinal tract: gastrointestinalni trakt; Hepatobiliary system: hepatobilijarni sistem; Pancreas: pankreas; Renal system: bubrežni sistem; Male reproductive system: muški reproduktivni sistem; Female reproductive system: ženski reproduktivni sistem; Muscle tissue: mišićno tkivo; Connective tissue: vezivno tkivo; Skin: koža; Hematopoietic system: hematopoetski sistem; Peripheral nervous system: periferni nervni sistem; Cardiovascular system: kardiovaskularni sistem; Adipose tissue: masno tkivo; RNA Expression (TPM): ekspresija RNK (broj transkripta po milionu); Protein expression (Mass Spectrometry): ekspresija proteina (masena spektrometrija); Protein Expression (IHC): ekspresija proteina (imunohistohemija).

Mutacije *GGT1* gena su direktno odgovorne za glutacionuriju, izuzetno retku autozomno-recesivnu bolest koja nastaje usled urođenog deficita ovog enzima (19). Rizik od nastanka akutnog i hroničnog pankreatitisa je, takođe, povezan je sa specifičnim genskim varijacijama unutar *GGT1* lokusa (20,21).

Nivoi ekspresije *GGT1* se značajno menjaju u različitim patofiziološkim stanjima. Povišena ekspresija i aktivnost enzima igraju važnu ulogu u patogenezi astme, kao i u procesima ishemijsko-reperfuzijske povrede tkiva (22). Pored toga, povećana ekspresija *GGT1* gena je uočena kod karcinoma bubrežnih ćelija, hepatocelularnog karcinoma, karcinoma želuca i karcinoma dojke, i u korelaciji je sa lošom prognozom i pojavom metastaza (14).

1.1.3. Sinteza i maturacija molekula GGT

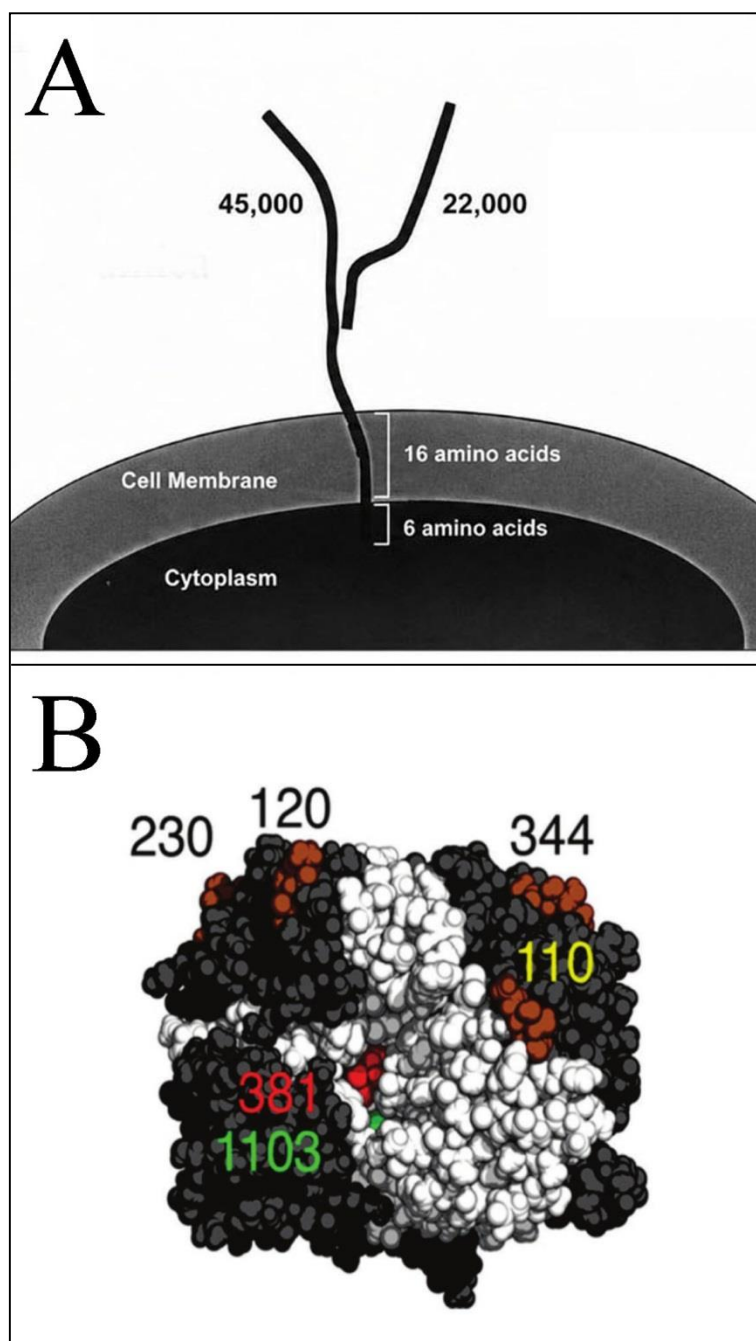
GGT je heterodimerni transmembranski glikoprotein tipa II koji se sintetise kao jednolančani prekursor polipeptid (pro-GGT) (23). Sazrevanje pro-GGT podrazumeva različite posttranslacione procese uključujući i glikozilaciju koja je neophodna za ovaj proces (24).

Pro-GGT podleže intramolekularnoj autokatalitičkoj proteolizi (23). Proteolitičko mesto nalazi se subcentralno i usmereno je ka C-terminalnom kraju. Nakon proteolize, obe subjedinice ostaju nekovalentno povezane i formiraju funkcionalni heterodimer (25). N-terminalni fragment formira tešku subjedinicu, dok C-terminalni fragment formira laku subjedinicu (Slika 3A).

GGT čoveka se sastoji od 569 aminokiselina (AK) (26). Teška subjedinica sadrži 351 AK, a njoj prethodi jedan peptidni lanac (signalni peptid) sastavljen od 27 aminokiselinskih ostataka, koji je rastvorljiv u mastima. Na N-terminalnom kraju teške subjedinice nalazi se hidrofoban domen (5-26 AK) kojim je GGT usidrena u plazma membranu. Relativna molekulska masa lanca teške subjedinice iznosi 48–66 kDa i ona ima šest potencijalnih mesta za N-glikozilaciju (27). Ekstracelularni deo teške subjedinice ostvaruje interakcije sa lakom subjedinicom i doprinosi stabilizaciji heterodimera, kao i pravilnoj ekstracelularnoj orijentaciji enzima na membrani (28).

Laka subjedinica sadrži 189 AK, a njena primarna struktura je očuvanija u odnosu na veliku subjedinicu. Relativna molekulska masa lake subjedinice GGT čoveka iznosi 22–30 kDa i ona ima jedno potencijalno mesto za N-glikozilaciju (27). Na lakoj subjedinici se nalazi i većina ostataka (uključujući katalitički treonin (Thr)) koji formiraju aktivno mesto enzima. Zbog svoje hidrofilne prirode, laka subjedinica je, u potpunosti, lokalizovana ekstracelularno (27,28).

Analiza kristalne strukture GGT čoveka ukazuje da molekul sadrži $\alpha\beta\beta\alpha$ strukturni motiv tipičan za superfamiliju N-terminalnih nukleofilnih (Ntn) hidrolaza (29). Laka subjedinica GGT je sa tri strane okružena teškom subjedinicom, formirajući specifičan prostorni raspored koji slikovito podseća na ruku obmotanu oko lopte. Na izloženoj površini lake subjedinice uočava se supstratni kanal koji vodi do katalitičkog nukleofila Thr-381, koji je smešten u najdubljem delu džepa (Slika 3B) (14). Za razliku od većine prokariotskih analoga čije je aktivno mesto prostorno ograničeno, aktivno mesto GGT čoveka je relativno otvoreno i pristupačno (22). Pored toga, eksperimentalno su uočene dve različite konformacije bočnog lanca katalitičkog ostatka Thr-381, što jasno ukazuje na dinamiku i pomeranje bočnog lanca tokom samog procesa vezivanja supstrata (22).



Slika 3. Struktura GGT.

A. Shematski prikaz lokalizacije GGT na ćelijskoj membrani. (Preuzeto: Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: Its expression and function in carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*. 1998;111:333-342.). 45,000: molekulska masa (u Da) teške subjedinice; 22,000: molekulska masa (u Da) lake subjedinice; Cell membrane: ćelijska membrana; Cytoplasm: citoplazma; aminoacids: aminokiseline.

B. Van der Valsova površina GGT. (Preuzeto: Wang F. i sar. *From Gene to Enzyme: Multidimensional Decoding of the GGT Molecular Family and Its Clinical Tumor Diagnosis*. *Cancer medicine*. 2025; 14(23): e71165). Teška subjedinica (tamnosiva); laka subjedinica (bela); Katalitički Thr-381 (crvena) pozicioniran je u najdubljem regionu džepa lake subjedinice. Četiri od sedam potencijalnih mesta N-glikozilacije (Asn-110, -120, -230 i -344) vidljiva su u ovoj orijentaciji. Anjonsko vezivno mesto (zeleno) unutar pukotine obeleženo je kao (mesto 1103).

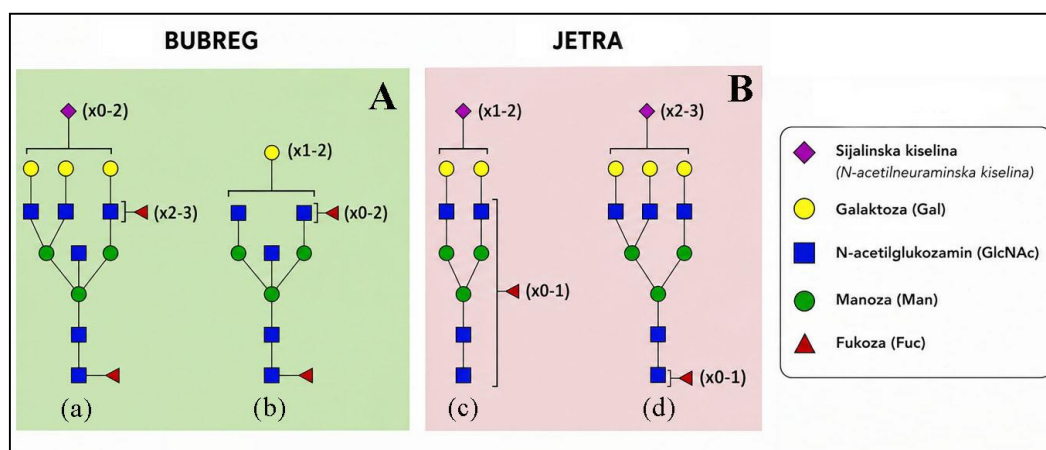
1.1.3.1. Glikozilacija GGT

Glikozilacija je neophodna za pravilno savijanje, autorazgradnju i aktivaciju GGT, iako enzim zadržava svoju aktivnost i kada se glikani uklone iz aktivnog heterodimera (24). N-glikozilacija se može vršiti na više asparaginskih (Asn) ostataka pro-GGT (Asn95, Asn120, Asn230, Asn266, Asn297, Asn344 i Asn511), što zavisi i od prostorne dostupnosti mesta za glikozilaciju.

Pokazano je da glikozilacija GGT varira u različitim tkivima. Razlika u glikozilaciji je odgovorna za razliku u molekularnoj masi teške (47-55 kDa) i lake (22-25 kDa) subjedinice GGT izolovane iz raznih izvora. Kao posledica ovoga, opisane su GGT izoforme koje se razlikuju prema sastavu i strukturi ugljenih hidrata (30-32).

Primenom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, uočeno je da se GGT iz seruma može razdvojiti na 2-3 trake, a formiranje specifičnih izoformi GGT direktno zavisi od prisustva sijalinske kiseline (14,33). Iako su ključne enzimске osobine GGT izoformi iz različitih tkiva međusobno veoma slične (prema vrednostima Mihaelis-Mentenove konstante (K_m), optimalnom pH, termičkoj stabilnosti i osetljivost na kompetitivnu inhibiciju redukovanim glutationom), njihove glavne razlike se ogledaju u specifičnoj elektroforetskoj pokretljivosti i afinitetu vezivanja za lektine (kao što su konkanavalin A (Con A), engl. *Wheat Germ* aglutinin (WGA), lat. *Ricinus Communis* aglutinin (RCA), lat. *Ulex Europaeus* aglutinin (UEA) i drugi) (34,35). Na osnovu njih opisani su tkivno-specifični obrasci glikozilacije (30-32). GGT iz jetre, bubrega i pankreasa se, tako, razlikuju po sadržaju sijalinske kiseline. Con A (lektin koji vezuje visoko/oligomanozne lance i hibridni tip N-glikana) i WGA (lektin koji vezuje jedinice N-acetil glukozamina i sijalinsku kiselinu) pokazuju visok afinitet vezivanja za GGT iz jetre, i nizak afinitet vezivanja za GGT iz bubrega (32).

Molekul GGT sadrži heksoze, heksozamine i sijalinsku kiselinu (22,24,25). Primenom visokoosetljivih metoda masene spektrometrije detaljno su opisani glikani prisutni na GGT iz jetre i bubrega (Slika 4) (24,36). GGT izolovana iz ćelija proksimalnih tubula bubrega, sadrži kompleksne N-glikane: bisektne biantenarne i triantenarne oligosaharidne lance koji imaju visok sadržaj fukoze, i nizak sadržaj sijalinske kiseline (Slika 4A). Sa druge strane, GGT iz jetre, ima visok sadržaj sijalinske kiseline, što je u skladu sa ranijim istraživanjima koji su ukazala na povećanu elektroforetsku pokretljivost i afinitet prema WGA (Slika 4B). Pored toga, uočena je manja mikroheterogenost glikana GGT iz jetre u poređenju sa glikanima GGT iz bubrega, što korelira sa razlikama u njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti na nativnom gelu (24,36).



Slika 4. Tkivno-specifična glikozilacija GGT. (Preuzeto i modifikovano iz: West, Matthew B i sar. Detection of distinct glycosylation patterns on human γ -glutamyl transpeptidase 1 using antibody-lectin sandwich array (ALSA) technology. BMC biotechnology. 2014;14:101.)

A. Glikozilacija GGT iz bubrega; a. Bisektni triantenarni lanac; b. Bisektni biantenarni lanac;
B. Glikozilacija GGT iz jetre; c. Biantenarni lanac; d. Triantenarni lanac.

Promene u glikozilaciji GGT opisane su u različitim malignim tkivima i zavise od tipa tumora (36). Kod karcinoma bubrega, u odnosu na normalno bubrežno tkivo, uočena je smanjena zastupljenost kompleksnih multiantenarnih bisektnih N-glikana (37). Nasuprot tome, kod hepatocelularnog karcinoma, u poređenju sa normalnim tkivom jetre, uočena je povećana zastupljenost oligomanoznih glikana i kompleksnih multiantenarnih N-glikana (38). Sličan obrazac glikozilacije GGT, koji karakterišu povećana sijalinizacija i granjanja lanaca, opisan je i u metastazama kolorektalnog karcinoma u jetri (39).

1.1.4. Molekulske forme GGT

Prvi uvid u postojanju različitih molekulskih formi GGT dobijen je u eksperimentima u kojima je ona oslobođana iz membrane pomoću deterdženta ili proteolitičkim tretmanom. Dejstvo deterdženta dovodi do oslobađanja amfifilne forme enzima, sklone agregaciji sa lipidima i drugim proteinima. Primenom proteolitičkog tretmana membrane papainom, oslobađa se hidrofilna forma enzima, koja nema deo teške subjedinice kojom je GGT vezana za membranu (40).

Razdvajanje serumske GGT zdravih osoba, primenom hidrofobne hromatografije, pokazalo je da se oko 72% GGT nalazi u obliku hidrofilne forme (41). Nasuprot tome, u serumima pacijenata sa različitim oboljenjima jetre, amfifilna forma GGT je bila dominantnija (oko 68%). Tretman seruma papainom dovodi do konverzije amfifilne u hidrofilnu formu GGT (42). Ispitivanja na homogenatima tkiva jetre, su, takođe, pokazala da amfifilna forma GGT, usled proteolitičke modifikacije, prelazi u hidrofilnu formu, čija su veličina i elektroforetska pokretljivost identične hidrofilnoj formi prisutnoj u serumu čoveka (43).

Uočeno je da je u serumu pacijenata sa hepatobilijarnim oboljenjima 60-80% ukupne GGT aktivnosti povezano sa lipoproteinskim kompleksima (44). Ovi kompleksi su razdvojeni u dve frakcije primenom gel filtracije. Frakcija velike molekulске mase (> 600 kDa) detektovana je u serumima pacijenata saolestazom, i pretpostavljeno je da njen najveći deo čini enzim asociran sa lipoproteinom-X. Druga frakcija je obuhvatila GGT formu molekulске mase od 250 do 450 kDa, i u njenom sastavu su bili prisutni kompleksi GGT sa lipoproteinima velike gustine (engl. *high-density lipoprotein*, HDL) (44).

Molekulske forme GGT su detaljno opisane primenom tačne hromatografije visoke rezolucije (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) (43). Analiza distribucije molekulskih formi GGT u plazmi zdravih osoba je pokazala da su kod svih, bez obzira na pol, prisutne četiri forme GGT različite molekulске mase: velika GGT (engl. *big*-GGT, b-GGT), srednja GGT (engl. *medium*-GGT, m-GGT), mala GGT (engl. *small*-GGT, s-GGT) i slobodna GGT (engl. *free*-GGT, f-GGT). Molekulске mase ovih formi su iznosile: >2000 kDa (b-GGT), 940 kDa (m-GGT), 140 kDa (s-GGT) i 70 kDa (f-GGT). Dominantne forme su bile f-GGT i s-GGT (43,45). Biogeneza i način oslobađanja ovih formi do danas nisu razjašnjeni (45). Pretpostavlja se da se b-GGT oslobađa u cirkulaciju dezintegracijom plazma membrane ili putem egzocitoze ekstraćelijskih vezikula (EV). Nasuprot tome, smatra se da m-GGT i s-GGT nastaju postepeno, progresivnom modifikacijom b-GGT (41). Za f-GGT, koja predstavlja monomernu hidrofilnu formu GGT, se smatra da nastaje proteaznom digestijom enzima na površini ćelijske membrane.

Istraživanje molekulске prirode GGT formi vršeno je na uzorcima plazme zdravih osoba i uzorcima žuči pacijenata podvrgnutih transplantaciji jetre (45). Utvrđeno je da, u plazmi, u kojoj su detektovane sve četiri molekulске forme, tretman deterdžentom (deoksiholna kiselina) dovodi do solubilizacije i gubitka b-GGT forme i pojave s-GGT forme, a da na m-GGT i s-GGT nema uticaj. Nasuprot tome, tretman plazme papainom doveo je do gubitka m-GGT i s-GGT, i do pojave f-GGT, a na b-GGT nije imao uticaj. Za razliku od plazme, u uzorcima žuči identifikovana je samo b-GGT i f-GGT, koje su imale slične karakteristike kao i b-GGT i f-GGT iz plazme, u smislu osetljivosti na

deterdžent i papain. Na osnovu rezultata, tj. utvrđenih razlika u solubilizaciji i osetljivosti na proteolizu, pretpostavlja se da se m-GGT i s-GGT nalaze u micelama žučnih kiselina. Da bi se dobio odgovor na pitanje da li se b-GGT nalazi na membrani EV, one su delimično prečišćene iz uzoraka plazme i žuči, ultracentrifugiranjem, i bojene obeleženim antitelima prema teškoj subjednici GGT. Rezultati dobijeni elektronskom mikroskopijom, potvrdili su da je u plazmi i žuči, GGT vezana za EV (45).

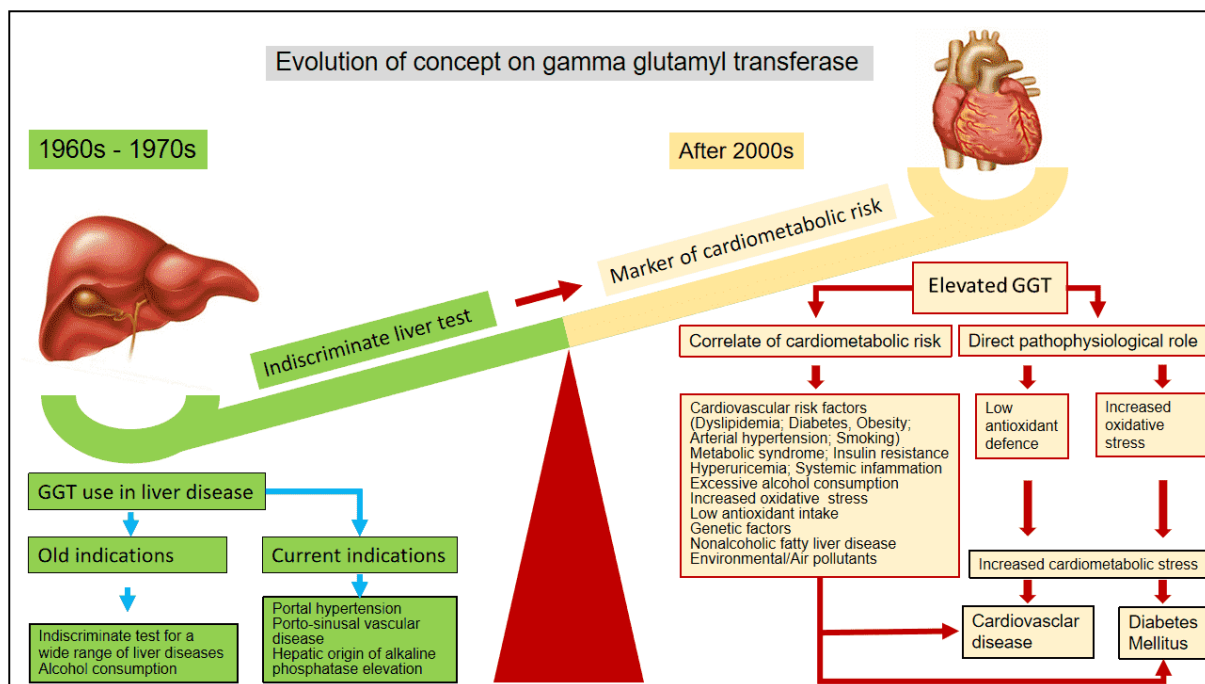
1.1.5. GGT kao heterogeni analit: biomarkerski potencijal određivanja molekulskih formi GGT

Zbog svoje funkcionalne i strukturne povezanosti sa sekretornim i apsorptivnim procesima hepatobilijarnog sistema, GGT se decenijama koristi kao biomarker poremećaja funkcije jetre i žučnih puteva. Povišene vrednosti u serumu su, primarno, povezane sa intrahepatičnomolestazom, akutnim i hroničnim oštećenjima hepatocita, kao i sa toksičnim efektima alkohola i ksenobiotika (46,47). Klinička ispitivanja sprovedena tokom 70-tih godina prošlog veka, identifikovala su serumsku GGT kao rani i izuzetno osetljiv marker alkoholne bolesti jetre (48,49). Ovi nalazi su uveli koncept primene GGT u kliničkoj praksi kao skrining parametra za detekciju štetnih efekata hronične zloupotrebe alkohola, kao i indikatora za praćenje apstinencije i relapsa (49,50).

Savremena saznanja, međutim, ukazuju na to da GGT prevazilazi okvire klasične hepatologije (51). U širokom spektru patofizioloških stanja, u kojima dolazi do povećanog oksidativnog stresa ćelije, javlja se povećana ekspresija GGT i posledično njeno povećano oslobađanje u cirkulaciju (52). Epidemiološke i kliničke studije potvrdile su da je povišena aktivnost serumske GGT povezana sa patofiziološkim stanjima poput metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i sistemske inflamacije, zbog čega je GGT validirana kao nezavisni prediktor dugoročnog kardiometaboličkog rizika (Slika 5) (53–55).

Uprkos visokoj osetljivosti, merenje ukupne aktivnosti GGT u serumu karakteriše niska klinička specifičnost. Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, poslednjih decenija istraživački fokus je usmeren na analizu pojedinačnih molekulskih formi GGT (56). Analizom ukupne i frakcionisane GGT u uzorcima plazme zdravih osoba, utvrđeno je da je udeo f-GGT forme najveći, a da u različitim patofiziološkim stanjima dolazi do njenog smanjenja, i povećanja udela molekulskih formi velike molekulske mase (b-GGT, m-GGT i s-GGT) (57,58).

U kliničkoj studiji u kojoj su ispitivani specifični obrasci GGT povezani sa metabolički asociranom steatotičnom bolesti jetre (engl. *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease, MASLD*), ustanovljeno je da je apsolutna aktivnost svih frakcija GGT (b-GGT, m-GGT, s-GGT i f-GGT) bila povišena u odnosu na kontrolnu grupu (57). Pored toga, najvišu dijagnostičku tačnost za MASLD imala je b-GGT forma, sa 74% osetljivosti i 81% specifičnosti (57). Porast sve četiri forme GGT, posebno s-GGT, uočen je i u serumima alkoholičara, dok je kod osoba u apstinenciji uočen porast samo m-GGT i s-GGT, u poređenju sa kontrolnom grupom (58). Odnos b-GGT / s-GGT bio je značajno niži i kod osoba u apstinenciji i kod alkoholičara (58). Dobijeni rezultati pokazuju da analiza odnosa b-GGT / s-GGT, kao i obrazaca GGT formi, može povećati specifičnost GGT kao biomarkera u diferencijalnoj dijagnozi alkoholizma i MASLD.



Slika 5. Evolucija značaja GGT u biomedicini (Preuzeto: Lonardo A, Ndrepepa G. Concise review: gamma-glutamyl transferase - evolution from an indiscriminate liver test to a biomarker of cardiometabolic risk. Metab Target Organ Damage. 2022;2:17.)

U kontekstu procene kardiometaobličkog rizika, frakcionisanje GGT bi moglo pružiti znatno preciznije podatke u poređenju sa merenjem ukupne aktivnosti enzima (59). Pokazano je da su aktivnosti b-GGT i m-GGT u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa nivoom C-reaktivnog proteina (CRP), u odnosu na f-GGT (59). Biohemijske i histološke analize su potvrdile da se b-GGT selektivno akumulira unutar aterosklerotskih lezija i da je direktno povezana sa histološkim markerima nestabilnosti karotidnih plakova (60). Upravo ova akumulacija b-GGT se prepoznaje kao ključni nosilac kardiometaobličkog rizika.

1.1.6. GGT u semenoj plazmi

U semenoj plazmi (SP) čoveka, aktivnost GGT je i do nekoliko stotina puta veća u poređenju sa normalnim vrednostima u serumu (61). Prvi jasni dokazi o anatomskom poreklu GGT iz SP, datiraju iz 1979. godine, kada je aktivnost enzima ispitivana na uzorcima SP zdravih pojedinaca, frakcionisanih ejakulata (engl. *split-ejaculates*) i uzorku dobijenom od pacijenta sa kongenitalnim nedostatkom semenovoda i semenih kesica (62). Utvrđeno je da aktivnost GGT ne korelira sa koncentracijom fruktoze, niti sa dužinom apstinencije. Analizom frakcionisanih ejakulata uočeno je da se GGT izlučuje dominantno u inicijalnoj fazi ejakulacije, prateći dinamiku pražnjenja prostate. S obzirom na to da je visoka aktivnost GGT detektovana i kod pacijenta sa urođenim nedostatkom semenovoda i semenih kesica, prostata se može smatrati primarnim izvorom GGT u SP (62). Ova činjenica je, kasnije, potvrđena u brojnim nezavisnim studijama (63–65). Zbog svoje izražene tkivne specifičnosti, GGT je predložena kao biomarker funkcionalnog stanja i sekretornog kapaciteta prostate (66).

Nivoi GGT, cinka i magnezijuma su u pozitivnoj korelaciji sa brojem i pokretljivošću spermatozoida samo kod normospermčnih osoba (66). Povećanje broja leukocita i smanjenje nivoa cinka, magnezijuma i GGT u oligospermiji ukazuju na poremećaj u funkciji prostate koja može biti u vezi sa njenom infekcijom. Ukupna aktivnost GGT u korelaciji je sa brojem spermatozoida i koncentracijom citrata. Ejakulati sa abnormalnom likvefakcijom imaju nižu ukupnu aktivnost GGT

nego oni sa normalnom. GGT aktivnost je u negativnoj korelaciji sa pH SP, a u pozitivnoj sa koncentracijom spermatozoida (67).

Majster i saradnici su 1977 godine prečistili GGT iz SP, i procenili njenu molekulsku masu na 70 kDa (61). Dostupni eksperimentalni podaci ukazuju na dva tipa molekula GGT koji su detektovani iz različitih frakcija SP. Izolovani su nativni GGT-1-imunoreaktivni enzim molekulske mase 78 kDa (zrela forma), kao i njen prekursor, koji su po svojim karakteristikama bili slični GGT iz bubrega (68). Pored toga, detektovan je GGT dimer molekulske mase 500 kDa, koji ima upadljivo različitu molekulsku masu subjedinica od 150 kDa i 95 kDa i ne pokazuje imunološku i strukturnu sličnost sa GGT-1 (69).

