

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Tamara N. Zmijanjac
(rođena Uzelac)

**Uticaj vezivanja antipsihotika klozapina,
ziprazidona i sertindola na sadržaj i
reaktivnost tiolne grupe Cys34 humanog
serum-albumina**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Tamara N. Zmijanjac
(born Uzelac)

**The effect of the binding of antipsychotics
clozapine, ziprasidone and sertindole on the
content and reactivity of the thiol group
Cys34 of human serum-albumin**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

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

dr Vesna Jovanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Marija Takić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za medicinska istraživanja

dr Simeon Minić, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Katarina Smiljanić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____ .

Mami Milici, tati Nenadu, dedi Milanu, baki Ljubici, sestri Tijani, suprugu Dušanu i našoj deci Nikolaju i Pavlu.

Zahvalnica

Stići do ove doktorske disertacije nije bio nimalo lak put ali, uz dopuštenje Božije, to je bilo jedno divno putovanje na kojem sam srela puno izuzetnih ljudi, saradnika i prijatelja. Želela bih da se zahvalim svima koji su mi pomogli i bili uz mene na tom putovanju.

Doktorska disertacija je urađena na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod prvobitnim mentorstvom prof. dr Ljube Mandić, redovnog profesora Hemijskog fakulteta u penziji. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na ukazanoj prilici, poverenju, strpljenju i razumevanju, kao i na nesebičnoj pomoći i zalaganju u početnim fazama izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Dragoj mentorki, dr Vesni Jovanović, naučnom savetniku Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dugujem ogromnu zahvalnost na neprocenjivoj pomoći tokom planiranja eksperimenata, njihovoj realizaciji, tumačenju rezultata i uobličavanju doktorske disertacije. Svojim znanjem, energijom, snagom i voljom značajno je doprinela tome da ova teza ugleda svetlost dana. Hvala na svim rečima podrške, poverenju i ljubavi koja oplemenjuje. Ovih nekoliko rečenica je malo da se izrazi sve ono što je pružila i čemu me je naučila.

Mom drugom mentoru, dr Milanu Nikoliću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu hvala na pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije, na sugestijama, idejama, korisnim savetima i konstruktivnim kritikama koje su doprinele da moja disertacija danas ima ovakav sadržaj i formu.

Posebno hvala dragoj dr Mariji Takić, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za medicinska istraživanja, na posvećenosti i prijateljskom pristupu. Hvala za sve naučne savete i diskusije, za rad u divnom okruženju koji je uvek bio prijatan i inspirativan što je doprinelo da ova disertacija dobije pun sjaj. Ukratko hvala što se uvek našla tu da pomogne, za šta god mi je pomoć bila potrebna.

Zahvaljujem se i svim članovima komisije koji su uložili svoje vreme za čitanje i ispravke disertacije.

Malo je redova da se zahvalim svojim roditeljima i sestri na neizmernoj ljubavi i ogromnoj podršci koja me bezuslovno prati celog života. Ogromnu zahvalnost dugujem i osobama koje nisu više sa nama a koje bi danas bile najponosnije – hvala do neba.

Konačno, hvala mojoj dragocenoj porodici, suprugu Dušanu i sinovima Nikolaju i Pavlu koji su svojim prstićima, smehom, radošću, prvim koracima i beskrajnom ljubavlju doprineli oblikovanju ove doktorske disertacije.

Tamara N. Zmijanjac

Uticaj vezivanja antipsihotika klopapina, ziprazidona i sertindola na sadržaj i reaktivnost tiolne grupe Cys34 humanog serum-albumina

Sažetak

Pronalaženje veze između simptoma shizofrenije i biomarkera oksidativnog stresa moglo bi voditi individualizaciji tretmana ove mentalne bolesti. Dokazano je da je oksidativni stres uključen u nastanak i razvoj shizofrenije i da antipsihotici imaju različite efekte na modulaciju nivoa oksidativnog stresa, odnosno, da različite vrste antipsihotika pokazuju različite efekte na ćelijske antioksidanse ili prooksidanse. U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitano vezivanje atipičnih antipsihotika klopapina, sertindola i ziprazidona za humani serum-albumin (HSA) metodom fluorescentne spektroskopije. Mehanizam gašenja fluorescencije, konstante vezivanja (K_a), broj vezujućih mesta (n) i identifikacija vezujućeg mesta sertindola za HSA, određeni su titracijom rastvora HSA fiksne koncentracije različitim koncentracijama liganda uz merenje intenziteta fluorescencije. Uticaj promene u strukturi HSA nakon vezivanja antipsihotika na njegovu antioksidativnu ulogu ispitan je određivanjem sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe *in vitro* (merenjem konstante brzine pseudo prvog reda za reakciju HSA-SH grupe sa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoinskom kiselinom)) i *in vivo* (nakon izolovanja albumina iz seruma pacova). Rezultati su upotpunjeni ispitivanjem efekata izlaganja HSA molekula različitim koncentracijama glukoze na sadržaj krajnjih produkata glikacije, na promenu strukture molekula HSA tokom glikacije, kao i ispitivanjem uticaja simultanog vezivanja masnih kiselina, antipsihotika i glukoze na transportnu i antioksidativnu ulogu HSA. Dobijeni rezultati omogućuju bolje sagledavanje i razumevanje mehanizma vezivanja antipsihotika, odnosno farmakodinamike ovih supstanci, ukazujući da ziprazidon, za razliku od klopapina i sertindola, modulira sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe prema povećanom antioksidativnom (odbrambenom) kapacitetu u cirkulaciji, što može doprineti bezbednijem i efikasnijem tretmanu shizofrenije lekovima iz ove grupe psihofarmaka.

Ključne reči: Humani serum-albumin; klopapin; ziprazidon; sertindol; sadržaj i reaktivnost tiolnih grupa; masne kiseline; glukoza; glikacija; antioksidativna uloga

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

The effect of the binding of antipsychotics clozapine, ziprasidone and sertindole on the content and reactivity of the thiol group Cys34 of human serum-albumin

Abstract

Finding a link between the symptoms of schizophrenia and biomarkers of oxidative stress could lead to the individualization of the treatment of this mental illness. It has been proven that oxidative stress is involved in the onset and development of schizophrenia and that antipsychotics have different effects on modulating the level of oxidative stress. Various types of antipsychotics also show different effects on cellular antioxidants or prooxidants. In this doctoral dissertation, the binding of the atypical antipsychotics clozapine, sertindole, and ziprasidone to human serum albumin (HSA) was examined using fluorescence spectroscopy. The fluorescence quenching mechanism, binding constants (K_a), number of binding sites (n), and identification of the binding site of sertindole for HSA were determined by titrating a fixed concentration of HSA solution with different concentrations of the ligand while measuring the fluorescence intensity. The influence of changes in the structure of HSA after the binding of antipsychotics on its antioxidant role was examined by determining the content and reactivity of the HSA-SH group *in vitro* (by measuring the pseudo-first-order rate constant for the reaction of the HSA-SH group with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) and *in vivo* (after isolating albumin from the serum of rats). The results were completed by examining the effects of exposure of HSA molecules to different concentrations of glucose on the content of glycation end products, on the change in the structure of HSA molecules during glycation, as well as by examining the effect of simultaneous binding of fatty acids, antipsychotics, and glucose on the transport and antioxidant role of HSA. The obtained results enable a better overview and understanding of the binding mechanism of antipsychotics, i.e., the pharmacodynamics of these substances, indicating that ziprasidone, unlike clozapine and sertindole, modulates the content and reactivity of the HSA-SH group according to increased antioxidant (defense) capacity in the circulation, which can contribute to safer and more efficient treatment of schizophrenia with drugs from this group of psychopharmaceuticals.

Keywords: human serum albumin; clozapine; ziprasidone; sertindole; thiol group content and reactivity; fatty acids; glucose; glycation; antioxidant role

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA

4-HNE	4-Hidroksinonenal
ANOVA	<i>engl. Analysis of Variance</i> , analiza varijanse
AGEs	<i>engl. Advanced Glycation Endproducts</i> , krajnji proizvodi glikacije
AS	Amonijum-sulfat
ATP	Adenozin-5'-trifosfat
BKZ	Bromkrezol zeleno
CAT	Katalaza
CNS	Centralni nervni sistem
DOPAC	Dihidroksifenil sirćetna kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
DTT	Ditiotreitol
EPS	Ekstrapiramidalni sindrom
GPX	Glutation peroksidaza
GSH	Glutation
HSA	Humani serum-albumin
HSA-SH	Tiolna grupa Cys34 HSA
MAO	Monoamin oksidaza
MDA	Malondialdehid
MK	Masne kiseline
PUFA	Polinezasićene masne kiseline
RNS	Reaktivne azotove vrste
ROS	Reaktivne kiseonične vrste
SK	Stearinska kiselina
SOD	Superoksid-dismutaza
SQ	Semihinon
TAS	<i>engl. Total Antioxidant Status</i> , ukupan antioksidativni status
TBARS	Reaktivne supstance sa tiobarbiturnom kiselinom
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultravioletno
ZAS	Zasićeni rastvor amonijum-sulfata

Sadržaj:

	<i>Strana</i>
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Shizofrenija - definicija, simptomi i etiologija bolesti	5
2.1.1. <i>Definicija, simptomi i tipovi shizofrenije</i>	5
2.1.2. <i>Etiologija shizofrenije</i>	6
2.2. Terapija shizofrenije antipsihoticima	7
2.2.1. <i>Antipsihotici prve generacije</i>	7
2.2.2. <i>Antipsihotici druge generacije</i>	8
2.3. Oksidativni stres u shizofreniji	11
2.3.1. <i>Reaktivne kiseonične vrste – poreklo i uloga u organizmu</i>	11
2.3.2. <i>Uzroci nastanka oksidativnog stresa u shizofreniji</i>	13
2.3.3. <i>Markeri oksidativnog stresa u shizofreniji</i>	14
2.3.4. <i>Parametri antioksidativne zaštite u shizofreniji</i>	16
2.3.5. <i>Suplementacija antioksidansima u shizofreniji</i>	18
2.4. Metabolički efekti u shizofreniji	19
2.4.1. <i>Karbonilni stres u shizofreniji</i>	19
2.4.2. <i>Neenzimsko glikozilovanje u shizofreniji</i>	20
2.5. Humani serum-albumin	21
2.5.1. <i>Funkcije i značaj HSA</i>	21
2.5.2. <i>Metabolizam i struktura HSA</i>	22
2.5.3. Transportna uloga HSA	23
2.5.3.1. <i>Vezivna mesta na molekulu HSA za MK</i>	24
2.5.3.2. <i>Vezivna mesta na molekulu HSA za lekove</i>	25
2.5.3.3. <i>Vezivno mesto na molekulu HSA za glukozu</i>	27
2.5.3.4. <i>Vezivna mesta na molekulu HSA za druge ligande</i>	27
2.6. Humani serum-albumin kao antioksidans	28
2.6.1. <i>Antioksidativna svojstva HSA određena vezivanjem liganda</i>	28
2.6.2. <i>Uloga Cys34 tiolne grupe HSA u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa</i>	29
2.6.3. <i>HSA – marker oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima</i>	31

2.7.	<i>Fiziološki značaj istovremenog vezivanja različitih liganda na uloge human serum-albumina</i>	32
3.	MATERIJALI I METODE	35
3.1.	<i>Hemikalije i reagensi</i>	35
3.2.	<i>Tretman pacova antipsihoticima</i>	35
3.3.	<i>Izolovanje plazme pacova</i>	35
3.4.	<i>Izolovanje albumina iz plazme pacova taloženjem amonijum-sulfatom</i>	36
3.5.	<i>Biohemijske metode</i>	36
3.5.1.	<i>Određivanje koncentracije ukupnih proteina i albumina u plazmi pacova</i>	36
3.5.2.	<i>Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom</i>	36
3.5.3.	<i>Određivanje reaktivnosti HSA-SH grupe albumina</i>	37
3.6.	<i>Priprema komercijalnog HSA za in vitro eksperimente</i>	37
3.6.1.	<i>Odmašćivanje komercijalnog HSA</i>	37
3.6.2.	<i>Redukcija komercijalnog HSA</i>	38
3.6.3.	<i>Pripremanje uzoraka HSA željenog sadržaja HSA-SH grupe</i>	38
3.6.4.	<i>Zamašćivanje uzorka HSA</i>	38
3.6.5.	<i>Vezivanje antipsihotika za odmašćeni HSA i zamašćeni HSA sa SK</i>	38
3.6.6.	<i>Priprema uzoraka HSA za in vitro glikaciju</i>	39
3.6.7.	<i>Vezivanje antipsihotika za HSA sa vezanom SK i glukozom</i>	39
3.7.	<i>Fluorescentna spektroskopija</i>	40
3.7.1.	<i>Fluorescentni emisiji i sinhroni spektri HSA</i>	40
3.7.2.	<i>Određivanje mesta vezivanja sertindola na molekulu HSA</i>	40
3.7.3.	<i>Određivanje Stern–Volmer-ove konstante kvenčovanja i konstante vezivanja</i>	40
3.7.4.	<i>Fluorimetrijsko praćenje strukturnih promena HSA tokom in vitro glikacije</i>	41
3.8.	<i>Obrada rezultata</i>	41
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	42
4.1.	<i>In vitro eksperimenti uticaja vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na reaktivnost i sadržaj HSA-SH grupa</i>	42
4.1.1.	<i>Ispitivanje uticaja vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na triptofanske emisije spektre</i>	42
4.1.2.	<i>Uticaj vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na promene u strukturi molekula HSA - Sinhroni fluorescentni spektri</i>	47

4.1.3.	<i>Određivanje vezujućeg mesta za sertindol na molekulu HSA</i>	50
4.1.4.	<i>Određivanje mehanizma i konstanti vezivanja antipsihotika za molekul HSA</i>	53
4.1.5.	<i>Uticaj vezivanja ziprazidona, klopazina i sertindola na sadržaj HSA-SH grupe</i>	55
4.1.6.	<i>Uticaj vezivanja sertindola, klopazina i ziprazidona na reaktivnost HSA-SH grupe</i>	59
4.1.7.	<i>Reaktivnosti i/ili dostupnosti Cys34 tiol grupe kao uzrok promene sadržaja HSA-SH grupe</i>	63
4.2.	<i>Uticaj terapije sertindolom, klopazinom i ziprazidonom na reaktivnost i sadržaj tiol grupe serum-albumina in vivo</i>	66
4.2.1.	<i>Uticaj sertindola, klopazina i ziprazidona na sadržaj ukupnih tiola u plazmi i sadržaj albumin-SH grupa kod pacova</i>	66
4.2.2.	<i>Uticaj antipsihotika sertindola, klopazina i ziprazidona na reaktivnost albumin-SH grupa kod pacova</i>	69
4.3.	<i>Uticaj vezivanja endogenih liganda (SK i glukoze) i antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe</i>	71
4.3.1.	<i>Strukturne promene HSA tokom glikacije – Trp214 emisijski spektri</i>	71
4.3.1.1.	<i>Efekti koncentracije glukoze na fluorescenciju Trp214</i>	74
4.3.1.2.	<i>Efekti molarnog odnosa HSA:SK na fluorescenciju Trp214</i>	75
4.3.2.	<i>Strukturne promene HSA tokom glikacije – emisijski spektri pentozidina</i>	76
4.3.2.1.	<i>Efekti koncentracije glukoze na formiranje pentozidnog adukta</i>	78
4.3.2.2.	<i>Efekti molarnih odnosa HSA:SK na formiranje pentozidnog adukta</i>	80
4.3.3.	<i>Efekat ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na sadržaj HSA Cys34 tiolne grupe</i>	81
4.3.3.1.	<i>Efekti koncentracije glukoze na sadržaj HSA-SH grupe</i>	81
4.3.3.2.	<i>Efekti molarnih odnosa HSA:SK na sadržaj HSA-SH grupe</i>	82
4.3.4.	<i>Efekat ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na reaktivnost HSA-SH grupe</i>	84
4.3.4.1.	<i>Efekti koncentracije glukoze na reaktivnost HSA-SH grupe</i>	84
4.3.4.2.	<i>Efekti molarnih odnosa HSA:SK na reaktivnost HSA-SH grupe</i>	85
4.3.5.	<i>Uticaj prisustva glukoze na gašenje fluorescencije Trp214 pri vezivanju SK za HSA</i>	87
4.3.6.	<i>Uticaj vezivanja antipsihotika za HSA u prisustvu SK i glukoze na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe</i>	89
4.3.6.1.	<i>Uticaj vezivanja antipsihotika na sadržaj HSA-SH grupe kod (ne)glukonovanog HSA</i>	89
4.3.6.2.	<i>Uticaj vezivanja antipsihotika na reaktivnost HSA-SH grupe kod (ne)glukonovanog HSA</i>	93

5.	<i>ZAKLJUČCI</i>	98
6.	<i>LITERATURA</i>	100
7.	<i>PRILOZI</i>	114
	<i>BIOGRAFIJA</i>	128
	<i>IZJAVE</i>	130

1. UVOD

Shizofrenija je jedan od najčešćih i najtežih psihičkih poremećaja, koja pogađa 1% populacije, najčešće od 15. do 35. godina života. Ovo patološko stanje manifestuje se na najrazličitije načine sa potpuno različitim simptomima. Etiologija nastanka bolesti je nepoznata, ali istraživanja pokazuju da kombinacija fizičkih, genetskih, psiholoških i ekoloških faktora povećavaju šansu za razvitak bolesti. Simptomi bolesti su najčešće uslovljeni disbalansom u aktivnosti dopamina i serotonina u mozgu. Poznato je da u shizofreniji postoji povišena aktivnost subkortikalnih dopaminskih neurona i smanjena aktivnost kortikalnih dopaminskih puteva. Glavna strategija tretmana shizofrenije zasniva se na primeni oralnih antipsihotika, lekova koji prvenstveno ostvaruju svoj efekat preko uticaja na dopaminske receptore. Ovi lekovi deluju i na druge receptore, prvenstveno serotoninske, čime se objašnjava njihova različita klinička efikasnost i neželjena dejstva.

Osnovna podela antipsihotika je na: (a) tipične (lekove prve generacije), sa međusobno sličnim delovanjem, primenom, ali i mnogim ozbiljnim neželjenim dejstvima; (b) atipične (lekove druge generacije), jednako efikasne, ali sa daleko manje izraženim ekstrapiramidalnim motornim poremećajima. Ipak, većina antipsihotika druge generacije pokazuje neželjene endokrine i metaboličke efekte.

Klozapin, ziprazidon i sertindol pripadaju atipičnim antipsihoticima, koji se međusobno razlikuju po hemijskoj strukturi, selektivnosti prema receptorima, kao i neželjenim dejstvima. Klozapin se izdvaja od drugih atipičnih antipsihotika po jedinstvenom profilu vezivanja za receptore i efikasnosti delovanja, posebno kod pacijenata koji dobro ne reaguju na terapiju sa drugim antipsihoticima, ili sklonih suicidu ili samopovređivanju. Iako se zbog toga smatra "zlatnim standardom" u terapiji shizofrenije, upotreba klozapina je ograničena zbog širokog spektra (nekada i fatalnih) neželjenih efekata. Kao i klozapin, i sertindol je posle nekoliko godina primene bio povučen sa tržišta zbog neželjenih dejstava na kardiovaskularni sistem, da bi ponovo bio odobren za lečenje shizofrenije kao lek drugog izbora kod pacijenata koji ne reaguju adekvatno na druge antipsihotike. Ziprazidon je noviji lek, tako da su podaci o neželjenim dejstvima izazvanim njegovom hroničnom upotrebom ograničeni. Zbog svoje specifične farmakološke aktivnosti na serotoninske, dopaminske i adrenalinske receptore, ziprazidon je zanimljiv za primenu u kliničkoj praksi i kao antidepresiv i anksiolitik.

Nedovoljno rasvetljena etiologija shizofrenije, praćena nepotpunim poznavanjem farmakokinetike i farmakodinamike antipsihotika, posebno mehanizama njihovih delovanja na nivou molekula u ćelijama i tkivima u telu, dodatno komplikuje razumevanje ove bolesti i posledice primene ovih lekova. Usaglašen je stav da je oksidativni stres karakteristika shizofrenije i da može dodatno doprineti patofiziologiji bolesti. Trenutno postoje nesuglasice oko toga da li primena antipsihotika dodatno doprinosi oksidativnom stresu, pošto su mnogi atipični antipsihotici redoks-aktivne supstance, što se povezuje sa njihovim istovremeno povoljnim terapijskim delovanjem i sa neželjenim efektima.

Humani serum-albumin (HSA), zbog sposobnosti da vezuje i transportuje brojne lekove, uključujući klozapin, ziprazidon i sertindol (za sertindol nije poznato vezujuće mesto na HSA!), ali i endogene molekule poput masnih kiselina (MK), glukoze, hormona, bilirubina i hema, predstavlja ključan model sistem za izučavanje međusobnog uticaja istovremenog vezivanja (odabranih) antipsihotika i endogenih molekula na transportnu ulogu molekula HSA. Pored transportne uloge, zbog visoke zastupljenosti u plazmi HSA (35–55 g/L) i dugog poluživota (21

dan), HSA je ključan u održavanju pH i osmotskog pritiska plazme. Ovaj najzastupljeniji protein plazme je izgrađen od jednog polipeptidnog lanca organizovanog u 3 homologna domena (I, II i III) sa po dva subdomena (A i B). Formiranju jedinstvene srolike trodimenzionalne strukture molekula HSA, velike fleksibilnosti, u velikoj meri doprinose disulfidni mostovi koji se formiraju između Cys ostataka raspoređenih u svim domenima molekula HSA. Od ukupno 35 Cys ostataka, 34 ostataka Cys formiraju 17 disulfidnih mostova, dok je tiolna grupa prvog Cys ostataka, koji je pozicioniran na 34. mestu u amino-kiselinskoj sekvenci, slobodna. Kako se oko 70% ove tiolne grupe Cys34 nalazi u redukovanom obliku, HSA-SH igra značajnu ulogu u antioksidativnom (redoks) sistemu. Zbog visoke zastupljenosti HSA u vanćelijskim tečnostima (najzastupljeniji protein u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti), ovaj protein se smatra glavnim molekulom odgovornim za očuvanje redoks-homeostaze u ovim tečnostima. Kako mozak ima relativno nizak nivo enzimske antioksidativne zaštite, koji je nedovoljno efikasan u hroničnom oksidativnom stresu izazvanom shizofrenijom, uključivanje HSA u održavanje redoks statusa može biti od izuzetnog značaja u ovom patološkom stanju.

Tiolna grupa Cys34 smeštena je na površini subdomena IA u hidrofobnom džepu. Zbog velike fleksibilnosti molekula HSA, vezivanje fizioloških liganda poput MK i glukoze, ili antipsihotika za vezujuća mesta HSA koja se nalaze u neposrednoj blizini Cys34 ostatka, može dovesti do konformacionih promena koje utiču na dostupnost tiolne grupe okolnoj sredini. Pored reaktivnih oksidativnih vrsta sa kojima reaguje tiolna grupa Cys34, ona, kao mnogo jači nukleofil od bročano zastupljenijih amino- i guanidino-grupa (59 lizinskih i 24 argininskih bočnih ostataka u molekulu HSA) i reagujući sa različitim karbonilnim jedinjenjima, igra značajnu ulogu i u odbrani od karbonilnog stresa. U patološkim stanjima, kao što su dijabetes, bolesti jetre i bubrega ili Alzheimer-ova bolest, dolazi do povećanja sadržaja karbonilnih jedinjenja poput glukoze, metilglioksala i glioksala, što ima za posledicu povećano karbonilovanje Cys34 grupe i smanjenje ukupnog sadržaja redukovane tiolne grupe. Kako u normalnim fiziološkim stanjima tiolna grupa Cys34 doprinosi 80% ukupnim tiolima plazme, njena uloga u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa je veoma značajna i zbog toga se HSA smatra najvažnijim vanćelijskim antioksidansom.

Budući da je shizofrenija patološko stanje koje se najčešće javlja do 35. godine života, i da ona zahteva doživotnu terapiju lekovima koji mogu takođe da se vežu pored endogenih molekula za HSA, njihovo međudejstvo na strukturne promene molekula HSA i, posledično, na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe predstavlja kompleksan sistem za istraživanja. Krajnji efekat vezivanja različitih liganda za HSA na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe Cys34 biće uslovljen afinitetima pojedinačnih supstanci za molekul HSA. U poslednjih nekoliko godina, fokus naučnih istraživanja se sve više usmerava na određivanje sadržaja Cys34 tiolne grupe HSA (HSA-SH grupe), kao specifičnijeg markera za procenu oksidativnog ili karbonilnog stresa u odnosu na ukupne tiole u različitim patološkim stanjima. Od izuzetne je važnosti, zato, postići dublje razumevanje sinergističkih i/ili antagonističkih efekata simultanog vezivanja strukturno različitih liganda (sa različitim afinitetima) za isto ili različito vezujuće mesto na molekulu HSA na dostupnost i reaktivnost Cys34 tiolne grupe.

Polazeći od poznatih činjenica:

- da se Cys34 grupa nalazi u okviru IA subdomena molekula HSA;
- da se ziprazidon vezuje za IB subdomen koji je u neposrednom kontaktu sa IA subdomenom;

- da se IA subdomen i Cys34 nalaze blizu Sudlow I vezujućeg mesta za lekove (za koji se vezuje klopazin);
- da nije poznato vezujuće mesto sertindola na molekulu HSA;
- da se peto i drugo vezujuće mesto za MK sa najvećim afinitetom nalaze, redom, u IIIB subdomenu i između dodirnih površina subdomena IA i IIA, koja se nalaze u neposrednoj blizini vezujućih mesta za lekove u okviru subdomena IB, IIA i IIIA;
- da glukoza (najzastupljeniji mali organski molekul u plazmi) interaguje sa HSA u okviru Sudlow I vezujućeg mesta kao i klopazin i
- da vezivanje liganda za HSA može da dovede do lokalnih konformacionih promena molekula HSA;

opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio ispitivanje efekata primene tri u kliničkoj praksi mnogo korišćena oralna atipična antipsihotika na antioksidativnu sposobnost HSA. Ovako (široko) postavljen cilj istraživanja je konkretizovan kroz tri uže određena cilja.

U prvom delu (cilju) ove disertacije, u *in vitro* eksperimentima, ispitano je kako tri strukturno različita antipsihotika, sa njihovim različitim afinitetima za poznata vezujuća mesta na HSA (klopazin i ziprazidon) i nepoznatom (sertindol), samostalno, ili u prisustvu vezane stearinske kiseline (SK), utiču na strukturu molekula HSA i, posledično, na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe Cys34. Iz ovog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- praćenje promene fluorescencije molekula HSA, snimanjem triptofanskih fluorescentnih emisionih spektara molekula HSA bez (odmašćeni HSA) i sa prisutnom vezanom SK u odnosima HSA:SK od 1:1 do 1:4 (mol/mol), tokom titracije ispitivanim antipsihoticima do molarnog odnosa HSA:lek 1:4,5;
- praćenje promene fluorescencije molekula HSA snimanjem sinhronih fluorescentnih spektara ostataka Tyr i Trp u molekulu HSA sa vezanom SK u molarnom odnosu HSA:SK 1:1, tokom titracije ispitivanim antipsihoticima do molarnog odnosa HSA:lek 1:2,88;
- identifikacija vezujućeg mesta za sertindol na molekulu HSA fluorescentnom spektroskopijom, koristeći varfarin i diazepam kao standardne ligande koji se vezuju za Sudlow I ili II mesto;
- određivanje konstanti vezivanja ispitivanih antipsihotika za HSA;
- ispitivanje sinergističkog i/ili antagonističkog efekta simultanog vezivanja SK i ispitivanih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost tiolne grupe Cys34.

U drugom delu ove disertacije ispitano je da li dobijeni efekti odabranih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe u *in vitro* eksperimenatima mogu da se potvrde i *in vivo*, u eksperimentu sa pacovima hronično tretiranim ispitivanim antipsihoticima. Iz ovog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- tretman 28 odraslih mužjaka Wistar albino pacova, podeljenih u 4 grupe, tokom četiri nedelje odabranim antipsihoticima u dozama koje, preračunato, odgovaraju najvećim terapijskim dozama kod ljudi;
- žrtvovanje životinja, sakupljanje pune krvi iz aorte i izolovanje plazme;
- određivanje osnovnih biohemijskih parametara i ukupnih tiola u plazmi životinja;
- izolovanje albumina iz plazme i određivanje sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe.

U trećem delu ove disertacije ispitano je da li je ko-inkubacija HSA u prisustvu MK (SK) i glukoze, u koncentracijama koje odgovaraju patofiziološkim uslovima, a u vremenskom periodu koji odgovara poluživotu HSA, relevantan model za ispitivanje uticaja ispitivanih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe. Iz ovog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- praćenje fluorescentnom spektroskopijom promena strukture molekula HSA tokom 21 dana ko-inkubacije HSA u prisustvu SK u molarnim odnosima od 1:0 do 1:4, kao i glukoze u koncentracijama 0, 5, 10 i 20 mM na 37°C;
- ispitivanje stepena glikacije/glukonovanja molekula HSA tokom njegove ko-inkubacije u prisustvu SK i glukoze u patofiziološkim koncentracijama tokom 21 dana na 37°C;
- ispitivanje uticaja ko-inkubacije HSA u prisustvu SK i glukoze u patofiziološkim koncentracijama na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupa;
- provera efekata ispitivanih lekova na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupa, koristeći model HSA molekula ko-inkubiranog u prisustvu SK i glukoze u odnosu na model gde je HSA odmašćen ili samo kontrolisano zamašćen.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Shizofrenija - definicija, simptomi i etiologija bolesti

2.1.1. Definicija, simptomi i tipovi shizofrenije

Shizofrenija predstavlja psihičko oboljenja koje karakteriše postojanje izoblične slike o realnosti, poremećaji u razmišljanju, osećanjima i ponašanju. Oboleloj osobi ona onemogućava razlikovanje stvarnih od nestvarnih događaja, ometa logičko razmišljanje, normalne osećajne doživljaje prema drugim osobama i tako narušava njeno društveno funkcionisanje. Shizofrenija se javlja kod 1% populacije i kod većine obolelih bolest se obično prvi put dijagnostifikuje u kasnoj adolescenciji ili ranom odraslom dobu (u starosnoj dobi između 15. i 35. godine) (**Shapiro i sar., 2011; Patel i sar., 2014**). Podjednako učestalo oboljevaju od shizofrenije osobe oba pola, ali se kod žena nešto kasnije (u proseku 2–3 godine) ispoljavaju simptomi bolesti. Bolest se manifestuje u raznolikim oblicima, sa potpuno različitim simptomima koji se često dele na pozitivne i negativne (**Davison i Neale, 1999**).

Pozitivni simptomi shizofrenije:

1. *Akustične, vizuelne, ili mirisne halucinacije.* Obolela osoba čuje glasove, vidi stvari koje ne postoje, ili oseća mirise i takva zapažanja smatra stvarnim;
2. *Sumanute ideje da ih neko proganja (prati, prisluškuje ili posmatra).* Ponekad one nastaju kao način da se objasni halucinacija;
3. *Poremećaj u razmišljanju.* Misli i govor obolele osobe su zbrkani, nepovezani i teško razumljivi.

Negativni simptomi shizofrenije:

1. *Nedostatak volje.* Gubitak elana i zainteresovanosti za stvari kojima su se oboleli ranije bavili;
2. *Socijalno povlačenje.* Udaljavanje obolelih od porodice i okruženja, jer se u njihovom prisustvu ne osećaju dobro. Oni vrlo često izražavaju i strah od njih;
3. *Gubitak osećanja.* U velikoj meri je smanjena sposobnost izražavanja emocija, što je često praćeno neprimerenim reagovanjem u tužnim ili srećnim situacijama;
4. *Poteškoće u razmišljanju.* Poremećeni su koncentracija, pamćenje i sposobnost planiranja i organizacije, što otežava logičko rasuđivanje, komuniciranje i obavljanje svakodnevnih zadataka obolelih od shizofrenije;
5. *Depresija.* Ozbiljan, ali uobičajeni mentalni problem, koji karakterišu poremećaji raspoloženja, lakog, umerenog ili teškog stepena, što zahteva ozbiljan farmakološki i psihoterapijski tretman pacijenta. Ona može da utiče na misaone obrasce, ali i na fizičko zdravlje čoveka. Simptomi depresije variraju od osobe do osobe.

Na osnovu simptoma koji preovlađuju, shizofrenija se klasifikuje u pet različitih tipova (Tabela 1; **Kecmanović, 1990**).

Tabela 1. Klasifikacija shizofrenije na osnovu simptoma (**Kecmanović, 1990**).

Tip shizofrenije	Simptomi
Paranoidni	Zablude i audio halucinacije, ali je relativno normalno intelektualno funkcionisanje i izražavanje emocija.
Dezorganizovani (Hebefreni)	Govor i ponašanje koji su neorganizovani i teško razumljivi, ili prisustvo neodgovarajućih osećaja. Njihovo neorganizovano ponašanje može poremetiti normalne aktivnosti, kao što su tuširanje, oblačenje i priprema obroka. Obično počinje u vreme puberteta ili rane adolescencije i prognoza je obično loša.
Post-shizofrena depresija	Predstavlja produžetak bolesti kada su shizofreni simptomi već oslabili ili nestali.
Rezidualni	Karakteriše najmanje jedna epizoda shizofrenije, ali osoba više nema pozitivne simptome.
Shizofreniformni premećaj	Ovaj poremećaj se nalazi između kratkog psihotičnog poremećaja (simptomi traju najmanje jedan dan, ali kraće od mesec dana) i shizofrenije za čiju dijagnozu je potrebno da simptomi traju najmanje šest meseci.

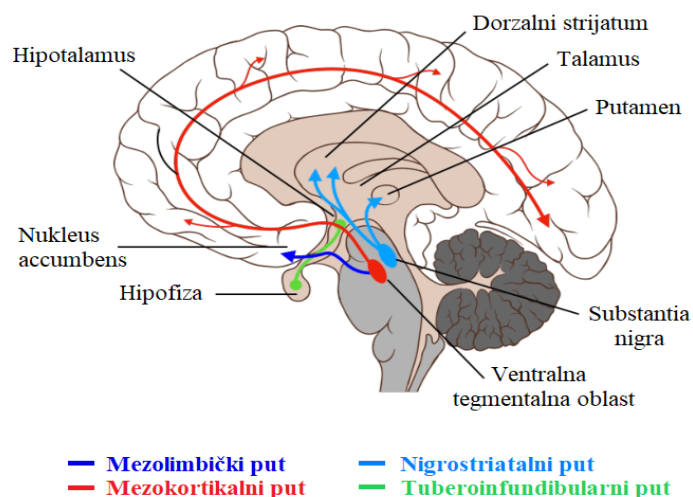
2.1.2. Etiologija shizofrenije

Tačan uzrok nastanka shizofrenije nije poznat. Istraživanja pokazuju da kombinacija fizičkih, genetskih, psiholoških i ekoloških faktora povećava šansu za razvitak bolesti. Smatra se da su neke osobe sklonije nastanku shizofrenije, gde neki stresni ili emocionalni događaji mogu izazvati psihotične epizode. Međutim, ne zna se zašto pojedine osobe razvijaju simptome bolesti. Shizofrenija je povezana sa genetskim predispozicijama, ali još uvek nije otkriveno da je neki poseban gen odgovoran za nastanak bolesti. Rizik od oboljevanja se povećava sa stepenom genetičke srodnosti: najveće šanse za razvitak bolesti su utvrđene kod identičnih blizanaca (50%) (**Cardno i Gottesman, 2000**).

Mnoge studije, urađene na osobama koje su obolele od shizofrenije, pokazuju da je za nastanak shizofrenih simptoma odgovoran poremećaj u funkciji i/ili strukturi mozga. Istraživanja urađena najsavremenijim tehnikama i metodama (kompjuterizovana tomografija, nuklearna magnetna rezonanca i pozitronemisiona tomografija) pokazuju jasnu razliku između mozga zdrave osobe i osobe obolele od shizofrenije. Kod obolelih osoba je utvrđeno prisustvo proširenih moždanih komora i povećanje moždanih udubljenja (sulkusa) između režnjeva mozga. Uočena je i smanjena veličina hipotalamusa i aktivnost prefrontalnog korteksa. Navedenim strukturnim i funkcionalnim razlikama u mozgu osobe obolele od shizofrenije, u odnosu na mozak zdrave osobe, mogu da se objasne neki od uočenih simptoma bolesti. Hipotalamus je funkcionalno najvažniji deo međumozga, u kojem se nalaze centri za glad, žeđ i održavanje telesne temperature. Pored ovoga, hipotalamus ima važnu ulogu u nastajanju emocija i motivaciji, dok je prefrontalni korteks odgovoran za moždane funkcije kao što su razmišljanje, pamćenje i učenje (**Lawrie i sar., 2008**).

Smatra se da disbalans neurotransmitera (dopamina i, delimično, serotonina) koji omogućavaju prenos impulsa između neurona u različitim moždanim strukturama predstavlja molekulsku osnovu razvoja ovog psihičkog poremećaja (**Remington i sar., 2008**). Utvrđeno je da obolele osobe imaju više nivoe dopamina u sinapsama, ili da su preosetljive na postojeći nivo dopamina (**Davis i sar., 1991**). Na **slici 1** predstavljena su četiri glavna dopaminergična puta (mezolimbčki, mezokortikalni, nigrostriatalni i tuberoinfundibularni put). Mezolimbčki i mezokortikalni putevi pružaju se od srednjeg mozga do limbickog sistema i odgovorni su za nastanak emocija. Nigrostriatalni put igra važnu ulogu u motornoj kontroli, dok se tuberoinfundibularni put pruža od hipotalamusa do hipofize i uključen je u regulaciju sekretorne funkcije hipofize. Disbalans u funkcionisanju ovih puteva i funkcija koje oni kontrolišu povezuje se sa uočenim simptomima kod osoba obolelih od shizofrenije.

Ustanovljeno je da u shizofreniji postoji povišena aktivnost subkortikalnih dopaminskih neurona nigrostriatalnog i mezolimbickog puta, dok je smanjena aktivnost kortikalnih dopaminskih puteva mezokortikalnog puta koji inerviraju prefrontalni korteks. Zbog ustanovljenog disbalansa u aktivnosti glavnih dopaminskih puteva, i posledično tome pojave simptoma koji prate ovu disfunkcionalnost, glavna strategija tretmana shizofrenije zasniva se na primeni lekova koji prvenstveno suzbijaju aktivnost dopaminskih (a ponekad i serotoninskih) receptora.