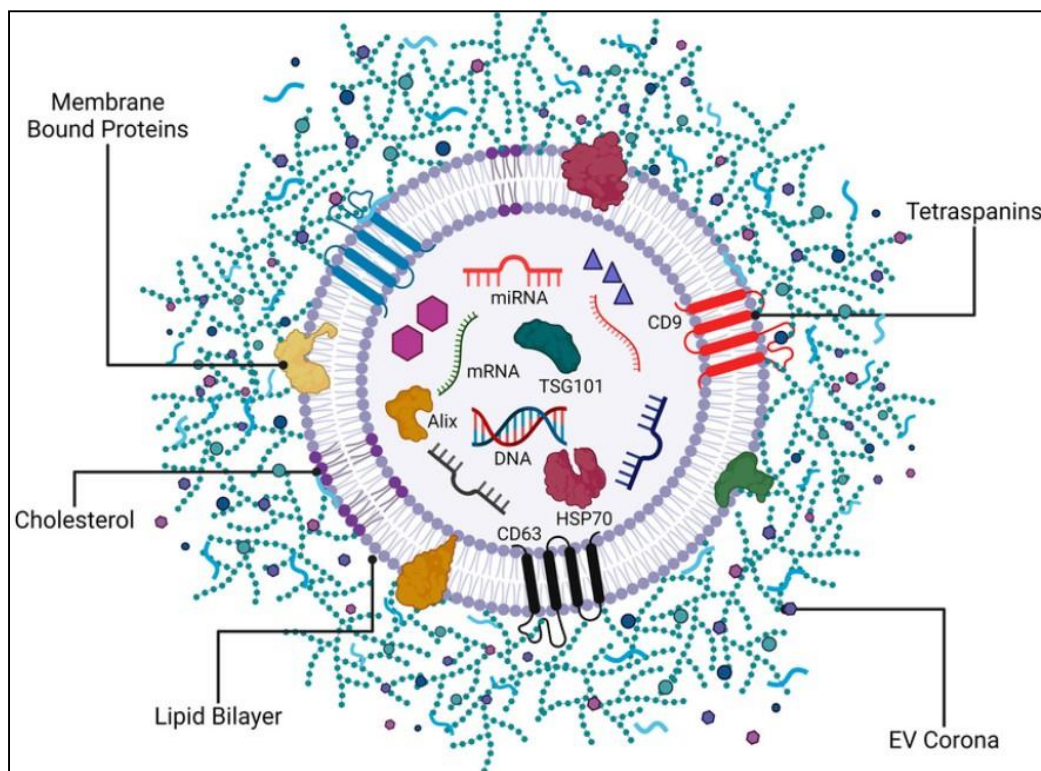
Glikozilacija GGT u SP izučavana je primenom lektinske afinitetne hromatografije sa imobilisanim Con A (konkanavalin A) (70). U uzorcima SP zdravih osoba, Con A je vezao 82,1 % GGT, dok je u uzorcima SP osoba sa infekcijom akcesornih polnih žlezda, vezivanje bilo značajno manje i iznosilo 74,5%. Tretman SP neuraminidazom, koja dovodi do uklanjanja sijalinske kiseline, rezultirao je u povećanom vezivanju Con A za GGT kod obe grupe uzorka (70).

1.2. Ekstracelularne vezikule

1.2.1. Pojam i klasifikacija

Ekstracelularne vezikule (EV) predstavljaju heterogenu grupu čestica nanometarskih dimenzija, ograničenih lipidnim dvoslojem, koje oslobađaju sve vrste ćelija (71). One su konstitutivno prisutne u svim telesnim tečnostima uključujući krv, urin, pljuvačku i semenu tečnost.

EV su se, dugo vremena od pronalaska, smatrale nefunkcionalnim ćelijskim otpadom i artefaktom koji nastaje usled starenja ili oštećenja ćelija (72,73). Razvoj i primena savremenih tehnologija izolacije, vizuelizacije i proteomike, kao i akumulirani eksperimentalni podaci, ukazali su na značaj EV. One su identifikovane kao ključni posrednici u međućelijskoj komunikaciji (72,74). EV od svoje roditeljske ćelije, prenose kompleksne molekulske informacije ciljnim ćelijama, kao što su solubilni bioaktivni proteini, lipidi, različite klase ribonukleinskih kiselina (informaciona RNK (*messenger RNA*, *mRNA*), mikroRNK (*microRNA*, *miRNA*), transportna RNK (*transfer RNA*, *tRNA*), ribozomalna RNK (*ribosomal RNA*, *rRNA*), male nuklearne RNK (*small nuclear RNA*, *snRNA*), cirkularne RNK (*circular RNA*, *circRNA*), duge nekodirajuće RNK (*long non-coding RNA*, *lncRNA*)) i fragmenti genomske ili mitohondrijalne DNK (Slika 6) (75).



Slika 6. Struktura EV. (Preuzeto iz: Fazeli A, Godakumara K. The evolving roles of extracellular vesicles in embryo-maternal communication. Communications Biology. Nature Research. 2024; 7:754.). Membrane Bound Proteins: proteini vezani za membranu; Tetraspanins: tetraspanini, CD9 i CD63; EV Corona: korona EV; Lipid Bilayer: lipidni dvosloj; Cholesterol: holesterol. miRNA: mikro ribonukleinska kiselina (RNK); mRNA: informacijska RNK; TSG101: gen 101 povezan sa tumorskom osetljivošću; Alix: protein X koji interaguje sa genom 2 povezan sa apoptozom; DNA: deoksiribonukleinska kiselina; HSP70: protein toplotnog šoka 70.

Prva klasifikacija EV, koja je dugo bila zastupljena, zasnivala se na pretpostavljenoj biogenezi kao i na opsegu veličine (76). Ona definiše tri tipa EV: egzosome, mikrovezikule i apoptotska tela (71,76,77).

Egzozomi su najmanje EV, a opseg njihove veličine iznosi 30-150 nm. Biogeneza egzozoma se odvija u endozomalnom putu i započinje invaginacijom plazma membrane i formiranjem ranih endozoma. Oni, u toku procesa maturacije, prelaze u kasne endosome, odnosno multivezikularna tela (engl. *multivesicular bodies*, *MVB*). Unutar *MVB* dolazi do sekundarne, unutrašnje invaginacije endozomalne membrane, čime se u lumenu generišu intraluminalne vezikule (engl. *intraluminal vesicles*, *ILV*). Tokom endocitnog sortiranja, specifični transmembranski proteini endozomalnog porekla ostaju gusto pakovani u membranskom dvosloju nastalih vezikula. Nakon transporta duž mikrotubula i fuzije membrane *MVB* sa plazma membranom, vezikule se oslobađaju u ekstracelularni prostor (78). Termin egzozom koji se koristi za EV nastale ovim putem, je, tako, izveden od reči endozom koja ukazuje na put njihove biogeneze i reči egzocitoza koja ukazuje na proces njihove sekrecije.

Mikrovezikule su EV čija je veličina u opsegu 100-1000 nm. One nastaju direktnim pupljenjem sa površine plazma membrane. Ovaj proces zahteva dinamično i lokalizovano narušavanje lipidne asimetrije plazma membrane, što se postiže aktivacijom kalcijum-zavisnih enzima flipaza, flopaza i skramblaza (73,79). Male guanozin trifosfat (*GTP*) hidrolaze (engl. *small Guanosine Triphosphate* (*GTP*) *hydrolases*) su uobičajene komponente regulacije biogeneze mikrovezikula (80).

Apoptotska tela su EV veličine iznad 1000 nm i predstavljaju produkte ćelijske dezintegracije koji se oslobađaju u kasnoj fazi apoptoze. Njihova biogeneza obuhvata stvaranje membranskog mehura, formiranje njegovih izbočina i, na kraju, formiranje same vezikule. Ovi procesi su regulisani različitim faktorima kao što su kinaza lakog lanca miozina (engl. *myosin-light chain kinase*), aktomiozin (engl. *actomyosin*) i protein kinaza 1 povezana sa Rho proteinima (engl. *Rho-associated protein kinase 1, ROCK1*) (81).

Sa napretkom istraživanja biološke uloge i funkcionalnih efekata EV, postalo je jasno da postojeća klasifikacija nije dovoljno precizna, budući da su se prema njoj egzozomi i mikrovezikule preklapali u pogledu svojih fizičkih i biohemijskih karakteristika. Pored toga, nakon izolacije EV, nemoguće je dokazati tačan put njihove biogeneze. Prema najnovijim smernicama Internacionalnog društva za ekstracelularne vezikule (engl. *International Society for Extracellular Vesicles, ISEV*), klasifikacija EV se zasniva na jasno merljivim i objektivnim fizičkim ili biohemijskim karakteristikama: veličini, gustini i biohemijskom sastavu (82). Prema veličini EV su podeljene na male EV (engl. *small EVs, sEV*) koje su manje od 200 nm i velike EV (engl. *large EVs, lEV*) koje su veće od 200 nm. Prema gustini, EV se dele na vezikule niske, srednje i visoke gustine. Prema biohemijskom sastavu dele se na osnovu prisustva ili odustva specifičnih površinskih markera kao što su tetraspanini (CD63, CD81, CD9), flotilin-1 i glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex, (MHC)* klase II), kao i markera intravezikularnog sadržaja: gen 101 povezan sa tumorskom osetljivošću (engl. *Tumor Susceptibility Gene 101, TSG101*), protein X koji interaguje sa genom 2 povezanim sa apoptozom (engl. *Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, Alix*), protein toplotnog šoka 70 (engl. *Heat Shock Protein 70, HSP70*), RNK i DNK (82).

1.2.2. Membrana EV

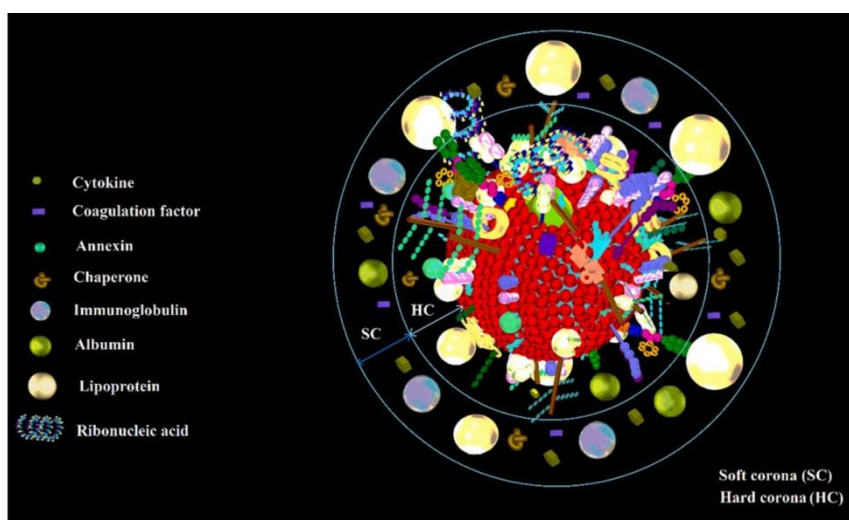
Membrana EV predstavlja visoko organizovan i kompleksan lipidni dvosloj, čiji je molekularni sastav jedinstven i strogo regulisan tokom procesa biogeneze vezikula (83). Iako EV nastaju od plazma membrane roditeljske ćelije, njihova membrana se znatno razlikuje kako po specifičnoj organizaciji i sastavu lipida, tako i po prisustvu određenih klasa proteina/glikoproteina.

Analize lipidnog sastava membrane EV potvrđuju da je ona bogata sfingomijelinom, holesterolom, zasićenim fosfatidilholinom, kao i fosfatidilserinom (84). Ovi lipidi nisu nasumično raspoređeni, već su organizovani u lipidne raftove, koji pokazuju izraženu asimetriju između unutrašnjeg i spoljašnjeg sloja (85). Visoka koncentracija holestera i zasićenih masnih kiselina omogućava gusto pakovanje alifatičnih lanaca, zbog čega je membrana EV izuzetno rigidna, stabilna i poseduje znatno veću otpornost u poređenju sa fluidnijom plazma membranom roditeljske ćelije. Stabilnost membrane EV je od ključnog značaja za očuvanje intaktnosti vezikula i zaštitu njihovog intravezikularnog sadržaja (poput nukleinskih kiselina i proteina) od degradacije enzimima u ekstracelularnom prostoru / telesnim tečnostima.

Analiza membranskih proteina EV je pokazala da oni mogu biti lokalizovani na različite načine: transmembranski proteini, glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol, GPI*) usidreni proteini, periferni proteini povezani elektrostatičkim interakcijama sa lipidima ili drugim integralnim membranskim proteinima kao i specifični solubilni proteini koji su vezani za membranske receptore, ili su adsorbovani drugim tipovima interakcija (86). Među njima, od posebnog značaja su tetraspanini (TS), integralni membranski proteini kao i periferni membranski proteini koji imaju intracelularnu orijentaciju: komponentne endozomalnog kompleksa za sortiranje (engl. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT*), Alix i TSG101, zatim Rab proteini i aneksini. Navedeni proteini predstavljaju markere EV, i u eksperimentalnom radu se koriste za njihovu identifikaciju (87,88).

Za membranu EV se vezuje pojam proteinske korone (Slika 7). Korona je dinamički sloj biomolekula koja, pored toga što štiti EV od imunskog klirensa, predstavlja i primaran molekularni kod prepoznavanja od strane ciljnih ćelija (83). Deo korone EV se formira u ćeliji porekla, a kada se izvrši sekrecija, na membranu EV se mogu vezati i drugi proteini iz ekstracelularnog okruženja (ekstracelularne komponente). Pored proteina i proteinskih kompleksa, u sastav korone mogu ući i lipidi i nukleinske kiseline. Termin tvrda (engl. *hard*) korona se odnosi na komponente koje su u stabilnoj vezi sa površinom EV, a termin meka (engl. *soft*) korona se koristi za komponente koje su slabije vezane za membranu EV i mogu se lako ukloniti u toku različitih eksperimentalnih procedura (83).

Posebno dinamičan segment predstavljaju proteini koji se regrutuju na spoljašnju površinu EV iz ekstracelularnog prostora, formirajući komplekse sa površinskim glikanima i lipidima EV. Pored enzima, u ovu grupu spadaju i galektini, koji prepoznaju i umrežavaju glikozilovane komponente membrane. Glikani glikoproteina i glikolipida koji su integralni deo EV membrane, kao i adsorbovani glikani, formiraju gusti sloj i kompleksnu mrežu na površini EV, analogno kao što formiraju glikokaliks na ćelijskoj membrani (89,90).



Slika 7. Korona EV (Preuzeto iz: Esmaili A, Baghaban Eslaminejad M, Hosseini S. Biomolecular corona potential in extracellular vesicle engineering for therapeutic applications. Biomed Pharmacother. 2025;188:118202.). Korona EV se sastoji od unutrašnjeg sloja: tvrda korona (Hard corona (HC)) i spoljašnjeg sloja: meka korona (Soft corona (SC)). Cytokine: citokin; Coagulation factor: faktor koagulacije; Annexin: aneksin; Chaperone: šaperon; Immunoglobulin: imunoglobulin; Albumin: albumin; Lipoprotein: lipoprotein; Ribonucleic acid: ribonukleinska kiselina;

1.2.2.1. Tetraspanini

Tetraspanini (TS) predstavljaju evoluciono konzerviranu superfamiliju integralnih membranskih glikoproteina koji se karakterišu prisustvom četiri transmembranska domena, dva ekstracelularna domena i specifičnim, očuvanim cisteinskim ostacima (91). Na membrani EV, molekuli poput CD9, CD63 i CD81, prepoznati su kao kanonski površinski markeri (82). Pored toga, TS na membrani imaju sposobnost lateralnog povezivanja u visoko organizovane platforme poznate kao mikrodomeni obogaćeni tetraspaninom (engl. *tetraspanin-enriched microdomains*) (87). Unutar ovih domena, TS formiraju tzv. engl. *tetraspanin web*, dinamičku mrežu interakcija sa drugim netetraspaninskim partnerima, uključujući integrine, receptore i specifične enzime. Najnovije studije potvrđuju da su tetraspaninski domeni odgovorni za prostornu segregaciju i površinsku dostupnost

funkcionalnih proteina na membrani EV, kao i da utiču na njihovo usmeravanje u specifične populacije EV (92,93).

1.2.2.2. Enzimi

Membrana EV je izuzetno bogata enzimima, koji zadržavaju svoju nativnu katalitičku aktivnost i uglavnom su orijentisani ka ekstracelularnom prostoru (71). Oni omogućavaju vezikuli da funkcioniše kao katalitička jedinica sposobna da modifikuje mikrookruženje. Na membrani EV su opisane peptidaze i nukleotidaze, poput CD39 i CD73, koje često formiraju funkcionalne enzimske klastere, a CD73 je predložen kao marker EV mezenhimskih ćelija (94). Pored njih, na spoljašnjoj strani membrane EV prisutne su i matriksne metaloproteinaze (MMP-2, MMP-9), a sa unutrašnje strane membrane prisutni su enzimi za sintezu lipidnih medijatora (ciklooksigenaze i fosfolipaze) (94). Enzimi, generalno, ostvaruju svoju interakciju sa lipidnim dvoslojem EV preko hidrofobnih aminokiselinskih sekvenci. Pored toga, postoji grupa enzima, koji su vezani za membranu preko GPI sidra (95).

1.2.2.3. Galektini

Galektini su animalni lektini koji specifično vezuju β -galaktozidne strukture (96). Ova familija ima najmanje 16 članova koji su, u zavisnosti od svojih domena za prepoznavanje ugljenih hidrata, klasifikovani u tri grupe: prototipski (engl. *proto-type*), tandem-ponavljajući (engl. *tandem repeat*) i himerni tip (engl. *chimera-type*). Na membrani EV, opisuje se prisustvo galektina-3 (Gal-3), jedinstvenog himernog tipa galektina koji poseduje C-terminalni domen za prepoznavanje ugljenih hidrata (engl. *carbohydrate recognition domain, CRD*) i dugačak N-terminalni domen sklon multimerizaciji (96). Gal-3 na spoljašnjoj strani membrane EV ima sposobnost da simultano vezuje terminalne galaktozidne ostatke na različitim membranskim glikoproteinima, formirajući kompleksne oligomerne rešetke poznate kao engl. *galectin-glycoprotein lattices*. Ova galektinska rešetka, kao i tetraspaninska mreža, utiče na prostornu konformaciju proteina/enzima integrisanih u membranski dvosloj, utičući na njihovu površinsku dostupnost za ligande ili ćelijske receptore (97). Postoje podaci koji ukazuju da Gal-3 učestvuje u biogenezi EV i da se može koristiti kao marker EV. Pored toga, on učestvuje u sortiranju glikozilovanih proteina i stoga utiče i na intravezikularni sadržaj (engl. *cargo*) EV (98,99).

1.2.2.4. Glikani

Glikoproteini i glikolipidi predstavljaju dominantne i važne komponente plazma membrane i, stoga, a na osnovu biogeneze, i svih tipova EV (90). Ispitivanje glikoma EV poreklom iz T limfocita ukazalo je, da je njihova površina, u poređenju sa roditeljskom ćelijom, obogaćena polilaktozaminom i α -2,6-sijalinskom kiselinom, kompleksnim tipom N-glikana i visoko manoznim oligosaharidnim lancima (100,101). Prisustvo terminalnih ostataka sijalinske kiseline daje membrani EV negativno naelektrisanje, sprečavajući nespecifičnu agregaciju čestica, dok specifične glikanske sekvence služe kao ciljna mesta za vezivanje različitih molekula uključujući Gal-3 (102).

Površinski/membranski glikani predstavljaju molekulski barkod koji definiše identitet vezikule u biološkim tečnostima (89,103,104). Glikozilacija EV se, specifično, menja u različitim patofiziološkim stanjima i može predstavljati njihov marker. Pored toga, promene u glikanskoj kompoziciji mogu imati uticaj i na funkcionalna svojstva EV jer se one, u velikoj meri, baziraju na interakcijama tipa protein-ugljenihidrat.

1.2.3. Intravezikularni sadržaj EV (engl. *cargo*)

U lumen EV su prisutni brojni strukturno i funkcionalno različiti molekuli (105). U zavisnosti od sadržaja EV, menja se njihova biološka aktivnost i ciljno tkivo, a ove promene mogu biti biomarkeri određenog fiziološkog stanja, ili imati uticaj na progresiju bolesti.

Pakovanje molekula u lumen EV predstavlja selektivan i strogo kontrolisan proces vođen unutrašnjim sortirajućim proteinima (106). Sprovedene su različite proteomske, lipidomske i transkriptomске analize u cilju karakterizacije unutrašnjeg sadržaja EV, i podaci su deponovani u baze podataka (107). Do sada je utvrđeno nekoliko mogućih mehanizama sortiranja unutrašnjeg sadržaja EV, ali svi oni još uvek nisu potvrđeni.

Glavni mehanizam sortiranja unutrašnjeg sadržaja u endozomalnom putu nastanka egzozoma zasniva se na *ESCRT*. Tokom sukcesivnog smenjivanja *ESCRT* 0, I, II i III kompleksa proteina, a u interakciji sa pomoćnim proteinima, dolazi do usmeravanja ubikvitiniranih proteina u endosome. Dalje, *ESCRT* mašinerija reguliše formiranje *ILV*. Pored ubikvitinacije, na selekciju proteinskog sadržaja lumena EV, utiču i druge posttranslacione modifikacije, uključujući: *SUMO*ilaciju (modifikacija malim proteinom sličnim ubikvitinu; engl. *Small Ubiquitin-like Modifier*, *SUMO*), fosforilaciju i glikozilaciju (108).

Što se tiče glikozilacije, uočeno je da su u EV, pretežno, zastupljeni oligomanozni i kompleksni N-glikani koji sadrže ostatke poli-N-acetil-laktozamina (engl. *poly-N-acetyl-lactosamine*, *poly-LacNac*). Oligomanozni glikani mogu da se vezuju za galektine kao i za vezikularni integralni membranski protein 36 (engl. *vesicular integral membrane protein 36*, *VIP36*). Naknadna oligomerizacija ovih glikoproteina olakšava njihovo usmeravanje u vezikule (109).

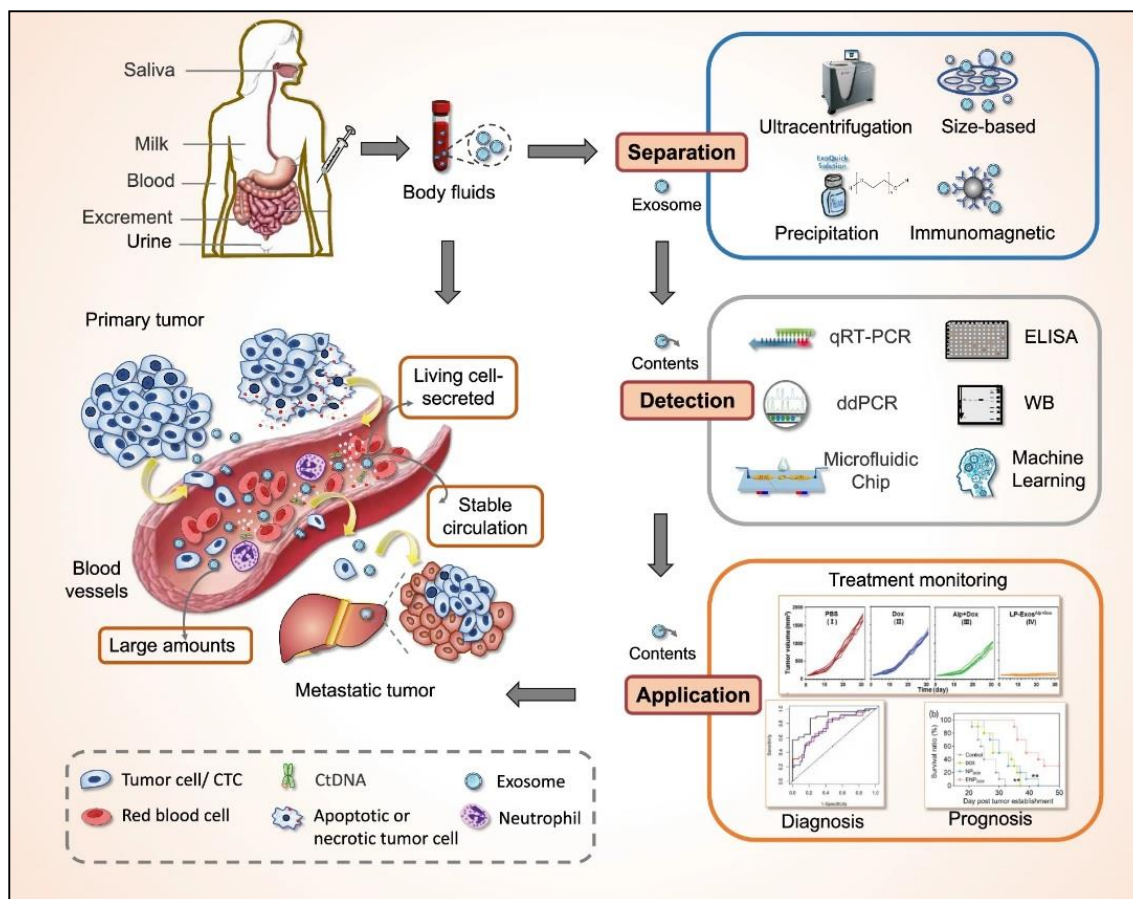
Postoje i mehanizmi sortiranja koji su nezavisni od *ESCRT*. Među njima, lipidni raftovi, specijalizovani mikrodomeni obogaćeni sfingolipidima i TS, imaju ključnu ulogu u selekciji intravezikularnog sadržaja, organizaciji membranskih mikrodomena i formiranju *ILV*. Jedan od alternativnih puteva biogeneze egzozoma je zavisn od tetraspanina CD63 i CD9 (110).

1.2.4. Biomarkerski potencijal ekstracelularnih vezikula

1.2.4.1. EV kao heterogeni analiti u tečnoj biopsiji

Koncept tečne biopsije (engl. *liquid biopsy*) predstavlja jedan od najvećih tehnoloških i kliničkih iskoraka u savremenoj biomedicini. Ova tehnika predstavlja minimalno invazivnu proceduru uzorkovanja i molekularne analize telesnih tečnosti, poput periferne krvi, urina, cerebrospinalne tečnosti, pljuvačke ili semene plazme (111). U poređenju sa klasičnom biopsijom tkiva, tečna biopsija uspešno omogućava repetitivno uzorkovanje bez rizika po pacijenta. Pored EV, koje se danas izdvajaju kao superiorni analiti, u tečnom bioptatu se mogu analizirati i drugi biomolekuli, kao što su slobodna cirkulišuća tumorska DNK (ctDNK) ili cirkulišuće tumorske ćelije (CTC) (112).

EV poseduju značajne analitičke prednosti u odnosu na ostale analite tečne biopsije (Slika 8). Zbog lipidnog dvosloja, EV su biološki veoma stabilne i imaju dug poluživot u telesnim tečnostima (113). Kao sastavni deo sekretoma, one omogućavaju kontinuirano praćenje promena roditeljskih ćelija tokom različitih fizioloških i patofizioloških stanja. Na osnovu ukupnog broja i raspodele veličina, EV se, same po sebi, mogu smatrati biomarkerima, a, dodatno, one predstavljaju i odličan izvor već poznatih i specifičnih biomarkera. Istovremeno određivanje različitih komponenti EV, uključujući proteine, nukleinske kiseline, lipide i metabolite, omogućava multiparametarsku analizu koja ima bolju dijagnostičku, prognostičku i prediktivnu vrednost u odnosu na analizu pojedinačnih biomarkera (112,114).



Slika 8. EV kao analit u tečnoj biopsiji (uzorkovanje, analiza i primena) (Preuzeto iz: Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. Mol Cancer. 2022;21:56.)

Uvođenje EV u rutinsku laboratorijsku praksu, međutim, nameće ozbiljne analitičke izazove jer se one u uzorku ne ponašaju kao homogeni molekulski entiteti, već kao izrazito heterogeni analiti (115). Ukupna frakcija EV izolovanih iz bilo koje telesne tečnosti uvek predstavlja kompleksan i dinamičan skup različitih populacija, koje istovremeno luče različiti tipovi ćelija u datom tkivnom mikrokruženju. Zbog toga, EV u uzorku zapravo čine kontinuum vezikula različitih dimenzija, gustine, intravezikularnog sadržaja, ali i specifične strukture membrane (94).

Čistoća preparata EV je, takođe, od kritičnog značaja za njihovu pouzdanu i reproduktivnu primenu u dijagnostici zasnovanoj na tečnoj biopsiji (116,117). Trenutno postoje brojne metodološke prepreke za standardizaciju izolacije EV i nijedna pojedinačna tehnika koja se danas koristi (poput ultracentrifugiranja ili gel filtracije) ne može se smatrati univerzalno idealnom. Tradicionalne biohemijske analize koje se vrše iz nefrakcionisanih uzoraka često maskiraju suptilne promene u manje zastupljenim, tkivno-specifičnim EV populacijama (118,119).

1.2.4.2. Primena EV u in vitro dijagnostici

Kompleksnost sastava EV predstavlja specifičnu platformu za ispitivanje postojećih i pronalazak novih biomarkera (120). Sa porastom upotrebe minimalno invazivnih tehnika u dijagnostičke svrhe, kao i modernim konceptom personalizovane medicine, savremena istraživanja se sve više bave EV sa ciljem njihove upotrebe u medicinskoj biohemijskoj i terapiji.

EV u perifernoj krvi čine vezikule iz normalnih ćelija, ćelija tumorske strome, kao i tumorskih ćelija. Kada je reč o njihovom molekulskom sadržaju, na istoj EV moguće je analizirati različite

biomolekule, uključujući RNK, DNK, proteine, lipide i ugljene hidrate, odnosno glikane (121). U kontekstu kliničke primene, RNK EV, naročito miRNK, lncRNK i iRNK, znatno su više istraživane od DNK EV i proteina. RNK EV su prepoznate kao molekulski markeri u dijagnostici, prognozi i praćenju terapijskog odgovora kod različitih malignih bolesti, uključujući karcinom dojke, pluća, jetre, jajnika, mokraćne bešike, kolorektalni karcinom, karcinom prostate i melanom (122–126).

Brojne kompanije i akademske institucije aktivno rade na identifikaciji i evaluaciji EV biomarkera (121). Kompanija *Exosome Diagnostics* razvila je komercijalno dostupan test *ExoDx Prostate*, koji je 2019. godine dobio oznaku „*Breakthrough Device*” Američke Uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*). Test se zasniva na analizi iRNK EV izolovanih iz urina, odnosno na određivanju transkripata tri gena koji su povezani sa agresivnim tipom karcinoma prostate, i namenjen je smanjenju broja nepotrebnih biopsija kod muškaraca sa koncentracijom prostata-specifičnog antigena (PSA) u tzv. sivoj zoni. Kompanija *miR Scientific* (Njujork, SAD) razvila je komercijalno dostupan test *miR Sentinel*, koji je 2020. godine, takođe, dobio oznaku „*Breakthrough Device*”. Ovaj test namenjen je otkrivanju karcinoma prostate na osnovu analize malih nekodirajućih RNK (engl. *small non-coding RNA, sncRNA*) poreklom iz EV izolovanih iz urina. Pored toga, razvijen je i biomarker miR-185, zasnovan na analizi miRNK iz EV izolovanih iz pljuvačke, namenjen dijagnostici i praćenju lečenja karcinoma usne duplje. Jedan od najznačajnijih novijih pomaka u oblasti dijagnostike zasnovane na EV predstavlja razvoj testa *EXO-OC™* kompanije *INOVIQ* (Melburn, Australija), namenjenog ranom otkrivanju karcinoma jajnika iz uzorka periferne krvi (127). Za razliku od postojećih pristupa koji se zasnivaju na određivanju pojedinačnih biomarkera, *EXO-OC™* koristi patentiranu tehnologiju *EXO-NET®* za izolaciju egzozoma, nakon čega se analizira panel EV biomarkera, uključujući miRNK, i tumorski marker CA125. Dobijeni podaci integrišu se primenom algoritma mašinskog učenja, čime se formira dijagnostički model za rano otkrivanje bolesti. Ovaj pristup predstavlja primer nove generacije tačne biopsije, u kojoj se analiza više biomarkera poreklom iz EV kombinuje sa algoritmima veštačke inteligencije radi povećanja dijagnostičke tačnosti, posebno u ranim stadijumima bolesti.

Iako se primena EV kao analita suočava sa tehničkim izazovima koji se odnose na performanse analitičkih metoda, prvenstveno sa niskom reproduktivnošću usled nedostatka standardizacije, što usporava razvoj i uvođenje ovih testova u kliničku praksu, u poslednjih nekoliko godina ostvaren je značajan napredak u razvoju novih tehnologija za njihovu izolaciju i analizu (121). Posebna pažnja usmerena je na razvoj mikrofluidnih platformi, među kojima se izdvaja tehnologija kompanije *Craif*, zasnovana na mikrofluidnim kanalima sa cink-oksidnim (ZnO) nano-žicama, koja omogućava efikasniju izolaciju EV i pouzdaniju analizu nukleinskih kiselina prisutnih u veoma niskim koncentracijama (128). Istovremeno, razvijaju se tehnologije za analizu pojedinačnih EV (engl. *single-EV analysis*), koje primenom nano-protočne citometrije, mikroskopije visokerezolucije i naprednih mikrofluidnih platformi omogućavaju identifikaciju retkih subpopulacija EV koje nije moguće detektovati analizom ukupne populacije vezikula (129–131). Ovakav pristup predstavlja novu generaciju tačne biopsije, jer obezbeđuje veću analitičku osetljivost i specifičnost.

Potencijal EV/egzozoma u savremenoj medicini istaknut je i 2026. godine, kada je Ekonomski forum sveta (engl. *World Economic Forum, WEF*) u okviru godišnjeg izveštaja engl. *Top 10 Emerging Technologies 2026* uvrstio dopremanje lekova putem egzozoma (engl. *exosome drug delivery*) među deset tehnologija sa najvećim potencijalom da transformišu različite oblasti nauke i medicine (132). *WEF* ističe da su egzozomi, zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, niskoj imunogenosti i sposobnosti da prelaze biološke barijere, uključujući krvno-moždanu barijeru, postali jedna od najperspektivnijih platformi za ciljanu isporuku terapijskih molekula. Istaknuto je da je od 2022. godine pokrenuto više od 200 kliničkih studija u kojima se ispituje primena egzozoma za lečenje malignih, neuroloških i drugih hroničnih oboljenja.

1.2.5. Ekstracelularne vezikule iz semene plazme

Semena plazma čoveka, predstavlja složenu tečnost koju luče akcesorne muške polne žlezde i epididimis (133). Izuzetno je bogata EV, među kojima su najzastupljenije one iz epitelnih ćelija prostate, poznate kao prostazomi (134). Postojanje ovih specifičnih čestica u semenoj plazmi je uočeno krajem 70-ih godina prošlog veka kada su Ronquist i saradnici, opisali nano-čestice sa izuzetno visokom aktivnošću membranskih enzima (135). Termin „prostazomi” koji je neformalan počeo je da se koristi početkom 80-ih godina prošlog veka za EV iz SP, a nastao je kombinovanjem latinske reči *prostates* (prostata) i grčke reči *soma* (telo), čime je naglašeno njihovo poreklo. Mehanizam njihove biogeneze najviše odgovara biogenezi egzozoma.

Prostazomi pokazuju izrazitu heterogenost u pogledu veličine (50-200 nm), oblika (izduženi, okrugli, kruškoliki), prisustva membranskih ispupčenja, kao i molekuskog sastava. Prostazomi, takođe, variraju u pogledu svoje elektronske gustine, pa se tako, primenom transmisione elektronske mikroskopije, uočavaju svetlije i tamnije vezikule (136).

Membrana prostazoma obiluje bioaktivnim molekulima kao što su enzimi, receptori i citokini, a od EV iz drugih ćelija ih jasno razlikuje specifičan sastav i organizacija lipida u membrani (136). Osnovna karakteristika njihovog lipidnog dvosloja je izuzetno visok odnos holesterola i fosfolipida, kao i visoka koncentracija sfingomijelina i glikofosfolipida, na račun smanjenog udela fosfatidilholina. Ovakva specifična lipidna arhitektura formira lipidne raftove, koji membranu prostazoma čine izuzetno rigidnom, visoko uređenom i stabilnom.

U membrani prostazoma je, takođe, opisano prisustvo dezmosterola koji pripada neholesterolskim sterolima (NHS). On se zajedno sa holesterolom može preneti na membranu spermatozoida, i na taj način doprineti održavanju njene stabilnosti i sprečavanju preuranjene kapacitacije (137). Pored dezmosterola, NHS čine i drugi prekursori holesterola i fitosteroli (biljni steroli). Kod sisara, najzastupljeniji prekursori holesterola su dezmosterol i lanosterol, koji pored toga što učestvuju u njegovoj biosintezi, mogu ispoljavati i sopstvene biološke funkcije (138). Značajnu grupu NHS predstavljaju i fitosteroli, među kojima su najzastupljeniji kampesterol, β -sitosterol i stigmasterol. Oni se ne sintetišu u organizmu čoveka, već se unose ishranom i apsorbuju putem istih transportnih mehanizama kao holesterol (139). Što se tiče fitosterola, ne postoje literaturni podaci o njihovom prisustvu u membrani EV, osim membrane EV iz jetre miša (140). Ispitivanje prisustva i kompozicije NHS u membrani prostazoma moglo bi biti od značaja za razumevanje postojećih ili ukazati na njihove nove funkcije.

Među proteinima membrane prostazoma najviše su proučavani enzimi, pri čemu se kao karakteristični markeri prostazoma izdvajaju aminopeptidaza N (CD13), dipeptidil-peptidaza IV (CD26) i enkefalinaza (CD10) (133,134,141). Ovi enzimi čine tzv. „prostazomski potpis“ (engl. *prostasomal signature*), koji se na elektroforezi detektuje kao tri proteinske trake molekulske mase između 90 i 150 kDa. Pored ovih enzima, na membrani prostazoma identifikovani su: 5'-nukleotidaza, alkalna fosfataza, alkalna fosfodiesteraza I, neutralna endopeptidaza, transmembranska serin proteaza 2 (engl. *transmembrane protease serine 2*; TMPRSS2), ekto-diadenozin-polifosfat hidrolaza, protein kinaze A i C, kazein kinaza II, membranski vezana adenzin trifosfataza i GGT (134).

Različitim eksperimentalnim metodama pokazano je da prostazomi mogu da se fuzionišu sa spermatozoidima i da na taj način izmene njihov lipidni i proteinski sastav. Na taj način, oni direktno utiču na funkciju spermatozoida jer menjaju njihovu pokretljivost, kapacitaciju i akrozomalnu reakciju. Pored toga, zahvaljujući antimikrobnim, antioksidativnim i imunosupresivnim svojstvima, prostazomi indirektno doprinose preživljavanju spermatozoida u ženskom genitalnom traktu (134,142,143). Sa druge strane, opisana su i svojstva prostazoma koja

moгу doprineti opstanku i progresiji ćelija karcinoma prostate (121). Smatra se da proteini prostazoma uključeni u procese fosforilacije, tkivni faktor, protektin, angiotenzin-konvertujući enzim i aminopeptidaza N, učestvuju u regulaciji ćelijske proliferacije, angiogeneze i maligne transformacije (143,144). Mehanizmi kojima prostazomi doprinose razvoju i progresiji karcinoma prostate još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni.

2. Ciljevi istraživanja

Ispitivanje različitih aspekata molekulske heterogenosti određenog biomarkera značajno je kako sa stanovišta osnovnih, tako i primenjenih istraživanja. Cilj ovoga rada je da, na osnovu glikobiohemijske karakterizacije molekulskih obrazaca koji sadrže GGT, kao *in vivo* selektovanih i povezanih molekula čiji sastav i stuktura svojstva odražavaju specifične fiziološke ili patofiziološke procese, definiše referentne parametre za anotaciju molekulskih formi GGT. Anotacija molekulskih formi GGT predstavlja osnov za kreiranje novih analitičkih protokola za određivanje GGT, koji bi se zasnivao na povezivanju merenja enzimske aktivnosti i strukturnih svojstva GGT.

GGT forme se, danas, definišu samo na osnovu njihove molekulske mase, a GGT aktivnost se, konvencionalnim testom, određuje u nefrakcionisanim telesnim tečnostima. Mapiranje GGT aktivnosti u kontekstu specifičnih molekula/kompleksa do sada nije primenjivano. Pored toga, dosadašnja ispitivanja su se, uglavnom, odnosila na serumske forme GGT, a ovo je prvo takvo ispitivanje u semenoj plazmi čoveka, i ono bi trebalo da upotpuni i proširi opšte znanje o heterogenosti GGT formi.

Da bi se ispunio glavni zadati cilj, eksperimentalni deo rada je podeljen u dve celine. Prva celina se odnosi na ispitivanje specifičnosti prezentacije i distribucije b-GGT na membrani EV iz semene plazme čoveka i ona obuhvata:

- Karakterizaciju molekulskih obrazaca koji sadrže b-GGT u razdvojenim populacijama EV na osnovu raspodele: GGT aktivnosti, selektovanih tipova glikana i tetraspanina kao i galektina-3;
- Karakterizaciju molekulskih obrazaca koji sadrže b-GGT na membranskim domenima EV koji su otporni/osetljivi na dejstvo deterdženta na osnovu redistribucije GGT aktivnosti, odabranih tetraspanina kao i galektina-3;
- Utvrđivanje razlika između molekulskih obrazaca koji sadrže b-GGT u normospermičnim i oligospermičnim uzorcima semene plazme čoveka.

Druga celina se odnosi na utvrđivanje profila molekulskih formi GGT u solubilnom subproteomu semene plazme čoveka i ona obuhvata:

- Karakterizaciju molekulskih obrazaca koji sadrže solubilne GGT forme velike molekulske mase na osnovu ko-distribucije GGT aktivnosti i selektovanih tipova glikana/ glikoproteina;
- Utvrđivanje razlika između molekulskih obrazaca koji sadrže solubilne GGT forme u normospermičnim i oligospermičnim uzorcima semene plazme čoveka.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci biološkog materijala

Ispitivanja su vršena na pulovima SP čoveka koja je izdvojena iz anonimizovanih uzoraka semene tečnosti preostale nakon rutinske analize spermograma/spermocitograma u Laboratoriji za ispitivanje, Instituta za primenu nuklearne energije (INEP), Zemun, Beograd. Shodno ovome, uzorci nisu poticali iz eksperimentalnih istraživanja na ljudima, a korišćenje njihovih pulova podrazumeva da nisu obrađivani lični podaci osoba. Etička saglasnost za ovo istraživanje dobijena je od Etičke komisije za rad sa humanim materijalom Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu (broj 02-1462/2 od 2021. godine), kao i Etičkog odbora za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 2001/3 od 2022. godine).

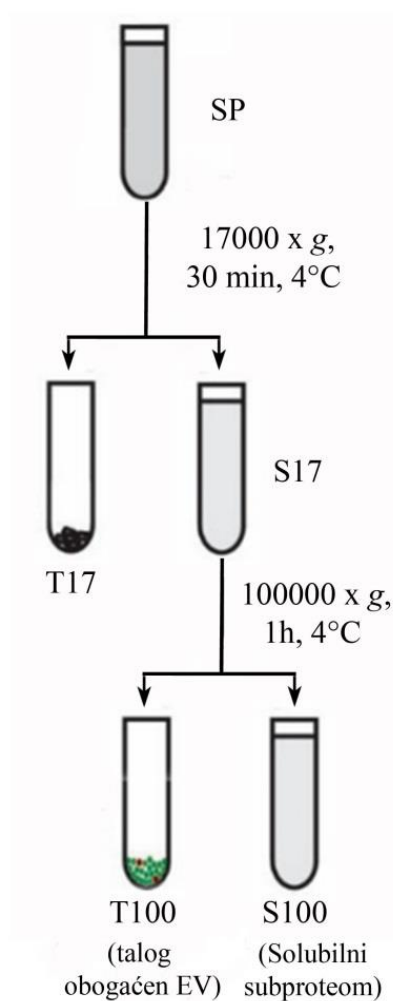
Klasifikacija uzoraka semene tečnosti vršena je na osnovu preporučenih kriterijuma Svetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine (145). Uzorak semene tečnosti je normospermičan kada je koncentracija spermatozoida veća od 16×10^6 / mL, ukupna pokretljivost veća od 42%, progresivna pokretljivost veća od 35% i normalna morfologija veća od 4%. Kriterijum za oligospermiju je koncentracija spermatozoida manja od 16×10^6 / mL, ukupna pokretljivost veća od 42%, progresivna pokretljivost veća od 35% i normalna morfologija veća od 4%.

Semena tečnost (nakon likvefakcije >30 min) je centrifugirana na $1000 \times g$, 20 min, na sobnoj temperaturi koristeći *Eppendorf 5430* centrifugu (Hamburg, Nemačka) radi uklanjanja spermatozoida, a izdvojena SP je, kao takva korišćena za dalju analizu. Analiza je vršena na po dva pula uzoraka SP normospermičnih i oligospermičnih osoba. Svaki pul je formiran spajanjem 10 pojedinačnih uzoraka (po 1 mL).

3.2. Metode

3.2.1. Frakcionisanje ekstracelularnih vezikula i solubilnog subproteoma

Odgovarajući pul SP (Slika 9) je prvo centrifugiran na $17000 \times g$, 30 minuta na 4°C , radi uklanjanja ćelijskih ostataka u talogu (T17 frakcija). Dobijeni supernatant (S17 frakcija) je, zatim, centrifugiran na $100000 \times g$, 1 h na 4°C da bi se razdvojila T100 frakcija ($100000 \times g$ talog), koja sadrži EV i S100 frakcija ($100000 \times g$ supernatant) koja sadrži solubilni subproteom (Sol-P) SP. Za centrifugiranje je korišćena *Beckman Coulter Optima L-90K* ultracentrifuga (Kalifornija, SAD). T100 frakcija je resuspendovana u 1 mL 30 mM TRIS (tris ((hidroksimetil)-aminometanu) koji sadrži 130 mM NaCl (natrijum-hlorida), pH 7,6 i korišćena za izolovanje EV. S100 frakcija je, kao takva, je korišćena za dalju analizu.



Slika 9. Shematski prikaz frakcionisanja semene plazme čoveka

SP: semena plazma; T17 frakcija (17000 x g talog), S17 frakcija (17000 x g supernatant), T100 frakcija (100000 x g talog), S100 frakcija (100000 x g supernatant).

3.2.2. Izolovanje EV

Izolovanje EV je vršeno metodom po Carlsson-u, sa manjim modifikacijama (141). Gel filtracija resuspendovanog taloga koji sadrži EV je vršena na koloni *Sephadex G200* (Cytiva, Upsala, Švedska). Kolona (35 mL) je predhodno uravnotežena i eluirana 30 mM TRIS koji sadrži 130 mM NaCl, pH 7,6. Na kolonu je naneto 1 mL uzorka, a sakupljane su frakcije zapremine 1 mL. Praćenje elucije EV je vršeno merenjem apsorbance na 280 nm i CD63-imunoreaktivnosti. Apsorbancija je merena na spektrofotometaru *Victor3V 1420 Multilabel* (Perkin Elmer, Monca, Italija) a imunoreaktivnost je određena imunodot blot metodom. Frakcije koje odgovaraju piku apsorbancije (280 nm) i koje su CD63-imunoreaktivne su pulovane i centrifugirane na 100000 x g, 1h, na 4°C, koristeći *Beckman Coulter Optima L-90K* ultracentrifugu (Kalifornija, SAD). Koncentrovane izolovane EV (100000 x g talog) su resuspendovane u 1 mL 30 mM TRIS koji sadrži 130 mM NaCl, pH 7,6, alikvotirane i čuvane na -20°C do upotrebe.

3.2.3. Imunodot blot

Na nitroceluloznu membranu (*Amersham Protran 0,45 NC*, *Cyntiva*, Masačusets, SAD) nanoseno je 2 μL odgovarajućeg uzorka (frakcije dobijene gel filtracijom nativnih / solubilizovanih EV). Membrana je blokirana rastvorom 1% goveđeg serumskog albumina (BSA) u 0,05 M fiziološkom rastvoru puferisanom fosfatnim solima (PBS), pH 7,2, 2 h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta), membrana je inkubirana sa odgovarajućim razblaženjima antitela (u 0,5 % BSA u 0,05 M PBS puferu, pH 7,2). Korišćena su sledeća antitela prema tetraspaninima: monoklonsko mišije anti-CD63 antitelo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (klon TS63, *Abcam*, Kembridž, UK), monoklonsko mišije anti-CD81 antitelo (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (klon M38, *Invitrogen*, *Thermo Fisher Scientific*, Kalifornija, SAD), monoklonsko mišije anti-CD9 antitelo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (klon MEM-61, *Invitrogen*, *Thermo Fisher Scientific*, Kalifornija, SAD). Nakon inkubacije, 18h, na 4°C, nevezana antitela isprana su 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta), a membrana je inkubirana sa biotinizovanim kozijim anti-mišijim IgG antitelima (0,75 $\mu\text{g/mL}$) (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 1h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, membrana je inkubirana sa smešom avidina i biotinizovane peroksidaze rena (HRPO) iz *Elite Vectastain ABC* kompleta (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta), detekcija vezanih antitela je vršena pomoću *PierceTM ECL Western Blotting Substrate* (*Thermo Fisher Scientific*, Masačusets, SAD). Vizualizacija hemiluminiscence vršena je na *ChemIDoc MP Imaging System* (*BioRad*, Kalifornija, SAD).

Za detekciju galektina-3 korišćena su biotinizovana poliklonska kozija anti-galektin-3 antitela (0,025 $\mu\text{g/mL}$) (*R&D Systems*, Mineapolis, SAD). Nakon inkubacije, 18h, na 4°C, i ispiranja 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta), detekcija vezanih anti-galektin-3 antitela je vršena po proceduri korišćenoj za tetraspaninska antitela.

3.2.4. Određivanje aktivnosti gama-glutamil transferaze

Određivanje aktivnosti enzima gama-glutamil transferaze (GGT) vršeno je korišćenjem GGT kita proizvođača *Bioanalytica* (Beograd, Srbija). Princip reakcije zasniva se na katalitičkoj aktivnosti GGT, pri kojoj enzim prenosi γ -glutamil grupu sa supstrata γ -glutamil-p-nitroanilida na akceptorski dipeptid (glicil-glicin), uz oslobađanje p-nitroanilina. Formiranje ovog produkta proporcionalno je aktivnosti GGT u uzorku i mereno je spektrofotometrijski na biohemijskom analizatoru *Biosystems A25* (Barselona, Španija).

3.2.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana kolorimetrijskom metodom pomoću *BCA Protein Quantification Kit*, *Abcam*, Kembridž, UK. Za kalibracionu krivu je korišćen standardni rastvor goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) u opsegu koncentracija 0 - 2000 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.6. Natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Uzorci su razdvajani na 10% poliakrilamidnom gelu za razdvajanje i 4% gelu za koncentrovanje, pod redukujućim i denaturišućim uslovima (146). Elektroforeza je vršena pri uslovima konstantnog napona od 150 V i jačine struje od 60 mA, na aparatu *Mini Protean 3 System* (*BioRad*, Kalifornija, SAD). Za kalibraciju gela korišćeni su standardi *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (*BioRad*, Kalifornija, SAD). Proteini u gelu su bojeni srebrom, korišćenjem kompleta *Silver*

Stain (BioRad, Kalifornija, SAD) po uputstvu proizvođača, ili su preneseni na nitroceluloznu membranu i dalje analizirani.

Denzitometrijska analiza proteina razdvojenih SDS-PAG elektroforezom i obojenih srebrom vršena je korišćenjem *ImageLab* programa (verzija 6.1, BioRad, Kalifornija, SAD). Intenzitet pojedinačnih traka kvantifikovan je korišćenjem parametra *Adjusted Total Lane Volume (Int)*, koji predstavlja integrisani intenzitet signala unutar definisane trake korigovan za pozadinski signal.

3.2.7. Elektrotransfer proteina (Western blot)

Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini iz gela su preneseni na nitroceluloznu membranu, postupkom polu-suvog transfera, koristeći aparat *Trans-Blot SD semi-dry transfer cell* (BioRad, Kalifornija, SAD). Pufer za transfer bio je 25 mM TRIS-HCl, pH 8,3 koji sadrži 192 mM glicin i 20% metanol. Transfer je vršen 40 minuta pod uslovima konstantnog napona od 15 V. Nakon transfera membrana je blokirana 1% BSA u 0,05 M PBS puferu pH 7,2, 18h na 4°C, nakon čega je isprana 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta) i dalje korišćena za lektinski / imunoblot.

3.2.7.1. Imunoblot

Proteini na membrani su inkubirani sa monoklonskim anti-CD63 antitelom (0,5 µg/mL) (klon TS63, *Abcam*, Kembridž, UK), 18h, na 4°C, nakon čega je nevezano antitelo isprano 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta). Membrana je inkubirana sa biotinizovanim kozijim anti-mišijim IgG antitelima (0,75 µg/mL) (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 1h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja (3 puta po 15 minuta), membrana je inkubirana, sa smešom avidina i biotinizovane peroksidaze rena (HRPO) iz *Elite Vectastain ABC* kompleta (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja (3 puta po 15 minuta), detekcija vezanog antitela je vršena pomoću *PierceTM ECL Western Blotting Substrate* (*Thermo Fisher Scientific*, Masačusets, SAD). Vizualizacija hemiluminiscencije vršena je na *ChemiDoc MP Imaging System* (BioRad, Kalifornija, SAD).

3.2.7.2. Lektinski blot

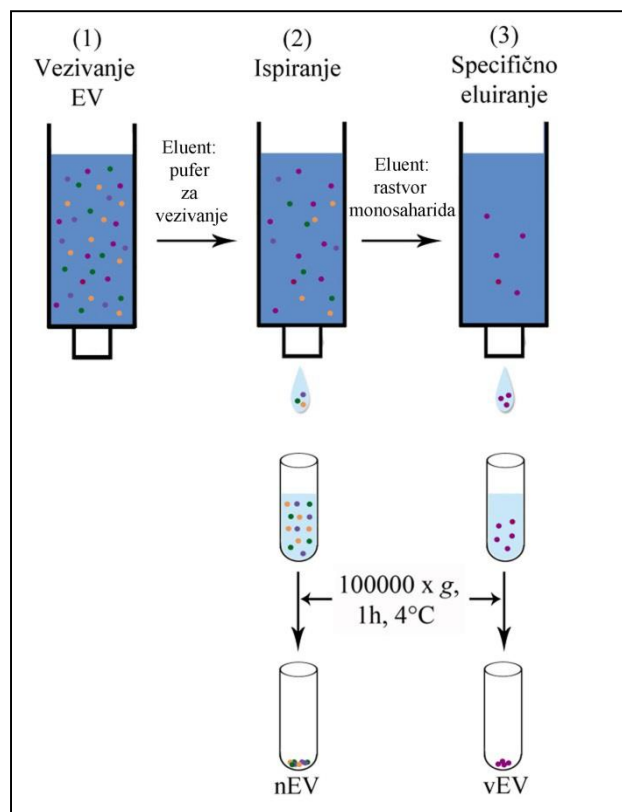
Proteini na membrani su inkubirani sa biotinizovanim biljnim lektinima: Con A (konkanavalin A, lektin iz *Canavalia ensiformis*) i WGA (*Wheat Germ agglutinin*) (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 1h, na sobnoj temperaturi. Nevezani lektini su isprani 0,05 M PBS, pH 7,2 (3 puta po 15 minuta), a membrana je, zatim, inkubirana sa smešom avidina i biotinizovane peroksidaze rena (HRPO) iz *Elite Vectastain ABC* kompleta (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja (3 puta po 15 minuta), vezani lektini su detektovani pomoću *PierceTM ECL Western Blotting Substrate* (*Thermo Fisher Scientific*, Masačusets, SAD). Vizualizacija hemiluminiscencije vršena je na *ChemiDoc MP Imaging System* (BioRad, Kalifornija, SAD).

3.2.8. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Uzorci EV (10 µL) su naneti na bakarne mrežice sa 200 otvora koje su obložene *Formvar*-filmom (*Sigma-Aldrich*, Misuri, SAD), metodom plutanja mrežica na uzocima u trajanju od 45 minuta. Nakon toga, uzorci su: fiksirani 2% paraformaldehidom (10 minuta); isprani 0,05 M PBS, pH 7,2 (3 puta po 2 minuta); blokirani 0,05 M glicinom (20 minuta); isprani 0,05 M PBS, pH 7,2 (3 puta po 2 minuta); fiksirani 2% glutaraldehidom (5 minuta), i isprani destilovanom vodom. Preparati EV su osušeni na vazduhu i snimani pomoću *Philips CM12* elektronskog mikroskopa (*Philips*, Ajndhoven, Holandija).

3.2.9. Lektinska afinitetna hromatografija

Lektinska afinitetna hromatografija (LAH) je vršena na kolonama sa imobilisanim biljnim lektinima (Slika 10). Nakon vezivanja odgovarajućih EV izolata za odabrani lektin, nevezana EV populacija (nEV) je isprana, a vezana EV populacija (vEV) je specifično eluirana rastvorom kompetitivnog monosaharida. Nakon centrifugiranja odgovarajućih eluata, razdvojene EV populacije su koncentrovane u talogu ($100000 \times g$ talog).



Slika 10. Shematski prikaz lektinske afinitetne hromatografije EV

Hromatografski matiks (■); EV: ukupni EV izolat; nEV: nevezana EV populacija; vEV: EV populacija koju vezuje lektin.

3.2.9.1. Lektinska afinitetna hromatografija na Con A-Sepharose 4B

Odgovarajući EV izolati su naneti na kolonu Con A - Sepharose 4B (5 mL) koja je uravnotežena sa 0,1 M acetatnim puferom, pH 6,0, koji je sadržao 1 M NaCl, 0,1 M CaCl_2 , 0,1 M MnCl_2 i 0,1 M MgCl_2 , i inkubirani 2h, na sobnoj temperaturi. Nevezana EV populacija je eluirana puferom kojim je kolona uravnotežena, a vezana EV populacija je eluirana rastvorom 0,2 M manoze (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). Nakon toga, kolona je isprana 0,1M boratnim puferom pH 8,4, radi regeneracije. Odgovarajući eluati, čiji je volumen bio jednak dvostrukom volumenu kolone, su centrifugirani na $100000 \times g$, 1h, 4°C koristeći Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifugu (Kalifornija, SAD), da bi se koncentrovale razdvojene populacije EV. EV populacije iz taloga su resuspendovane u 0,5 mL 0,05 M PBS puferu, pH 7,2, i korišćene za dalju analizu.

3.2.9.2. Lektinska afinitetna hromatografija na WGA - Sepharose 4B

Odgovarajući EV izolati su naneti na kolonu WGA - Sepharose 4B (2 mL) koja je uravnotežena sa 0,05 M TRIS pufer, pH 7,4, i inkubirani 2h, na sobnoj temperaturi. Nevezana EV populacija je

eluirana puferom kojim je kolona uravnotežena, vezana EV populacija je eluirana rastvorom 0,2 M N-acetil-D-glukozamina (*Sigma-Aldrich*, Misuri, SAD). Nakon toga, kolona je isprana 0,2 M CH₃COOH, radi regeneracije. Odgovarajući eluati, čiji je volumen bio jednak dvostrukom volumenu kolone, su centrifugirani na 100000 x g, 1h, 4°C koristeći *Beckman Coulter Optima L-90K* ultracentrifugu (Kalifornija, SAD) da bi se koncentrovale razdvojene populacije EV. EV populacije iz taloga su resuspendovane u 0,5 mL 0,05 M PBS puferu, pH 7,2, i korišćene za dalju analizu.

3.2.10. Solubilizacija EV i razdvajanje membranskih domena

Odgovarajući EV izolati su tretirani Triton X-100 (TX-100, *t*- oktilfenoksi-polietoksi etanol, *Sigma-Aldrich*, Misuri, SAD), (finalna koncentracija 1%), 1h, na sobnoj temperaturi. Izdvajanje membranskih domena iz solubilizovanih EV je vršeno gel filtracijom prema metodi (40). Na kolonu *Sephadex G200*, koja je predhodno uravnotežena 30 mM TRIS koji sadrži 130 mM NaCl, pH 7,6 i 1% TX-100, nanete su solubilizovane EV (1 mL). Sakupljane su frakcije zapremine 1 mL. Elucija je praćena merenjem enzimske aktivnosti GGT (opisano u 3.2.3.), Con A- i WGA-reaktivnosti (opisano u 3.2.11.) i TS- i Gal-3-imunoreaktivnosti (opisano u 3.2.2.). Kolona je kalibrisana prema elucionoj poziciji b-GGT na nativnim EV (molekulska masa veća od 2000 kDa) i f-GGT koja je oslobođena iz membrana EV (molekulska masa ~ 70 kDa).