Slika 1. Šematski prikaz četiri glavna dopaminska puta u mozgu: mezolimbčki, mezokortikalni, nigrostriatalni i tuberoinfundibularni put (**Nummenmaa i sar., 2022**).

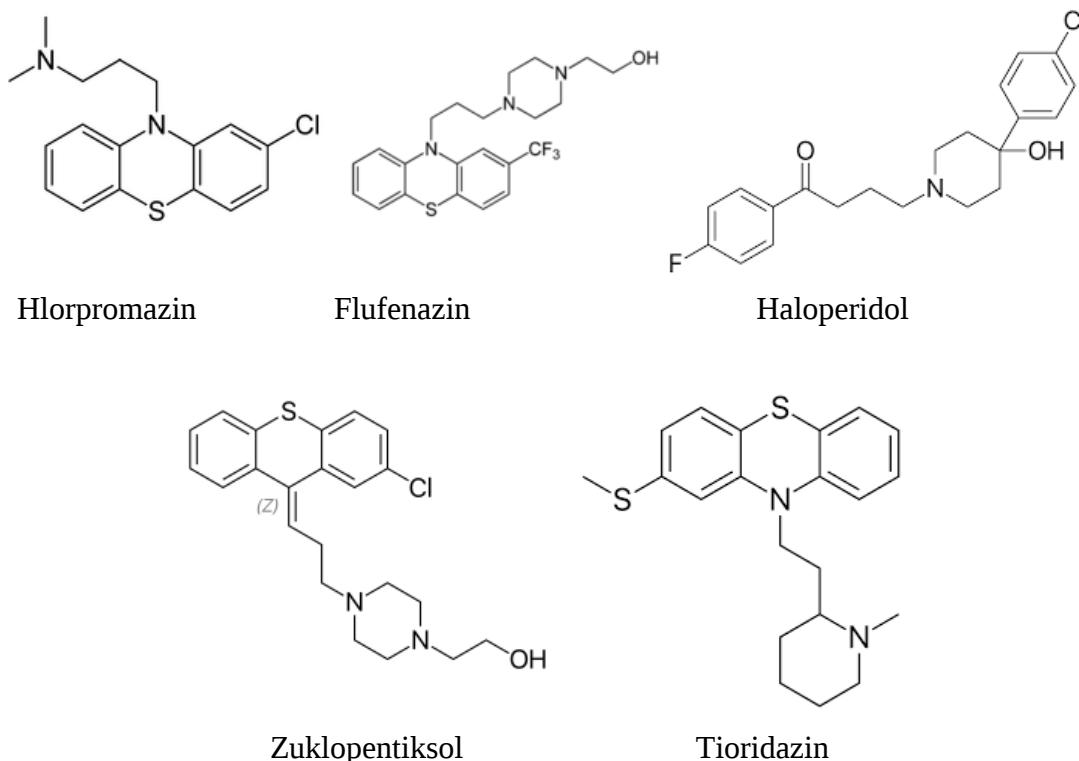
2.2. Terapija shizofrenije antipsihoticima

Lekovi koji se primenjuju u terapiji shizofrenije nazivaju se antipsihotici. Antipsihotici se uobičajeno dele u dve generacije (prva i druga generacija antipsihotika), u zavisnosti od mehanizma delovanja, selektivnosti prema dopaminskim i drugim receptorima (serotoninskom, nikotinskom) i neželjenim efektima koji izazivaju.

2.2.1 Antipsihotici prve generacije

Antipsihotike prve generacije čine tipični antipsihotici koji se koriste za lečenje shizofrenije. Ovoj grupi lekova pripadaju: hlorpromazin (largactil), flufenazin (metoten), tioridazin (triksifen, haloperidol (haldol)) i zuklopentiksol (clopixol) (**Slika 2**). Zajedničko za ovu grupu antipsihotika

je da deluju kao antagonisti D₂ receptora u mezolimbičkom i mezokortikalnom putu, i/ili blokatori D₂ receptora u nigrostriatalnom i tuberoinfundibularnom putu. Druga karakteristika ove grupe antipsihotika je relativno niska selektivnost: oni pored dopaminskih receptora blokiraju i druge nedopaminske receptore, utičući na normalno funkcionisanje drugih neurotransmitera čija aktivnost je normalna u shizofreniji. Kao posledica ove neselektivnosti, neželjena dejstva kao što su ekstrapiramidalni sindrom (EPS), sedacija, kardiotoksični efekti i hiperprolaktinemija se javljaju kod pacijenta koji koriste tipične antipsihotike. Psihoteični simptomi, kao što su halucinacije, sumanute ideje i poremećaj mišljenja, mogu da se kontrolišu tipičnim antipsihoticima, dok isti ne deluju na simptome depresije i nedostataka motivacije.

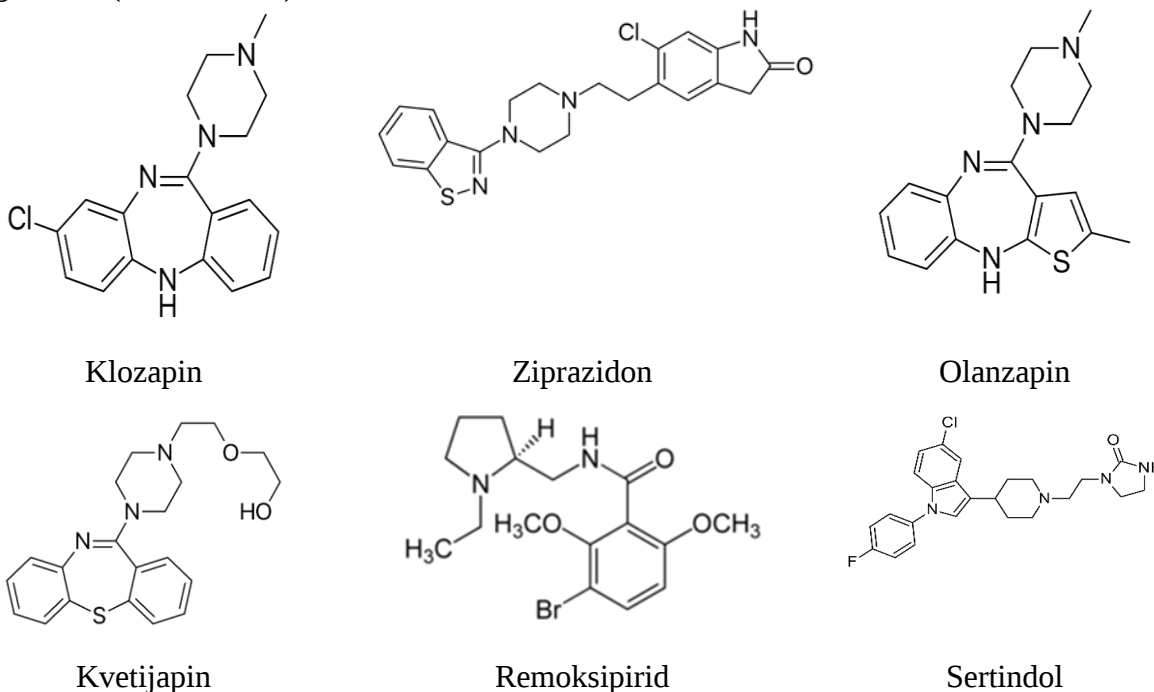


Slika 2. Strukturne formule antipsihotika prve generacije (tipični antipsihotici).

2.2.2 Antipsihotici druge generacije

Lekovi druge generacije koji se koriste za tretman shizofrenije pripadaju atipičnim antipsihoticima. To su: klozapin, ziprazidon, risperidon, olanzapin, kvetiapin, remoksipirid i sertindol (**Slika 3**). U odnosu na tipične antipsihotike, atipični antipsihotici se selektivnije vezuju za receptore mezolimbičkog puta. Dalje, njihovo vezivanje za receptore je fleksibilnije i kraće nego za ostale D₂ receptore u drugim dopaminskim putevima. U odnosu na tipične antipsihotike, atipični antipsihotici delimično deluju i kao antagonisti serotoninskih receptora (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} i 5-HT_{1A}). Različiti mehanizam delovanja i selektivnost prema specifičnim receptorima u dva transmitterska sistema uzrok je različitog profila delovanja na simptome shizofrenije kao i razlika u neželjenim dejstvima antipsihotika prve i druge generacije. U sledećim delovima ovog poglavlja, za lekove druge generacije (klozapin, ziprazidon i sertindol) koji su odabrani da se ispituju u ovom radu, dat je detaljniji prikaz načina njihovog delovanja, efekata do kojih dovodi njihova primena, kliničkih simptoma koji zahtevaju primenu datog leka, kao i kratak pregled

apsorpcije, transporta, biotransformacije i eliminacije (farmakokinetika) svakog leka u/iz organizma (Farah, 2005).



Slika 3. Strukturne formule antipsihotika druge generacije (atipični antipsihotici).

Klozapin

Klozapin pripada hemijskoj klasi jedinjenja koja sadrže dibenzodiazepinski ostatak, koji se sastoji od dva benzena povezana diazepinskim prstenom (**Slika 3**). Ovaj lek prvi put je upotrebljen za tretman shizofrenije 1971. godine. Zbog selektivnosti prema serotoninskim receptorima i manjem efektu na dopaminske D_2 receptore u nigrostriatalnom dopaminskom putu, koji je odgovoran za kontrolu motorike, klozapin je vrlo efikasan u terapiji psihotičnih simptoma, bez negativnog efekta na EPS i nivo prolaktina. Pored selektivnijeg vezivanja za dopaminske D_2 receptore u mezolimbičnom putu, deluje i kao antagonist receptora za druge monoaminske neurotransmitere (serotonin, adrenalin i histamin). Klozapin se visokim afinitetom vezuje za serotoninske receptore tipa 2 ($5HT_{2A}$) u frontalnom korteksu, kao i adrenalinske receptore 1 i 2, i histaminski receptor H_1 . Antagonično dejstvo klozapina na dopaminske D_2 receptore ublažava pozitivne simptome kod shizofrenije, dok antagonično dejstvo na serotoninske $5HT_{2A}$ receptore ublažava negativne simptome kod shizofrenije. Ipak, pošto deluje i na mnoge druge receptore u mozgu, klozapin izaziva i neželjena dejstva, kao što su sedacija (dejstvo na histaminski H_1 receptor) i antiholinergične efekte (dejstvom na muskarinski receptor $M1-5$). Kod manjeg broja ljudi, klozapin dovodi i do značajnog porasta telesne mase, a može dovesti i do konvulzija. Poznato je, takođe, da on dovodi do značajnog smanjenja broja belih krvnih zrnaca u krvi (agranulocitoza). Zbog ove potencijalno opasne komplikacije, klozapin je 1975. godine povučen kao lek za lečenje shizofrenije. Međutim, ponovo je vraćen u upotrebu, za one pacijente koji nisu dobro reagovali na druge antipsihotične lekove i kod shizofrenih stanja koja su praćena povećanjem suicidalnosti i agresije, s tim da se prati broj leukocita na nedeljnoj bazi. Zbog svojih neželjenih dejstava, klozapin nije predviđen za prvu liniju terapije, naročito kod starih osoba (**Meltzer, 2012**).

Nakon oralne administracije, apsorpcija klopapina je brza i skoro potpuna iz digestivnog sistema. Zbog svoje lipofilnosti, 97% količine apsorbovanog leka transportuje se u cirkulaciji vezana za proteine seruma, prevashodno serum-albumin. Kao i za većinu drugih lekova, glavna biotransformacija klopapina odvija se u jetri, kroz nekoliko reakcija katalizovanim enzimima prve i druge faze biotransformacije ksenobiotika. Enzim citohrom P₄₅₀ 1A2 (familija 1, subfamilija A) katalizuje reakciju N-demetilovanja klopapina koji se prevodi u norklopapin, dok citohrom P₄₅₀ 3A4 (familija 3, subfamilija A) katalizuje reakciju N-oksidacije klopapina u njegov N-oksid. Nastali proizvodi prve faze biotransformacije klopapina se u drugoj prevode u odgovarajuće glukuronide klopapina, u reakciji koju katalizuje UDP-glukuroniltransferaze 1–4, koji se ekskretuje iz organizma putem urina (50%) i fecesa (30%) (**Fang i sar., 1998; Olesen i Linnet, 2001; Mori i sar., 2005**). Vreme poluživota klopapina u cirkulaciji je oko 8 sati.

Ziprazidon

Ziprazidon pripada hemijskoj klasi benzotiazolnih derivata (benzenov prsten povezan sa tiazol-prstenom) (**Slika 3**). Selektivno se vezuje za receptore monoaminskih neurotransmitera dopamina i serotonina. Deluje kao visoko afinitetni antagonist dopaminskih D₂ receptora i serotoninских 5HT_{2A} i 5HT_{1D} receptora, kao i agonist 5HT_{1A} receptora. Ziprazidon je i umereno jak blokator noradrenalinskih receptora i receptora za ponovo preuzimanje serotonina, što sve ima za posledicu porast nivoa ovih neurotransmitera u mozgu (**Stahl i Shayegan, 2003**). Selektivnost ziprazidona prema ovim receptorima je praćena malim rizikom od pojave EPS-a, kao neželjenog efekta terapije antipsihoticima. Istraživanja ukazuju i da je ziprazidon efikasan u terapiji depresivnih simptoma kod shizofrenije, da ne dovodi do povećanja telesne mase, ali da može izazvati srčane aritmije (**Mandrioli i sar., 2015**).

Nakon oralne administracije, iz digestivnog sistema se apsorbuje oko 60% unetog ziprazidona, pri čemu se 99% količine apsorbovanog leka transportuje u cirkulaciji vezan za serum-albumin. Od ukupno apsorbovane količine, u nepromenjenom obliku preko urina se izlučuje manje od 1%, i preko fecesa manje od 4% leka. Biotransformacija ziprazidona odvija se u jetri posredstvom nekoliko izoformi citohroma P₄₅₀, uz nastajanje različitih proizvoda prve faze biotransformacije leka. Na primer, oksidacija ziprazidona u bezisotiazol-piperazin, katalizovana citohromom P₄₅₀ 3A4, predstavlja jednu od reakcija ove faze biotransformacije leka. Metaboliti druge faze biotransformacije ziprazidona izlučuju se urinom (20%) i fecesom (66%). Vreme poluživota ovog leka u cirkulaciji je oko 7 sati (**Prakash i sar., 2000**).

Sertindol

Sertindol je jedan od novijih antipsihotika, koji strukturno pripada hemijskoj klasi fenilpirola (policiklična aromatična jedinjenja koja sadrže benzenov prsten vezan za pirolni prsten C-C ili C-N vezom) (**Slika 3**). Na tržištu se pojavio 1996. godine, ali je zbog brojnih neželjenih efekata na rad srca povučen iz upotrebe 1998. godine, da bi se potpunije procenio rizik i koristi upotrebe leka. Evropska komisija za lekove, 2006. godine, dala je odobrenje za primenu sertindola u lečenju shizofrenije, od kada je ponovo dostupan na evropskom tržištu (**Muscatello i sar., 2014**).

Sertindol pokazuje visok afinitet za dopaminske D₂ receptore, serotoninске 5HT_{2A} i 5HT_{2C} receptore i za α -1-adenoreceptore, a nizak afinitet za muskarinske receptore i histaminski H₁ receptor. Lek prvenstveno deluje na D₂ receptore mezolimbicnog i mezokortikalnog dopaminskog puta. Zbog niskog afiniteta za muskarinske i histaminske H₁ receptore, terapija sertindolom ne dovodi do pojave neželjenih efekata kao što su sedacija, hiperprolaktinemija i

EPS. Uobičajni neželjeni efekti terapije sertindolom su glavobolja, nesanica i seksualna disfunkcija kod muškaraca (**Muscatello i sar., 2014**).

Od ukupno apsorbirane količine sertindola gastrointestinalnim traktom, 99,5% se vezuje za proteine plazme, pre svega za serum-albumin. Lek se biotransformiše u jetri, uz učešće nekoliko izoformi citohroma P₄₅₀ (CYP 2D6 i CYP 3A4), koji katalizuju reakcije oksidacije sertindola do dehidrosertindola. Nastali metaboliti prve faze, nakon konjugacije u drugoj fazi biotransformacije, polako se izlučuju uglavnom preko fecesa. U odnosu na druge antipsihotične lekove čiji poluživot u plazmi je nekoliko časova, sertindol ima relativno dug poluživot od oko 3 dana (**Muscatello i sar., 2014**), što može predstavljati potencijalnu korist u kliničkoj praksi.

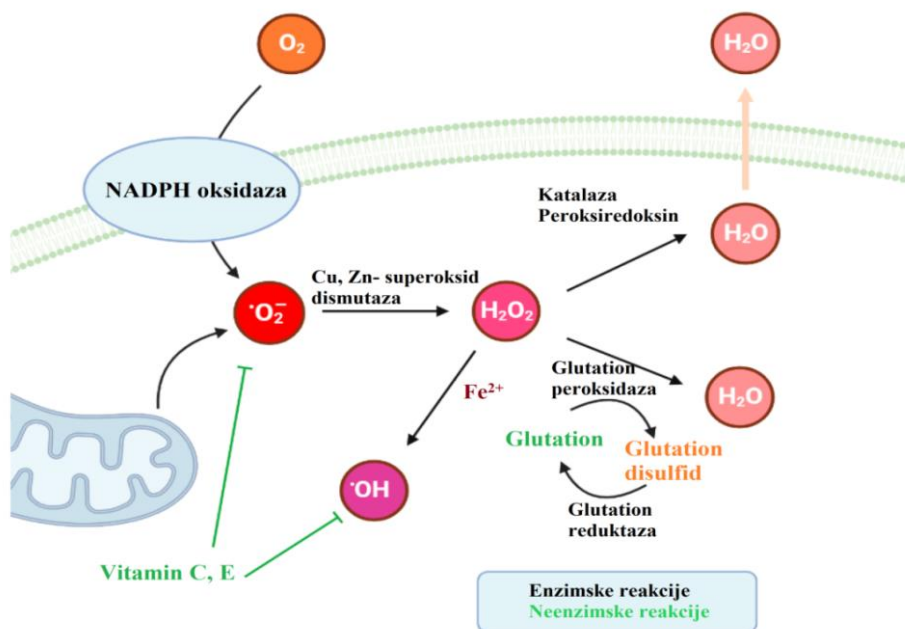
2.3. Oksidativni stres u shizofreniji

Centralni nervni sistem (CNS) predstavlja pogodno mesto za nastanak oksidativnog stresa, pri čemu je i veoma osetljiv na njegova negativna delovanja. Najpre, CNS troši mnogo adenzin-5'-trifosfata (ATP) kao izvora hemijske energije, neophodnog za normalno prenošenje nervnih signala unutar CNS. ATP nastaje u procesu oksidativne fosforilacije, za čije odvijanje je neophodan gradijent protona koji se formira između međumembranskog prostora i matriksa mitohondrija. Ova pokretačka sila za sintezu ATP-a nastaje tokom prenosa elektrona sa redukovanih supstrata na molekulski kiseonik, kao krajnji primalac elektrona u elektron-transportnom lancu (**Berner i sar., 2007**). Kako je proces prenosa dva elektrona na jedan molekul kiseonika 98–99 % efikasan, neki od molekula kiseonika prime samo jedan elektron, što dovodi do stvaranja reaktivnog kiseoničnog radikala, superoksid anjon-radikala ($O_2^{\cdot-}$), jednog od uzročnika oksidativnog stresa (**Berner i sar., 2007**). Drugo, CNS se karakteriše kao lipofilan organ, sa značajnom količinom polinezasićenih MK (PUFA, engl. polyunsaturated fatty acids) u fosfo- i sfingolipidima membrana i mijelinskih omotača neurona, koje su zbog prisustva dvostrukih veza u svojoj strukturi podložnije oksidaciji. Treće, u CNS je sadržaj malih molekula sa antioksidativnom aktivnošću nizak, uz istovremeno i nisku aktivnost antioksidativnih enzima (**Jcsbergcr, 1991**). Iz oštećenih neurona se lako i nekontrolisano oslobađaju kateholamini (posebno dopamin), koji podležu autooksidaciji i daljem stvaranju slobodnih radikala. Stoga oksidativni stres može igrati značajnu ulogu u razvoju ili napredovanju shizofrenije (**Beleslin i Jovanović, 1997**).

2.3.1. Reaktivne kiseonične vrste – poreklo i uloga u organizmu

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) zajedno sa reaktivnim azotovim vrstama (RNS) se smatraju glavnim uzročnikom oksidativnog stresa koji je odgovoran za peroksidaciju lipida, ćelijske promene, starenje i apoptozu (**Slika 4**). Zajedničko za većinu ROS i RNS je da se radi o atomima, atomskim grupama, ili molekulima, koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj atomskoj, odnosno molekulskoj orbitali. Ovi slobodni radikali imaju relativno kratak poluživot usled izuzetne reaktivnosti zbog prisutnih nesparenih elektrona. Većina ovih kratkoživećih vrsta, odmah po nastajanju, najčešće reaguju sa biomakromolekulima iz okruženja, kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Zato što je kod aeroba metabolizam molekulskog kiseonika veoma visok, ROS značajnije doprinose oksidativnom stresu u odnosu na RNS. Mitohondrije se smatraju glavnim mestom generisanja ROS, jer se tokom ćelijskog disanja do 2% kiseonika ne redukuje potpuno do H_2O , već učestvuje u stvaranju $O_2^{\cdot-}$ (**Berner i sar., 2007**). U normalnim fiziološkim uslovima, uz normalnu antioksidativnu zaštitu, $O_2^{\cdot-}$ ne izaziva značajan oksidativni stres, pošto se neenzimski i enzimski, posredstvom enzima superoksid-

dismutaze (SOD), prevodi u manje reaktivan vodonik-peroksid (Slika 4). U fiziološkim uslovima, manje količine $O_2^{\cdot -}$ generišu se tokom enzimskih reakcija katalizovanim enzimima citohrom P_{450} , ksantin-oksidadom i mijeloperoksidazom. U prisustvu slobodnih jona bakra i/ili gvožđa, u neenzimskoj Fentonovoj reakciji, manje reaktivni H_2O_2 se može prevesti u dugo-živeći reaktivni hidroksil-radikal ($^{\cdot}OH$), ili se enzimskim reakcijama uz delovanje glutathion peroksidaze (GPX) i katalaze (CAT) prevodi do vode, ili kiseonika i vode (Harris, 1992) (Slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz procesa uključenih u nastajanje i uklanjanje ROS (superoksid anjon-radikala ($O_2^{\cdot -}$), H_2O_2 i hidroksilnog radikala ($^{\cdot}OH$) sa enzimskim i neenzimskim antioksidansima); crne strelice označavaju enzimске reakcije, a zelene linije neenzimske reakcije (Hong i sar., 2024).

Reakcije u kojima učestvuju ROS su lančane hemijske reakcije. Ako slobodni radikal preuzme elektron od stabilnog ne-radikalnog molekula, kao što su biomolekuli, taj molekul postaje radikal koji može reagovati sa drugim stabilnim molekulom i na taj način izazvati promenu strukture i funkcije biomolekula. U zavisnosti od tipa i uloge koju dati oštećeni biomolekul ima u ćeliji, to dalje može da dovede do izmenjene funkcije ćelije u kojoj se oksidativni stres desio, čak i da dođe do njene smrti (Negi i sar., 2011).

Međutim, slobodni radikali nisu uvek toksični proizvodi metabolizma, već su uključeni u niz važnih fizioloških procesa kao glasnici u prenosu informacija unutar ili između ćelija. U složenom sistemu prenosa informacija u ćeliji u cilju njene adaptacije i preživljavanja, slobodni radikali imaju značajnu ulogu kao pokretači i/ili modulatori ćelijskog odgovora, kroz pokretanje ili stopiranje ekspresije gena za specifične funkcionalne ili strukturne proteine, kao odgovor na nastalu promenu u ćeliji ili njenom okruženju. Pored ovoga, neke vrste ROS u niskim koncentracijama, kao $HClO$, predstavljaju prvu liniju odbrane neutrofila od bakterijskih infekcija, zbog svojih oksidacionih svojstava. Takođe, ROS su i značajni sekundarni ćelijski glasnici, sa ulogom u regulaciji ćelijskog ciklusa kroz proces apoptoze (programirane ćelijske smrti), koji je neophodan kod rasta i razvoja višćelijskih organizama koji uključuju procese remodelovanja tkiva i organa (Bourdon i Blache, 2001).

Kakav će efekat ROS ispoljiti na organizam zavisi od njihove koncentracije, koja je sa jedne strane uslovljena brzinom njihovog nastajanja, a sa druge brzinom njihovog uklanjanja. Preterano generisanje ROS usled pojačanog metabolizma, prisustva slobodnih jona bakra ili gvožđa, pojačane aktivnosti pojedinih izoformi citohroma P₄₅₀ usled konzumiranja lekova, alkohola ili drugih supstanci koji se metabolišu ovim enzimskim sistemom, uz smanjenu koncentraciju malih antioksidativnih molekula ili enzima antioksidativne zaštite, ima za posledicu nastanak oksidativnog stresa (**Hong i sar., 2024**).

Iako je utvrđena veza između oksidativnog stresa i patofiziologije shizofrenije (**Walker i Tessner, 2008; Emiliani i sar., 2014**), merenje koncentracije slobodnih radikala u biološkim uzorcima je nepraktično, zbog njihove relativno niske koncentracije i nestabilnosti usled visoke reaktivnosti. U klinici ili u naučnim istraživanjima, oksidativni stres se obično procenjuje određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, GPX i CAT) i određivanjem specifičnih markera – proizvoda oksidativnih modifikacija biomolekula, poput malondialdehida (MDA), nastalog usled lipidne peroksidacije (**Ciobica i sar., 2011**).

2.3.2. Uzroci nastanka oksidativnog stresa u shizofreniji

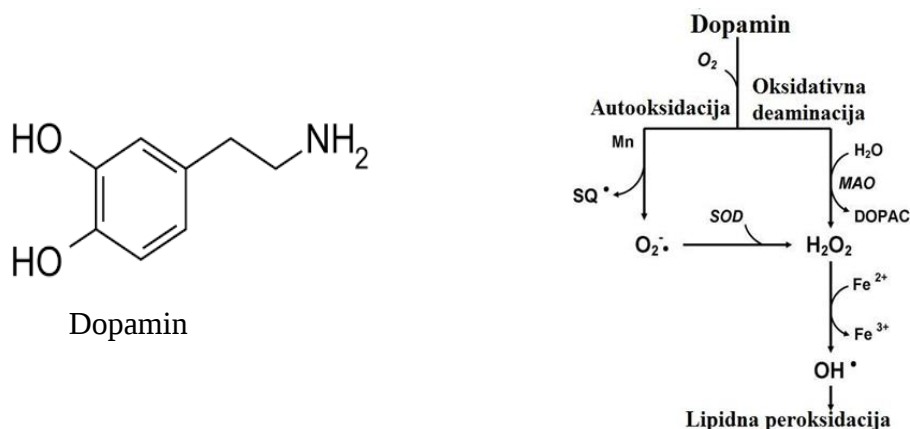
Od 50-tih godina XX veka, kada je prvi put pretpostavljeno da oksidativna oštećenja mogu imati značajnu ulogu u patofiziologiji shizofrenije (**Hoffer i sar., 1954**), sproveden je veliki broj studija, uglavnom zasnovanih na praćenju aktivnosti enzima antioksidativne odbrane i stepena lipidne peroksidacije (**Bošković i sar., 2011; Koga i sar., 2016**). Dobijeni rezultati ukazali su na izmenjeni redoks status kod pacijenata sa shizofrenijom. Oksidativni stres se povezuje, pre svega, sa kliničkim tokom i terapijskim ishodom tretmana. Oksidativna oštećenja neurona mogu doprineti razvoju brojnih kliničkih simptoma shizofrenije, među kojima se posebno ističu tardivna diskinezija, negativni EPS i neurološki simptomi (**Yao i Keshavan, 2011**).

U prilog ovim pretpostavkama ide i činjenica da je mozak organ veoma osetljiv na oksidativna oštećenja. Ovaj organ ima visok energetska zahtev, zbog čega sadrži veliki broj mitohondrija u kojima se oksidativnom fosforilacijom sintetiše ATP-a, koji je neophodan za aktivnost Na⁺/K⁺-ATP-aze i održavanje akcionog potencijala ćelija, kao i za sintezu i transport neurotransmitera. Pretpostavlja se da je oštećenje mitohondrijalnog elektron-transportnog lanca sa ROS važan faktor u patogenezi niza psihijatrijskih poremećaja. **Faizi i sar. (2014)** su pronašli smanjeni nivo ATP-a u bazalnim ganglijama i temporalnom režnju, kao i smanjenu aktivnost citohrom c-oksidadze (COX kompleks IV) u frontalnom korteksu pacova sa indukovanom shizofrenijom. Pored toga, rezultati drugih studija na životinjskim modelima shizofrenije potvrđuju postojanje mitohondrijalne disfunkcije (**Prabakaran i sar., 2004**).

Povećana osetljivost moždanih struktura na oksidativni stres povezuje se i sa povišenim količinama gvožđa (posebno u bazalnim ganglijama), koji se putem transferina doprema preko krvno-moždane barijere. Najveći deo deponovanog gvožđa u mozgu je u sastavu feritina, male količine i u hemosiderinu. Oštećenjem nervnog tkiva oslobađa se „katalitičko“ gvožđe iz ovih depoa, koje učestvuje u neenzimskoj Fentonovoj reakciji prevođenja H₂O₂ u dugo-živeći i veoma reaktivni [•]OH radikal (**Slika 4**). Rezultati istraživanja ukazuju na smanjene nivoe feritina i transferina u serumu pacijenta sa shizofrenijom (**Bitanhirwe i Woo, 2011**).

Metabolizam neurotransmitera dopamina, glutamata i serotonina ima važnu ulogu u održavanju redoks-homeostaze u biološkim sistemima, jer se tokom njihovog metabolizma generišu ROS. Posebna pažnja je zato posvećena proučavanju metabolizma dopamina u različitim mentalnim poremećajima, uključujući i shizofreniju. Klasična dopaminska hipoteza u shizofreniji postulira

hiperaktivnost dopaminergične transmisije na D₂ receptoru (**Bitanirwe i Woo, 2011**). Dopamin pripada monoaminima dihidrohinonske strukture, čiji katabolizam se odvija, sa jedne strane, preko enzimske oksidativne deaminacije uz učešće monoamin oksidaze (MAO), pri čemu nastaju H₂O₂ i dihidroksifenil sirćetna kiselina (DOPAC), a sa druge, preko spontane autooksidacije molekulskim kiseonikom, uz nastajanje semihinona (SQ) i O₂^{•-}, obe redoks reaktivne vrste. Nastali O₂^{•-} se dalje SOD prevodi do H₂O₂, koji u prisustvu slobodnih jona gvožđa u Fentonovoj reakciji stvara toksični [•]OH, koji dovodi do lipidne peroksidacije i narušavanja integriteta ćelijskih membrana i, posledično, do narušavanja funkcije neurona (**Slika 5**). Kako je u shizofreniji ustanovljena povećana aktivnost dopamina ili povećana osetljivost na postojeće količine dopamina (**Davis i sar., 1991**), značajne količine ROS-a mogle bi nastati kao posledica intenzivne razgradnje dopamina (**Yao i Keshavan, 2011**).



Slika 5. Strukturna formula i katabolizam dopamina u mozgu. SQ - semihinon, MAO – monoamin-oksidadza, DOPAC - dihidroksifenil sirćetna kiselina (**Yao i Keshavan, 2011**).

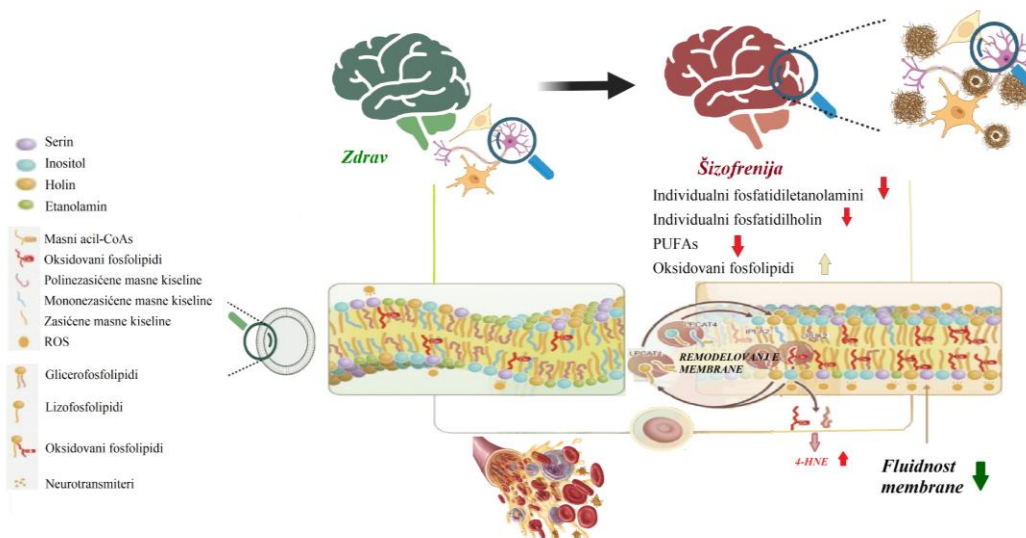
Visok sadržaj PUFA, pre svega arahidonske i dokozaheksaenske kiseline, veoma osetljivih na dejstvo slobodnih radikala, dodatno doprinosi povećanoj osetljivosti mozga na oksidativni stres. Niz sprovedenih studija ukazuje na poremećaj metabolizma fosfolipida i ćelijske signalizacije kod pacijenata sa shizofrenijom. Utvrđeno je i da dolazi do smanjenja koncentracije PUFA u fosfolipidima plazme, trombocitima, fibroplastima kože i postmortalnim tkivima mozga. Jedan od predloženih mehanizama, koji bi mogao biti od značaja za poremećaj statusa PUFA u shizofreniji, predstavlja aktivaciju fosfolipaze A2 posredovanu oksidativnim stresom (**Yao i Keshavan, 2011**).

Uprkos velikoj osetljivosti i podložnosti oksidativnim oštećenjima, mozak ima relativno nizak nivo antioksidativne zaštite, nedovoljno efikasan u hroničnim stanjima povećane produkcije ROS u neuronima, kao što je shizofrenija, što dalje vodi do oštećenja moždanih struktura.

2.3.3. Markeri oksidativnog stresa u shizofreniji

U cilju procene oksidativnog stresa, merenje koncentracije ROS u biološkim uzorcima je relativno nepraktično, zbog njihovog relativno kratkog života uslovljenog visokom reaktivnošću. Da bi se dobio uvid u veličinu oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima, određuju se specifični markeri koji nastaju tokom oksidativnog stresa. Kako ROS mogu da reaguju sa svim biološkim biomolekulima i da ih modifikuju, do sada su identifikovani brojni specifični markeri oksidativnog oštećenja proteina, lipida, šećera i nukleinskih kiselina. Kako je mozak bogat

lipidima, a ROS dovode do lipidne peroksidacije, ćelijske membrane i membrane subćelijskih organela predstavljaju mesto gde otpočinje oksidativno oštećenje lipida tokom oksidativnog stresa u shizofreniji. Kao posledica modifikacije ćelijskih membranskih lipida, pre svega PUFA, dolazi do povećanja sadržaja oksidovanih PUFA i njihovog umrežavanja, što dovodi do smanjenja fluidnosti membrane. Tokom remodelovanja strukture membrana menja se i odnos zasićenih/polinezasićenih MK, što sve kumulativno dovodi do disfunkcionalnosti membrane i abnormalnog prenosa signala neurotransmiterima (Slika 6) (Li i sar., 2022).



Slika 6. Šematski prikaz promena u membrani usled oksidativnog stresa kod osoba obolelih od shizofrenije u odnosu na zdrave osobe – uzroci i posledice. Adaptirano prema Li i sar. (2022).

Procena stepena lipidne peroksidacije se analizira i određivanjem sadržaja molekula koji su proizvodi oksidacije lipida koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS). Pored kratkoživećih ROS, poput $O_2^{\cdot -}$ koji se gotovo potpuno neutrališe unutar ćelije gde nastaje, $^{\cdot}OH$ je dugoživeći radikal koji iz ćelije prelazi u cirkulaciju i, zato, nanosi ozbiljnija oštećenja biomolekula. Zato se u slučajevima kada je teško doći do biološkog materijala za procenu oksidativnog stresa (npr. mozak pacijenata obolelih od shizofrenije) za procenu nivoa oksidativnog stresa uzima relativno dostupan materijal, kakvi su krv ili cerebrospinalna tečnost (Emiliani i sar., 2014).

U studiji Huang i sar. (2010) ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u nivou TBARS između pacijenata sa shizofrenijom i kontrolne grupe, u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija (Scottish Schizophrenia Research Group, 2000; Akyol i sar., 2002; Ranjekar i sar., 2003), ali kontradiktorni sa studijama drugih istraživača (Pavlovic i sar., 2002; Khan i sar., 2002; Skinner i sar., 2005; Kropp i sar., 2005; Zhang i sar., 2006; Dadheech i sar., 2006). Nakon 4 nedelje tretmana pacijenata sa antipsihoticima haloperidolom, klozapinom i risperidonom nije došlo do promene u nivou TBARS, što ukazuje da farmakološko delovanje tipičnih i atipičnih antipsihotika može biti različito, ali je krajnji efekat na sadržaj TBARS isti nakon kratkoročnog tretmana odabranim antipsihoticima (Huang i sar., 2010). Blagotvorno antioksidativno dejstvo atipičnih antipsihotika (smanjenje peroksidacije lipida), dobijeno je i u novijoj studiji (Dietrich-Muszalska i sar., 2021), gde je procenjena sposobnost šest atipičnih antipsihotika (klozapina, olanzapina, kvetiapina, risperidona, aripiprazola i ziprazidona) da moduliraju oksidativna oštećenja proteina i lipida. Rezultati ove studije su pokazali da je nivo

TBARS bio viši kod pacijenata sa shizofrenijom u poređenju sa zdravim osobama, ali je nakon 4 nedelje tretmana lekovima on značajno smanjen u poređenju sa početnim vrednostima.