3.2.11. Test vezivanja lektina na čvrstoj fazi

Ogovarajući uzorci (frakcije dobijene gel filtracijom nativnih / solubilizovanih EV) u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, adsorbovani su na polistirensku ploču (*Maxisorp*, *Thermo Fisher Scientific*, Kalifornija, SAD), fizičkom adsorpcijom, 18h, na 4°C. Nakon ispiranja 0,05 M PBS puferom pH 7,2 (3 puta 200 µL po bunarčiću), slobodna mesta su blokirana 0,5 % BSA u 0,05 M PBS, pH 7,2 (200 µL po bunarčiću), 2h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, u bunarčiće su dodati (50 µL po bunarčiću) biotinizirani biljni lektini Con A ili WGA (0,5 µg/µL) i inkubirani 1h, na sobnoj temperaturi. Sve inkubacije su vršene uz mućkanje (150 rpm) na orbitalnom šejkeru *Titramax 100* (*Heidolph Instruments*, Švabach, Nemačka). Nakon ispiranja 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta 200 µL po bunarčiću), u bunarčiće je dodata (50 µL po bunarčiću) smeša avidina i biotinizirane peroksidaze rena (HRPO) iz *Elite Vectastain ABC* kompleta (*Vector Laboratories*, Kalifornija, SAD), i inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Ploče su isprane 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 (3 puta 200 µL po bunarčiću), i nakon toga, je dodata (50 µL po bunarčiću) smeša 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) i supstrata (*Human GmbH*, Vizbaden, Nemačka). Reakcija je zaustavljena nakon 10 minuta dodavanjem 0,16 M sumporne kiseline (50 µL po bunarčiću). Izmerena je apsorbanca na 450 nm korišćenjem *Victor3V 1420 Multilabel* spektrofotometra (*Perkin Elmer*, Monca, Italija).

3.2.12. Određivanje neholesterolskih sterola (NHS) u EV izolatima

Određivanje NHS u EV-N i EV-O: dezmosterola, latosterola, kampesterola, β-sitosterola i stigmasterola u EV izolatima je vršeno metodom koju su opisali Gojković i saradnici (147). Priprema EV uzoraka je podrazumevala saponifikaciju, ekstrakciju i derivatizaciju. Razdvajanje derivatizovanih analita vršeno je na nepolarnoj kapilarnoj koloni *Agilent HP-5* (5 % fenil-metilsiloksan) (*Agilent Technologies*, SAD) dimenzija 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm korišćenjem gasnog hromatografa sa plameno-jonizacionim detektorom *Agilent 7890A* (*Agilent Technologies*, Kalifornija, SAD).

3.2.13. Gel filtracija solubilnog subproteoma semene plazme

S100 frakcija razdvojena centrifugiranjem SP na 100000 x *g* (Slika 9) je analizirana gel filtracijom na kolonama *Sephadex G200* i *Sepharose 2B*, po istoj proceduri. Kolone su uravnotežene sa 30 mM TRIS koji sadrži 130 mM NaCl, pH 7,6, i nanet je odgovarajući uzorak solubilnog subproteoma semene plazme (sol P) (1 mL). Elucija je praćena merenjem ukupne enzimske aktivnosti GGT (opisano u 3.2.4.) i Con A- i WGA-reaktivnosti u testu na čvrstoj fazi (opisano u 3.2.11.). Kolone su kalibrisane prema elucionoj poziciji b-GGT na nativnim EV (molekulska masa veća od 2000 kDa) i f-GGT koja je oslobođena iz membrana EV (molekulska masa ~ 70 kDa). Analiza hromatograma, u smislu udela GGT aktivnosti u razdvojenim GGT pikovima, vršena je pomoću programa *PeakFit* (verzija 4.12, *Inpixon HQ*, Kalifornija, SAD).

3.2.14. Precipitacija solubilnog subproteoma semene plazme pomoću polietilen-glikola (PEG)

Odgovarajući uzorci sol P su taloženi rastvorom 20% PEG 6000 (*Sigma-Aldrich*, Misuri, SAD) u 0.9% NaCl, 10 minuta, na 4°C a, zatim centrifugirani na 4000 x *g*, 15 min koristeći *Eppendorf 5430* centrifugu (Hamburg, Nemačka) (148). Dobijeni talog je resuspendovan u 0,05 M PBS puferu, pH 7,2 i korišćen za analizu GGT.

3.2.15. Određivanje koncentracije CA19-9 i CA125 antigena

Određivanje koncentracije CA19-9 antigena vršeno je korišćenjem ELISA CA19-9 kompleta, proizvođača *CisBio*, *Biointernational* (Kodolet, Francuska), a CA125 antigena korišćenjem ELISA II CA125 kompleta, proizvođača *CisBio*, *Biointernational* (Kodole, Francuska).

4. Rezultati

4.1. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u ekstracelularnim vezikulama semene plazme

4.1.1. Frakcionisanje i izolovanje ekstracelularnih vezikula iz semene plazme

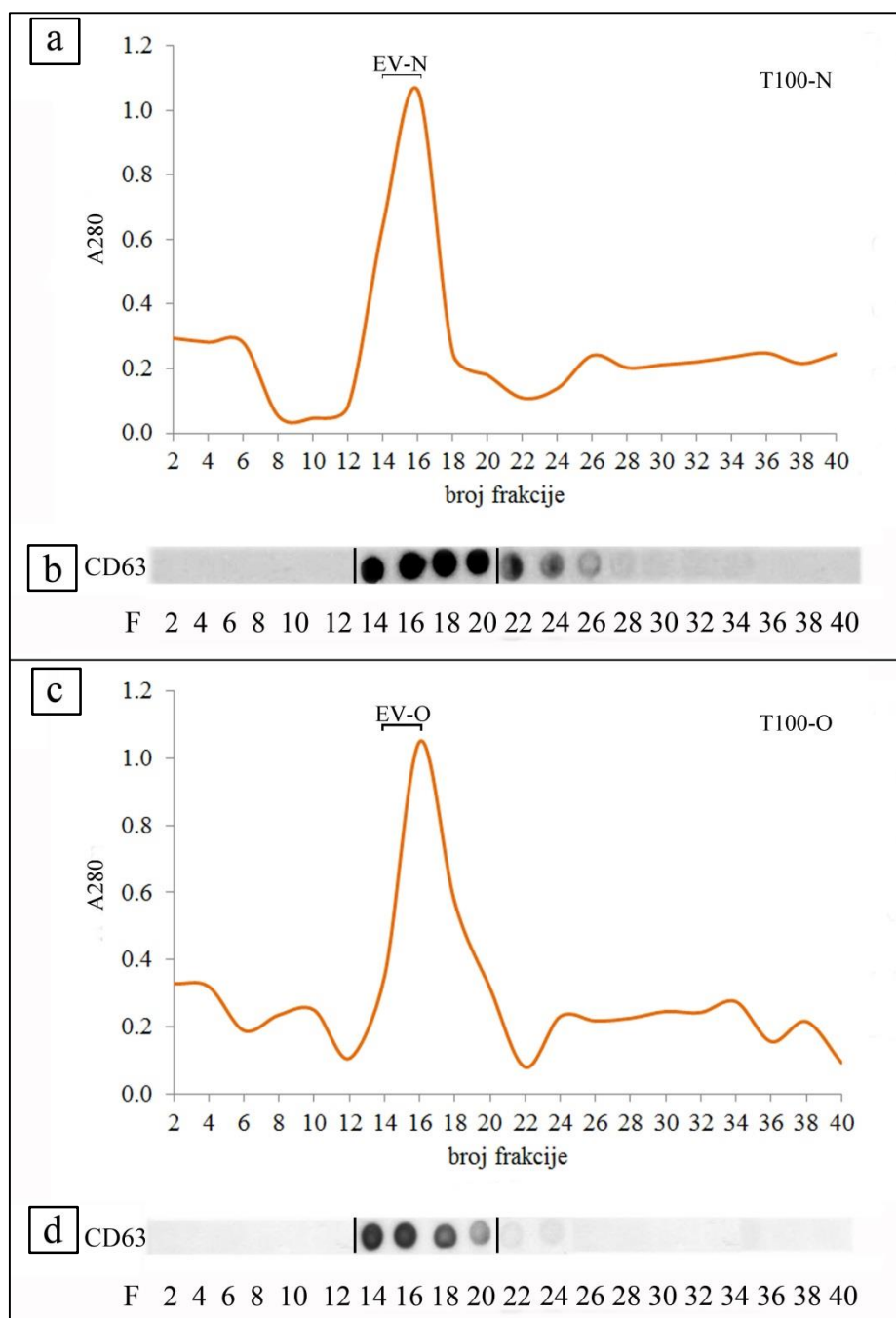
U T100 frakciji (100000 x *g* talog) SP, koja je obogaćena EV, detektovana je GGT aktivnost koja potiče od b-GGT. T100-N, frakcija normospermičnih uzoraka SP, je sadržala 2,4% , dok je T100-O, frakcija oligospermičnih uzoraka SP, sadržala 5,0% ukupne enzimске aktivnosti GGT.

EV su prečišćene iz T100-N i T100-O frakcija SP metodom gel filtracije na koloni *Sephadex G200* (Slika 11). Elucioni profili proteina (Slika 11a i 11c) i tetraspanina CD63 (Slika 11b i 11d) su pokazali jedan glavni pik u regionu velikih molekulskih masa (>200 kDa), kod oba ispitivana uzorka. Frakcije u pik (Slika 11, frakcije 14-16) su spojene, koncentrovane i označene kao EV-N (izolat EV iz normospermičnih uzoraka SP) i kao EV-O (izolat EV iz oligospermičnih uzoraka SP). Prisustvo EV u prečišćenim izolatima je potvrđeno analizom njihove veličine i oblika, kao i proteinskog sastava (Slika 12 i 13). Izolati EV-N i EV-O, su dodatno okarakterisani na osnovu sadržaja NHS (Tabela 1.).

Transmisiona elektronska mikroskopija je pokazala da su u oba izolata prisutne svetle i tamne vezikule, veličine 50 nm - 150 nm. Vezikule su imale tipičan *cup shape* oblik. Za razliku od izolata EV-N (Slika 12A), izolat EV-O (Slika 12B) je sadržao više amorfne supstance.

Elektroforetski profili ukupnih proteina EV-N i EV-O (Slika 13A) su bili slični i pokazali su prisustvo brojnih traka koje su se delimično ili u potpunosti preklapale u širokom rasponu molekulskih masa (20 kDa – 150 kDa). U regionu 90 kDa - 150 kDa, uočene su tri trake, poznate pod nazivom: prostazomski potpis. U regionu iznad 31 kDa, detektovana je CD63-imunoreaktivna traka (Slika 13B).

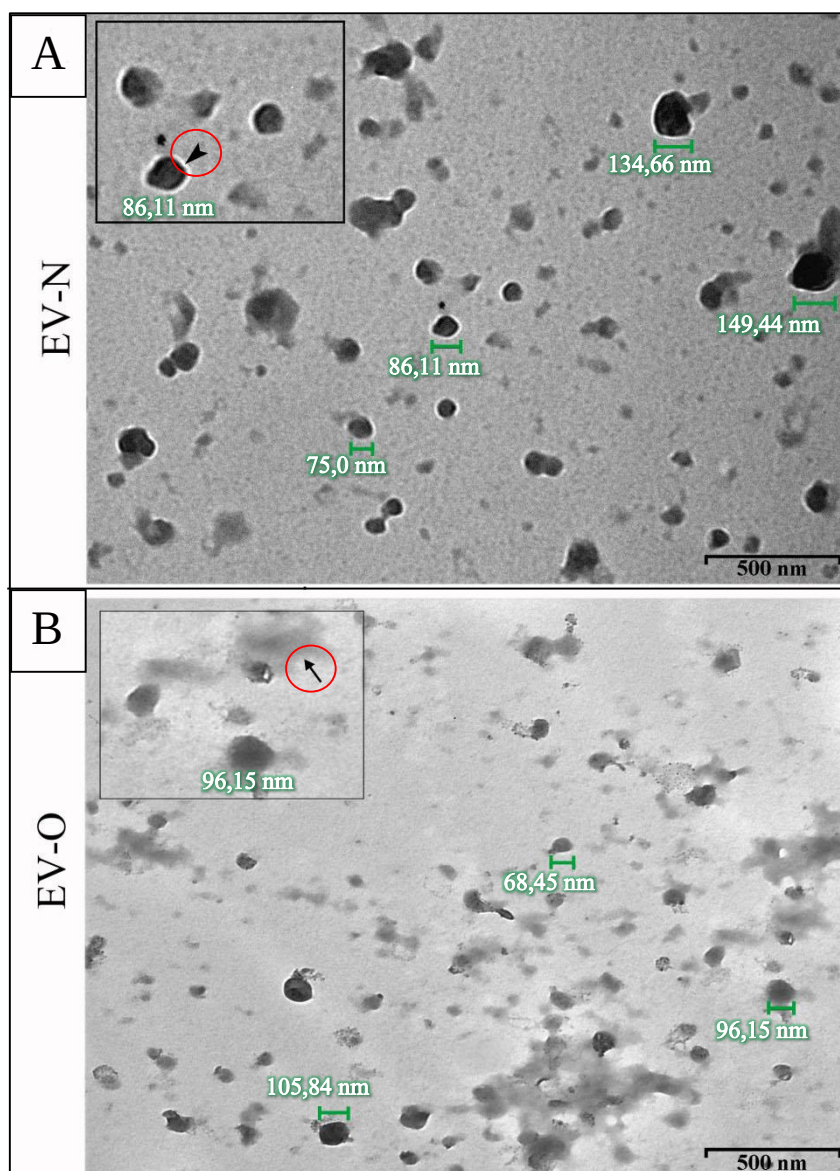
Analizom NHS uočene su razlike u zastupljenosti pojedinačnih analita u EV-N i EV-O. Dok su koncentracije latosterola i kampesterola bile ispod granice kvantifikacije u oba tipa uzorka, u EV-N je dezmosterol bio zastupljeniji u odnosu na fitosteroles (β-sitosterol i stigmasterol), a u EV-O koncentracija β-sitosterola bila je viša u odnosu na dezmosterol i stigmasterol (Tabela 1.).



Slika 11. Prečišćavanje EV iz T100 frakcije semene plazme

Gel filtracija na koloni *Sephadex G200* (a, c). Elucija proteina je praćena merenjem apsorpcije na talasnoj dužini 280 nm (A₂₈₀). Zapremina frakcije 1 mL.

Imunodot blot (b, d). Detekcija CD63, membranskog markera EV. F: broj frakcije; CD63 imunoreaktivne frakcije (frakcije 14-16) su spojene i koncentrovane, i označene kao EV-N (a) i EV-O (c). EV-N: izolat EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-O: izolat EV iz oligospermičnih uzoraka SP; T100-N: Frakcija (100000 x g talog) obogaćena EV iz normospermičnih uzoraka SP; T100-O: Frakcija (100000 x g talog) obogaćena EV iz oligospermičnih uzoraka SP.

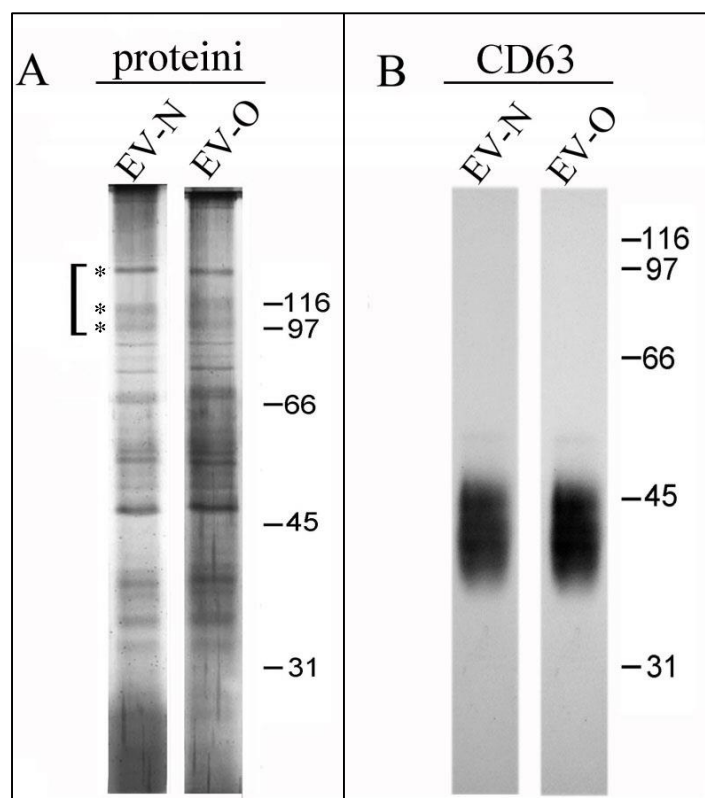


Slika 12. Transmisiona elektronska mikroskopija EV izolata

A. Mikrografija EV-N. Insert: uvećani deo prikazuje tamne vezikule sa izraženim *halo* efektom (vrh strelice). Optički *halo* predstavlja vizuelni artefakt pri kojem se oko objekata na slici pojavljuje svetao oreol.

B. Mikrografija EV-O. Insert: uvećani deo prikazuje vezikule zajedno sa amorfnom supstancom (strelica).

EV-N: izolat EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-O: izolat EV iz oligospermičnih uzoraka SP. Bar 500 nm.



Slika 13. Proteinski profil EV izolata

A. Elektroforeza. Reprezentativni elektroforetski profil proteina dobijen bojenjem srebrom. Oznacene su tri proteinske trake (*) koje čine prostazomski potpis.

B. Immunoblot. Detekcija CD63, membranskog markera EV. Uočava se karakteristična *smeared* traka. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda.

EV-N: izolat EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-O: izolat EV iz oligospermičnih uzoraka SP.

Tabela 1. Koncentracija NHS u EV izolatima

Izolati	NHS		
	Dezmosterol (μmol/L)	β-sitosterol (μmol/L)	Stigmasterol (μmol/L)
EV-N	29,6	18,0	4,9
EV-O	7,2	18,6	4,6

EV-N: izolat EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-O: izolat EV iz oligospermičnih uzoraka SP; NHS: neholesterolski steroli.

4.1.2. Prezentacija b-GGT na membrani EV

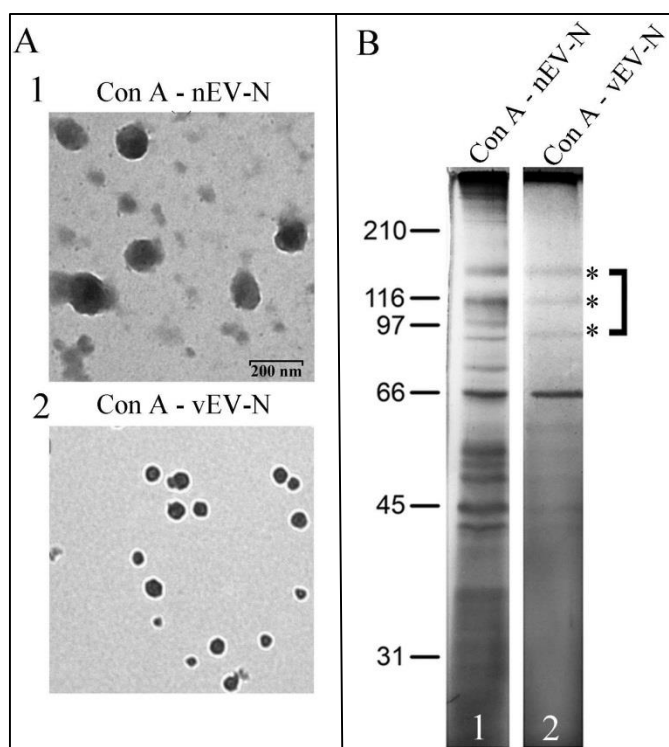
Heterogenost prezentacije b-GGT u kontekstu specifičnih tipova membranskih glikana nativnih EV je analizirana korišćenjem LAH. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskog obrasca koji sadrži b-GGT na membrani EV populacija, koje su razdvojene na osnovu reaktivnosti sa izabranim lektinima, se zasnivala na analizi prisustva ukupnih Con A- i WGA-reaktivnih membranskih glikana i izabranih kanonskih EV markera: tetraspanina (CD63, CD9, CD81) i galektina-3 (Gal-3). EV populacije su analizirane u smislu moguće promene u prisustvu površinskih membranskih markera kao i promena u izgledu, proteinskom profilu i raspodeli/specifičnoj GGT aktivnosti.

4.1.2.1. Lektinska afinitetna hromatografija EV-N

Analiza izgleda, proteinskog profila kao i raspodele membranskih/površinskih markera je ukazala na razlike između EV-N populacija koje su razdvojene LAH na Con A - *Sepharose 4B* koloni.

Con A - nEV-N (populacija EV normospermičnog uzorka semene plazme koju ne vezuje Con A) sadrži vezikule heterogenog izgleda, a prisutan je i amorfni materijal (Slika 14A1). Proteinski profil Con A - nEV-N karakterišu tri prostazomske trake (90-150 kDa), kao i trake molekulskih masa manjih od 66 kDa (Slika 14B1). Na Con A - nEV-N (77% EV-N) se detektuju CD63, CD81 i Gal-3, i ne menja se (u odnosu na ukupne EV-N) specifična aktivnost GGT (Tabela 2). Na osnovu ovih rezultata, može se ustanoviti da ne dolazi do promene u ispitivanim karakteristikama Con A - nEV-N, tj. da one odgovaraju karakteristikama ukupnih EV-N (Slika 12A i 13A).

Con A - vEV-N (populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A) sadrži uniformne tamne vezikule koje pokazuju *halo* efekat, a amorfni materijal nije prisutan (Slika 14A2). Na proteinskom profilu Con A - vEV-N se uočavaju (na granici detekcije) tri prostazomske trake (150-90 kDa) dok je profil traka molekulskih masa manjih od 66 kDa promenjen u smislu vrste/broja i intenziteta pojedinačnih traka (Slika 14B2). Na Con A - vEV-N (23% EV-N) se detektuje samo CD63 a dolazi do znatnog smanjenja (u odnosu na ukupne EV-N) specifične aktivnosti GGT (Tabela 2). Na osnovu ovih rezultata, može se ustanoviti da se Con A - vEV-N razlikuje u svim ispitivanim karakteristikama u odnosu na ukupne EV-N.



Slika 14. Izgled i proteinski profil EV-N populacija razdvojenih na Con A-Sepharose 4B koloni

A. Transmisiona elektronska mikroskopija. Izgled Con A - nEV-N i Con A - vEV-N. Bar 200 nm. **B. Elektroforeza.** Elektroforetski profil Con A - nEV-N i Con A - vEV-N. Proteini su bojeni srebrom. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. Označene su tri proteinske trake (*) koje čine prostazomski potpis. Con A - nEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju ne vezuje Con A; Con A - vEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A; Con A: konkanavalin A.

Tabela 2. Raspodela membranskih markera EV-N populacija razdvojenih na Con A-*Sepharose 4B* koloni

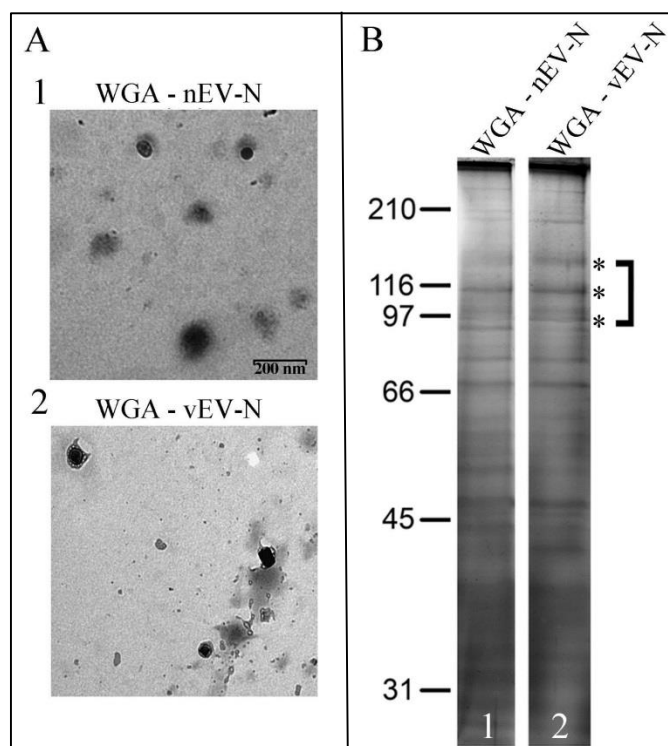
EV-N	GGT (U/g proteina)	EV-N (mg/mL*)	% EV-N	CD63	CD81	Gal-3
Ukupne EV-N	398,7	1,86	100	+++	++	++
Con A - nEV-N	513	1,06	77	+++	++	++
Con A - vEV-N	102,6	0,31	23	+	-	-

Con A - nEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju ne vezuje Con A; Con A - vEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A; GGT (U/g proteina): specifična aktivnost GGT; EV-N (mg/mL*): koncentracija proteina je korišćena kao pokazatelj koncentracije EV; % EV-N: udeo EV-N populacija razdvojenih na Con A-*Sepharose 4B* koloni. Prisustvo CD63, CD81 i Gal-3 je detektovano imunodot blot metodom (+++ intenzivna imunoreaktivnost, - nema imunoreaktivnosti); Con A: konkanavalin A; Gal-3: galektin 3.

Analiza EV-N populacija koje su razdvojene LAH na WGA-*Sepharose 4B* koloni je ukazala na njihove sličnosti u pogledu izgleda i proteinskog profila kao i na razlike u površinskim/membranskim markerima.

Ustanovljena je sličnost izgleda (Slika 15A1) i proteinskog profila (Slika 15B1) WGA - nEV-N (populacija EV normospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA) sa ukupnim EV-N (Slika 12A i 13A). Diskretne razlike su uočene u smislu intenziteta kao i broja i vrsta proteinskih traka, posebno, u regionu molekulskih masa manjih od 66 kDa (Slika 15B1). Na WGA - nEV-N (62% EV-N) se detektuju CD63 i Gal-3 ali ne i CD81, a dolazi i do smanjenja (u odnosu na ukupne EV-N) specifične aktivnosti GGT (Tabela 3).

Izgled (Slika 15A2) i proteinski profil (Slika 15B2) WGA - vEV-N (populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA) delimično su odgovarali onima ukupnih EV-N. Na WGA - vEV-N (38% EV-N) se detektuje samo CD63, a dolazi i do smanjenja (u odnosu na ukupne EV-N) specifične aktivnosti GGT (Tabela 3).



Slika 15. Izgled i proteinski profil EV-N populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni
A. Transmisiona elektronska mikroskopija. Izgled WGA - nEV-N i WGA-vEV-N. Bar 200nm.
B. Elektroforeza. Elektroforetski profil WGA - nEV-N i WGA - vEV-N. Proteini su bojeni srebrom. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. Označene su tri proteinske trake (*) koje čine prostazomski potpis. WGA - nEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA; WGA - vEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA. WGA: *wheat germ agglutinin*.

Tabela 3. Raspodela membranskih markera EV-N populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni

EV-N	GGT (U/g proteina)	EV-N (mg/mL*)	% EV-N	CD63	CD81	Gal-3
Ukupne EV-N	398,7	1,86	100	+++	++	++
WGA - nEV-N	294,4	0,57	62	+++	-	++
WGA - vEV-N	242,4	0,35	38	+	-	-

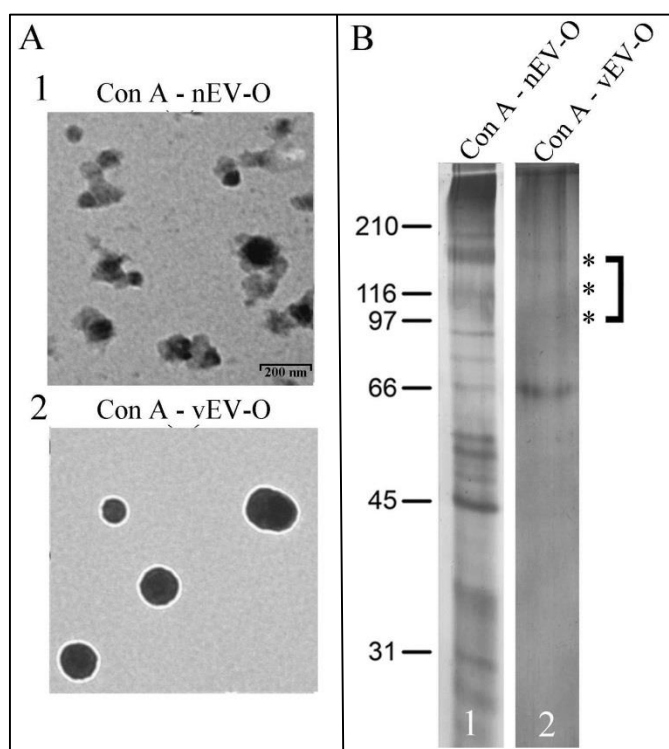
WGA - nEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA; WGA - vEV-N: populacija EV normospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA; GGT (U/g proteina): specifična aktivnost GGT; EV-N (mg/mL*): koncentracija proteina je korišćena kao pokazatelj koncentracije EV; % EV-N: udeo EV-N populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni. Prisustvo CD63, CD81 i Gal-3 je detektovano imunodot blot metodom (+++ intenzivna imunoreaktivnost, - nema imunoreaktivnosti); WGA: *wheat germ agglutinin*; Gal-3: galektin 3.

4.1.2.2. Lektinska afinitetna hromatografija EV-O

Analiza izgleda, proteinskog profila kao i raspodele membranskih/površinskih markera je ukazala na razlike između EV-O populacija koje su razdvojene LAH na Con A - *Sepharose 4B* koloni.

Con A - nEV-O (populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje Con A) sadrži vezikule heterogenog izgleda a prisutan je i amorfni materijal (Slika 16A1). Proteinski profil Con A - nEV-O karakterišu tri prostazomske trake (90-150 kDa), kao i trake molekulskih masa manjih od 66 kDa (Slika 16B1). Na Con A - nEV-O (66% EV-O) se detektuju CD63, CD81 i gal-3, i ne dolazi do znatnog smanjenja (u odnosu na ukupne EV-O) specifične aktivnosti GGT (Tabela 4). Na osnovu ovih rezultata, može se ustanoviti da ne dolazi do promene u ispitivanim karakteristikama Con A - nEV-O, tj. da one odgovaraju karakteristikama ukupnih EV-O (Slika 12B i 13A).