Određivanjem drugog markera lipidne oksidacije, 4-hidroksinonenala (4-HNE), visoko reaktivnog i citotoksičnog α,β -aldehida, koji nastaje tokom lipidne oksidacije u fiziološkim i različitim patološkim stanjima, ustanovljeno je značajno povećanje njegovog nivoa kod pacijenata sa shizofrenijom u odnosu na zdrave osobe (**Li i sar., 2022**). Prisustvo 4-HNE ima značajne implikacije i u drugim neurološkim bolestima, poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (**Ciobica i sar., 2011**). Nađeno povećanje nivoa 4-HNE kod pacijenata sa shizofrenijom, koji nisu tretirani lekovima koji mogu da izazovu oksidativni stres, ukazuje da je 4-HNE pre svega povezan sa patologijom shizofrenije (**Medina-Hernández i sar., 2007**). Kako povećanje sadržaja 4-HNE nije posledica primene lekova, on je predložen kao potencijalni marker shizofrenije. Zbog povećanog nastanka 4-HNE i u drugim neurološkim oboljenjima, njemu nedostaje specifičnost da bi bio prihvaćen kao jedinstveni klinički marker shizofrenije.

Novija studija **Manzoor i sar. (2022)** se fokusirala na identifikaciju adukata HNE-proteini i posledica njihovog stvaranja u patologiji shizofrenije usled oksidativnog stresa, posebno povećane peroksidacije lipida. Elektroforetska analiza je urađena na sedam obdukovanih uzoraka mozga, iz korteksa i regiona hipotalamusa pacijenata sa shizofrenijom i njihovih odgovarajućih normalnih zdravih kontrola. Dobijeno povećanje ekspresije adukata HNE-proteina kod pacijenata sa shizofrenijom ukazuje na značajno veći nivo oksidativnog stresa u odnosu na zdravu kontrolnu grupu. Zanimljivo je da region hipotalamusa mozga kod shizofrenije pokazuje povećane adukate HNE-proteina u poređenju sa korteksom.

Poznato je da je citotoksični MDA, krajnji proizvod peroksidacije lipida, usled čega se nivoi MDA u plazmi ili serumu mogu iskoristiti kao treći marker lipidne peroksidacije. U tom kontekstu, brojne studije su istraživale nivo MDA kod pacijenata obolelih od shizofrenije (**Anuradha i sar. 2015; Güneş i sar., 2016, Hurşitoğlu i sar., 2021; Dudzińska i sar., 2022, Jawlikar i sar., 2024**) i bez obzira na tip bolesti ili primenjenu terapiju kod pacijenata u ovim studijama, zaključci dosledno pokazuju da je povećanje nivoa MDA prisutno u shizofreniji.

2.3.4. Parametri antioksidativne zaštite u shizofreniji

Pored određivanja proizvoda nastalih oksidacijom biomolekula, drugi pristup procene nivoa oksidativnog stresa zasniva se na određivanju komponenti antioksidativne zaštite organizma, koje se dele u tri grupe (**Stadman, 2004**). Enzimi poput SOD, CAT i GPX pripadaju prvoj grupi, i oni direktno uklanjaju ROS. Drugoj grupi pripadaju proteini, poput transferina, ceruloplazmina, feritina, laktoferina, ili HSA, koji direktno uklanjaju ROS preko reaktivnih bočnih amino-kiselinskih ostataka, kao što je tiolna grupa, vezuju jone teških metala (gvožđe ili bakar) koji učestvuju u generisanju ROS u Fentonovoj reakciji, ili vezuju molekule osetljive na oksidaciju, kao što su nezasićene MK. Treću grupu komponenti antioksidativne zaštite formiraju mali molekuli kao vitamini A, C i E, bilirubin, mokraćna kiselina, ubikinon, redukovani glutathion (GSH) i drugi molekuli koji sakupljaju radikalske vrste i na taj način prekidaju lančane reakcije (per)oksidacije. Zajedničko za sve antioksidanse je da se oni nalaze u niskim koncentracijama u odnosu na supstrat koji ROS oksiduje, i da njihovo prisustvo u organizmu u velikoj meri usporava ili sprečava oksidaciju tog supstrata (**Halliwell i Whiteman, 2004**).

Kako je već navedeno, elektron-transportni lanac predstavlja glavno mesto generisanja ROS, uz aktivnost monoamin- ili ksantin-oksidaza, inflamaciju, gama-, X- i ultraviolettne (UV) zrake.

Tokom evolucije razvila se strategija da je na mestima gde najviše nastaju ROS i najveća zastupljenost komponenti antioksidativne zaštite (**Ma, 2010**). U odnosu na većinu drugih organa u organizmu u kojima su zastupljene komponente antioksidativne zaštite, mozak se odlikuje slabim antioksidativnim kapacitetom. Zato pojačani katabolizam dopamina, posredovan monoamino-oksidadama, a usled povišene aktivnosti dopaminskih puteva, dovodi do povećanog nastajanja dugo-živećeg $\bullet\text{OH}$ (**Slika 5**), koji dovodi do lipidne peroksidacije i narušavanja integriteta ćelijskih membrana i, zato, do disfunkcije neurona (**Li i sar., 2022**) (**Slika 6**).

Zbog veze između oksidativnog stresa i shizofrenije, brojne studije su određivale različite komponente antioksidativne zaštite u ovoj bolesti (**Bošković i sar., 2011**). **Raffaa i sar. (2009)** su odredili različite komponente antioksidativne zaštite kod bolesnika sa shizofrenijom, koji nisu ili jesu tretirani antipsihoticima, u odnosu na zdrave osobe. Pacijenti sa shizofrenijom, u poređenju sa zdravim ispitanicima, pokazali su znatno niže nivoe SOD, CAT i redukovano GSH. Aktivnost SOD i CAT, kao i koncentracija GSH kod osoba obolelih od shizofrenije, a nisu bile tretirane lekovima, u odnosu na pacijente tretirane lekovima bila je značajno niža. Ovi rezultati ukazuju da smanjenje u nivou GSH i smanjenje aktivnosti ovih antioksidativnih enzima kod pacijenata sa dijagnozom shizofrenije nije posledica delovanja antipsihotika, te se može smatrati biološkim indikatorom stepena težine simptoma shizofrenije (**Raffaa i sar., 2009**).

Kod gotovo 100 pacijenata iz tri podgrupe tretirane klopazinom, risperidonom i tipičnim antipsihoticima nije bilo značajnih razlika u aktivnosti SOD, GPX i CAT (**Zhang i sar., 2006**). Na osnovu ovih rezultata moglo bi se zaključiti da nema razlika u efektima tipičnih ili atipičnih antipsihotika na oksidativni stres, što je protivno prethodno postavljenoj hipotezi da oksidativni stres kod pacijenata sa shizofrenijom može biti dodatno pogoršan tretmanom antipsihoticima koji poseduju prooksidativna svojstva (**Kropp i sar., 2005**; **Pillai i sar., 2007**).

Yang i sar. (2023) su u komparativnoj analizi istražili efekte antipsihotika (pre i posle tretmana) na enzimске (nivoi SOD, CAT, GPX) i neenzimske markere (nivoi glutaciona i vitamina C) antioksidativne zaštite u krvi kod pacijenata obolelih od shizofrenije. Dvadeset studija je ispunilo kriterijume za uključanje u ovu meta-analizu, sa ukupno 1162 pacijenta na početku i 1105 pacijenata u završnoj tački praćenja. Glavni zaključak ove studije bio je da je efekat antipsihotika na indukciju oksidativnog stresa složen, te da se abnormalni nivo oksidativnog stresa kod pacijenata sa shizofrenijom može poboljšati antipsihoticima, pri čemu efekti lekova mogu biti modifikovani uticajem drugih faktora. Efekat antipsihotika na nivo oksidativnog stresa značajno varira između različitih podtipova pacijenata sa shizofrenijom: prva ili ne-prva epizoda bolesti, ili različite vrste lekova koje oni koriste (tipični ili atipični antipsihotici). Do sada urađene studije, i njihovi dostupni podaci, nisu dovoljne da se potpuno razumeju promene u nivou oksidativnog stresa izazvanog antipsihoticima. Stoga su neophodna rigorozna klinička ispitivanja ili osnovne studije, kako bi se istražili mehanizmi koji regulišu indukciju oksidativnog stresa i poboljšanje kliničkih simptoma i kognicije kod osoba obolelih od shizofrenije, a u cilju uspostavljanja bolje kliničke prakse i tretmana simptoma ove bolesti.

Pregled literaturnih podataka sugerise da su nivoi GSH kod osoba obolelih od shizofrenije međusobno krajnje različiti. Iako je uloga GSH u patofiziologiji shizofrenije prepoznata, identifikovano je nekoliko faktora koji verovatno dovode do diskrepance u rezultatima studija: nejednakost korišćenih metoda i eksperimentalnih sistema, varijabilnost fenotipova shizofrenije, stadijuma i težine bolesti. Međutim, uočene razlike u GSH statusu mogu biti povezane i sa specifičnim simptomima ili grupama simptoma bolesti, gde je GSH mogući kandidat za biomarker razlikovanja fenotipova shizofrenije (**Carletti i sar., 2023**).

U vezi komponenti neenzimske antioksidativne zaštite, literaturni podaci uglavnom ukazuju na smanjenje njihovog sadržaja kod osoba obolelih od shizofrenije. Ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme (TAS, engl. Total Antioxidant Status) najvećim delom doprinose albumin, vitamin C i mokraćna kiselina, zbog njihovih visokih koncentracija u odnosu na druge neenzimske antioksidanse u krvi (bilirubin, α -tokoferol i β -karoten). Iako svaki od antioksidanasa ima svoju specifičnu ulogu u antioksidativnoj odbrani, *in vivo* ovi antioksidansi deluju kooperativno kako bi sinergistički zaštitili organizam od oksidativnih oštećenja. Zato se merenjem TAS određuje ukupan antioksidativni kapacitet plazme. Utvrđeno je smanjenje TAS-a ne samo kod osoba sa prvom epizodom shizofrenije, već i kod pacijenata koji jesu ili nisu bili na terapiji antipsihoticima (**Reddy i sar. 2003; Pazvantoglu i sar. 2009; Virit i sar. 2009; Yao i Keshavan 2011; Avval i sar., 2018**). Ustanovljeno je i da su koncentracije individualnih antioksidanasa albumina, bilirubina i mokraćne kiseline u plazmi značajno niže kod osoba sa shizofrenijom u odnosu na kontrolnu grupu (**Yao i Keshavan, 2011; Dahake i sar., 2016**).

Ispitivanja urađena na pacijentima obolelim od shizofrenije ukazuju na narušeni antioksidativni sistem. Međutim, dobijeni rezultati različitih studija za pojedinačne komponente antioksidativne zaštite nisu uvek međusobno saglasni. Razlike u dobijenim rezultatima se objašnjavaju različitim kliničkim simptomima bolesti, terapiji i trajanju same bolesti. Potvrđeno je da je ozbiljnost simptoma shizofrenije u vezi sa smanjenom antioksidativnom zaštitom, dok veza između trajanja bolesti i nivoa antioksidanata nije utvrđena (**Ciobica i sar., 2011**).

2.3.5. Suplementacija antioksidansima u shizofreniji

Zbog značaja oksidativnog stresa u nastanku i progresiji shizofrenije, aktuelna su i istraživanja suplementacije pacijenata sa shizofrenijom različitim antioksidansima, u cilju smanjenja generisanja ROS i oksidativnog stresa, uzrokovanog samom bolešću ili primenom antipsihotika (**Ng i sar., 2008; Bošković i sar. 2016; Firth i sar. 2017; Mitra i sar., 2017; Hsu i sar., 2020**). Efikasnost dobro poznatih antioksidanata, kao što su vitamini C i E, ispitana je u terapiji različitih simptoma shizofrenije.

Većina studija suplementacije vitaminom E bila je fokusirana na preventivnu i terapijsku ulogu u tardivnoj diskineziji (**Ng i sar., 2008**). U kliničkim studijama suplementacije vitaminom E uglavnom je korišćena doza od 1200–1600 IU/dan. Klinički značajan odgovor na poboljšanje tardivne diskinezije je pronađen sa dnevnom dozom od 1200 IU, sa terapijskim efektom od 7 do 13 meseci nakon prestanka suplementacije (**Peet i sar., 1993**). Međutim, prema statističkim analizama rezultata deset kliničkih studija, nema dokaza da vitamin E smanjuje simptome ovog poremećaja, iako je nekoliko prethodnih studija, sa relativno malo pacijenata uključenih u istraživanje, pokazalo da suplementacija vitaminom E dovodi do smanjenja simptoma tardivne diskinezije (**Lohr i sar., 1987; Elkashef i sar., 1990; Peet i sar., 1993; Yao i sar., 2001**). Oralna suplementacija vitaminom C sa atipičnim antipsihoticima značajno smanjuje nivo MDA, obnavlja nivo vitamina C u krvi i poboljšava rezultate psihijatrijske procene na kratkoj skali (**Bošković i Vovk, 2008**). Zanimljivo, pored korisnog delovanja egzogeno unetih antioksidanasa, suplementacija ω -3 i ω -6 MK iz ekstrakta *Ginkgo biloba* (**Ng i sar., 2008**), pokazala je moguće korisne efekte ovih jedinjenja u shizofreniji (**Bošković i Vovk, 2008**).

Uprkos činjenici da su neke od studija dale pozitivne rezultate primene antioksidanasa u terapiji simptoma shizofrenije, otvorena ostaju pitanja izbora najoptimalnijeg antioksidansa, njegove terapijske doze, dužine suplementacije, kao i optimalnog vremena za početak uzimanja antioksidansa u odnosu na klinički tok shizofrenije.

2.4. Metabolički efekti u shizofreniji

Narušavanje funkcionisanja glavnih dopaminskih puteva koji povezuju različite moždane strukture navodi se kao jedan od osnovnih uzroka nastanka shizofrenije (**Nummenmaa i sar., 2022**). Tuberoinfundibularni put, koji se pruža od hipotalamusa do hipofize, predstavlja jedan od dopaminskih puteva za koji je ustanovljena disregulacija u ovoj bolesti. Ovaj put je odgovoran za sekreciju hipofize, kao dela neuro-endokrine ose (hipotalamus-hipofiza-endokrine žlezde), uključene u održanje homeostaze celog organizma. Narušeno funkcionisanje ove ose u shizofreniji, ili tokom terapije antipsihoticima koji deluju ne samo na dopaminske već i druge receptore unutar moždanih struktura, dovodi i do narušavanja metaboličke homeostaze.

Do sada je objavljeno više studija o disregulaciji homeostaze glukoze (dijabetes, dijabetična ketoacidoza, hiperglikemija) i lipida (dislipidemija), kod osoba obolelih od shizofrenije koji su na terapiji atipičnim antipsihoticima (**Newcomer i sar., 2002; Grajales i sar., 2019; Kim i sar., 2019; Au i sar., 2025**). Sposobnost vezivanja antipsihotika za dopaminske, ali i serotoninske, adrenergičke i histaminske receptore, dovodi se u vezu sa nastankom zapaženih metaboličkih efekata kod pacijenata na terapiji ovom grupom lekova. U zavisnosti od tipa primenjenog antipsihotika i njegove selektivnosti prema određenim receptorima, težine i trajanja same bolesti, vremenskog trajanja terapije i primenjene doze leka, kao i opšteg stanja pacijenta (pridružene hronične bolesti), disbalans metaboličke homeostaze ispoljava se u širokom opsegu vrednosti pojedinačnih biohemijskih parametara (**Grajales i sar., 2019; Kim i sar., 2019**).

Poređenjem podataka kliničkih studija o efektima terapija različitim atipičnim antipsihoticima (klozapinom, ziprazidonom i sertindolom), na promenu telesne mase pacijenata, nađene su značajne razlike između različitih antipsihotika. Pacijenti na terapiji klozapinom imali su najveći rizik od povećanja telesne mase, dok je ovaj rizik na terapiji ziprazidonom bio najmanji. Između ove dve krajnosti bili su pacijenti na terapiji sertindolom, koji izaziva umereno dobijanje na masi, što se objašnjava visokim afinitetom za 5-HT_{2C} receptore (**Kingsbury i sar. 2001; Newcomer i Nasrallah, 2004; Muscatello i sar., 2010; Meltzer, 2012; Patel i sar., 2014**).

Podaci o efektima sertindola na promene u metabolizmu glukoze i lipida nisu potpuni. U kratkoročnoj studiji dobijeno je manje povećanje nivoa glukoze, holesterola i triacilglicerola u plazmi pacijenata sa shizofrenijom na terapiji sertindolom (**Perquin i Steinert, 2004**). Hroničan tretman klozapinom povećava rizik od diabetes melitusa tipa II, dijabetične ketoacidoze i dislipidemije, kao rezultat insulinske rezistencije (**Meltzer, 2012**). Međutim, faktori kao što su stil života, uključujući ishranu, i osetljivost na metaboličke probleme prisutne u shizofreniji, mogu umanjiti nepovoljne metaboličke posledice delovanja klozapina. Dostupni podaci o terapiji ziprazidonom sugerišu da lek nema negativan uticaj na serumske nivoe glukoze i lipida (**Pappadopoulos i sar., 2012**). Uočene razlike u metaboličkim efektima antipsihotika druge generacije treba imati u vidu prilikom izbora terapijskog pristupa, posebno kod povećanog naslednog rizika od razvoja pojedinih hroničnih bolesti, kao što su dijabetes, hiperlipidemije, hiperholesterolemija, gojaznost, bolesti srca i drugo.

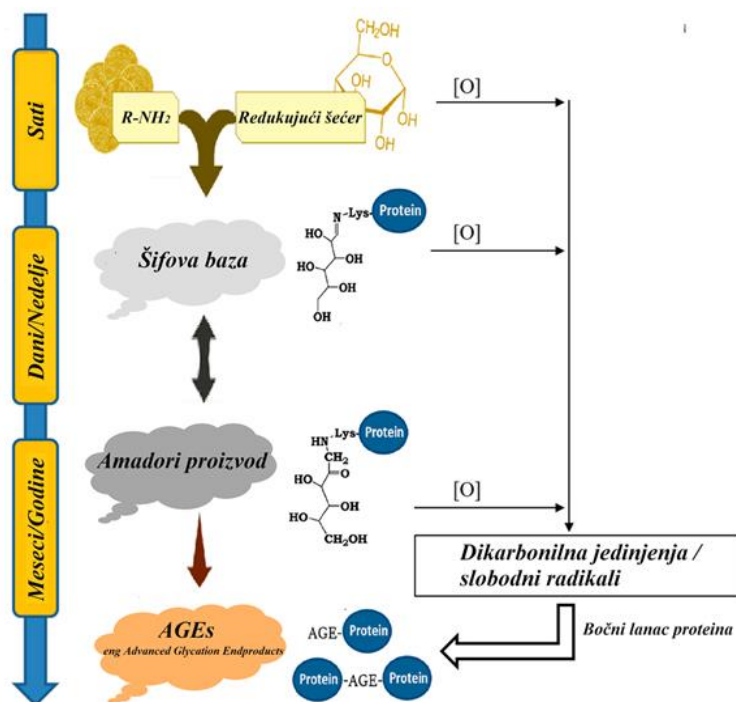
2.4.1. Karbonilni stres u shizofreniji

U shizofreniji je povećan rizik od razvoja hiperglikemije i dijabetesa zbog disbalansa dopaminskih puteva i neželjenih dejstava primene atipičnih antipsihotika. Svako povećanje koncentracije glukoze u krvi iznad fizioloških vrednosti može da dovede do karbonilnog stesa, koji se, pored oksidativnog stresa, navodi kao jedan od glavnih razloga razvoja brojnih

patoloških stanja (Thornalley, 2008; Oetl i sar., 2008; Matsuyama i sar., 2009; Sebekova i sar., 2012; Guerin-Dubourg i sar., 2012).

2.4.2. Neenzimsko glikozilovanje u shizofreniji

Neenzimsko glikozilovanje (glikacija), ili Milardova reakcija, predstavlja mrežu spontanijh, neenzimskih reakcija redukujućih šećera (npr. glukoze, galaktoze, manoze, riboze ili fruktoze) sa nukleofilnim grupama proteina, lipida i nukleinskih kiselina, koje dovode do promene strukture i funkcije ovih biomolekula. Milardova reakcija najčešće započinje spontanom reakcijom karbonilne grupe redukujućeg šećera sa slobodnom amino grupom proteina (α -amino grupom na N-terminalnom kraju ili ϵ -amino grupom izloženih lizinskih bočnih ostataka), što u toku nekoliko dana ili nedelja dovodi do formiranja reverzibilne Šifove baze. Šifova baza je u ravnoteži sa slobodnim redukujućim šećerom (najčešće glukozom) u rastvoru i sa ireverzibilnim Amadori proizvodom koji nastaje usled spore reakcije premeštanja, tj. keto-enolne tautomerizacije Šifove baze. Amadori proizvodi, daljim preuređivanjem, kroz reakcije premeštanja, ciklizacije, oksidacije ili dehidratacije, formiraju čitav niz različitih proizvoda koji se zajedničkim imenom zovu krajnji proizvodi glikacije (AGEs, engl. Advanced Glycation Endproducts) (Slika 7) (Younus i Anwar, 2016).



Slika 7. Vremenska skala reakcije glikacija proteina i formiranja AGEs. Adaptirano prema Sirangelo i Iannuzzi, 2021.

U fiziološkim uslovima nastajanje AGEs je spor proces, koji traje mesecima ili godinama. Brojne studije ukazuju na akumulaciju AGEs i njihovu ulogu u razvoju i napredovanju različitih bolesti (ateroskleroza, dijabetes, neurodegenerativni poremećaji i shizofrenija) (Thornalley, 2008; Oetl i sar., 2008; Matsuyama i sar., 2009; Sebekova i sar., 2012; Guerin-Dubourg i sar., 2012; Arai i sar., 2010; Toyoshima i sar., 2019; Ishida i sar., 2022). Većina ovih patofizioloških stanja praćena je i oksidativnim stresom, u toku kojeg dolazi do povećane oksidacije molekula glukoze i drugih redukujućih šećera do još reaktivnijih dikarbonilnih

jedinjenja (glioksala, metilglioksala i 3-deoksiglukozona), koji dodatno indukuju nastajanje AGEs. U studiji **Arai i sar. (2010)** primećeni su povišeni nivoi pentozidina (AGEs biomarker) i smanjeni nivoi piridoksala (vitamina B6, koji inhibira stvaranje AGEs) u serumu pacijenata obolelih od shizofrenije. Studija **Ishida i sar. (2022)** je pokazala da kod pacijenata obolelih od shizofrenije dolazi do nagomilavanja depozita pentozidinskih jedinjenja u specifičnim moždanim strukturama (kora velikog mozga i vizuelni korteks), što je mogući uzrok pojave specifičnih simptoma shizofrenije povezanih sa funkcijom ovih moždanih struktura. U revijskom radu **Kouidrat i sar. (2015)** podržana je hipoteza da postoje povišeni nivoi AGEs kod pacijenata obolelih od shizofrenije, merenjem cirkulišućih nivoa AGEs ili autofluorescencijom kože.

Iako rezultati studija sugerišu učešće povišenih AGEs i oksidativnog stresa u razvoju shizofrenije, potrebna su dodatna ispitivanja za rasvetljavanje molekulskih mehanizama koji povezuju nastanak ROS i AGE sa patogeneom bolesti. Nepotpuno je i razumevanje genetskih i faktora sredine (ishrana, pušenje, socio-ekonomski status, pridružene hronične bolesti, vrsta antipsihotika koja se koristi u terapiji shizofrenije, itd.) koji utiču na razvoj i tok shizofrenije.

Usled svega navedenog u ovom i prethodnim odeljcima, postoji široko interesovanje i potreba za proučavanjem shizofrenije sa različitih aspekata. S tim u vezi, opšti cilj istraživanja ove disertacije bio je ispitivanje efekata primene tri u kliničkoj praksi mnogo korišćena oralna atipična antipsihotika (klozapina, ziprazidona i sertindola) na antioksidativnu sposobnost HSA.

2.5. Humani serum-albumin

Pored unutarćelijskih enzima (SOD, GPX i CAT) i malih neproteinskih molekula (vitamini C, A i E, β -karoten, mokraćna kiselina, bilirubin i GSH) i brojni proteini (HSA, transferin, haptoglobin, ceruloplazmin i metalotionin) imaju važnu antioksidativnu ulogu u telu (**Halliwell i Gutteridge, 2012**).

2.5.1. Funkcije i značaj HSA

HSA je najzastupljeniji (odrasli: 35–50 g/L, deca 35–54 g/L; 40–60 % ukupnih proteina plazme) multifunkcionalni, ne-glikozilovani, negativno naelektrisani protein plazme, sa izoelektričnom tačkom pH 4,6 (**Peters, 1996**). Pored krvi, u kojoj se nalazi jedna-trećina ukupne količine HSA u organizmu, ostatak HSA se nalazi u limfi, cerebrospinalnoj tečnosti, mleku, sinovijalnoj tečnosti, mišićima, koži i drugim tkivima. HSA se iz cirkulacije do ovih delova organizma doprema prostom difuzijom, kroz diskontinualne kapilare, ili se aktivno preuzima preko specijalizovanih HSA-transportera u plazminoj membrani (**Merlot i sar., 2014**).

Kao najzastupljeniji protein plazme (prosečna koncentracija oko 640 μ M), HSA značajno doprinosi održanju osmotskog pritiska i pH krvi, kao i distribuciji tečnosti između unutarvaskularnog i vanvaskularnog prostora. HSA poseduje još nekoliko važnih fizioloških funkcija: transportna, antioksidativna, zaštita od teških metala i nekih toksičnih supstanci. Ove uloge HSA sa jedne strane potiču od jedinstvene strukture molekula HSA, koja omogućava reverzibilno vezivanje i prenošenje brojnih supstanci endogenog ili egzogenog porekla (MK, bilirubin, hematin, glukoza, žučni pigmenti, metalni joni, lekovi, pesticidi, toksini) kroz cirkulaciju (**Quinlan i sar., 2005**). Sa druge strane, funkcije HSA u krvi, kao antioksidativna i zaštitna, kod toksičnog delovanja nekih supstanci, omogućene su njegovom visokom koncentracijom u odnosu na druge proteine, kao i sposobnošću nekih bočnih amino-kiselinskih

ostataka u molekulu (Cys, Met, Lys i Arg) da direktno reaguju sa jonima teških metala, nekim toksinima, ROS i drugim vrstama koji mogu biti toksični po organizam.

2.5.2. Metabolizam i struktura HSA

Homeostaza HSA u plazmi je pod kontrolom tri procesa: brzina sinteze, brzina razgradnje i brzina prelaska HSA iz kapilarnog prostora u okolna tkiva (**Peters, 1996**). Sinteza HSA se odvija u jetri, u količini oko 15 g na dan (**Van der Vusse, 2009**); u jetri se kataboliše oko 40% dnevno sintetisanog HSA. Ostatak HSA pre svega se kataboliše u mišićima i koži (oko 50%), a preostalih 10% se gubi u gasto-intestinalnom traktu, ili putem urina (**Peters, 1996**). U normalnim fiziološkim uslovima, molekul HSA ima poluživot oko 20 dana (**Rondeau i Bourdon, 2011**).

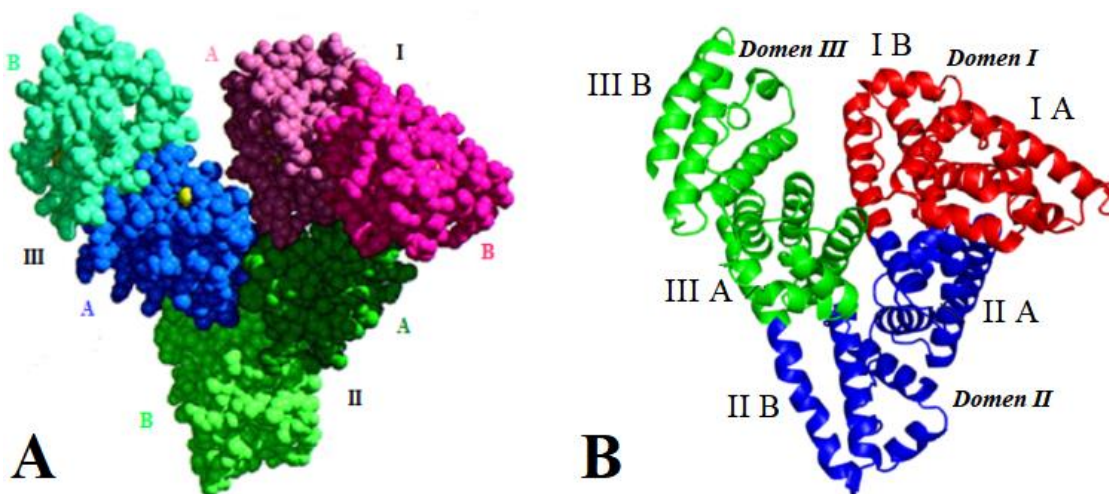
HSA, zajedno sa α -fetoproteinom, proteinom G komplementa, vitamin D-vezujućim proteinom i α -albuminom, čini multigensku familiju proteina, sa genima u blizini centromere na dužem kraku četvrtog hromozoma (**Peters, 1996**). Sinteza HSA započinje nastajanjem primarnog transkripta gena od 19011 nukleotida u nizu, od 14 introna i 15 egzona (**Minghetti i sar., 1986**). Nakon postranskripcione obrade, sintetiše se HSA u obliku prealbumina (609 amino-kiselinskih ostataka), na rapavom endoplazmatičnom retikulumu (**Feldhoff i sar., 1977**). Kada novosintetisani polipeptidni lanac HSA uđe u endoplazmatični retikulum, signalna peptidaza odseca signalnu sekvencu od 18 amino-kiselinskih ostataka i nastaje proalbumin (591 amino-kiselinskih ostataka). Uz pomoć šaperona, novosintetisani polipeptidni lanac se uvija u nativnu konformaciju, približavanjem cisteinskih bočnih ostataka udaljenih u primarnoj sekvenci i postepenim formiranjem svih disulfidnih mostova od N-kraja proteina, već posle 30 s od završetka sinteze celog polipeptidnog niza (**Ellis i van der Vies, 1991; Peters, 1996**). Proalbumin se potom iz endoplazmatičnog retikuluma vezikulama transportuje do Goldžijevog aparata, gde se u trans-Goldžijevom kompleksu sa N-kraja proalbumina odseca sekvenca sastavljena od tri bazna i tri hidrofobna aminokiselinska ostatka, uz nastajanje zrelog HSA, koji se pakuje u velike vezikule koje se iz hepatocita sekretuju u cirkulaciju (**Saucan i Palade, 1994**).

HSA je globularni protein (66,4 kDa), sastavljen od 585 amino-kiselinska ostatka. Usled velike zastupljenosti i lakoće izolovanja, sredinom prošlog veka počelo je određivanje amino-kiselinskog sastava i sekvence u molekulu HSA; 1975. godine objavljena je kompletna sekvenca molekula HSA (**Slika 8**) (**Behrens, 1975; Meloun i sar., 1975**).

```
60 MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPF
120 EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
180 ERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF
240 AKRYKAAFTECQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAV
250 ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
360 ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
420 RHPDYSVVLLRLAKTYETLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE
480 QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
540 LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
600 EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV
609 AASQAALGL
```

Slika 8. Primarna struktura molekula HSA. Signalna sekvenca od 18 amino-kiselinskih ostataka (crveno) se odseca u endoplazmatičnom retikulumu, a od 6 amino-kiselinskih ostataka u trans-Goldžijevom aparatu (bordo). Roze, zelenom i plavom bojom označeni su, redom, ostaci amino-kiselina u domenima I, II i III HSA.

U primarnoj strukturi HSA zastupljen je veliki procenat pozitivno i negativno naelektrisanih amino-kiselinskih ostataka i mali procenat ostataka glicina i metionina, dok je prisutan samo jedan triptofanski ostatak na poziciji 214 (**Carter i Ho, 1994**). Analiza sekundarne strukture HSA pokazala je da 67% amino-kiselinskih ostataka učestvuje u formiranju heliksa, koji su spojeni polipeptidnim lancem uređene strukture, bez prisustva β -pločica. Tek posle dobijanja kristalografske slike molekula HSA, prvo sa rezolucijom od 6 Å (**Carter i sar., 1989**), koja je potom potvrđena sa boljom rezolucijom od 3,2 Å (**He i Carter, 1992**), ustanovljeno je da molekul HSA ima srcoliki oblik (**Slika 9A**). Molekul HSA se sastoji od 3 homologna domena (označena sa I, II i III), koji su izgrađeni od 10 α -heliksa, a svaki domen čine dva subdomena (označena sa A i B), redom sastavljena od 4 i 6 α -heliksa (**Slika 9B**). Na molekulu HSA uočava se „glava“, koju formiraju čvrsto upakovani domeni IA, IB i IIA, i „rep“, formiran od subdomena IIB, IIIA i IIIB (**Peters, 1996; Ascenzi i Fasano, 2010**).



Slika 9. Prikaz tercijarne (A) i sekundarne strukture (B) molekula HSA, sa označenim domenima (I, II i III) i subdomenima (A i B). Adaptirano prema **Mishra i Heath (2021)**.

Jedinstvena trodimenzionalna srcolika struktura HSA, koju formiraju domeni i subdomeni sa svojim heliksima, povezana sa 17 disulfidnih mostova između ostatka cisteina koji slede jedan za drugim u primarnoj sekvenci proteina, značajno doprinose izuzetnoj konformacionoj fleksibilnosti i stabilnosti molekula HSA. Fleksibilnost molekula HSA, kao i formiranje više šupljina unutar trodimenzionalne strukture molekula, odgovorna je za osnovnu funkciju HSA, a to je vezivanje i transport brojnih supstanci. Sa druge strane, neparan broj cisteinskih ostataka (35 ostataka) u primarnoj sekvenci HSA ima za posledicu da je (prvi) Cys ostatak na poziciji 34 slobodan i ne učestvuje u formiranju disulfidne veze. Ova slobodna tiolna (sulfhidrilna) grupa je odgovorna za (jednako važnu) antioksidativnu ulogu molekula HSA, čijem ostvarenju značajno doprinosi visoka zastupljenost HSA. Stoga se on smatra najznačajnijim antioksidansom u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (**Taverna i sar., 2013**).

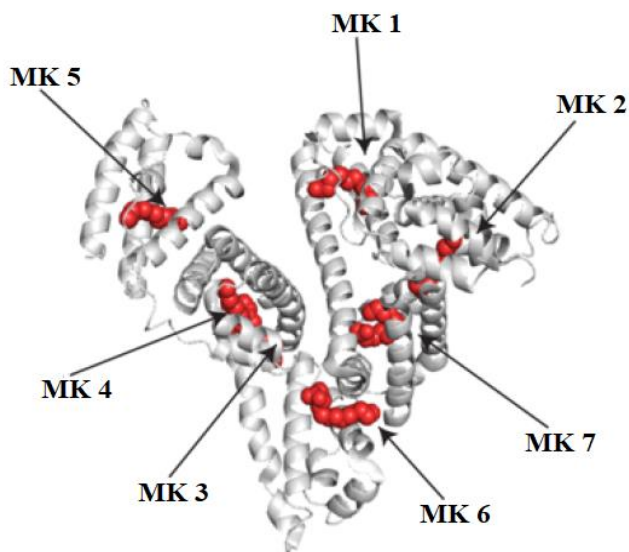
2.5.3. Transportna uloga HSA

Najvažnija funkcija HSA se zasniva na sposobnosti ovog molekula da reverzibilno vezuje različite ligande, kao što su MK, hormoni, vitamini, bilirubin, hem, lekovi, pesticidi, joni metala, i druge supstance, i da ih potom transportuje putem krvotoka do svih ćelija u organizmu

(Petitpas i sar., 2001; Quinlan i sar., 2005). Do sada je identifikovano više od 400 supstanci koje se vezuju za molekul HSA (Lexa i sar., 2014), pri čemu je sa fiziološkog i farmakološkog aspekta najvažnije vezivanje MK, glukoze i lekova.

2.5.3.1. Vezivna mesta na molekulu HSA za MK

HSA je primarni transporter za neesterifikovane, dugolančane, slobodne MK u cirkulaciji. U normalnim fiziološkim uslovima, koncentracija slobodnih MK u plazmi je oko 300–600 μM (natašte). Usled izuzetno niske rastvorljivosti MK u plazmi, dodatno smanjene usled dimerizacije dve MK preko jonizovanih karboksilnih grupa, 99,9% slobodnih MK se vezuje za molekul HSA. S obzirom na strukturnu raznolikost MK po pitanju dužine i zasićenja njihovih ugljovodoničnih lanaca, očekivano je da za njih postoji više vezujućih mesta na molekulu HSA. Primena različitih eksperimentalnih tehnika, kao kristalografija, NMR spektroskopija, ili dirigovana mutacija, omogućile su nalaženje tačne lokacije vezujućih mesta i njihov afinitet za MK (Curry i sar., 1998; Bhattacharya i sar., 2000; Kragh-Hansen i sar., 2002; Reichenwallner i Hinderberger, 2013). Ustanovljeno je da postoji sedam vezujućih mesta za MK, asimetrično raspoređenih unutar molekula HSA (Slika 10) (Kragh-Hansen i sar., 2002). U subdomenu IB se nalazi prvo vezujuće mesto za MK, dok se između dodirnih površina subdomena IA i IIA nalazi drugo. Tri vezujuća mesta za MK su smeštena u III domenu, treće i četvrto u subdomenu A, peto u subdomenu B. Šesto vezujuće mesto za MK na HSA je lokalizovano između dodirnih površina subdomena IIA i IIB, dok je sedmo mesto smešteno u subdomenu IIA (Curry, 2003). Studije su pokazale i da pored ovih sedam glavnih mesta, visokog ili umerenog visokog afiniteta za MK, postoji još 20 drugih vezujućih mesta niskog afiniteta unutar molekula HSA (Goodman i Gordon, 1958). Sa povećanjem dužine ugljovodoničnog lanca MK raste broj vezujućih mesta visokog afiniteta (Cistola i sar., 1987; Tonsgard i Meredith 1991; Otagiri i Chuang, 2009). Najviši afinitet za MK na HSA ustanovljen je, redom, za sledeća vezujuća mesta: peto, zatim drugo, a potom četvrto vezujuće mesto (Simard i sar., 2006).