Con A - vEV-O (populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A) sadrži uniformne tamne vezikule koje pokazuju *halo* efekat, a amorfni materijal nije prisutan (Slika 16A2). Proteinski profil Con A - vEV-O je bio promenjen u smislu vrste/broja i intenziteta pojedinačnih traka (na granici detekcije) uključujući i prostazomsku traku na 150 kDa (Slika 16B2). Na Con A - vEV-O (34% EV-O) se detektuje samo CD63, a dolazi do izraženog smanjenja (u odnosu na ukupne EV-O) specifične aktivnosti GGT (Tabela 4). Na osnovu dobijenih rezultata, može se ustanoviti da se Con A - vEV-O razlikuje u svim ispitivanim karakteristikama u odnosu na ukupne EV-O.



Slika 16. Izgled i proteinski profil EV-O populacija razdvojenih na Con A-Sepharose 4B koloni

A. Transmisiona elektronska mikroskopija. Izgled Con A - nEV-O i Con A - vEV-O. Bar 200 nm. **B. Elektroforeza.** Elektroforetski profil Con A - nEV-O i Con A - vEV-O. Proteini su bojani srebrom. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. Označene su tri proteinske trake (*) koje čine prostazomski potpis. Con A - nEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje Con A; Con A - vEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A; Con A: konkanavalin A.

Tabela 4. Raspodela membranskih markera EV-O populacija razdvojenih na Con A-*Sepharose 4B* koloni

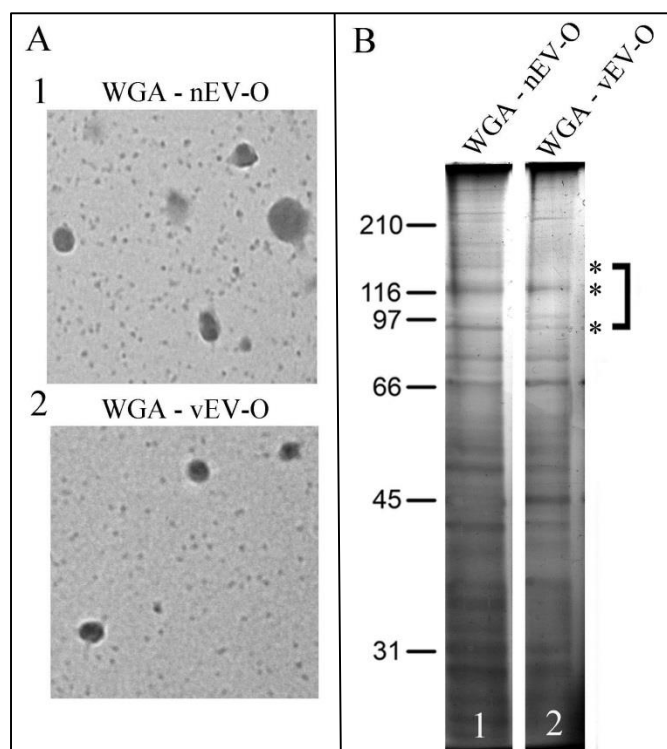
EV-O	GGT (U/g proteina)	EV-O (mg/mL*)	% EV-O	CD63	CD81	Gal-3
Ukupne EV-O	577,4	1,75	100	+++	++	++
Con A - nEV-O	389,5	0,65	66	+++	++	++
Con A - vEV-O	35,1	0,34	34	+	-	-

Con A - nEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje Con A; Con A - vEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje Con A; GGT (U/g proteina): specifična aktivnost GGT; EV-O (mg/mL*): koncentracija proteina je korišćena kao pokazatelj koncentracije EV; % EV-O: udeo EV-O populacija razdvojenih na Con A-*Sepharose 4B* koloni. Prisustvo CD63, CD81 i Gal-3 je detektovano imunodot blot metodom (+++ intenzivna imunoreaktivnost, - nema imunoreaktivnosti); Con A: konkanavalin A; Gal-3: galektin 3.

Analiza EV-O populacija koje su razdvojene LAH na WGA-*Sepharose 4B* koloni je ukazala na njihove sličnosti u pogledu izgleda i proteinskog profila kao i na razlike u površinskim/membranskim markerima.

Ustanovljena je sličnost izgleda (Slika 17A1) i proteinskog profila (Slika 17B1) WGA - nEV-O (populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA) sa ukupnim EV-O (Slika 12B i 13A). Na WGA - nEV-O (57% EV-O) se detektuju CD63, Gal-3 i CD81, a dolazi i do smanjenja (u odnosu na ukupne EV-O) specifične aktivnosti GGT (Tabela 5).

Izgled (Slika 17A2) i proteinski profil (Slika 17B2) WGA - vEV-O (populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA) su odgovarali onima ukupnih EV-O. Na WGA - vEV-O (43% EV-O) se detektuje samo CD63, a dolazi i do znatnog smanjenja (u odnosu na ukupne EV-O) specifične aktivnosti GGT (Tabela 5).



Slika 17. Izgled i proteinski profil EV-O populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni
A. Transmisiona elektronska mikroskopija. Izgled WGA - nEV-O i WGA-vEV-O. Bar 200nm.
B. Elektroforeza. Elektroforetski profil WGA - nEV-O i WGA - vEV-O. Proteini su bojeni srebrom. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. Označene su tri proteinske trake (*) koje čine prostazomski potpis. WGA - nEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA; WGA - vEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA. WGA: *wheat germ agglutinin*.

Tabela 5. Raspodela membranskih markera EV-O populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni

EV-O	GGT (U/g proteina)	EV-O (mg/mL*)	% EV-O	CD63	CD81	Gal-3
Ukupne EV-O	577,4	1,75	100	+++	++	++
WGA - nEV-O	235,5	0,48	57	+++	++	++
WGA - vEV-O	102,2	0,36	43	+	-	-

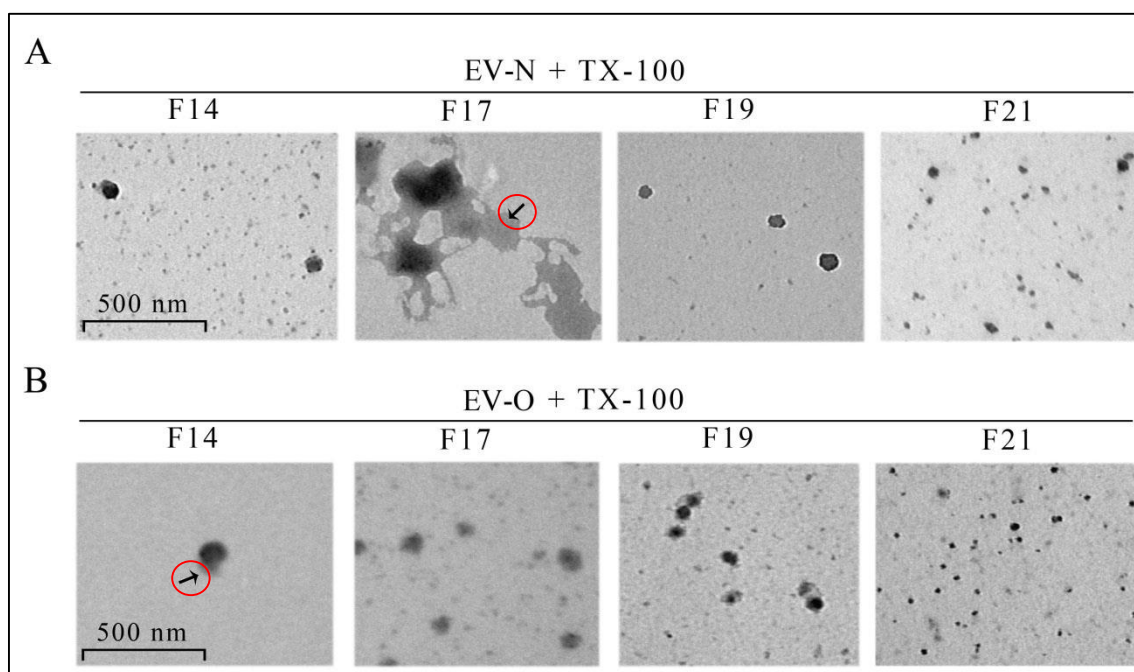
WGA - nEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju ne vezuje WGA; WGA - vEV-O: populacija EV oligospermičnog uzorka SP koju vezuje WGA; GGT (U/g proteina): specifična aktivnost GGT; EV-O (mg/mL*): koncentracija proteina je korišćena kao pokazatelj koncentracije EV; % EV-O: udeo EV-O populacija razdvojenih na WGA-Sepharose 4B koloni. Prisustvo CD63, CD81 i Gal-3 je detektovano imunodot blot metodom (+++ intenzivna imunoreaktivnost, - nema imunoreaktivnosti); WGA: *wheat germ agglutinin*; Gal-3: galektin 3.

4.1.3. Distribucija b-GGT na membrani EV

Heterogenost distribucije b-GGT koja podrazumeva njeno prisustvo na različitim tipovima membranskih domena je analizirana nakon solubilizacije EV i frakcionisanja domena koji su otporni na dejstvo deterdžena korišćenjem gel filtracije. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskog obrasca koji sadrži b-GGT na odgovarajućem membranskom domenu EV se zasnivala na analizi redistribucije ukupnih Con A- i WGA-reaktivnih membranskih glikana i izabranih kanonskih EV markera: tetraspanina (CD63, CD9, CD81) i galektina-3 (Gal-3).

4.1.3.1. Solubilizacija EV

Solubilizacija EV je vršena korišćenjem Triton X-100 (TX-100), nakon čega su membranski domeni otporni na dejstvo deterdženta razdvojeni na koloni *Sephadex G200*. Solubilizacija EV-N i EV-O je potvrđena analizom izgleda (Slika 18) i proteinskog sastava (Slika 19) odgovarajućih frakcija. U oba solubilizovana izolata, na poziciji gde se očekuje eluiranje membranskih domena otpornih na deterdžent (molekulska masa veća od 200 kDa), bile su prisutne strukture sa naboranom površinom (Slika 18A i 18B, frakcija 14) a moglo se uočiti i oslobađanje sadržaja (Slika 18A i 18B, frakcija 17). Na pozicijama na kojima se očekuje razdvajanje solubilizovanih komponenata (molekulske mase manje od 200 kDa) takve strukture nisu bile vidljive, već samo nepravilni depoziti (Slika 18A i 18B, frakcije 19, 21).



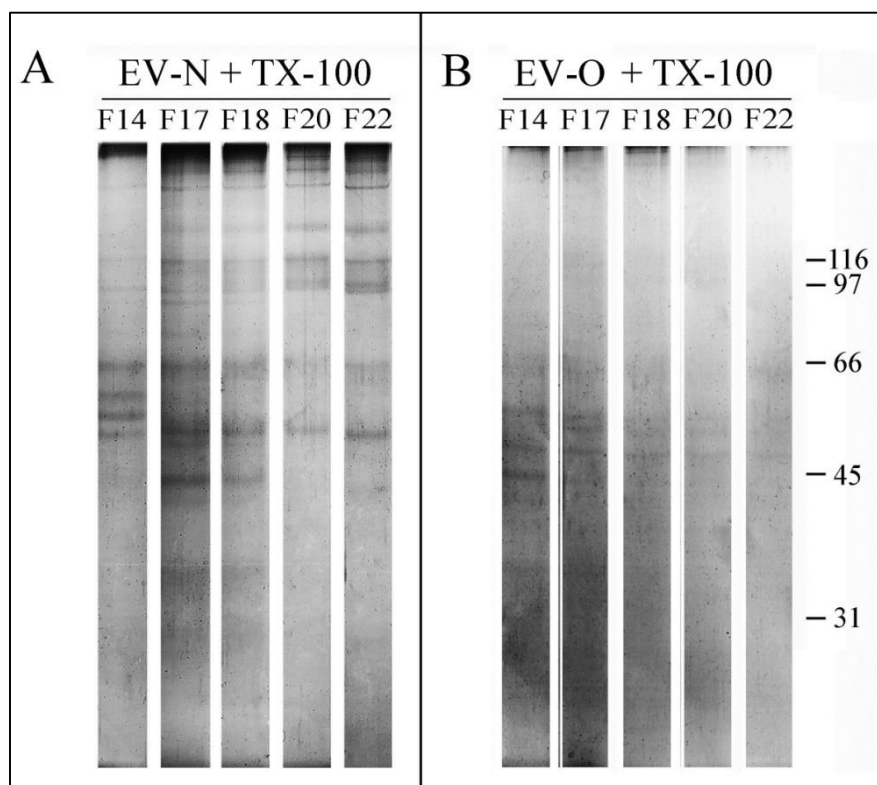
Slika 18. Transmisiona elektronska mikroskopija solubilizovanih EV izolata

Prikazane su mikrofotografije frakcija solubilizovanih EV-N (A) i EV-O (B), razdvojenih gel filtracijom na *Sephadex G200* koloni, pod uslovima koji održavaju potpunu solubilizaciju.

A i B: Strukture naborane površine i oslobađeni sadržaj (strelica) (F14-F17); Heterogeni depoziti (F19-F21). Bar 500 nm. F: frakcija; TX-100: Triton X-100; EV-N + TX-100: solubilizovane EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-O + TX-100: solubilizovane EV iz normospermičnih uzoraka SP.

Proteinski profil odgovarajućih frakcija je pokazao da, na elucionim pozicijama koje odgovaraju molekulskim masama većim od 200 kDa, u solubilizovanom izolatu EV-N (Slika 19A, frakcije 14, 17) i EV-O (Slika 19B, frakcije 14, 17), dolazi do gubitka traka u regionu molekulskih masa većih od 66 kDa (ne detektuje se prostazomski potpis) kao i u regionu molekulskih masa manjih od 45 kDa (u poređenju sa nativnim EV-N i EV-O, slika 13).

Na elucionim pozicijama koje odgovaraju molekulskim masama manjim od 200 kDa, u solubilizovanom izolatu EV-N (Slika 19A, frakcije 20 i 22) i EV-O (Slika 19B, frakcije 20 i 22), detektovane su proteinske trake koje su oslobođene iz membranskih domena koji su osetljivi na TX-100 i lumena EV. Njihov profil je ukazivao na izraženu agregaciju (Slika 19A, frakcije 20 i 22) a promene (broj, zastupljenost i opseg molekulskih masa pojedinačnih traka) su bile više izražene kod solubilizovanih EV-O (Slika 19B) nego solubilizovanih EV-N (Slika 19A).



Slika 19. Proteinski profil solubilizovanih EV

Reprezentativni elektroforetski profil frakcija solubilizovanih EV nakon razdvajanja gel filtracijom na koloni *Sephadex G200*. Proteini su bojeni srebrom. Odabrane frakcije su analizirane bez podešavanja koncentracije, da bi se uočile razlike u elucionim profilima pojedinačnih proteina. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. F: broj frakcije; TX-100: Triton X-100.

A. EV-N + TX-100: solubilizovane EV iz normospermičnih uzoraka SP; B. EV-O + TX-100: solubilizovane EV iz oligospermičnih uzoraka SP.

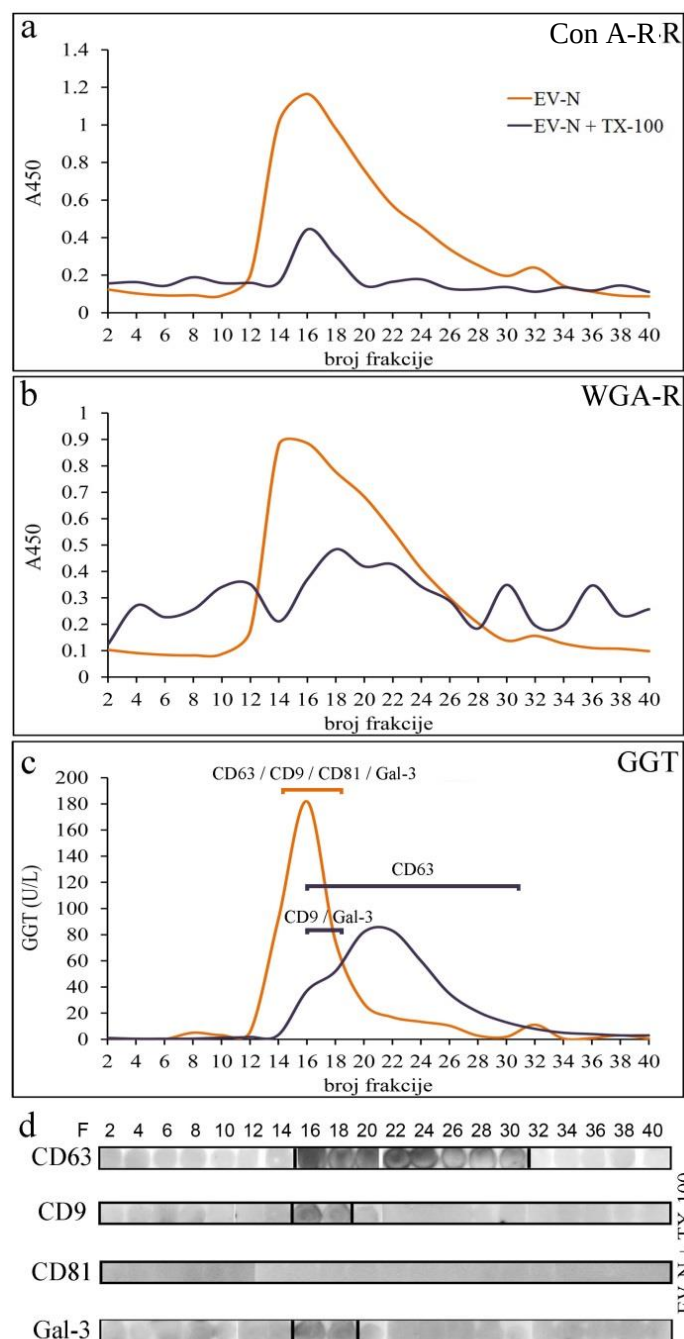
4.1.3.2. b-GGT na membranskim domenima otpornim na dejstvo deterdženta

Uvid u distribuciju b-GGT na membranskim domenima koji su otporni na dejstvo deterdženta dobijen je praćenjem promene elucionog volumena i redistribucije i/ili razdvajanja GGT i tetraspanina (integralni membranski proteini), Con A- i WGA-reaktivnih glikana (većinom periferni membranski proteini) kao i Gal-3 (Slika 20 i 21). Poređenje elucionih profila nativnih EV-N i solubilizovanih EV-N na koloni *Sephadex G200* pokazuje redistribuciju GGT (Slika 20c, frakcije 20-24), CD63 (Slika 20c, frakcije 20-24), kao i WGA-reaktivnih membranskih glikana (Slika 20b, frakcije 18-22).

Tetraspanin CD9 i Gal-3 se, nakon solubilizacije EV-N, isključivo eluiraju na poziciji membranskih domena otpornih na deterdžent (molekulska masa veća od 200 kDa) (Slika 20c i 20d, frakcije 14-18). Na ovoj poziciji se, takođe, eluiraju Con A-reaktivni membranski glikani ali se uočava smanjenje ukupne lektinske reaktivnosti u poređenju sa nativnim EV-N (Slika 20a, frakcije 14-18). Nakon solubilizacije EV-N, tetraspanin CD81 se ne može detektovati ni u jednoj frakciji (Slika 20c i 20d).

Solubilizacija EV-O dovodi do redistribucije GGT (Slika 21c, frakcije 20-24), CD63 (Slika 21d, frakcije 20-24), i dela WGA-reaktivnih membranskih glikana (Slika 21b, frakcije 8-10). Ukupni Con A-reaktivni membranski glikani su smanjeni, i ne dolazi do njihove redistribucije (Slika 21a, frakcije 14-18).

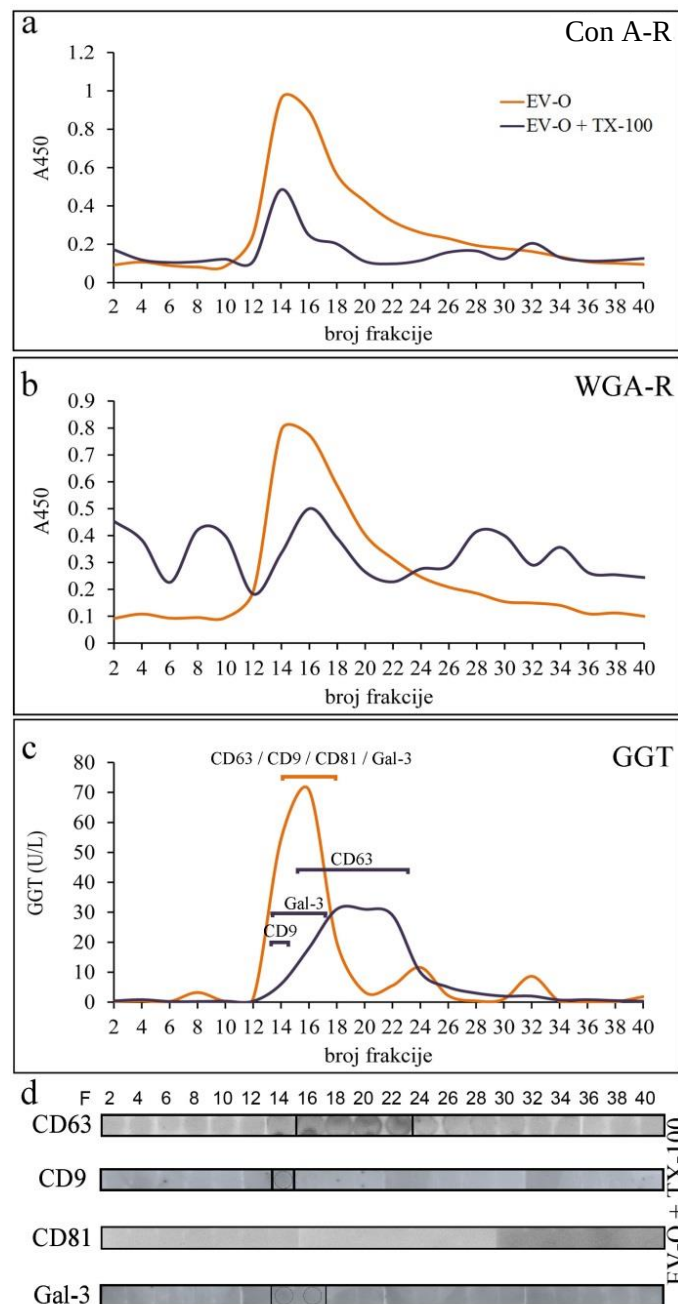
CD9 i Gal-3 se kod solubilizovanih EV-O eluiraju (Slika 21 i 21d, frakcije 14-18) na poziciji membranskih domena otpornih na deterdžent (molekulska masa veća od 200 kD) ali se, za razliku od solubilizovanih EV-N, njihovi elucionni profili samo delimično preklapaju. Tetraspanin CD81 se, nakon solubilizacije EV-O, ne može detektovati ni u jednoj frakciji (Slika 21c i 21d), isto kao kod solubilizovanih EV-N.



Slika 20. Distribucija b-GGT na membrani EV-N

Gel filtracija EV-N na koloni Sephadex G200. (a) Detekcija Con A-reaktivnih (Con A-R) membranskih glikana na nativnim EV-N (EV-N, narandžasta linija) i solubilizovanim EV-N (EV-N + TX100, ljubičasta linija); (b) Detekcija WGA-reaktivnih (WGA-R) membranskih glikana na nativnim i solubizovanim EV-N; (c) Detekcija GGT (praćena merenjem ukupne enzimske aktivnosti (U/L)) na nativnim i solubilizovanim EV-N. Horizontalnom narandžastom linijom označen je region u kom je detektovana CD63-, CD81-, CD9- i Gal-3- imunoreaktivnost nativnih EV-N (rezultati imunodot blota nisu prikazani). Horizontalnom ljubičastom linijom je označen region u kom je detektovana CD63-, CD81-, CD9- i Gal-3- imunoreaktivnost solubilizovanih EV-N (imunodot blot, panel d). Zapremina frakcije 1 mL. A450: apsorbancija na 450 nm; Gal-3: galektin-3; TX-100: Triton X100; EV-N: native EV iz normospermičnih uzoraka SP; EV-N + TX-100: solubilizovane EV iz normospermičnih uzoraka SP.

Imunodot blot. (d) Detekcija tetraspanina: CD63, CD81, CD9 i Gal-3 u frakcijama solubilizovanih EV-N, razdvojenih gel filtracijom. Prisustvo TX-100 dovodi do razlivenog izgleda tačaka. F: frakcija.



Slika 21. Distribucija b-GGT na membrani EV-O

Gel filtracija EV-O na koloni Sephadex G200. (a) Detekcija Con A-reaktivnih (Con A-R) membranskih glikana na nativnim EV-O (EV-O, narandžasta linija) i solubilizovanim EV-O (EV-O + TX100, ljubičasta linija); (b) Detekcija WGA-reaktivnih (WGA-R) membranskih glikana na nativnim i solubizovanim EV-O; (c) Detekcija GGT (praćena merenjem ukupne enzimske aktivnosti (U/L)) na nativnim i solubilizovanim EV-O. Horizontalnom narandžastom linijom označen je region u kom je detektovana CD63-, CD81-, CD9- i Gal-3- imunoreaktivnost nativnih EV-O (rezultati imunodot blota nisu prikazani). Horizontalnom ljubičastom linijom je označen region u kom je detektovana CD63-, CD81-, CD9- i Gal-3- imunoreaktivnost solubilizovanih EV-O (imunodot blot, panel d). Zapremina frakcije 1 mL. A450: apsorbancija na 450 nm; Gal-3: galektin-3; TX-100: Triton X100; EV-O: nativne EV iz oligospermičnih uzoraka SP; EV-O + TX-100: solubilizovane EV iz oligospermičnih uzoraka SP.

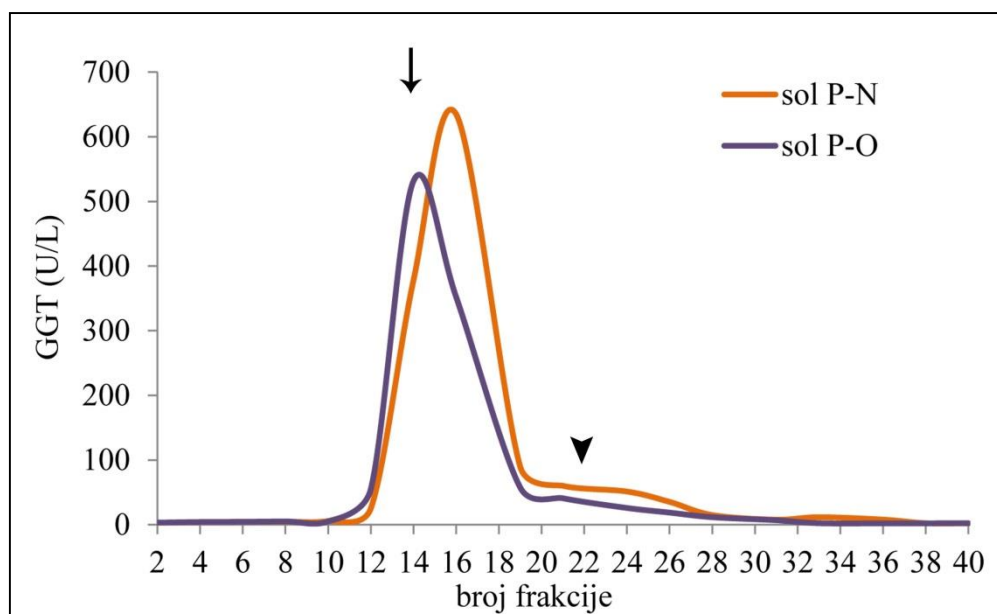
Imunodot blot. (d) Detekcija tetraspanina: CD63, CD81, CD9 i Gal-3 u frakcijama solubilizovanih EV-O, razdvojenih gel filtracijom. Prisustvo TX-100 dovodi do razlivenog izgleda tačaka. F: frakcija.

4.2. Glikobiohemijska karakterizacija molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u solubilnom subproteomu semene plazme

4.2.1. Distribucija GGT u solubilnom subproteomu semene plazme

U S100 frakciji SP (100000 x *g* supernatant), koja predstavlja sol P, detektovana je GGT aktivnost koja potiče od solubilnih molekulskih formi GGT: m-GGT, s-GGT i f-GGT. S100-N, frakcija iz normospermičnih uzoraka SP, je sadržala 97,6%, dok je S100-O, frakcija iz oligospermičnih uzoraka SP, sadržala 94,9% ukupne enzimске aktivnosti GGT.

Inicijalni uvid u molekulske forme GGT u solubilnom subproteomu semene plazme (sol P) je dobijen gel filtracijom S100 frakcije na koloni *Sephadex G200*, pod eksperimentalnim uslovima koji su primenjeni za prešićavanje EV iz uparene T100 frakcije (100000 x *g* talog). Elucioni profili GGT iz solubilnog subproteoma normospermičnih uzoraka semene plazme (sol P-N) i solubilnog subproteoma oligospermičnih uzoraka SP (sol P-O) su pokazali, da se maksimum GGT aktivnosti, u oba uzorka, eluira na poziciji bliskoj poziciji b-GGT, a da se minorni deo eluira na poziciji f-GGT (Slika 22).



Slika 22. Gel filtracija solubilnog subproteoma semene plazme na koloni *Sephadex G200*

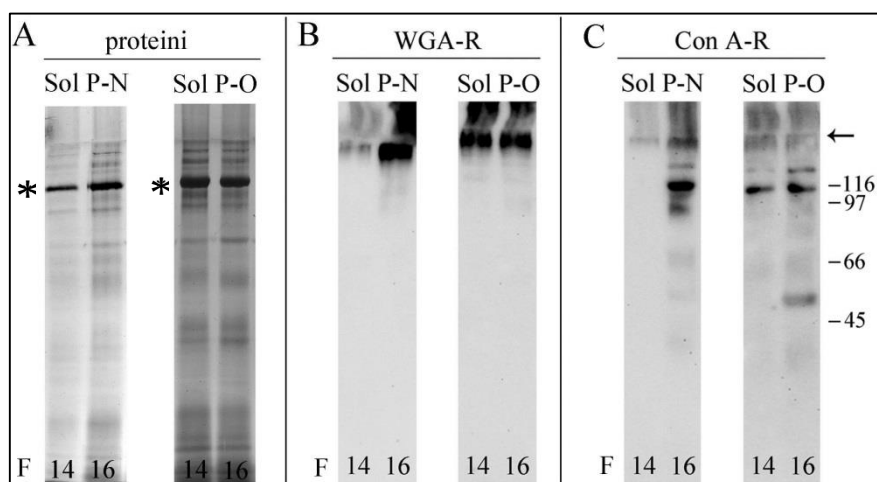
Elucija GGT je praćena merenjem ukupne enzimске aktivnosti (U/L). Zapremina frakcije 1 mL. Kolona je kalibrisana prema elucionoj poziciji b-GGT na nativnim EV (strelica; molekulska masa veća od 2000 kDa) i f-GGT koja je oslobođena iz membrana EV (vrh strelice; molekulska masa ~ 70 kDa). sol P-N: solubilni subproteom normospermičnih uzoraka SP, sol P-O: solubilni subproteom oligospermičnih uzoraka SP.