Slika 10. Prikaz sekundarne strukture molekula HSA sa sedam vezanih molekula masnih kiselina (MK) (Mishra i Heath, 2021).

Iako ne postoje potpuno ista vezujuća mesta za MK na molekulu HSA, ustanovljeno je da se svako sastoji iz dva dela: hidrofobnog džepa od bočnih ostataka nepolarnih amino-kiselina i jednog ostatka polarne (uglavnom Ser ili Tyr) ili bazne (Lys ili Arg) amino-kiseline, na ili blizu površine džepa. Nepolarne amino-kiseline učestvuju u formiranju hidrofobnih sila sa nepolarnim ugljovodoničnim lancem MK, dok polarne ili bazne amino-kiseline formiraju elektrostatičke interakcije i vodonične veze sa jonizovanom karboksilnom grupom MK. Afinitet vezujućeg mesta za specifičnu MK određen je energijom koja se oslobađa tokom formiranja ovih veza. Kristalografske studije su pokazale da je molekul HSA izuzetno fleksibilan i da vezivanje MK za njega izaziva udaljšavanje domena I i III, što je praćeno otvaranjem centralne šupljine. Vezivanje MK izaziva i rotaciju jednih domena u odnosu na druge. Sve ove strukturne promene dovode do povećanja širine molekula HSA sa 80 na 90Å nakon vezivanja MK (**Curry i sar., 1998**). Kao posledica fleksibilnosti molekula HSA, u zavisnosti od pH sredine i prisustva vezanih liganda (MK i/ili lekovi) primećena su tri konformaciona oblika HSA: fast (F) oblik, na pH 2,3–4,3, normalan (N) oblik, na pH 4,3–8,0, sa vezanim ligandima i srcolikom konformacijom, i bazni (B) oblik, na pH >8,0 u odsustvu liganda (**Yamasaki i sar., 1999; Mattu i sar., 2001; Fasano i sar., 2002**). Sa fiziološkog aspekta, najznačajniji je normalni oblik molekula HSA, pošto on postoji u uslovima u krvi i drugim odeljcima organizma u kojima je distribuiran HSA.

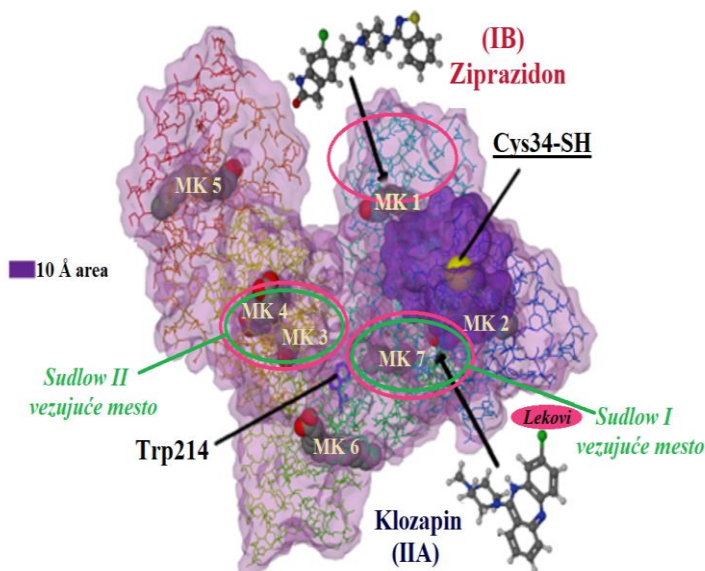
Na osnovu vrednosti HSA (0,52–0,75 mM) i slobodnih MK natašte (0,2–0,6 mM) u plazmi, pod normalnim fiziološkim uslovima je jedan do dva molekula MK vezano za molekul HSA. S obzirom na broj i afinitet vezujućih mesta za MK na HSA zaključuje se da ne postoji kompeticija između vezivanja pojedinačnih MK za protein, što je razlog da je 99,9% ukupnih slobodnih MK u plazmi vezano za HSA. U nekim patofiziološkim stanjima praćena poremećajem metabolizma lipida (dijabetes, metabolički sindrom, bolesti jetre i drugo), ili povećanim i/ili izmenjenim energetskim zahtevima organizma (intenzivni fizički rad ili gladovanje), dolazi do povećane lipolize. Kao posledica toga, koncentracija slobodnih MK u plazmi raste, a to dovodi do povećanja broja molekula MK vezanih za HSA (do 6 molekula MK na HSA) (**Spector, 1986; Brodersen i sar., 1990; Cistola, 1991; Peters, 1996; Curry i sar. 1998**).

2.5.3.2. Vezivna mesta na molekulu HSA za lekove

Pored MK, lekovi predstavljaju posebnu grupu liganda koju HSA vezuje i transportuje putem cirkulacije do mesta njihovog delovanja u organizmu (**Ghuman i sar., 2005**). Ova karakteristika HSA je od izuzetnog značaja za farmakokinetiku nekog leka, pošto povećava rastvorljivost leka i njegovu distribuciju, te utiče na njegovu dostupnost za farmakološko delovanje, metabolizam, deponovanje i ekskreciju. Stoga je od izuzetnog značaja u potpunosti identifikovati vezujuće mesto na molekulu HSA za dati lek, odrediti njegov afinitet (jačinu) vezivanja i ispitati mogući sinergistički ili antagonistički efekat istovremenog vezivanja drugih liganda u prisustvu leka.

U okviru molekula HSA identifikovana su tri vezujuća mesta za lekove, smeštena u IB, IIA i IIIA subdomenu. Dva glavna mesta vezivanja lekova se označavaju kao Sudlow I i Sudlow II mesto, u čast naučnika koji se bavio njihovom karakterizacijom (**Slika 11**) (**Sudlow i sar., 1975; Sudlow i sar., 1976**). Sudlow I vezujuće mesto za lekove lokalizovano je u IIA subdomenu i predstavlja prostrani džep u koji mogu da se smeste relativno veliki ligandi, kao što su anjonska heterociklična jedinjenja varfarin, fenilbutazon, oksifenbutazon, jodometacin, diflunisal, klozapin, i druga (**Ghuman i sar., 2005**). Zbog tipičnog vezivanja varfarina za ovo vezujuće mesto, česti korišćeni sinonim za Sudlow I je i varfarinsko vezujuće mesto. Za ovo vezujuće mesto vezuju se i drugi ligandi, poput MK (sedmo vezujuće mesto za MK), hormoni (tiroksin), šećeri (glukoza, fruktoza, galaktoza), kontrastna sredstva u medicini (npr. trijodbenzoat),

polifenoli, i druga jedinjenja (Ghuman i sar., 2005; Wang i sar., 2013; Xiao i sar., 2013; Awang i sar., 2017; Pongprayoon i Mori 2018; Zargar i Wani, 2021). Drugo glavno vezujuće mesto (Sudlow II) za lekove je smešteno u IIIA subdomenu HSA; ono formira šupljinu u kojoj se vezuju molekuli aromatične strukture, kao što su diazepam, ibuprofen, halotan i propofol (Carter i Ho, 1994; Petitpas i sar., 2001; Ghuman i sar., 2005). Zbog toga se za ovo vezujuće mesto za lekove koriste sinonimi diazepamsko ili ibuprofensko vezujuće mesto. Naravno, kao i u slučaju prvog vezujućeg mesta, pored lekova, za Sudlow II se vezuju i drugi ligandi, pre svega MK: treće i četvrto vezujuće mesto za MK se poklapa sa ovim vezujućim mestom (Slika 11). Za mali broj liganda, uključujući i neke lekove, kao što je antipsihotik ziprazidon, ustanovljeno je da se vezuju za vezivno mesto smešteno u IB subdomenu molekula HSA (Zsila, 2013). Ujedno, ovo vezujuće mesto se delimično preklapa sa prvim vezujućim mestom za MK (Slika 11).

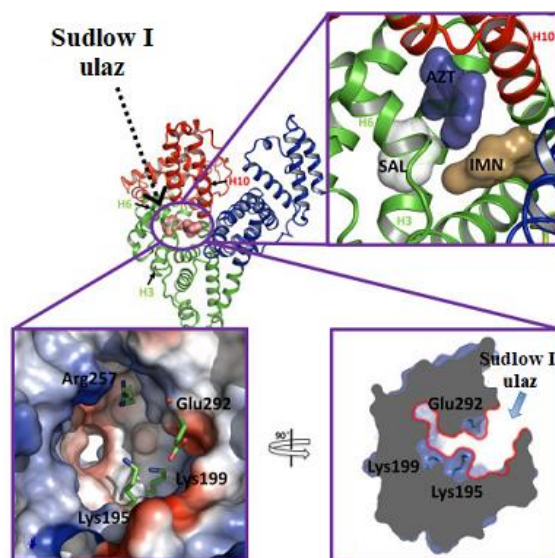


Slika 11. Asimetrična lokalizacija glavnih vezujućih mesta za MK (označeno žutim brojevima 1–7) i za lekove (roze krugovi) na molekulu HSA.

Na osnovu dosadašnjih saznanja o lokalizaciji vezujućih mesta za MK i lekove ona su asimetrično raspoređena unutar strukture molekula HSA i imaju različitu veličinu, afinitet i specifičnost/selektivnost prema određenom ligandu (Kragh-Hansen i sar., 2002). Usled preklapanja nekih vezujućih mesta za MK i lekove moglo bi se očekivati da dođe do kompeticije pri njihovom vezivanju. Pri normalnim fiziološkim uslovima, jedan do dva molekula MK vezana su za molekul HSA, verovatno najvećim delom za peto i drugo vezujuće mesto (najveći afinitet vezivanja MK). Kako se ova dva mesta za MK ne preklapaju sa mestima vezivanja za lekove, ali se nalaze u njihovoj neposrednoj blizini (Slika 11), istovremeno vezivanje MK i nekog leka moglo bi biti sinergističko ili antagonističko, uslovljeno finim promenama u strukturi molekula HSA tokom vezivanja liganda. Međutim, kada u patofiziološkim uslovima postoji porast broja vezanih molekula MK za molekul HSA, uz preklapanje vezujućih mesta MK i lekova, postoji mogućnost direktne kompeticije za vezujuća mesta koja se preklapaju. Na to koliko će jednog ili drugog liganda biti vezano za HSA utiču i njihove konstante afiniteta. Iako su ova razmatranja od značaja za farmakokinetiku lekova, ona su nedovoljno ispitivana i iskorišćena u kliničkoj praksi, pošto broj molekula MK vezanih za HSA značajno varira (Dobretsov i sar., 2010), a može uticati na transport lekova, njihovu dostupnost, efikasnost, detoksikaciju i eliminaciju.

2.5.3.3. Vezivno mesto na molekulu HSA za glukozu

Sposobnost HSA da vezuje monosaharide, poput glukoze, galaktoze i fruktoze, ostala je dugo skrivena, sve do 2013. godine kada su Wang i sar., izkristalisali molekule HSA u prisustvu šećera (**Wang i sar., 2013**). O vezivanju u vodi lako rastvornih šećera za HSA nije se pre toga ni pomišljalo, jer su ovi molekuli po svojoj strukturi i svojstvima bili suprotnost do tada poznatim ligandima koji se vezuju za HSA (nepolarne jedinjenja male rastvorljivosti u vodi, kao MK, heterociklični i aromatični ligandi kao što su lekovi, bilirubin, hem, vitamini i druge supstance). Pokazano je da se glukoza, fruktoza ili galaktoza vezuju za Sudlow I vezujuće mesto na HSA (**Wang i sar., 2013; Pongprayoon i Mori, 2018**). Kako je glukoza najzastupljeniji monosaharid u plazmi (3,5–5,5 mM), čija koncentracija nekoliko puta prevazilazi koncentracije drugih endogenih liganda koji se vezuju za HSA, poput MK, hema i bilirubina, za očekivati je da pod fiziološkim uslovima deo molekula HSA ima vezan molekul glukoze. Kristalografske studije su pokazale da se dva molekula glukoze vezuju za Sudlow I mesto (**Slika 12**) (**Wang i sar., 2013**). Jedan molekul glukoze (piranozni oblik) smešten je pri dnu Sudlow I vezujućeg mesta na molekulu HSA, između bočnih lanaca Leu238 i Ala291, slično vezivanju i mnogih lekova. Na ovom mestu piranozni prsten glukoze ostvaruje višestruke vodonične veze sa ostacima amino-kiselina u molekulu HSA, uključujući ostatke Tyr150, Arg222, His242 i Arg257. Drugi molekul glukoze nalazi se u linearnoj otvorenoj formi *kovalentno* vezan za Lys195 na samom ulazu u Sudlow I vezujuće mesto. Ostatak Lys199 iz Sudlow I vezujućeg mesta izgleda da katalizuje reakciju otvaranja piranoznog prstena glukoze. Neuobičajeno niska pK_a vrednost Lys199 (7,47), u poređenju sa drugim ostacima lizina u proteinu (npr. 10,76 za Lys195), posledica je uronjenosti ovog lizinskog ostatka u hidrofobni džep, što ga čini kiselijim i jačim donatorom protona. I fruktoza ima dva vezivna mesta na HSA u Sudlow I regionu, takođe za jedan molekul šećera u cikličnom, a drugi u linarnom obliku (**Wang i sar., 2013**).



Slika 12. Predložena mesta vezivanja dva molekula glukoze za Sudlow I vezujuće mesto na molekulu HSA (**Wang i sar., 2013**).

2.5.3.4. Vezivna mesta na molekulu HSA za druge ligande

Pored MK, HSA vezuje i transportuje i brojne druge nepolarne molekule, bilirubin (**Martin, 1949**), hem (**Wardell i sar., 2002**), vitamin D (**Bikle i sar., 1986**), žučne kiseline (**Farruggia i**

Pico, 1993), steroidne hormone (**Watanabe i sar., 1991**) i tiroksin (**Ghuman i sar., 2005**). Od pobrojanih molekula, vezivanje i transport bilirubina, krajnjeg proizvoda metabolizma hema, je od izuzetnog fiziološkog značaja. Usleg građenja unutarmolekulskih vodoničnih veza, bilirubin je praktično nerastvoran u vodi pod fiziološkim uslovima, iako u molekulu sadrži dve karboksilne grupe i nekoliko polarnih grupa koje bi mogle nagraditi vodonične veze sa molekulima vode. Od slezine, gde se odvija glavni deo (80%) katabolizma hema (ostatak je u kostnoj srži), nakon razgradnje starih i oštećenih eritrocita, nastali bilirubin se transportuje vezan za HSA do jetre, gde podleže konjugaciji sa glukuronskom kiselinom i potom izlučuje putem žuči. U studijama u kojima su korišćeni tripsinski fragmenti HSA, pokazano je da se bilirubin vezuje visokim afinitetom ($K_d = 10^{-7}$ – 10^{-8} M) (**Petersen i sar., 2000**) za IIA subdomen HSA (**Reed i sar., 1975**; **Sjodin i sar., 1977**; **Petersen i sar., 2000**). 2008. godine je kristalografski određena tačna lokalizacija vezujućeg mesta na molekulu HSA za bilirubin (**Zunszain i sar., 2008**), u okviru subdomena IB i njegovog hidrofobnog džepa L-oblika (**Slika 9**). Za IB subdomen HSA vezuje se i molekul hema (**Wardell i sar., 2002**), MK (prvo vezujuće mesto) i neki lekovi poput ziprazidona (**Zsila, 2013**). Steroidni hormoni testosteron i pregnenolon se vezuju za Sudlow II vezujuće mesto (**Fischer i sar., 1993**), a žučne kiseline, u zavisnosti od svoje polarnosti, za oba Sudlow vezujuća mesta (**Beckett i sar. 1981**; **Farruggia i Pico 1993**).

Pored anjonskih liganda (MK, anjonskih heterocikličnih lekovi, bilirubin, žučne kiseline i hem), HSA vezuje i različite katjonske ligande, kao jone metala: Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Au^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} i Fe^{2+} (**Lau i Sarkar, 1979**; **Laussac i Sarkar, 1984**; **Halliwell, 1988**; **Vallee i Falchuk, 1993**; **Peters, 1996**). Na N-kraju molekula HSA nalazi se tetrapeptid (Asp-Ala-His-Lys) odgovoran za specifično vezivanje jona Cu^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} (**Glennon i Sarkar, 1982**; **Laussac i Sarkar, 1984**; **Sadler i sar., 1994**), dok se joni Ag^+ , Au^+ i Hg^{2+} vezuju za Cys34 (**Lau i Sarkar, 1979**), a joni Zn^{2+} , Cd^{2+} i Al^{3+} za mesta unutar molekula HSA (**Giroux i Schoun, 1981**; **Sadler i sar., 1994**). Od svih pobrojanih jona metala koji se vezuju za HSA, joni Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} i Co^{2+} su esencijalni za normalno funkcionisanje organizma. HSA je glavni vezujući protein za Zn^{2+} jone u plazmi, dok se Cu^{2+} i Fe^{2+} u plazmi transportuju preko (za njih) specifičnih transportnih molekula (ceruloplazmin za Cu, a transferin za Fe) (**Loban i sar., 1997**). Od ukupno prisutne količine Cu^{2+} jona u plazmi, oko 10–15% je vezano visokim afinitetom za N-kraj molekula HSA. Formiranje helatnog kompleksa, u čijem centru je jon bakra, nikla ili kobalta, koji je okružen azotovim atomima koji potiču od terminalne amino grupe, prve dve peptidne veze, N atoma iz bočnog ostatka His i Lys, formira ovo visoko afinitetno mesto u HSA. Za razliku od bakra, HSA poseduje relativno slab, nespecifičan afinitet za Fe^{2+} jone. Zbog svoje visoke koncentracije u plazmi, značajan deo jona Fe^{2+} i Cu^{2+} može biti vezan za HSA. Zbog mnogo manjeg afiniteta vezivanja gvožđa za HSA u odnosu na bakar, verovatnije je da će slobodni joni gvožđa katalizovati nastajanje ROS (**Quinlan i sar., 2004**).

2.6. Humani serum-albumin kao antioksidans

2.6.1. Antioksidativna svojstva HSA određena vezivanjem liganda

Sposobnost HSA da reverzibilno vezuje različite ligande od značaja je i za njegovu antioksidativnu aktivnost. Ova uloga HSA se ostvaruje na više načina: vezivanjem liganda koji su osetljivi na oksidaciju (nezasićene MK), liganda koji imaju prooksidantnu ulogu (hem ili joni Cu^{2+} i Fe^{2+}) ili nastajanjem kompleksa HSA-ligand koji pokazuju (in)direktna antioksidativna svojstva, kao što je HSA-bilirubin kompleks.

PUFA veoma su podložne oksidaciji sa ROS, te se smatra da njihovo vezivanje u hidrofobne džepove vezujućih mesta na HSA sprečava njihov direktni kontakt sa ROS iz okruženja i oksidaciju (**Papathodorou i Weiss., 2007**).