Frakcije sol P-N i sol P-O koje su razdvojene gel filtracijom na koloni *Sephadex G200*, i u kojima je detektovana GGT aktivnost (Slika 22, frakcije 14 i 16) su pokazale komparabilne elektroforetske profile proteina (Slika 23A) i glikoproteina (Slika 23B, C).

Detektovana je glavna proteinska traka molekulske mase 120 kDa (Slika 23A), i minorne trake u regionu molekulskih masa manjih od 80 kDa koje su bile uočljivije kod sol P-O. Način elektroforetskog razdvajanja proteina je ukazivao na izraženu agregaciju.

WGA-reaktivni glikoproteini u frakcijama sol P-N i sol P-O (Slika 23B) su, isključivo, detektovani u gelu za koncentrovanje kao i na granici gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Ove pozicije odgovaraju glikokonjugatima ekstremno velikih molekulskih masa, a način razdvajanja (*smear*ed traka) ukazuje na moguće prisustvo mucina.

U oba ispitivana uzorka, Con A-reaktivni glikoproteini (Slika 23C) su, takođe, detektovani u regionu ekstremno velikih molekulskih masa (slično WGA-reaktivnim glikoproteinima) ali i u regionu molekulskih masa manjih od 80 kDa (slično proteinima). Detektovana je glavna traka na 120 kDa, i trake na 150 kDa, 100 kDa, 60 kDa i 40 kDa, koje su bile uočljivije kod sol P-N. Način elektroforetskog razdvajanja je ukazao na njihovo moguće prisustvo u agregatima Con A-reaktivnih glikoproteina i/ili različitih proteina.



Slika 23. Proteinski i glikoproteinski profil sol P frakcija koje sadrže solubilnu GGT

Sol P-N i sol P-O frakcije razdvojene gel filtracijom na koloni *Sephadex G200* (Slika 22, frakcije 14 i 16) su analizirane 10% SDS-PAG elektroforezom pod redukujućim i denaturišućim uslovima. Proteini su bojeni srebrom (A) ili su preneseni na membranu i detektovani lektinskim-blotom (B, C). A. Reprezentativni obrazac ukupnih proteina: označena je glavna proteinska traka na 120 kDa (*). B. Reprezentativni obrazac WGA-reaktivnih glikoproteina. C. Reprezentativni obrazac Con A-reaktivnih glikoproteina. Brojevi označavaju molekulsku masu (kDa) standarda. WGA-R: *Wheat Germ* aglutinin- reaktivni glikoproteini. Con A-R: konkanavalin A-reaktivni glikoproteini. Sol P-N: solubilni subproteom normospermičnih uzoraka SP; Sol P-O: solubilni subproteom oligospermičnih uzoraka SP. F: frakcija.

Da bi se ustanovilo poreklo GGT forme velike molekulske mase u sol P, primenjen je postupak koji se standardno koristi za izolovanje imunoglobulina (uklanja GGT u kompleksu sa IgG/IgA) i lipidnih čestica (uklanja GGT u kompleksu sa EV / lipoproteinskim česticama) a koji se zasniva na njihovoj precipitaciji rastvorom PEG. Dobijeni rezultati su ukazali da GGT velike molekulske mase u sol P-N kao i u sol P-O, ne potiče od ovih molekulskih kompleksa, budući da je 2,5–5,6% od ukupne GGT aktivnosti bilo detektovano u precipitatu. Polazeći od ovih rezultata, kao i rezultata gel

filtracije na *Sephadex G200*, dalja analiza GGT u sol P je vršena na koloni *Sepharose 2B* koja ima opseg frakcionisanja pogodan za razdvajanje komponenata velike molekulske mase.

4.2.2. Proteinski i glikoproteinski profil frakcija koje sadrže solubilne molekulske forme GGT

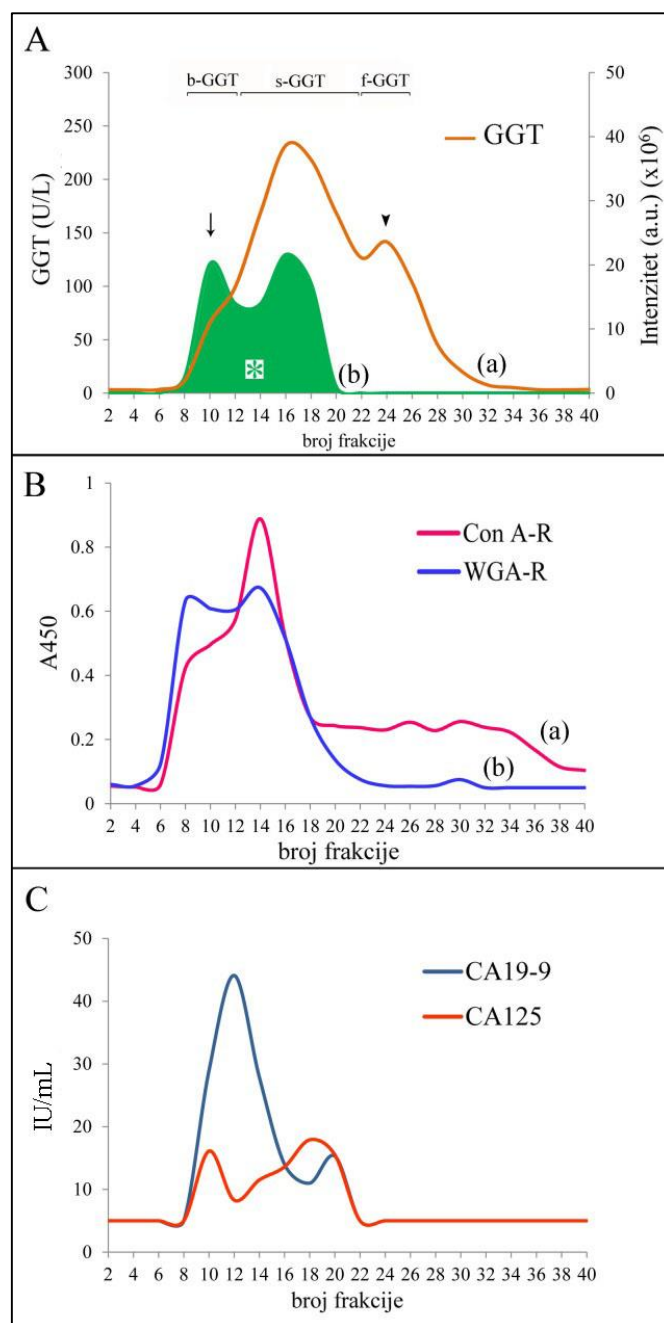
Gel filtracija sol P-N na koloni *Sepharose 2B* je pokazala da se GGT aktivnost eluira kao dva do tri delimično razdvojena pika (Slika 24Aa). Udeo GGT pikova u ukupnoj površini pikova eluirane GGT aktivnosti iznosio je: na poziciji b-GGT (14,9%), s-GGT (52,8%) i f-GGT (32,3%).

Distribuciju GGT aktivnosti (u rasponu molekulskih masa b-GGT i s-GGT) je pratila distribucija proteinske trake molekulske mase 120 kDa (Slika 24Ab). Con A- (Slika 24Ba) i WGA-reaktivni glikani (Slika 24Bb) sol P-N su eluirani kao dva delimično razdvojena pika čiji se odnos razlikovao.

Polazeći od specifičnog elektroforetskog profila (Slika 23A) i WGA- reaktivnosti sol P frakcija velike molekulske mase (Slika 23B) ispitano je prisustvo mucina u frakcijama razdvojenim na *Sepharose 2B* koloni (Slika 24C). Dobijeni rezultati su pokazali jedan pik mucinskog antigena CA19-9 koji se eluira na poziciji koja odgovara molekulskoj masi b-GGT i dva pika mucinskog antigena CA125 koji se eluiraju u rasponu molekulskih masa b-GGT i s-GGT.

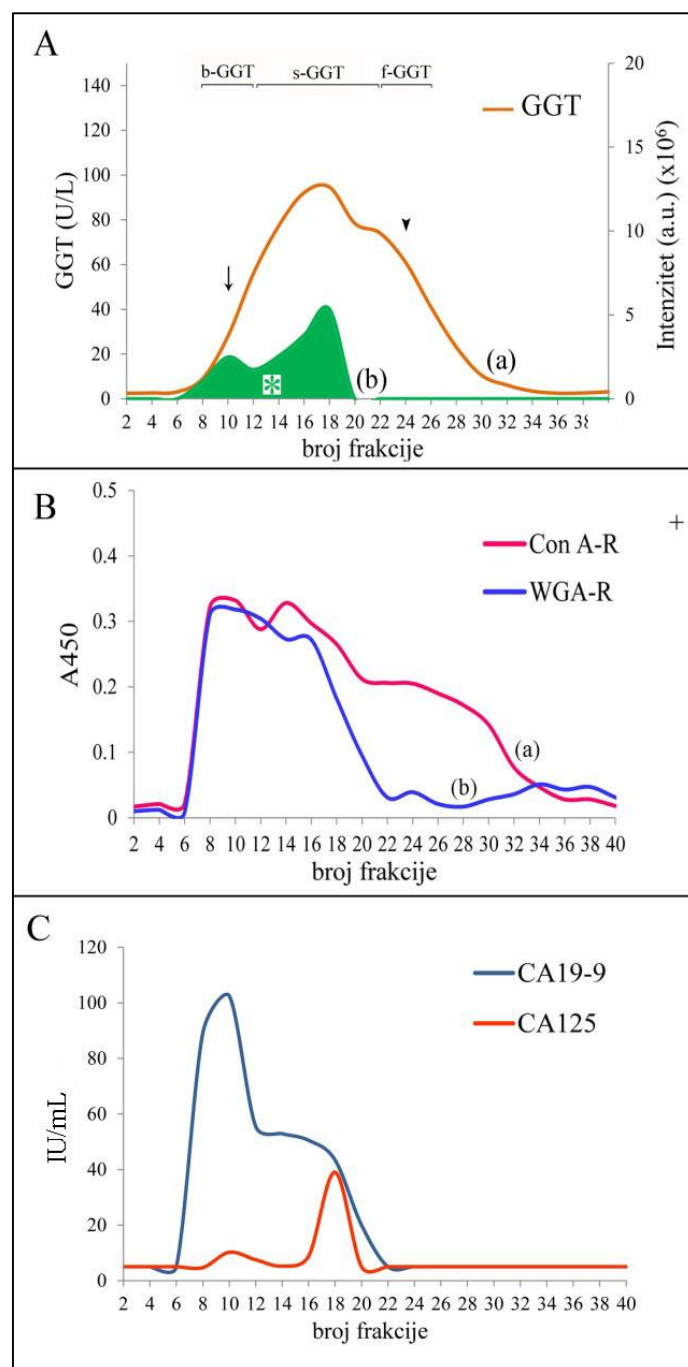
Gel filtracija sol P-O na koloni *Sepharose 2B* je, slično kao i sol P-N, pokazala da se GGT eluira u širokom opsegu masa kao dva do tri slabo razdvojena pika (Slika 25Aa). Udeo GGT pikova u ukupnoj površini pikova eluirane GGT aktivnosti iznosio je: na poziciji b-GGT (24,6%), s-GGT (42,5%) i f-GGT (32,9%).

Slično kao i u slučaju sol P-N, distribuciju GGT aktivnosti u sol P-O (u rasponu molekulskih masa b-GGT i s-GGT) je pratila distribucija, proteinske trake na 120 kDa (Slika 25Ab), a Con A- (Slika 25Ba) i WGA-reaktivni glikani (Slika 25Bb) su bili eluirani kao dva delimično razdvojena pika. Mucinski antigen CA19-9 se, za razliku od sol P-N, u sol P-O eluirao kao dva pika u rasponu molekulskih masa b-GGT i s-GGT, dok se CA125 eluirao kao jedan pik na poziciji koja odgovara molekulskoj masi s-GGT (Slika 25C).



Slika 24. Distribucija GGT i koeluiranih proteina i glikoproteina u frakcijama solubilnog subproteoma normospermičnih uzoraka semene plazme

A. Proteini. (a) Elucija GGT sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem ukupne enzimске aktivnosti (U/L). Kolona je kalibrisana prema elucionoj poziciji b-GGT na nativnim EV (strelica; molekulska masa veća od 2000 kDa) i f-GGT koja je oslobođena iz membrana EV (vrh strelice; molekulska masa ~ 70 kDa). Eluicioni volumeni GGT formi su označeni (arbitarno) na sledeći način: b-GGT, frakcije 8–12; s-GGT, frakcije 12–22 i f-GGT, frakcije 22–26. Zapremina frakcije 1 mL. (b) Denzitometrijski hromatogram () proteinske trake molekulske mase 120 kDa (Slika 23A). Intenzitet trake je izražen u arbitrarnim jedinicama (a.u.). **B. Glikani.** Elucija Con A- (a) i WGA-reaktivnih glikana (b) sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem lektinske reaktivnosti imobilisanih frakcija. Zapremina frakcije 1 mL. A450: apsorpcija na 450 nm. Con A-R: konkanavalin A-reaktivni glikani. WGA-R: *Wheat Germ* aglutinin- reaktivni glikani. **C. Mucini.** Elucija mucinskih antigena: CA 19-9 (plava linija) i CA125 (crvena linija) sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem njihove koncentracije (IU/mL).



Slika 25. Distribucija GGT i koeluiranih proteina i glikoproteina u frakcijama solubilnog subproteoma oligospermičnih uzoraka semene plazme

A. Proteini. (a) Elucija GGT sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem ukupne enzimske aktivnosti (U/L). Kolona je kalibrisana prema elucionoj poziciji b-GGT na nativnim EV (strelica; molekulska masa veća od 2000 kDa) i f-GGT koja je oslobođena iz membrana EV (vrh strelice; molekulska masa ~ 70 kDa). Eluicioni volumeni GGT formi su označeni (arbitrarno) na sledeći način: b-GGT, frakcije 8–12; s-GGT, frakcije 12–22 i f-GGT, frakcije 22–26. Zapremina frakcije 1 mL. (b) Denzitometrijski hromatogram () proteinske trake molekulske mase 120 kDa (Slika 23A). Intenzitet trake je izražen u arbitrarnim jedinicama (a.u.). B. Glikani. Elucija Con A- (a) i WGA-reaktivnih glikana (b) sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem lektinske reaktivnosti imobilisanih frakcija. Zapremina frakcije 1 mL. A450: apsorpcija na 450 nm. Con A-R: konkanavalin A-reaktivni glikani. WGA-R: *Wheat Germ* aglutinin- reaktivni glikani. C. Mucini. Elucija mucinskih antigena: CA 19-9 (plava linija) i CA125 (crvena linija) sa kolone *Sepharose 2B* je praćena merenjem njihove koncentracije (IU/mL).

4.3. Referentni parametri za anotaciju molekulskih formi GGT

Rekapitulacija analize molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u EV i sol-P SP, u pogledu lokalizacije, komponenata i analitičkih parametara, je prikazana u **tabeli 6**. Na osnovu bazičnih metodoloških i bioloških principa korišćenih za razdvajanje i detekciju individualne molekulske forme GGT, ustanovljeni su referentni parametri: glikanski potpis, solubilizacioni potpis i homologni / heterologni kompleks, koji bi se mogli koristiti za anotaciju njene strukturne heterogenosti. Ovaj pristup se bazirao na analogiji sa uspostavljenim i prihvaćenim sistemom identifikacije EV iz SP, koje opisuje tzv. prostazomski potpis a koji čine tri proteinske trake definisane molekulske mase.

Tabela 6. Rekapitulacija analize molekulskih obrazaca koji sadrže GGT u semenoj plazmi

Molekulski obrazac koji sadrži GGT				
Lokalizacija	Komponente	Analitički parametri	Ustanovljen referentni parametar	Moguća primena
<u>EV</u> • Membrana EV • Membrana populacija EV	1. b-GGT 2. Tetraspanini 3. Galektin-3 4. Membranski proteini 5. Membranski glikoproteini	1. Ukupna / specifična aktivnost GGT 2 - 4. Imunoreaktivnost 5. Lektinska reaktivnost	Glikanski potpis	Anotacija b-GGT
	1. b-GGT 2. Tetraspanini 3. Galektin-3	1. Ukupna aktivnost GGT 2 - 3. Imunoreaktivnost	Solubilizacioni potpis	
<u>Sol P</u> • Frakcija proteina > 2000kDa • Frakcija proteina > 1000 kDa • Frakcija proteina > 250 kDa	1. GGT 2. Glikoproteini 3. Proteini 4. IgA / IgG 5. Lipoproteinske čestice	1. Ukupna aktivnost GGT 2. Lektinska reaktivnost 3. Imunoreaktivnost 4 - 5. Koncentracija	Homologni / heterologni kompleks GGT	Anotacija m-GGT Anotacija s-GGT

Analitički parametri selektovanih komponenti molekulskog obrasca koji sadrži GGT, ukazali su na razlike u anotiranoj b-GGT formi između normospermičnih i oligospermičnih uzoraka SP (Tabela 7). One su se odnosile na prezentaciju glikana na nativnim EV populacijama (poglavlje 4.1.2.) i na distribuciju TS i Gal-3, na membranskim domenima EV otpornim na dejstvo deterdženta (poglavlje 4.1.3.). Anotacija b-GGT iz SP, na osnovu glikanskog potpisa ili solubilizacionog potpisa, bi mogla uticati na njen biomarkerski potencijal, što zahteva dalje ispitivanje i potvrdu u fazama validacije i standardizacije.

Kod solubilnih formi GGT, pod datim eksperimentalnim uslovima, glikobiohemijska karakterizacija nije ukazala na razlike.

Tabela 7. Poređenje anotiranih molekulskih formi GGT normospermičnih i oligospermičnih uzoraka semene plazme

Eksperimentalna faza: anotacija molekulskih formi GGT		
Anotirana molekulska forma GGT	Osnov biomarkerskog potencijala	
	GGT Individualni biomarker	GGT/EV Kompozitni biomarker
	Razlika između molekulskih obrazaca GGT normospermičnih i oligospermičnih uzoraka	
b-GGT anotirana glikanskim potpisom	b-GGT u kontekstu prezentacije WGA-reaktivnih glikana	Odnos udela definisanih populacija EV Promene u površinskom sastavu definisanih populacija EV
b-GGT anotirana solubilizacionim potpisom	b-GGT u kontekstu distribucije CD9 i Gal-3	Promene u distribuciji molekula na membranskim domenima EV otpornim na deterdžent
s-GGT/m-GGT anotirane homolognim / heterolognim kompleksom	Ne postoji razlika	Odnos udela GGT u solubilnom subproteomu i EV

5. Diskusija

5.1. Definisanje referentnih parametara i anotacija molekulskih formi GGT

Rezultati ovog rada, na osnovu kojih su ustanovljeni referentni parametri za anotaciju GGT formi velike molekulske mase, upotpunili su osnovna znanja o heterogenosti ovog molekula i ukazali da se GGT može razmatrati ne samo kao individualni, već i kompozitni biomarker.

Istovremeno postojanje različitih molekulskih formi GGT u telesnim tečnostima ukazuje na generalni značaj i potrebu razlikovanja dopirinske membranske i solubilne forme enzima ukupnoj GGT aktivnosti koja se meri standardnim laboratorijskim testovima. Definisanje referentnih parametara, koji će anotirati određenu molekulsku formu GGT na osnovu molekulskog obrasca, može se smatrati kao vredan dodatak i potencijalni faktor diferencijacije pri standardnom određivanju GGT aktivnosti, a ovo je prva studija takve vrste. Postoji paralela između ovog pristupa i pristupa koji se zasniva na određivanju strukturnih karakteristika određenog biomarkera, sa ciljem poboljšanja dijagnostičkog potencijala koji se primarno zasniva na određivanju njegove koncentracije. Pored ovoga, dobijeni rezultati otvaraju i mogućnost da se GGT ne određuje samo u serumu (ili drugoj nefrakcionisanoj telesnoj tečnosti), već i na EV, koje su i same danas prepoznate kao analit tečne biopsije od posebnog značaja. Definisanje referentnih parametara (glikanski potpis, solubilizacioni potpis i homologni/heterologni kompleksi) za anotaciju molekulskih formi GGT predstavlja originalni naučni doprinos i ovo je prva studija takve vrste. Imajući u vidu esencijalna svojstva glikana koja čine EV heterogenim analitom, uvođenje površinskih glikoparametara je značajno za poređenje izolata dobijenih različitim metodama, kao i za bolji uvid u heterogenost svake pojedinačne molekulske forme GGT, posebno b-GGT.

Polazeći od činjenica da bi heterogenost i/ili razlika u b-GGT na čestici-membrani EV i solubilnim GGT formama koje takođe imaju veliku molekulsku masu (s-GGT, m-GGT) mogla biti posledica različitog porekla (sekretorne vezikule u odnosu na specifične granule), ili naknadne modifikacije u nekim patofiziološkim stanjima, analitički koncept glikobiohemijske karakterizacije molekulskih obrazaca koji sadrže GGT je proistekao iz odgovarajuće biološke prezentacije i lokalizacije određenog molekula na membrani ili u molekulskom kompleksu.

Poređenje rezultata razdvajanja EV-N i EV-O pomoću LAH, ukazalo je da postoji međusobna razlika u prezentaciji b-GGT u kontekstu WGA-reaktivnih glikana na odgovarajućim populacijama EV. Pokazano je da EV bivaju modifikovane prolaskom kroz WGA kolonu, što se manifestovalo diskretnim izmenama njihovog oblika i proteinskog profila, kao i smanjenjem specifične aktivnosti GGT. Ustanovljeno je da se, takođe, menja i TS/Gal-3 profil, tj. na populacijama EV-N koje ne vezuje WGA detektuju se CD63 i Gal-3, ali ne i CD81, dok se na populacijama EV-O koje ne vezuje WGA detektuju CD63, CD81 i Gal-3. Populacije EV-N i EV-O koje vezuje WGA bile su slične, tj. detektovan je samo CD63. Istovremeno, nije nađena razlika u prezentaciji b-GGT u kontekstu Con A-reaktivnih glikana. Uočene su, međutim, populacije EV-N i EV-O koje su reagovala sa Con A i koje su se razlikovale od vezikula koje nisu reagovala sa Con A, a koje su imale tzv. prostazomski potpis. U prilog ovome govori dobijeni rezultat TEM koja otkriva karakterističan oblik i elektronsku gustinu ove populacije i kod EV-N, kao i kod EV-O. Postoji mogućnost da one predstavljaju drugi tip vezikula, npr. lipidne vezikule, ili posebnu populaciju EV iz SP, ali ovo nije dalje analizirano zbog niske ukupne GGT aktivnosti.

Na osnovu ispitivanja prezentacije b-GGT u odnosu na površinske glikane nativnih populacija EV-N i EV-O, definisani su njihovi referentni glikanski potpisi. Glikanski potpis pruža kvalitativne podatke na osnovu kojih se anotira b-GGT, i na osnovu kojih se EV mogu međusobno razlikovati bez potrebe za ispitivanjem njihovog intravezikularnog sadržaja ili proteina karakterističnih za određeni ćelijski tip. Sortiranje i transport različitih proteina, generalno, zavisi od različitih

posttranslacionih modifikacija, uključujući glikozilaciju. Pored toga, distribucija, lokalizacija i održavanje molekulskih okruženja u smislu doprinosa različitih ekstracelularnih ili celularnih struktura kompoziciji EV, predstavljaju rezultat ravnoteže između puteva egzocitoze i endocitoze. Sve ovo može značajno uticati na površinski, ali i membranski sastav EV, a samim tim i na aktivnost GGT, što ukazuje da su glikani tj. glikanski potpis relevantni kao referentni parametri.

Poređenje rezultata razdvajanja EV-N i EV-O u odnosu na membranske domene otporne na dejstvo deterdženta ukazalo je na značajne razlike u solubilizaciji svakog TS, kao i u njihovoj povezanosti sa GGT i Gal-3. Kada se efekat TX-100 na EV-N uporedi sa efektom na EV-O, može se videti sličnost u pogledu preraspodele ispitivanih membranskih glikoproteina, uključujući GGT, za koje se pretpostavlja da su uglavnom deo korone EV. Nasuprot tome, izraženija razlika je pronađena u preraspodeli integralnih membranskih proteina (TS) kao i Gal-3. GGT se, najvećim delom, solubilizuje i razdvaja kao i CD63 i Con A-reaktivni glikani. Manjim delom, GGT ostaje u domenima koji su otporni na dejstvo deterdženta i tu distribuciju prate CD9, Gal-3 i WGA-reaktivni glikoproteini.

Dobijeni rezultati su pokazali i da postoji razlika u prisustvu CD9 i Gal-3 u molekulskim obrascima koji sadrže b-GGT na membranskim domenima EV-N i EV-O koji su otporni na dejstvo deterdženta. Kod EV-O, TX-100 deluje na CD9 i Gal-3 u smislu njihove međusobne segregacije, tj. izgleda da oni ne ostaju u potpunosti kolokalizovani u membranskim domenima otpornim na deterdžente, kao što je zapaženo za EV-N. Elucioni profili solubilizovanih EV ukazuju da dolazi do formiranja različitih kompleksa velike molekulske mase. Ovo bi bilo u skladu sa rezultatima TEM koji su pokazali da CD9 u EV-N ostaje u vezikularnim strukturama nerastvorljivim u deterdžentu, dok u EV-O, može biti deo agregiranih proteina i lipida. Što se tiče CD81, ranije je pokazano da on interaguje sa GGT (149). Primenjene metode detekcije, međutim, ne omogućavaju da se ustanovi ko-distribucija GGT i CD81 kod EV iz SP. Ovo može biti povezano sa podacima koji ukazuju da različita antitela različito prepoznaju CD81 ako je u TS-mreži, ili ako je mreža narušena dejstvom TX-100 (150).

Ispitivani tipovi glikana najvećim delom su bili oslobođeni iz membrane EV. Promene izazvane deterdžentom su, međutim, bile različite i to je uticalo na razlike u detekciji Con A- i WGA-reaktivnih glikana pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Ovo je bilo posebno primetno u slučaju WGA-reaktivnih glikana. Stvaranje autoagregata ili heterolognih kompleksa, kao i mešovito oslobađanje glikolipida/lipoproteina (izraženo kod EV-O), može da ometa vezivanje lektina i samim tim i detekciju.

Na osnovu ispitivanja distribucije b-GGT u odnosu na membranske domene EV-N i EV-O, definisani su njihovi referentni solubilizacioni potpisi. Određivanje solubilizacionog potpisa ima uporište u podacima koji ukazuju na specifičan lipidni sastav membrane EV, posebno onih iz SP (151). Solubilizacioni potpis se može posmatrati kao sveobuhvatni faktor na osnovu kojeg se može utvrditi razlika u površinskim svojstvima (lokalizacija membranskih ili perifernih komponenti molekulskog obrasca) EV u kontekstu fiziološkog stanja, izvora ili metodološkog pristupa primenjenog za izolaciju, kao i za identifikaciju različitih tipova vezikula. Polazeći od pretpostavljene uloge EV u ćelijskoj komunikaciji, uvid u solubilizacioni potpis bi mogao biti osnova za razmatranje doprinosa GGT i TS funkcionalnosti membrane EV. Pored toga, ovaj pristup može biti osnova i za proširenje istraživanja različitih pitanja složenosti membrane, za koja se uglavnom koristi ćelijska plazma membrana kao model, na model membrane EV. Uvid u obrasce distribucije TS na različitim membranskim domenima može proširiti njihovu dosadašnju primenu kao markera EV. Štaviše, pošto TS imaju ulogu u ćelijskoj adheziji, pokretljivosti i formiranju metastaza, kao i u ćelijskoj aktivaciji i prenosu signala, moguće razlike u njihovoj organizaciji mogu imati biomedicinski značaj (152–154). Dakle, solubilizacioni potpis TS ili EV mogao bi povezati njihovu strukturu sa funkcionalnim promenama u različitim patofiziološkim stanjima.

Poređenje rezultata razdvajanja solubilnih molekulskih formi GGT iz sol P-N i sol P-O, ukazalo je da ne postoje izrazite međusobne razlike. U oba slučaja, detektovan je širok obrazac elucije GGT velike molekulske mase (u rasponu molekulskih masa b-GGT, m-GGT, s-GGT), što može sugerisati da većina enzima nije lišena hidrofobnog domena odgovornog za interakciju između samih molekula GGT ili interakciju GGT sa različitim molekulima. U poređenju sa podacima dobijenim analizom drugih bioloških tečnosti, u solubilnom subproteomu SP udeo f-GGT forme je bio manji od udela s-GGT.

Analizom proteinskog i glikoproteinskog profila frakcija sol-P koje sadrže GGT i koje su razdvojene na osnovu molekulske mase, uočeno je da postoji preklapanje distribucije 120 kDa proteinske i Con A-reaktivne trake. Što se tiče distribucije drugih Con A-reaktivnih glikana (*smear*ed traka ekstremno velike molekulske mase), oni su pretežno detektovani u rasponu molekulskih masa b-GGT i m-GGT, ali ne i s-GGT gde su uočeni Con A-reaktivni glikani manjih molekulskih masa. Poznato je da je ponašanje GGT tokom elektroforetskog razdvajanja nestandardno jer molekul ispoljava rezistenciju na SDS, a profil karakteriše prisustvo oligomera lakih subjedinica, teških subjedinica ili mešovitih oligomera (155). Pored toga, postoji širok opseg detektovanih molekulskih masa (zbog razlika u glikozilaciji), što sve utiče na tumačenje dobijenih rezultata. U poređenju sa molekulskim obrascem koji sadrži b-GGT na membrani EV, molekulski obrasci solubilnih molekulskih formi GGT su bili uočljivo različiti u odnosu na prisustvo Con A-reaktivnih glikana (u odnosu na njihove molekulske mase i brojnost), kao i WGA-reaktivnih glikana (u odnosu na brojnost). Pored toga, analiza glikanske kompozicije molekulskih obrazaca koji sadrže solubilni GGT je pokazala da su WGA-reaktivni glikani (*smear*ed traka ekstremno velike molekulske mase) dominantni u odnosu na molekulski obrazac b-GGT na EV. Elektroforetsko razdvajanje (izgled i molekulska masa) WGA-reaktivnih glikana govore u prilog tome da bi oni mogli poticati od mucina, za koje je poznato da imaju karakterističan profil u SP.

Postoji mogućnost da bi GGT mogla biti jedna od komponenata interaktoma mucina za koji je ranije pokazano da sadrži glutation (GSH) i enzime povezane sa GSH. Ova povezanost nije ispitivana, ali postoje indirektni podaci koji su dobijeni na EV iz amniotske tečnosti i koji su pokazali njihovu vezu sa mucinom 16, tj. CA125 antigenom (156). GGT igra ključnu ulogu u homeostazi glutationa (GSH), posredstvom razgradnje ekstracelularnog GSH, ali i pokretanjem metabolizma glutation S-konjugata kao proizvoda antioksidativnih procesa (157). Značaj postojanja pretpostavljenih kompleksa GGT-mucin nije još razrešen, s obzirom na to da interakcija glutation S-transferaze sa mucinima utiče na njihova reološka svojstva (158). Ova interakcija može imati modulatornu ulogu, u smislu inhibicije ili pojačavanja aktivnosti povezanih enzima. Do sada je predložena moguća upotreba odnosa CA19-9 prema ukupnom serumskom GGT za predviđanje recidiva i dugoročne prognoze pacijenata sa karcinomom glave pankreasa i holangiokarcinomom (159,160).

Na osnovu ispitivanja solubilnih formi GGT u odnosu na ko-distribuciju selektovanih ključnih komponenata molekulskog obrasca, definisani su njihovi referentni homologni/heterologni kompleksi. Dostupni literaturni podaci, dobijeni ispitivanjem otpornosti solubilnih GGT kompleksa na dejstvo različitih kombinacija proteolitičkih enzima i deterdženata, govore da postoji mogućnost postojanja GGT velike molekulske mase koja nije povezana sa membranom EV, već je rezultat uključivanja GGT u makromolekulske proteinske komplekse (161). Analiza solubilnog subproteoma SP, tako, pruža dodatni uvid u način na koji se GGT u SP angažuje u različitim molekulskim okruženjima koje omogućavaju specifične biološke aktivnosti.

5.2. Koncept glikobiohemijske karakterizacije

5.2.1. Molekulski obrazac i ključne komponente

Molekulski obrazac je deskriptivna kategorija odnosno pojam. Glavni kriterijum za njegovo definisanje i poređenje je reaktivnost (imuno-/lektinska-) određenog molekula a ne njegova koncentracija kao matematička veličina koja se može analizirati statističkim metodama. Vrednosti dobijenih analitičkih parametara se, tako, ne odnose na jedan specifični homogeni molekul ili entitet, već potiču od više entiteta (npr. lektinskoj reaktivnosti doprinose brojni Con A ili WGA reaktivni glikoproteini, a ne samo jedan). Pored toga, imunoreaktivnost ili enzimska aktivnost nisu direktno povezani sa koncentracijom određenih analita, već su pod značajnim uticajem sredine u kojoj su oni eksprimirani/lokalizovani (npr. dostupnost epitopa ili aktivnog mesta). Prema primenjenom konceptu, svaka promena molekulskog obrasca je biološki značajna jer površinsko svojstvo utiče na interakcije i funkcije bioaktivnih membranskih molekula.

GGT, kao ključna komponenta istraživnog molekulskog obrasca, analizirana je na nekoliko nivoa koji su obuhvatili različite komponente sa njom povezanih molekulskih aranžmana. U osnovi, distribucija i sastav ovih aranžmana zavise od strukture, transportera i/ili liganda (interagujući proteini) za svaki pojedinačni molekul koji ulazi u njegov sastav. Molekulski obrazac koji sadrži GGT, na ovaj način, objedinjuje molekule na osnovu zajedničkog biološkog puta (sekretorni aparat ćelije i povezani mehanizmi postranslacionih modifikacija). Ovo je suštinska razlika u odnosu na multimarkerske panele koje poznajemo i koji se, uobičajeno formiraju prema ciljevima određenog istraživanja i povezanosti različitih molekula u okviru određenog funkcionalnog ili sintetskog puta ciljnog molekula. Ovaj pristup do sada nije korišćen za karakterizaciju b-GGT kao ni za karakterizaciju GGT kao markera EV.

U ovom radu je ispitivana GGT iz kompleksnih subproteoma frakcionisanih iz SP (solubilni i EV). Kao kompozitni sekret tkiva muškog reproduktivnog trakta i pomoćnih polnih žlezda, SP je izuzetno složena i heterogena u pogledu sastava proteina (162). Primenom različitih metoda identifikovano je 923 proteina (jednodimenzionalna elektroforeza) ili 1487 proteina (proteomska analiza) u uzorcima SP fertilnih muškaraca (163,164). Ekstracelularni, odnosno sekretovani proteini čine približno 25% ukupne SP, dok glikokonjugati i slobodni oligosaharidi predstavljaju posebnu grupu sa izraženim razlikama u zastupljenosti i strukturnoj heterogenosti (163,165). Što se tiče glikoproteina, identifikovano je ukupno 720 mesta N-glikozilacije na 372 proteina SP (166). Pored toga, dostupni podaci o glikomu SP ukazuju na prisustvo visokomanoznih i biantenarnih /bisektnih, tri- i tetraantenarnih N-glikana, kao i jezgra 1- i jezgra 2- O-glikana. Generalno, njihova sijalinizacija i fukozilacija (posebno Luis antigeni krvnih grupa), značajno variraju među osobama (167).

Analitički problem koji nastaje kao posledica izrazite heterogenosti ciljnog biološkog materijala je prevaziđen korišćenjem pulova uzoraka. Time se poništava efekat individualnih varijacija u sastavu SP kao i uticaj heterogenosti EV u pogledu oblika, veličine i gustine. Sa druge strane, komponente molekulskih obrazaca su birane tako da predstavljaju konstitutivno prisutne membranske markere (TS kao integralni i Gal-3 kao periferni protein) i/ili glikane (Con A- i WGA-reaktivne glikane), čiji sastav odražava različite faze remodelovanja oligosaharidnih lanaca koji određuju njihov transport i lokalizaciju ka membrani ili ka citoplazmi. Pored toga, ovaj pristup se oslanjao na rezultate ranijih ispitivanja glikoma SP koji su pokazali da postoji prostorno razdvajanje određenih tipova glikana i različit ligandni kapacitet za endogene lektine (168).

Dostupni eksperimentalni podaci ukazuju na to da, pored zajedničkog glikanskog potpisa EV, postoje specifičnosti vezane ne samo za biogenezu već i za fiziologiju ćelija (89). Na ovaj način, glikani EV koji imaju ćelijsko poreklo, kao i oni koji potiču iz ekstracelularnog okruženja, čine

jedinstvene molekularne aranžmane. Površinski membranski glikani tako predstavljaju specifične determinante populacija različitih tipova EV, koje mogu biti osnov za njihovu diferencijaciju u biološkim tečnostima. Oni još uvek nisu pravilno prepoznati u istraživanjima EV, kako sa osnovnih tako i sa primenjenih aspekata.

Pored glikana, analizirane ključne komponente molekulskog obrasca: GGT, TS i Gal-3, na strukturnom nivou, ulaze u sastav brojnih i suštinski različitih molekulskih aranžmana, a međusobno se razlikuju po glikozilaciji, lokalizaciji, kao i tipovima interakcija koje ostvaraju. GGT ispoljava tkivno specifične obrasce glikozilacije, uslovljene različitim sadržajem sijalinske kiseline, manoze i galaktoze (24). S druge strane, glikozilacija ispitivanih TS se međusobno razlikuje. CD9 je glikozilovani proteolipid, CD63 je glikozilovani protein, a CD81 je neglikozilovani protein (169). TS, generalno, ulaze u sastav različitih makromolekularnih kompleksa na plazma membrani i pretpostavlja se da omogućavaju različite biološke funkcije. TS pripadaju familiji integralnih membranskih proteina i oni mogu biti uključeni u tri nivoa interakcije sa svojim molekulskim partnerima. Ove interakcije dovode do njihovog grupisanja u tzv. membranske domene obogaćene TS koji su rastvorljivi u deterdžentu i koji se jasno razlikuju od drugih vrsta molekulskih kompleksa višeg reda. Postojanje TS mreže na EV generalno nije proučavano, ali postoje podaci o tome da različiti deterdženti mogu različito uticati na specifične nivoe interakcija TS i drugih molekula (91,170).

Slično TS, galektini mogu regrutovati različite molekule u organizovane komplekse. Iako su solubilni proteini, galektini se lako mogu naći na membrani zbog interakcija sa membranskim glikanima (unakrsno povezivanje N-glikana), ili sa drugim proteinima ili lipidima (171). Ovo je karakteristično za Gal-3 koji, za razliku od drugih članova ove porodice lektina, ima odgovarajuće domene kojima ostvaruje različite interakcije koje nisu bazirane na vezivanju ugljenih hidrata (97). Gal-3 je multifunkcionalni protein koji povezuje kompleksne N-glikane (u obliku rešetke od galektina i glikoproteina) na površini ćelije, i na taj način utiče na multivalentne interakcije protein-protein/ugljeni hidrat (97).

Postojanje različitih površinskih molekulskih kompleksa na EV kao rezultata njihove lokalizacije na membrani može se sagledati na osnovu promene njihove distribucije nakon solubilizacije određenim deterdžentom (otkrivanje veza TS-primarni ligand, veze Gal-3-glikoprotein i sl.), ili osetljivosti na deterdžente (otkrivanje solubilnih kompleksa glikoproteina-glikolipida). Definisani analitički parametri koji su korišćeni u ovom radu omogućavaju da se sastav domena koji su osetljivi na deterdžent prati indirektno, a da se domeni koji su otporni na deterdžent sagledaju direktno sa stanovišta prisustva TS i Gal-3, a indirektno i preko Con A- i WGA-reaktivnih glikana.

Osim na b-GGT, koncept heterogenosti se može primeniti i na solubilne molekulske forme GGT, s tim da se one ne analiziraju u odnosu na membransku površinu kao kod b-GGT već u odnosu na solubilne komponente koje interaguju sa GGT. Značaj postojanja homolognih (autoagregati) i heterolognih kompleksa GGT (sa lipoproteinima, glikoproteinima, imunoglobulinima), koji se razlikuju po molekulskoj masi nije u potpunosti razjašnjen. Rezultati ranijih ispitivanja su pokazali da je f-GGT najzastupljenija u solubilnim frakcijama seruma zdravih osoba, zatim sledi s-GGT i najmanje zastupljene m-GGT i b-GGT (43). Povišena koncentracija GGT u serumu, koja je rezultat različitih patoloških procesa, povezana je sa promenama u udelu molekulskih formi GGT, posebno promenama odnosa b-GGT / s-GGT prema f-GGT (56,58,172). U ovom radu, frakcija SP koja se razdvaja nakon uklanjanja membranskih komponentata je bila izvor solubilnih GGT formi. Con A- i WGA-reaktivni glikani (kao i u slučaju EV) u frakcijama koje su razdvojene na osnovu molekulske mase (koja odgovara pojedinačnim GGT formama) su praćeni kao ključne komponente koje ulaze u sastav molekulskog obrasca. Ovaj izbor je bio zasnovan na podacima dobijenim na EV, tj. b-GGT i pretpostavkama da molekulske forme GGT manjih masa (ali većih od f-GGT) mogu, generalno, nastati progresivnom modifikacijom same b-GGT. Postojanje GGT u kompleksima ili u vidu makro

enzima u serumu i žuči je poznato, ali do sada nije opisano za SP. U ovom radu prvi put se uvodi koncept razmatranja m-GGT i s-GGT kao zasebnih molekulskih entiteta, ne samo na osnovu njihove ukupne aktivnosti, već i u odnosu na klasu molekula koji, sa ovim formama, prave specifične komplekse.

5.2.2. Metode i analitički parametri

Za ispitivanje prezentacije b-GGT u kontekstu membranskih glikana EV, u ovoj studiji korišćena je LAH, i ovo predstavlja novi metodološki pristup koji je po prvi put primenjen na prostazomima. Danas se za identifikaciju i prečišćavanje EV, uglavnom, koristi imunoafinitetni pristup baziran na dostupnim antitelima prema različitim markerima odnosno ćelijski-specifičnim proteinima EV (173). Za razliku od antitela, lektinima kao proteinima koji vezuju glikane nije posvećena pažnja koju zaslužuju i shodno tome su retko korišćeni u specifične svrhe. EV koje su razdvojene na osnovu reaktivnosti sa izabranim lektinima, analizirane su u smislu moguće promene u prisustvu površinskih membranskih markera kao i promena u izgledu, proteinskom profilu i raspodeli GGT aktivnosti. Ove promene mogu nastati kao posledica interakcije sa lektinom koja dovodi do uklanjanja dela perifernih glikana i Gal-3, tj. promene EV korone (izraženije kod nevezanih EV). Pored toga, one mogu biti rezultat separacije različitih populacija EV koje dele izgled i karakterističan proteinski potpis prostazoma (izraženije kod vezanih EV). Promene u specifičnoj aktivnosti GGT se, takođe, mogu dovesti u vezu sa izmenjenom koronom i/ili ultrastukturom EV (kod nevezanih i vezanih EV).

Rad sa glikanima zahteva eksperimentalne uslove pri kojima će se prevazilaziti problemi sa njihovom bazičnom heterogenošću u smislu optimalnog vezivanja za afinitetni hromatografski matriks. Bez obzira na ispitani izvor EV, na ovo vezivanje mogu uticati razni faktori kao što su: prostorna orijentacija, gustina i dostupnost različitih gliko-epitopa/ostataka na membrani (174). U ovom radu, Con A i WGA su bili izabrani za analizu, ali se izbor generalno može zasnivati na korišćenju bilo kojeg lektina, a konačna odluka zahteva prethodno ispitivanje površine EV koja je u pitanju. Con A i WGA, koji se razlikuju po svojoj specifičnosti prema ugljenim hidratima, obično se kombinuju kako bi se stekao uvid u prisustvo različitih tipova N-glikana (175).

Iako reaktivnost lektina, generalno, ukazuje na dostupnost strukturno odgovarajućih liganda na EV populacijama, dobijeni rezultati (vezivanje ili nevezivanje za afinitetni matriks) mogu biti posledica razlika u konformacionim zahtevima između ovih klasa lektina, kao i gustine liganda. Generalno, distribucija i/ili ko-distribucija pojedinačnih markera može odražavati razlike u njihovoj dostupnosti na površini različitih vezikula. EV, dakle, predstavljaju čestice na kojima strukturno povezani glikani mogu imati različite prezentacije zbog gustine i prirode njihovih nosača (176). LAH može uticati na integritet površinskih glikanskih struktura (177). Stoga, interpretacija rezultata dobijenih LAH zahteva oprez, posebno pri poređenju različitih uzoraka i njeni rezultati bi trebalo da se posmatraju u kontekstu drugih analitičkih metoda.

Za ispitivanje lokalizacije b-GGT na membranskim domenima EV, u ovoj studiji korišćena je solubilizacija u kombinaciji sa gel filtracijom. Na osnovu postojećih podataka, za ovaj rad je izabran deterdžent koji se, najčešće, koristi za ekstrakciju TS i GGT (178–180). EV su solubilizovane pomoću Tritona X-100 (TX-100), nejonskog deterdženta, koji narušava interakcije lipid-lipid i lipid-protein uz formiranje micela, pri čemu dolazi do prelaska membranskih komponenti u rastvorljivu fazu (181). Radna koncentracija je održavana iznad kritične micelarne koncentracije koja omogućava potpunu solubilizaciju membrana (182). U ovim eksperimentalnim uslovima, očekuje se da se TS lako solubilizuju zbog svoje molekulске mase (~ 250 aminokiselina), i da se raskinu interakcije TS-TS. TS, kao i Gal-3, s druge strane, ostaju vezani za svoje ligande budući da deterdžent ne utiče na interakcije tipa protein-protein i protein-ugljeni hidrat (183).

Membranski domeni otporni na deteržent su razdvojeni od solubilizovanog materijala metodom gel filtracije. U poređenju sa drugim metodama koje se mogu primeniti za ispitivanje svojstava samih membranskih domena i koje imaju bolje performanse u odnosu na heterogenost preparata (razdvajanje na gradijentu gustine), ovo je bazična metoda, čija dostupnost i jednostavnost izvođenja omogućavaju široku primenu u svakodnevnoj laboratorijskoj rutini. Pored toga, ne očekuje se da na rezultate dobijene u ovakvom eksperimentalnom dizajnu značajno utiču različiti postupci izolacije EV. Definisani analitički parametri koji su korišćeni u ovom radu omogućavaju da se sastav domena koji su osetljivi na deterdžent prati indirektno, a da se domeni koji su otporni na deterdžent sagledaju direktno sa stanovišta prisustva TS i Gal-3, a indirektno i preko Con A- i WGA-reaktivnih glikana. Do sada su membranski domeni otporni na deteržent, odnosno lipidni raftovi, uglavnom okarakterisani na osnovu ukupnog lipidnog sastava, sa posebnim osvrtom na zastupljenost holesterola i sfingolipida, kao i kroz analizu njihovog proteinskog sastava. U ovoj studiji, po prvi put opisano je prisustvo neholesterolskih sterola – intermedijera endogene sinteze holesterola (latosterola i dezmosterola), kao i fitosterola (β -sitosterola i stigmasterola), što može biti od značaja za bolje razumevanje organizacije membrane EV.

Analiza membranskih proteina je veoma zahtevna, zato što oni mogu pokazati nepravilno ponašanje u mnogim standardnim tehnikama (184,185). Pri tumačenju rezultata se mora uzeti u obzir mogućnost da neki proteini mogu agregirati uprkos kritičnoj micelarnoj koncentraciji, zbog njihove koncentracije, ili esencijalne strukture. Pored toga, značajno je imati na umu da proteini razdvojeni prema jedinstvenom izabranom parametru (npr. molekulska masa/naelektrisanje) mogu imati heterogeni sastav tj. biti skup kako proteina, tako i proteinskih kompleksa, lipida i deterdženata. Dakle, sama struktura ispitivanih ključnih membranskih komponenti molekulskog obrasca, kao i specifičnosti njihovog mikrokruženja na površini EV (u smislu prezentacije glikana), takođe mogu uticati na rezultate solubilizacije.

Za ispitivanje solubilnih molekulskih formi GGT u kontekstu njihovog prisustva u molekulskim kompleksima, u ovoj studiji je korišćena standardna metoda gel filtracije. Specifičnosti pristupa koji je ovde, po prvi put, korišćen se ogledaju u praćenju ko-elucije komponentata velike molekulske mase i njihove proteinske i glikoproteinske kompozicije. Ovo predstavlja osnov za uvid u u moguće razlike ili sličnosti u prostornoj raspodeli GGT i glikana koji imaju istu strukturu na EV u poređenju sa solubilnim komponentama, što direktno uslovljava i razlike u njihovoj prezentaciji tj. dostupnosti kao liganada.

5.3. Biomarkerski potencijal anotiranih molekulskih formi GGT

GGT je prisutna u SP čoveka u ekstremno visokoj koncentraciji (62). Što se tiče SP, poznato je da na njen sastav utiču intenzivni proteolitički procesi i da postoje različiti mehanizmi koji su odgovorni za razgradnju membrana koje sadrže GGT ili oslobađanje enzima iz membrane u ekstracelularni prostor. Štaviše, različita tkiva koja oblikuju sastav SP mogu lučiti strukturno različite solubilne forme GGT.

Originalni naučni doprinos ovoga rada se, pored definisanja referentnih parametara, može sagledati i u odnosu na biološki materijal (SP čoveka), koji je po prvi put korišćen za ispitivanje heterogenosti GGT, kao i na izvor (normospermčni i oligospermčni uzorci SP) ovog materijala. Proteom ukupne SP kao i subproteom EV se menja u različitim fiziološkim i patološkim stanjima (186). U ovom radu su analizirani uzorci normospermčnih i oligospermčnih uzoraka SP kao izvora b-GGT i EV. Poznato je da je povišena serumska koncentracija GGT u različitim patofiziološkim stanjima povezana sa promenama u zastupljenosti njenih molekulskih formi (172). U tom smislu može se postaviti pitanje da li se takve promene dešavaju kada je koncentracija GGT smanjena, kao u uslovima niskog broja spermatozoida (oligospermija), kao i da li su one povezane sa specifičnim molekularnim aranžmanima. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na kvalitativni aspekt

promena molekulskih formi GGT u uslovima oligospermije, ali potrebna su dalja ispitivanja molekulskih aranžmana u kojima se nalazi GGT, za evaluaciju primarno uočenih razlika. Oligospermija je medicinsko stanje koje je rezultat različitih patoloških procesa koji zahvataju testise ili muški reproduktivni trakt, uključujući poremećaje spermatogeneze, hormonsku disfunkciju, varikokelu, infekcije i inflamatorne procese, genetske abnormalnosti, kao i izloženost faktorima životne sredine (187). Ovi procesi mogu biti povezani sa povećanim oksidativnim stresom, izmenjenim imunskim odgovorom, poremećajem energetskog metabolizma (mitohondrijalnom disfunkcijom) (188,189). Komparativna analiza normospermičnih i oligospermičnih uzoraka SP je po prvi put opisala prezentaciju i distribuciju molekulskih formi GGT, koje mogu usmeriti njenu moguću upotrebu kao potencijalnog biomarkera na nov način, a indirektno bi mogla biti od značaja za razumevanje njene multifunkcionalnosti u reprodukciji.

Pristup koji je primenjen u ovom radu, omogućio je da se dobije uvid u diskretne razlike u odnosu na membransku kompoziciju EV-N i EV-O populacija koje direktno definišu glikobiohemijsku heterogenost molekulskih obrazaca koji sadrže b-GGT. Ovo predstavlja nov način da se strukturna svojstva GGT (ili drugog molekula od interesa) uzmu u obzir kada se dizajniraju novi analitički protokoli u oblasti biomarkera.

Utvrđene razlike u molekulskim obrascima koji sadrže GGT kod normospermičnih i oligospermičnih uzoraka SP mogu predstavljati polaznu osnovu za primenu ovog analita kao potencijalnog biomarkera patofizioloških procesa koji dovode do smanjenja reproduktivnog potencijala. Da bi se postigao ovaj cilj, trebalo bi da se koristi kombinovana detekcija različitih karakteristika molekula koji međusobno reaguju, ili klase molekula koje dominiraju u odabranom proteomu. U tom smislu, očuvanje biološke aktivnosti tokom imobilizacije/afinitetnog vezivanja i finalne detekcije predstavlja glavni tehnički izazov u dizajniranju odgovarajućeg esaja.

Kao odgovor na potrebu za uvođenjem dodatnih testova koji bi dopunili određivanje aktivnosti ili koncentracije različitih analita, u ovom radu je detaljno razmatrana široka dinamička distribucija GGT molekula zasnovana na njegovoj hemijskoj raznolikosti. Generalno, f-GGT se može izdvojiti, u jednom koraku, ultracentrifugiranjem (45). Što se tiče seruma čoveka kao analita, smanjenje broja mikrovezikula i izolacija malih EV (ekvivalent izolatu EV iz SP) ili solubilnih kompleksa iste veličine /molekulske mase, čini ovako pripremljen uzorak pogodnijim za praćenje specifičnih promena GGT. Separacija/frakcionisanje b-GGT (na membrani EV) je poželjnije kada se razmatra primena (tečna biopsija) u kliničkoj dijagnostici. Štaviše, ovo je neophodno kada se molekulski obrasci koji sadrže GGT razmatraju kao dodatni parametar za diferencijaciju njenih formi različite molekulske mase.

U osnovi, distribucija i sastav molekulskih obrazaca, u odnosu na određeni molekul koji ulazi u njegov sastav može biti posledica njegove strukture, molekula relevantnih za njegov transport ili njegovih liganda tj. intereagujućih molekula. Na ovaj način, rekognitivna svojstva heterogenog analita kao što je GGT predstavljaju nove molekulske determinante koje se mogu analizirati u kontekstu nativnog proteoma i koje bi trebalo uzeti u obzir kad se razmatraju promene aktivnosti enzima u različitim patofiziološkim stanjima.

6. Zaključci

1. U EV frakciji izolovanoj iz normospermičnih i oligospermičnih uzoraka SP detektovana je b-GGT.
2. U sol-P-N i sol-P-O frakciji SP detektovane su, pretežno, s-GGT i f-GGT forma.
3. Molekulski obrazac koji sadrži b-GGT se razlikuje između nativnih EV-N i EV-O populacija u kontekstu prezentacije WGA-reaktivnih membranskih glikana.
4. Molekulski obrazac koji sadrži b-GGT se ne razlikuje između EV-N i EV-O populacija u kontekstu prezentacije Con A-reaktivnih membranskih glikana.
5. Molekulski obrazac koji sadrži b-GGT na membranskim domenima otpornim na dejstvo deterdženta se razlikuje između EV-N i EV-O u kontekstu distribucije EV markera: CD9 i galektina-3.
6. Molekulski obrazac koji sadrži b-GGT se ne razlikuje između EV-N i EV-O u kontekstu distribucije CD63 na membranskim domenima koji su otporni na dejstvo deterdženta, kao i na membranskim domenima koji su osetljivi na dejstvo deterdženta.
7. Molekulski obrazac koji sadrži s-GGT se ne razlikuje između sol P-N i sol P-O u kontekstu ko-distribucije ukupnih proteina kao i WGA- i Con A-reaktivnih glikoproteina.
8. Na osnovu glikobiohemijske karakterizacije molekulskih obrazaca koji sadrže GGT definisani su referentni parametri: glikanski potpis, solubilizacioni potpis i homologni/ heterologni kompleks, koji se mogu koristiti za anotaciju GGT formi velike molekulske mase.
9. Uočene razlike u anotiranoj b-GGT formi između EV-N i EV-O bi mogle imati biomarkerski potencijal, koji zahteva dalje ispitivanje i potvrdu u fazama validacije i standardizacije.
10. Dobijeni rezultati su upotpunili osnovna znanja o heterogenosti molekula GGT i ukazali da se on može razmatrati ne samo kao individualni, već i kompozitni biomarker.

7. Literatura

1. Hanes CS, Hird FJR, Isherwood F. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione. *Nature*. 1950;166:288–92.
2. Hanes C, Hird F, Isherwood F. Enzymic transpeptidation reactions involving γ -glutamyl peptides and α -amino-acyl peptides. *Biochem J*. 1952;51(1):25–35.
3. Tate SS, Meister A. Stimulation of the hydrolytic activity and decrease of the transpeptidase activity of γ -glutamyl transpeptidase by maleate; Identity of a rat kidney maleate-stimulated glutaminase and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(9):3329–33.
4. Tate SS, Meister A. Identity of maleate stimulated glutaminase with γ glutamyl transpeptidase in rat kidney. *J Biol Chem*. 1975;250(12):4619–27.
5. Webb EC, editor. *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. San Diego: Academic Press; 1992.
6. Linhorst A, Lübke T. The human Ntn-hydrolase superfamily: structure, functions and perspectives. *Cells*. 2022;11:1592.
7. Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res*. 2014;122:103–41.
8. Brennan PN, Dillon JF, Tapper EB. Gamma-glutamyl transferase (γ -GT) – An old dog with new tricks? *Liver Int*. 2022;42(1):9–15.
9. Angeli V, Tacito A, Paolicchi A, Barsacchi R, Franzini M, Baldassini R, et al. A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Arch Biochem Biophys*. 2009;481(2):191–6.
10. Verma VV, Gupta R, Goel M. Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Biol Direct*. 2015;10(1):49.
11. Mitrić A, Castellano I. Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: A pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2023;208:672–83.
12. Keillor JW, Castonguay R, Lherbet C. Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Methods Enzymol*. 2005;401:449–67.
13. Corti A, Belcastro E, Dominici S, Maellaro E, Pompella A. The dark side of gamma-glutamyltransferase (GGT): Pathogenic effects of an ‘antioxidant’ enzyme. *Free Radic Biol Med*. 2020;160:807–19.
14. Wang F, Yang J, Zhu F, Xu X, Zhao J, Xie X, et al. From gene to enzyme: multidimensional decoding of the GGT molecular family and its clinical tumor diagnosis. *Cancer Med*. 2025;14(23):e71165.
15. Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, Sneddon T. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet*. 2008;123(4):321–32.
16. Hanigan MH, Gillies EM, Wickham S, Wakeham N, Wirsig-Wiechmann CR. Immunolabeling of gamma-glutamyl transferase 5 in normal human tissues reveals that expression and localization differ from gamma-glutamyl transferase 1. *Histochem Cell Biol*. 2015;143(5):505–15.
17. Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Rajagopalan S, et al. γ -Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol*. 1995;147(5):1175–85.
18. GeneCards: The human Gene Database. GGT1 gene [Internet]. LifeMap Sciences, Inc. [cited 2026 Mar 12]. Available from: <https://www.genecards.org/card/GGT1>
19. Darin N, Leckström K, Sikora P, Lindgren J, Almén G, Asin-Cayuela J. γ -glutamyl transpeptidase deficiency caused by a large homozygous intragenic deletion in GGT1. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(6):808–17.
20. Brand H, Diergaarde B, O’Connell MR, Whitcomb DC, Brand RE. Variation in the γ -

- glutamyltransferase 1 gene and risk of chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2013 Jul;42(5):836–40.
21. Sciskalska M, Ołdakowska M, Marek G, Milnerowicz H. Increased risk of acute pancreatitis occurrence in smokers with rs5751901 polymorphisms in *ggt1* gene. *Int J Med Sci*. 2020;17(2):242–54.
22. Terzyan SS, Burgett AWG, Heroux A, Smith CA, Mooers BHM, Hanigan MH. Human γ -glutamyl transpeptidase 1: Structures of the free enzyme, inhibitor-bound tetrahedral transition states, and glutamate-bound enzyme reveal novel movement within the active site during catalysis. *J Biol Chem*. 2015;290(28):17576–86.
23. West MB, Wickham S, Quinalty LM, Pavlovicz RE, Li C, Hanigan MH. Autocatalytic cleavage of human γ -glutamyl transpeptidase is highly dependent on N-glycosylation at asparagine 95. *J Biol Chem*. 2011;286:28876–88.
24. West MB, Segu ZM, Feasley CL, Kang P, Klouckova I, Li C, et al. Analysis of site-specific glycosylation of renal and hepatic γ -glutamyl transpeptidase from normal human tissue. *J Biol Chem*. 2010;285(38):29511–24.
25. West MB, Chen Y, Wickham S, Heroux A, Cahill K, Hanigan MH, et al. Novel insights into eukaryotic γ -glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme. *J Biol Chem*. 2013;288(44):31902–13.
26. The UniProt Consortium. UniProtKB-P19440 (GGT1_HUMAN): Gamma-glutamyltransferase 1 [Internet]. National Institutes of Health. [cited 2026 Mar 16]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P19440/entry>
27. Balakrishna S, Prabhune AA. Gamma-glutamyl transferases: A structural, mechanistic and physiological perspective. *Front Biol (Beijing)*. 2014;9(1):51–65.
28. Castellano I, Merlino A. γ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(20):3381–94.
29. Terzyan SS, Nguyen LT, Burgett AWG, Heroux A, Smith CA, You Y, et al. Crystal structures of glutathione-and inhibitor-bound human GGT1: Critical interactions within the cysteinylglycine binding site. *J Biol Chem*. 2021;296:100066.
30. Shaw LM, London JW, Petersen LE. Isolation of γ -glutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney. *Clin Chem*. 1978;24(6):905–15.
31. Shaw LM, Petersen-Archer L, London JW, Marsh E. Electrophoretic, kinetic, and immunoinhibition properties of γ -glutamyltransferase from various tissues compared. *Clin Chem*. 1980;26:473–80.
32. Huseby NE. Separation and characterization of human γ -glutamyltransferases. *Clin Chim Acta*. 1981;111:39–45.
33. Xu K, Meng X, Shi Y, Ge Z, Ye L, Yu Z, et al. The diagnostic value of a hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase. *Int J Cancer*. 1985;36(6):667–9.
34. Das ND, Shichi H. Tissue difference in gamma-glutamyl transpeptidase attributed to sialic acid content. *Life Sci*. 1979;25:1821–8.
35. Sener A, Yardimci T. Lectin affinity chromatography and electrophoretic properties of human Platelet gamma-glutamyl transferase. *Platelets*. 2000;11(6):325–30.
36. West MB, Partyka K, Feasley CL, Maupin KA, Goppallawa I, West CM, et al. Detection of distinct glycosylation patterns on human γ -glutamyl transpeptidase 1 using antibody-lectin sandwich array (ALSA) technology. *BMC Biotechnol*. 2014;14:101.
37. Arai K, Sumi SH, Yoshida K ichiro, Komoda T. A precursor form of human kidney γ -glutamyl transferase in normal and cancerous tissues, and its possible post-translational modification. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1995;1253(1):33–8.
38. Yamashita K, Totani K, Iwaki Y, Takamisawa I, Tateishi N, Higashi T, et al. Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidases purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. *J Biochem*. 1989;105(5):728–35.
39. Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, Mathisen Ø, Bremnes R, Wellman M, et al. Heterogeneity in γ -glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells. *Biochim*

- Biophys Acta Proteins Proteomics. 2003;1648(1–2):210–8.
40. Huseby NE. Multiple forms of γ -glutamyltransferase in normal human liver, bile and serum. *Biochim Biophys Acta*. 1978;522:354–62.
 41. Selvaraj P, Rolston DDK, Balasubramanian KA. Separation of hydrophobic and hydrophilic forms of γ -glutamyltransferase from human serum by hydrophobic chromatography on phenyl-Sepharose CL-4B: studies on normal sera and sera of patients with liver disease. *Clin Chim Acta*. 1984;138:141–9.
 42. Huseby NE. Hydrophilic form of γ -glutamyltransferase: proteolytic formation in liver homogenates and its estimation in serum. *Clin Chim Acta*. 1982;124:113–21.
 43. Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, Ghiri E, Scatena F, Barsacchi R, et al. A high performance gel filtration chromatography method for γ -glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem*. 2008;374:1–6.
 44. Huseby NE. Multiple forms of serum γ -glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 1982;124:103–12.
 45. Fornaciari I, Fierabracci V, Corti A, Elawadi HA, Lorenzini E, Emdin M, et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: Characteristic and biogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e88532.
 46. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001;38:263–355.
 47. Elawdi HA, Franzini M, Paolicchi A, Emdin M, Fornaciari I, Fierabracci V, et al. Circulating gamma-glutamyltransferase fractions in cirrhosis. *Liver Int*. 2014;34:e191-9.
 48. Rosalki SB, Rau D. Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. *Clin Chim Acta*. 1972;39:41–7.
 49. Spencer-Peet J, Wood D, Glatt M. Screening test for alcoholism. *Lancet*. 1973;2:1089–90.
 50. Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AET, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):953–61.
 51. Lonardo A, Ndrepepa G. Concise review: gamma-glutamyl transferase-evolution from an indiscriminate liver test to a biomarker of cardiometabolic risk. *Metab Target Organ Damage*. 2022;2(4):17.
 52. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res*. 2004;38(6):535–9.
 53. Lee DS, Evans JC, Robins SJ, Wilson PW, Albano I, Fox CS, et al. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: The Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):127–33.
 54. Haghighi S, Amini M, Pournaghshband Z, Amini P, Hovsepian S. Relationship between gamma-glutamyl transferase and glucose intolerance in first degree relatives of type 2 diabetics patients. *J Res Med Sci*. 2011;16(2):123–9.
 55. Turgut O, Tandogan I. Gamma-glutamyltransferase to determine cardiovascular risk: shifting the paradigm forward. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18:177–81.
 56. Franzini M, Ottaviano V, Fierabracci V, Bramanti E, Zyw L, Barsacchi R, et al. Fractions of plasma gamma-glutamyltransferase in healthy individuals: reference values. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1–2):188–9.
 57. Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V, Elawadi HA, Bolognesi V, Maltinti S, et al. Accuracy of b-GGT fraction for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver. *Liver Int*. 2012;32:629–34.
 58. Franzini M, Fornaciari I, Vico T, Moncini M, Cellesi V, Meini M, et al. High-sensitivity gamma-glutamyltransferase fraction pattern in alcohol addicts and abstainers. *Drug Alcohol Depend*. 2013;127:239–42.
 59. Franzini M, Paolicchi A, Fornaciari I, Ottaviano V, Fierabracci V, Maltinti M, et al. Cardiovascular risk factors and γ -glutamyltransferase fractions in healthy individuals. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(5):713–7.
 60. Pucci A, Franzini M, Matteucci M, Ceragioli S, Marconi M, Ferrari M, et al. b-Gamma-glutamyltransferase activity in human vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*.

- 2014;237(1):307–13.
61. Krishnaswamy PR, Tate SS, Meister A. γ -glutamyl transpeptidase of human seminal fluid. *Life Sci.* 1977;20:681–6.
62. Verhoeven G, Steeno O. Evidence for the prostatic origin of gamma-glutamyltransferase activity in human semen. *Andrologia.* 1979;11(2):163–9.
63. Uchijima Y, Yoshida K, Hiraga S. Studies on gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GTP) in seminal plasma. *Hinyokika Kiyo.* 1986;32(4):553–9.
64. Lilja H, Weiber H. γ -glutamyltransferase bound to prostatic subcellular organelles and in free form in human seminal plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 1983;43:307–12.
65. Beer R, Weisselberg M, Soffer Y, Lewin LM. Human seminal fluid gamma-glutamyl transferase: a prostatic marker enzyme. *Int J Androl.* 1978;1(1–6):405–10.
66. Awadallah S, Salem N, Saleh S, Mubarak M, Elkarmi A. Zinc, magnesium and gamma glutamyltransferase levels in human seminal fluid. *Bahrain Med Bull.* 2003;25(3):1–8.
67. Djordjevic D, Lalic N, Vukovic I, Nale D, Perovic D, Kisic DT, et al. Sperm quality and seminal biochemical parameters in infertile men with and without leukocytospermia. *Andrology.* 2018;7(2):197.
68. Arai K, Yoshida KI, Komoda T, Sakagishi Y. Comparative studies on the properties of purified gamma-glutamyl transferase from human reproductive system and the kidney. *Clin Biochem.* 1990;23(2):105–12.
69. Castle JD, Cameron RS, Patterson PL, Ma AK. Identification of high molecular weight antigens structurally related to gamma-glutamyl transferase in epithelial tissues. *J Membr Biol.* 1985;87(1):13–26.
70. Delanghe J, Comhaire F, de Buyzere M, Vermeulen L. Altered glycosylation of γ -glutamyltranspeptidase (GGT) in seminal fluid from men with accessory gland infection. *Int J Androl.* 1985;8(3):186–92.
71. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200:373–83.
72. Couch Y, Buzàs EI, Vizio D Di, Ghossein YS, Harrison P, Hill AF, et al. A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(14):e12144.
73. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43–51.
74. Fazeli A, Godakumara K. The evolving roles of extracellular vesicles in embryo-maternal communication. *Commun Biol.* 2024;7(1):754.
75. Wang Z, Zhou X, Kong Q, He H, Sun J, Qiu W, et al. Extracellular vesicle preparation and analysis: A state-of-the-art review. *Adv Sci.* 2024;11(30):2401069.
76. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7:1535750.
77. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2667–88.
78. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;9:19.
79. Van Niel G, D’angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:213–28.
80. Clancy JW, Schmidtman M, D’Souza-Schorey C. The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances.* 2021;3(6):399–406.
81. Li M, Liao L, Tian W. Extracellular vesicles derived from apoptotic cells: an essential link between death and regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:573511.
82. Welsh JA, Goberdhan DCI, O’Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced

- approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024;13(2):e12404.
83. Esmaeili A, Baghaban Eslaminejad M, Hosseini S. Biomolecular corona potential in extracellular vesicle engineering for therapeutic applications. *Biomed Pharmacother*. 2025;188:118202.
 84. Skotland T, Llorente A, Sandvig K. Lipids in extracellular vesicles: what can be learned about membrane structure and function? *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2023;15(8):a041415.
 85. Sapon K, Manka R, Janas T, Janas T. The role of lipid rafts in vesicle formation. *J Cell Sci*. 2023;136(9):jcs260887.
 86. Lischnig A, Bergqvist M, Ochiya T, Lässer C. Quantitative proteomics identifies proteins enriched in large and small extracellular vesicles. *Mol Cell Proteomics*. 2022;21(9):100273.
 87. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014;5:442.
 88. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255–89.
 89. Williams C, Royo F, Aizpurua-Olaizola O, Pazos R, Boons G-J, Reichardt N-C, et al. Glycosylation of extracellular vesicles: current knowledge, tools and clinical perspectives. *J Extracell Vesicles*. 2018;7:1442985.
 90. Macedo-da-Silva J, Santiago V, Rosa-Fernandes L, Marinho C, Palmisano G. Protein glycosylation in extracellular vesicles: Structural characterization and biological functions. *Mol Immunol*. 2021;135:226–46.
 91. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127:3641–8.
 92. Duke LC, Cone AS, Sun L, Dittmer DP, Meckes DG, Tomko RJ. Tetraspanin CD9 alters cellular trafficking and endocytosis of tetraspanin CD63, affecting CD63 packaging into small extracellular vesicles. *J Biol Chem*. 2025;301(3):108255.
 93. Umeda R, Satouh Y, Takemoto M, Nakada-Nakura Y, Liu K, Yokoyama T, et al. Structural insights into tetraspanin CD9 function. *Nat Commun*. 2020;11(1):1606.
 94. Hallal S, Túzesi Á, Grau GE, Buckland ME, Alexander KL. Understanding the extracellular vesicle surface for clinical molecular biology. *J Extracell Vesicles*. 2022;11(10):e12260.
 95. Fabiani R, Ronquist G. Association of some hydrolytic enzymes with the prostasome membrane and their differential responses to detergent and PIPLC treatment. *Prostate*. 1995;27(2):95–101.
 96. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*. 2002;19(7–9):527–35.
 97. Dumić J, Dabelić S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(4):616–35.
 98. Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci*. 1997;110:1169–78.
 99. Delacour D, Greb C, Koch A, Salomonsson E, Leffler H, Le Bivic A, et al. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic*. 2007;8(4):379–88.
 100. Krishnamoorthy L, Bess JW, Preston AB, Nagashima K, Mahal LK. HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol*. 2009;5:244–50.
 101. Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, Hendricks-Muñoz KD, Mahal LK. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res*. 2011;10:4624–33.
 102. Williams C, Pazos R, Royo F, González E, Roura-Ferrer M, Martínez A, et al. Assessing the role of surface glycans of extracellular vesicles on cellular uptake. *Sci Rep*. 2019;9:11920.
 103. Gabius H-J, Cudic M, Diercks T, Kaltner H, Kopitz J, Mayo KH, et al. What is the sugar code? *ChemBioChem*. 2022;23:e202100327.
 104. Freitas D, Balmaña M, Poças J, Campos D, Osório H, Konstantinidi A, et al. Different isolation approaches lead to diverse glycosylated extracellular vesicle populations. *J*

- Extracell Vesicles. 2019;8:1621131.
105. Mir B, Goettsch C. Extracellular vesicles as delivery vehicles of specific cellular cargo. *Cells*. 2020;9(7):1601.
 106. Chen Y, Zhao Y, Yin Y, Jia X, Mao L. Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles. *Bioengineered*. 2021;12(1):8186–201.
 107. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol*. 2016;428:688–92.
 108. Ju J, Neuen SML, Zandvoort M van, Keulers TGH, Rouschop KMA. Extracellular vesicles: cargo loading, degradation and secretory pathways, and their intersection with autophagy. *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids*. 2025;6(3):355–80.
 109. Anand S, Samuel M, Kumar S, Mathivanan S. Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2019;1867(12):140203.
 110. Mazurov D, Barbashova L, Filatov A. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS J*. 2013;280(5):1200–13.
 111. Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:144.
 112. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer*. 2022;21(1):79.
 113. Yuana Y, Böing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, et al. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:29260.
 114. Valencia K, Montuenga LM. Exosomes in liquid biopsy: The nanometric world in the pursuit of precision oncology. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2147.
 115. Zhang J, Wu J, Wang G, He L, Zheng Z, Wu M, et al. Challenges and opportunities for extracellular vesicles in clinical oncology therapy. *Bioengineering*. 2023;10(3):325.
 116. Rai A, Fang H, Fatmous M, Claridge B, Poh QH, Simpson RJ, et al. A protocol for isolation, purification, characterization, and functional dissection of exosomes. *Methods Mol Biol*. 2021;2261:105–49.
 117. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov A V, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8545347.
 118. Kosanović M, Janković M. Isolation of urinary extracellular vesicles from Tamm-Horsfall protein-depleted urine and their application in the development of a lectin-exosome-binding assay. *Biotechniques*. 2014;57:143–9.
 119. Kosanović M, Milutinović B, Goč S, Mitić N, Janković M. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. *Biotechniques*. 2017;63:65–71.
 120. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301–12.
 121. Tenchov R, Sasso JM, Wang X, Liaw WS, Chen CA, Zhou QA. Exosomes nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano*. 2022;16:17802–46.
 122. Li M, Zou X, Xia T, Wang T, Liu P, Zhou X, et al. A five-miRNA panel in plasma was identified for breast cancer diagnosis. *Cancer Med*. 2019;8:7006–17.
 123. Wang X, Jiang X, Li J, Wang J, Binang H, Shi S, et al. Serum exosomal miR-1269a serves as a diagnostic marker and plays an oncogenic role in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2020;11:3436–47.
 124. Amintas S, Vendrely V, Dupin C, Buscail L, Laurent C, Bournet B, et al. Next-generation cancer biomarkers: Extracellular vesicle DNA as a circulating surrogate of tumor DNA. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8:622048.
 125. Andre M, Caobi A, Miles JS, Vashist A, Ruiz MA, Raymond AD. Diagnostic potential of exosomal extracellular vesicles in oncology. *BMC Cancer*. 2024;24(1):322.
 126. Zhou E, Li Y, Wu F, Guo M, Xu J, Wang S, et al. Circulating extracellular vesicles are

- effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. *EBioMedicine*. 2021;67:103365.
127. Salomon C, Lai A, Guanzon D, Sharma S, Scholz-Romero K, Razo M, et al. Early detection of ovarian cancer: An accurate high-throughput extracellular vesicle test. *J Clin Oncol*. 2025;43(16 Suppl):5582.
 128. Yasui T, Paisrisarn P, Yanagida T, Konakade Y, Nakamura Y, Nagashima K, et al. Molecular profiling of extracellular vesicles via charge-based capture using oxide nanowire microfluidics. *Biosens Bioelectron*. 2021;194:113589.
 129. von Lersner AK, Fernandes F, Ozawa PMM, Jackson M, Masureel M, Ho H, et al. Multiparametric single-vesicle flow cytometry resolves extracellular vesicle heterogeneity and reveals selective regulation of biogenesis and cargo distribution. *ACS Nano*. 2024;18(15):10464–84.
 130. Su Y, He W, Zheng L, Fan X, Hu TY. Toward clarity in single extracellular vesicle research: defining the field and correcting missteps. *ACS Nano*. 2025;19(17):16193–203.
 131. Zhang J, Wu J, Wang G, He L, Zheng Z, Wu M, et al. Extracellular vesicles: techniques and biomedical applications related to single vesicle analysis. *ACS Nano*. 2023;17(18):17668–98.
 132. Top 10 emerging technology of 2026 [Internet]. World Economic Forum. [cited 2026 Jul 15]. Available from: <https://www.weforum.org/stories/2026/06/the-top-10-emerging-technologies-of-2026/>
 133. Sahlén G, Nilsson O, Larsson A, Carlsson L, Norlén BJ, Ronquist G. Secretions from seminal vesicles lack characteristic markers for prostasomes. *Ups J Med Sci*. 2010;115:107–12.
 134. Aalberts M, Stout TAE, Stoorvogel W. Prostasomes: Extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*. 2014;147:1–14.
 135. Ronquist G, Hedström M. Restoration of detergent-inactivated adenosine triphosphatase activity of human prostatic fluid with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta*. 1977;483:483–6.
 136. Aalberts M, van Dissel-Emiliani FMF, van Adrichem NPH, van Wijnen M, Wauben MHM, Stout TAE, et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod*. 2012;86(3):82.
 137. Keber R, Rozman D, Horvat S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. *J Lipid Res*. 2013;54(1):20–33.
 138. Brown AJ, Ikonen E, Olkkonen VM. Cholesterol precursors: More than mere markers of biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(2):133–9.
 139. De Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem*. 2003;14(7):362–9.
 140. Gongye X, Xia P, Ma T, Chai Y, Chen Z, Zhu Y, et al. Liver extracellular vesicles and particles enriched β -sitosterol effectively promote liver regeneration in mice. *Int J Nanomedicine*. 2024;19:8117–37.
 141. Carlsson L, Nilsson O, Larsson A, Stridsberg M, Sahlén G, Ronquist G. Characteristics of human prostasomes isolated from three different sources. *Prostate*. 2003;54:322–30.
 142. Ronquist G. Prostasomes are mediators of intercellular communication: from basic research to clinical implications. *J Intern Med*. 2012;271:400–13.
 143. Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. Prostasomes - Their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):283–92.
 144. Ronquist G, Nilsson B. The Janus-faced nature of prostasomes: their pluripotency favours the normal reproductive process and malignant prostate growth. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2004;7:21–31.
 145. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva; 2021.
 146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
147. Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Arsenijevic J, et al. Preanalytical and analytical challenges in gas chromatographic determination of cholesterol synthesis and absorption markers. *Clin Chim Acta*. 2018;478:74–81.
 148. Davidson DF, Watson DJM. Macroenzyme detection by polyethylene glycol precipitation. *Ann Clin Biochem*. 2003;40(5):514–20.
 149. Detchokul S, Williams ED, Parker MW, Frauman AG. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5462–90.
 150. Grove J, Hu K, Farquhar MJ, Goodall M, Walker L, Jamshad M, et al. A new panel of epitope mapped monoclonal antibodies recognising the prototypical tetraspanin CD81. *Wellcome Open Res*. 2017;2:82.
 151. Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JWA, van Niel G, Wauben MH, Stout TAE, et al. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics*. 2013;13:1660–6.
 152. Rubinstein E, Théry C, Zimmermann P. Tetraspanins affect membrane structures and the trafficking of molecular partners: what impact on extracellular vesicles? *Biochem Soc Trans*. 2025;53(2):371–82.
 153. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*. 2001;155(7):1103–7.
 154. Kummer D, Steinbacher T, Schwietzer MF, Thölmann S, Ebnet K. Tetraspanins: integrating cell surface receptors to functional microdomains in homeostasis and disease. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(4):397–405.
 155. Abe S, Kochi H, Hiraiwa K. Purification and immunological characterization of a new form of γ -glutamyltransferase of human semen. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1077(3):259–64.
 156. Mitić N, Kosanović M, Milutinović B, Goč S, Mladenović D, Grubiša I, et al. Nano-sized CA125 antigen glycoconjugate: Mucin - extracellular vesicles alliance to watch? *Arch Biochem Biophys*. 2018;653:113–20.
 157. Nichols TC, Guthridge JM, Karp DR, Molina H, Fletcher DR, Holers VM. γ -glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur J Immunol*. 1998;28:4123–9.
 158. Radicioni G, Cao R, Carpenter J, Ford AA, Wang TT, Li Y, et al. The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1442–54.
 159. Lyu S, Wang J, Huang M, Wang H, Zhou L, He Q, et al. CA19-9 level to serum γ -glutamyltransferase as a potential prognostic biomarker in patients with pancreatic head carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2021;13:4887–98.
 160. Wang F, Lyu S, Cao D, Ren Z, Zhao X, Li L, et al. Correlation between preoperative CA19-9/GGT ratio and postoperative long-term survival of distal cholangiocarcinoma. *Chin J Hepatobiliary Surg*. 2021;27(10):762–6.
 161. Remaley A, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*. 1989;35(12):2261–70.
 162. Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A. The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16:41.
 163. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*. 2006;7(5):R40.
 164. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messina I, Pontecorvi A, De Marinis L, et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril*. 2012;97(1):67–73.e1.
 165. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J Androl*. 2007;28(6):858–65.
 166. Yang X, Liu F, Yan Y, Zhou T, Guo Y, Sun G, et al. Proteomic analysis of N-glycosylation of human seminal plasma. *Proteomics*. 2015;15(7):1255–8.

167. Pang PC, Tissot B, Drobnis EZ, Morris HR, Dell A, Clark GF. Analysis of the human seminal plasma glycome reveals the presence of immunomodulatory carbohydrate functional groups. *J Proteome Res.* 2009;8(11):4906–15.
168. Milutinovic B, Mitic N, Roncevic J, Goc S, Jankovic M. Glycome complexity of human seminal plasma high molecular mass components: Evaluation of the contribution of acid-soluble glycoproteins/mucins and extracellular vesicles. *Arch Biochem Biophys.* 2016;609:20–30.
169. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 1997;11:428–42.
170. Gerlach JQ, Griffin MD. Getting to know the extracellular vesicle glycome. *Mol Biosyst.* 2016;12:1071–81.
171. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR, et al. When galectins recognize glycans: From biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry.* 2011;50:7842–57.
172. Foddìs R, Franzini M, Bonotti A, Marino R, Silvestri R, Fallahi P, et al. Big and free fractions of gamma-glutamyltransferase: New diagnostic biomarkers for malignant mesothelioma? *Diagnostics.* 2022;12:311.
173. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
174. Vrablova V, Kosutova N, Blsakova A, Bertokova A, Kasak P, Bertok T, et al. Glycosylation in extracellular vesicles: Isolation, characterization, composition, analysis and clinical applications. *Biotechnol Adv.* 2023;67:108196.
175. García R, Rodríguez R, Montesino R, Besada V, González J, Cremata JA. Concanavalin A- and Wheat germ agglutinin-conjugated lectins as a tool for the identification of multiple N-glycosylation sites in heterologous protein expressed in yeast. *Anal Biochem.* 1995;231(2):342–8.
176. Taylor ME, Drickamer K. Structural insights into what glycan arrays tell us about how glycan-binding proteins interact with their ligands. *Glycobiology.* 2009;19(11):1155–62.
177. Cortes Galvez D, Kau-Strebinger S, Gabner S, Walter I. Separation methods affect glycan patterns in extracellular vesicle preparations from canine osteoblasts and osteosarcoma Cells. *J Extracell Biol.* 2026;5(2):e70119.
178. Miller SP, Awasthi YC, Srivastava SK. Studies of human kidney γ glutamyl transpeptidase. Purification and structural, kinetic, and immunological properties. *J Biol Chem.* 1976;251(8):2271–8.
179. Lichtenberg D, Ahyauch H, Alonso A, Goñi FM. Detergent solubilization of lipid bilayers: A balance of driving forces. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(2):85–93.
180. Luo J, Zhu S, Kang Y, Liu X, Tan X, Zhao J, et al. Isolation of CD63-positive epididymosomes from human semen and its application in improving sperm function. *J Extracell Vesicles.* 2024;13:e70006.
181. Caritá AC, Cavalcanti RRM, Oliveira MSS, Riske KA. Solubilization of biomimetic lipid mixtures by some commonly used non-ionic detergents. *Chem Phys Lipids.* 2023;255:105327.
182. Heerklotz H, Seelig J. Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. *Biophys J.* 2000;78:2435–40.
183. Beck PR, King J. Influence of detergents and organic solvent extraction on human gamma-glutamyltransferase activity. *Enzyme.* 1978;23(6):388–94.
184. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:1760–5.
185. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis.* 2000;21(6):1054–70.

186. Governini L, Haxhiu A, Shaba E, Vantaggiato L, Mori A, Bruttini M, et al. Unraveling the multi-omic landscape of extracellular vesicles in human seminal plasma. *Biomolecules*. 2025;15(6):836.
187. Gul M, Russo GI, Kandil H, Boitrelle F, Saleh R, Chung E, et al. Male infertility: new developments, current challenges, and future directions. *World J Mens Health*. 2024;42(3):502–17.
188. Sengupta P, Pinggera GM, Calogero AE, Agarwal A. Oxidative stress affects sperm health and fertility—Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians. *Reprod Med Biol*. 2024;23(1):1–17.
189. Vahedi Raad M, Firouzabadi AM, Tofighi Niaki M, Henkel R, Fesahat F. The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2024;22(1):83.

BIOGRAFIJA

Tamara Janković je rođena 08.07.1993. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer magistar farmacije – medicinski biohemičar, upisala je 2012, a završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 8,83. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije. Po završetku fakulteta, završila je pripravnički staž i položila stručni ispit za magistre farmacije – medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije – modul Medicinska biohemija upisala je školske 2018/2019. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i uspešno je položila sve predmete predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa prosečnom ocenom 9,73.

Od novembra 2018. godine je zaposlena u Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač pripravnik. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2023. godine. Od 2018-2019. godine učestvovala je na projektu 173010 „Strukturna heterogenost i efekti kompleksnih ugljenih hidrata (glikana) kao ključnih komponenti molekulskog raspoznavanja u biološkim sistemima” koji je bio finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije. Od 2020. godine angažovana je na istraživačkoj temi „Kompleksnost humanog glikoma“, koja se realizuje u okviru institucionalnog finansiranja INEPa. Od 2023-2024. godine bila je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetu medicinska biohemija, na Katedri za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Rukovođila je internim *Proof of Concept* projektom: „Razvoj standarda egzozoma: izolovanje, prečišćavanje i karakterizacija egzozoma iz pula semene plazme čoveka“ (2024. godine), raspisanim od strane Tela za transfer tehnologija, Instituta za primenu nuklearne energije-INEP, a finansiranog od strane SAIGE (*Serbia Accelerating Innovation and Entrepreneurship Project*).

Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za imunohemiju i glikobiologiju, pod rukovodstvom dr Mirosłave Janković, naučnog savetnika.

Kao autor i koautor je objavila ukupno osam naučnih radova. Od toga sedam naučnih radova u međunarodnim časopisima (jedan rad u časopisu kategorije M21a, tri rada u časopisima kategorije M21, jedan rad u časopisu kategorije M22, dva rada u časopisima kategorije M23) i jedan rad u časopisu od nacionalnog značaja (kategorije M24). Učestvovala je sa osam saopštenja na nacionalnim i međunarodnim skupovima. Rezultate doktorske disertacije publikovala je u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M21, jednom radu u međunarodnom časopisu kategorije M22, jednom radu u međunarodnom časopisu kategorije M23.

Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS) i Srpskog društva za ekstracelularne vezikule (SrbEV). Za ambasadora SrbEV za *Student Network for Extracellular Vesicles (SNEV)* izabrana je 2025. godine. Član Komiteta za etiku u laboratorijskoj medicini (*C-Ethics*) Evropske federacije za laboratorijsku medicinu (*EFLM*) postala je 2026. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Тамара Јанковић _____

Број индекса _____ 15/2018 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Гликобиохемијска карактеризација молекулских образаца који садрже
гама-глутамил трансферазу у екстрацелуларним везикулама
и солубилном субпротеому семене плазме човека

- 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 _____ Тамара Јанковић

Број индекса _____ 15/2018

Студијски програм _____ Медицинска биохемија

Наслов рада _____ Гликобиохемијска карактеризација молекулских образаца који садрже гама-глутамил трансферазу у екстрацелуларним везикулама и солубилном субпротеому семене плазме човека

Ментор _____ проф др Александра Зељковић, редовни професор
др Мирослава Јанковић, научни саветник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, _____

Изјава о коришћењу

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

Гликобиохемијска карактеризација молекулских образаца који садрже
гама-глутамил трансферазу у екстрацелуларним везикулама и
солубилном субпротеому семене плазме човека

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, _____