Sposobnost HSA da vezuje Cu^{2+} i Fe^{2+} , i pored postojanja u cirkulaciji specifičnih transportnih proteina za ove jone (ceruplazmin 150–600 mg/L; transferin 2–3 g/L), od izuzetnog je fiziološkog značaja, pošto zbog visoke koncentracije HSA u plazmi (35–50 g/L) praktično nema prisutnih slobodnih (katalitičkih) jona ovih metala za neenzimsku Fentonovu reakciju, u kojoj od H_2O_2 nastaje visoko reaktivni i relativno dugo-živeći hidroksil-radikal (**Prousek, 2007**). Slobodan hem je još jedan izvor slobodnih Fe^{2+} jona u cirkulaciji, zbog čega se smatra da ima pro-oksidativna svojstva. Njegovo vezivanje za IB subdomen HSA (**Wardell i sar., 2002**), je zato jedan od mehanizama za ispoljavanje antioksidativnog delovanja HSA.

Neuzil i Stocker su pokazali da kompleks HSA i bilirubina pokazuje jače inhibitorno dejstvo na oštećenje lipida ili vitamina E peroksil-radikalima u odnosu na pojedinačne komponente ovih kompleksa (**Neuzil i Stocker, 1993; Neuzil i Stocker, 1994**).

2.6.2. Uloga Cys34 tiolne grupe HSA u odbrani od oksidativnog i karbonilnog stresa

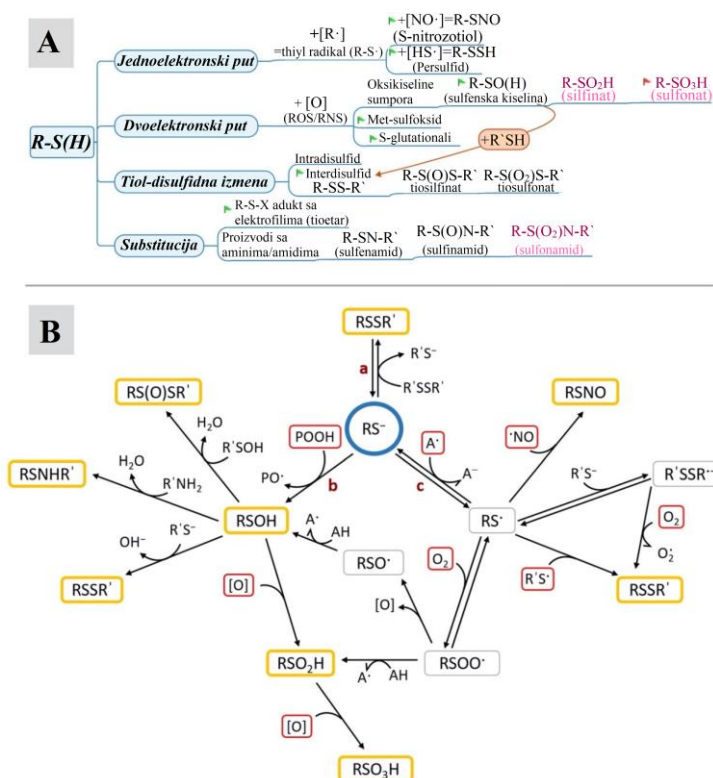
Zbog visoke koncentracije u plazmi (0,67 mM) i prisustva jedne slobodne Cys34 tiolne grupe u okviru IA subdomena, HSA je najvažniji redoks-regulatorni sistem u plazmi, vanećelijskoj i cerebrospinalnoj tečnosti (**Otagiri i sar., 2009; Peters, 1996**). Održanje redoks-homeostaze je ključno za telo i predstavlja skup sistema ili procesa čiji je osnovni zadatak održanje ravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa (**Descamps-Latscha i sar., 2001**). Pomeranje ove fine redoks-ravnoteže ka oksidantima dovodi do oksidativnog stresa, u drugom pravcu do reduktivnog stresa, koja mogu trajno da oštete organizma i budu uzročnici brojnih patoloških stanja uključujući i shizofreniju (**Pérez-Torres i sar., 2017; Chun i sar., 2021**).

U normalnim fiziološkim uslovima, između 70 i 80% molekula HSA ima Cys34 grupu u redukovanom (tiolnom) obliku (Cys34-SH), koja doprinosi od 370 μM do 474 μM ukupnom pulu tiola u plazmi (400–600 μM) (**Turell i sar., 2009**). Preostali molekuli HSA (oko 25%) poseduju Cys34 ostatak disulfidnom vezom povezan sa različitim malim tiolima u plazmi, kao što su cistein, GSH, homocistein, ili cisteinilglicin (**Turell i sar., 2009**). Najmanji udeo HSA Cys34 grupe (oko 1–2%) je oksidovan do različitih oksidacionih stanja (sulfenska, sulfonska i sulfinska kiselina), ili nitrozilovan sa NO do HSA-SNO. Činjenica da bočni ostatak Cys34 postoji u različitim oblicima ukazuje da pored antioksidativne uloge, kada tiolna grupa direktno reaguje sa nekim ROS (**Bourdon i Blanche, 2001**), on može imati i druge još nedovoljno eksperimentalnim podacima potkrepljene uloge. Zbog mogućnosti da Cys34 grupa reverzibilno veže male tiole ili NO , HSA ima i ulogu rezervoara ovih jedinjenja u plazmi. Tako na primer, NO je ćelijski glasnik uključen u regulaciju ćelijskih procesa kao što je vazodilatacija krvnih sudova, adhezija i agregacija trombocita, modulacija inflamatorne i anti-inflamatorne reakcije i drugo (**da Silva i sar., 2021**). U stanju hipertenzije ili inflamacije, kada je neophodno delovanje molekula NO , on bi se mogao otpustiti sa molekula HSA. Dalje, nitrozoalbumin (HSA-SNO) može preneti NO na niskomolekularne tiole (GSH, Cys, homocistein i druge), što omogućava vraćanje HSA-Cys34 grupe u redukovani oblik (**Taverna i sar., 2013**).

Efikasnost HSA Cys34-SH grupe da učestvuje u reakciji sa različitim molekulima iz okruženja određena je njenom dostupnošću i reaktivnošću (**Bonanata i sar., 2017**). Cys34 bočni ostatak se nalazi u hidrofobnom džepu na površini IA subdomena, u kome je samo 12,6% tiolne grupe dostupno spoljašnjoj sredini (**Gerstein, 1992**). Pozicioniranje Cys bočnog ostatka u ovaj džep

menja njegovu reaktivnost, usled prisustva susednih bočnih amino-kiselinskih ostataka koji odvlače proton sa –SH grupe. Tiolna grupa u ovakvom okruženju postaje jači nukleofil: pK_a vrednost je oko 7,3, niža od vrednosti za tiolnu grupu na površini proteina (pK_a od 8,1).

Istraživanjem mehanizama i povezanosti pojedinih reakcija Cys34-SH grupe tokom kojih se ona prevodi u navedene oblike, ustanovljeno je da sulfenska kiselina (HSA-SOH) zauzima centralnu poziciju (Turell i sar., 2009). Ovaj oksidovani oblik tiolne grupe dualnog karaktera (nukleofil i elektrofil), koji nastaje kroz višestepenu radikalsku ili direktnu oksidaciju, nalazi se na raskrsnici reverzibilnih ili ireverzibilnih modifikacija tiolne grupe Cys34 (Slika 13). Naime, nastala HSA-SOH može da reaguje sa malim tiolima iz plazme i da nagradi mešovite disulfide cisteina, homocisteina, GSH, cisteinilglicina, koji se u prisustvu nekog tiolnog reagensa reverzibilnom reakcijom, uz i bez posredovanja enzima, mogu prevesti do slobodne Cys34 tiolne grupe i malih tiola (Roche i sar., 2008). Kondezacijom dva molekula sulfenske kiseline nastaje tiosulfinat (HSA-S(O)SR), dok amid (RSNHR') nastaje u reakciji HSA-SOH i R'NH₂ i on se može ponovo redukovati do slobodne tiolne grupe (Allison i sar., 1973). Nasuprot ovim reverzibilnim modifikacijama sulfenske kiseline, sulfinska kiselina (RSO₂H) i sulfonska kiselina (RSO₃H) nastaju ireverzibilnom dvostepenom oksidacijom sulfenske kiseline. U prisustvu povećanog nastajanja oksidujućih vrsta u patološkim stanjima, raste udeo mešovitih disulfida i ireverzibilnih oksidacionih oblika HSA-Cys34 grupe (Quinlan i sar., 2005).



Slika 13. (A) Kompletna shema reakcija koje generišu proizvode oksidacije tiola u biološkim sistemima. Zelene zastavice označavaju reverzibilne reakcije, a crvena zastavica ireverzibilnu reakciju. Tekst istaknut fuksijom označava proizvode koji se možda ne javljaju pod biološkim uslovima. (B) Oksidacija tiolne grupe albumina; plavi i crveni okviri sadrže reagense, a žuti obuhvataju proizvode reakcija (Poimenova i sar., 2024).

Tiolna grupa Cys34 HSA pored antioksidativne, ima ulogu i u odbrani od karbonilnog stresa. Karbonilni stres opisuje se kao stanje povećanja koncentracije karbonilnih (glukoza, galaktoza, fruktoza) i dikarbonilnih (glioksal, metilglioksal) jedinjenja, koji u hemijskim reakcijama modifikuju dostupne bočne amino-kiselinske ostatke Lys, Arg i Cys u proteinima. U strukturi HSA nalazi se 59 lizinskih, 24 argininska i samo jedan cisteinski ostatak. Međutim, pored ukupno 83 lizinska i argininska ostatka u molekulu HSA, koji mogu da se modifikuju tokom karbonilnog stresa, u *in vivo* uslovima nađeno je samo 13 ostataka lizina i 6 ostataka arginina, od kojih se primarno modifikuju Lys525 i Arg410 (**Rondeau i Bourdon, 2011**). Iako je u strukturi HSA prisutna samo jedna slobodna tiolna grupa, ona je pri fiziološkim uslovima jači nukleofil od amino- i guanidino-grupe i brzo reverzibilno reaguje sa karbonilnom grupom dajući hemitioacetal (**Aćimović i sar., 2010**). Formirani hemitioacetal, kao i Šifova baza, može dalje da se preuređuje i, na kraju, nagradi AGEs, odgovorne za umrežavanje proteina (**Desai i sar., 2010**).

2.6.3. HSA – marker oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima

U cilju procene oksidativnog stresa u različitim patofiziološkim stanjima, predloženi su njegovi markeri, uključujući određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije neproteinskih i proteinskih komponenti sistema antioksidativne zaštite (**Vona i sar., 2021**). Krv, koja je u kontaktu sa svim ćelijama organizma, predstavlja dostupan biološki materijal pogodan za određivanje markera oksidativnog stresa. Pored enzima antioksidativnog stresa i koncentracije antioksidativnih vitamina C i E, određivanje ukupnih tiola u plazmi ili serumu je jedan od najčešće određivanih parametara procene redoks statusa (**Huang i sar. 2010; Topcuoglu i sar., 2017; Poimenova i sar., 2024**). Sadržaju ukupnih tiola u plazmi zajedno doprinose nisko molekularni slobodni tioli i tioli proteina plazme. Kako su slobodni mali tioli (cistein, GSH, homocistein, cisteinilglicin) zastupljeni u nisko mikromolarnoj koncentraciji (**Turell i sar., 2013**), HSA, zbog svoje visoke koncentracije u plazmi i slobodne Cys34 grupe, sa oko 80% doprinosi ukupnom sadržaju tiola plazme, i zato je pogodan marker za procenu oksidativnog statusa. S obzirom da se cisteinski ostatak nalazi u šupljini unutar IA domena (**Bonanata i sar., 2017**), i da dostupnost i reaktivnost Cys34 može biti modifikovana vezivanjem različitih liganda za vezivna mesta u blizini Cys34 ostatka, ili usled modifikacija HSA oksidativnim ili karbonilnim vrstama (**Pavićević i sar., 2014; Takić i sar., 2016; Penezić i sar., 2019; Takić i sar., 2023**), sve više se određuje sadržaj HSA-SH grupe kao parametra oksidativnog stresa.

Ustanovljeno je da sadržaj HSA-SH opada usled oksidativnog stresa uključenog u etiologiju dijabetesa, metaboličkog sindroma, bolesti jetre, bubrega i nervnog sistema, opstruktivnoj apnei i drugim patološkim stanjima, kao i usled intenzivne fizičke aktivnosti (**Guerin-Dubourg i sar., 2012; Matsuyama i sar., 2009; Oetl i sar., 2008; Otagiri i Chuang, 2009; Takić i sar., 2023**).

Sadržaj HSA-SH grupa u shizofreniji, u čijoj etiologiji učestvuje oksidativni stres, koliko je nama poznato, nije određivan, ali postoje studije u kojima je ispitan nivo ukupnih slobodnih tiola u plazmi (**Huang i sar., 2010; Topcuoglu i sar., 2017**). Najznačajniji zaključak studije **Huang i sar. (2010)** je da su pacijenti u akutnoj fazi shizofrenije imali znatno niže nivoe slobodnih tiola u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat je kompatibilan sa teorijom nedostatka GSH u bolesti (**Do i sar., 2000; Grima i sar., 2003; Berk i sar., 2008**). Dalje, nađen je i statistički niži nivo slobodnih tiola nakon 4 nedelje terapije antipsihoticima. Rezultati ovih studija pokazuju narušenu redoks-homeostazu kod pacijenata obolelih od shizofrenije, ali i da sama terapija može dodatno da naruši redoks-homeostazu (**Huang i sar., 2010**).

2.7. Fiziološki značaj istovremenog vezivanja različitih liganda na uloge human serum-albumina

HSA predstavlja jedinstven protein po broju i raznovrsnosti uloga koje obavlja. S obzirom da na njemu postoji više asimetrično raspoređenih vezujućih mesta za uvek prisutne endogene ligande (MK, glukoza, bilirubin, hem, Cu^{2+} , Fe^{2+} i Co^{2+}) i egzogene ligande kao što su lekovi, važno je razumeti kako simultano vezivanje pojedinih liganda utiče na transportnu i antioksidativnu ulogu HSA. Specifična strukturna organizacija HSA obezbeđuje proteinu izuzetnu strukturnu fleksibilnost, a vezivanje MK za HSA praćeno je takođe značajnim promenama u strukturi molekula HSA (Curry i sar., 1998; Curry i sar., 1999) čiji fiziološki značaj nije ustanovljen. Kako HSA doprema MK do različitih ćelija na kojima postoje specifični receptori za HSA (Luiken i sar., 1997; Schnitzer i Oh, 1994), smatra se da su ovi receptori sposobni da selektuju strukture molekula HSA sa vezanim MK. Njihovim odabirom povećava se efikasnost dopremanja MK do ćelija kada je za njima povećana potreba (izvori energije), kao kod intenzivnog fizičkog rada (Takić i sar., 2023). Drugo objašnjenje značaja strukturnih promena koje prate vezivanje MK za HSA, kristalografski potvrđeno, je da neka vezujuća mesta za MK nisu potpuna, i da po vezivanju MK, usled konformacionih promena u proteinu, dolazi do formiranja potpuno komplementarnog vezujućeg mesta za ligand (Curry i sar., 1998). Fiziološki značaj postojanja nepotpuno formiranih vezujućih mesta za MK je razumljiv, s obzirom da se MK međusobno razlikuju po dužini i stepenu zasićenja ugljovodoničnih lanaca.

Postojanje alosternog efekta je drugi značajan fenomen otkriven tokom istovremenog vezivanja liganda za različita vezujuća mesta na HSA. Ustanovljeno je da hem, vezan za I domen, alosterno utiče na vezivanje varfarina za Sudlow I vezujuće mesto i obrnuto, dok nije pokazana alosterija u vezivanju lekova, poput ibuprofena ili diazepama, i vezivanju hema za Sudlow II mesto (Baroni i sar., 2001; Ascenzi i sar., 2005; Bocedi i sar., 2005). Sa druge strane, vezivanje glukoze ili fruktoze za Sudlow I vezujuće mesto pospešuje vezivanje MK u Sudlow II mesto (Wang i sar., 2013), ili, glikozilovanje Cys34 grupe metilglioksalom dovodi do promene kapaciteta N-kraja HSA da vezuje Co^{2+} (Penezić i sar., 2019). Zapaženi fenomen međusobnog uticaja vezivanja liganda za različita vezujuća mesta na molekulu HSA objašnjava se prostornom udaljenošću vezujućih mesta. Ako su dva vezujuća mesta na proteinu prostorno relativno blizu jedno drugom (vezujuće mesto za hem i Sudlow I ili N-kraj i Cys 34 ostatak), ili se ona dodiruju (Sudlow I i Sudlow II), konformaciona promena izazvana vezivanjem liganda unutar jednog vezujućeg mesta prenosi se i na drugo vezujuće mesto.

Kako su MK fiziološki najznačajniji ligandi koji se vezuju za molekul HSA, čiji broj značajno varira u zavisnosti od patofiziološkog stanja, efekti istovremenog vezivanja MK i vezivanje drugih liganda (lekovi, polifenoli) za HSA mogu biti dvojak. Kada se ispitivani ligandi vezuju za različita vezujuća mesta između kojih postoji alosterni efekat, vezivanje jednog liganda će stimulisati vezivanje drugog, međutim, ako se vezuju za isto vezujuće mesto dolazi do kompeticije, gde prisustvo jednog liganda smanjuje konstantu afiniteta drugog (Chuang i Otagiri, 2002; Fanali i sar., 2005; Takić i sar., 2016).

HSA ima relativno dug poluživot od oko 20 dana, tako da je očekivati da, nakon sinteze i oslobađanja iz jetre, ovaj protein tokom svog polu-života prolazi kroz različite faze neenzimskih modifikacija u reakciji sa glukozom i/ili ROS. Glukoza kao najzastupljeniji, uvek prisutan mali organski ligand u plazmi, čija koncentracija značajno raste u bolestima kao što je dijabetes, metabolički sindrom, ili tokom terapije shizofrenije antipsihoticima, može u većem stepenu da modifikuje molekul HSA, osim što se vezuje za Sudlow I vezujuće mesto (Wang i sar., 2013).

Ustanovljeno je da se vezivanjem šećera za molekul HSA menja naelektrisanje, sekundarna i tercijarna struktura proteina, usled vezivanja glukoze za pozitivno naelektrisane amino-grupe ili promenom konformacije molekula HSA, vezivanjem voluminoznog hidrofilnog ostatka glukoze na dostupna mesta u molekulu HSA (**Rondeau i Bourdon, 2011**). Sve ove strukturne promene HSA mogu da se reflektuju na promenu njegove funkcije: može doći do promene afiniteta HSA prema pojedinim ligandima, formiranja novih vezujućih mesta na molekulu, ili se menja antioksidativni kapacitet HSA, usled povećanja ili smanjenja dostupnih vezujućih mesta za pro-oksidante, ili zbog promene dostupnosti i reaktivnosti amino-kiselinskih bočnih ostataka zaslužnih za antioksidativnu ulogu proteina (**Otagiri i Chuang, 2009**). Pored zapaženih strukturnih i funkcionalnih promena u HSA, moguća je i promena njegove stabilnosti. Na primer, usled oksidativnog ili karbonilnog stresa, obeležja shizofrenije i terapije nekim antipsihoticima, brža je eliminacija molekula HSA iz cirkulacije u odnosu na fiziološka stanja (**Matsuyama i sar., 2009**).

Kakav i koliki je međusobni uticaj svih ovih faktora na uloge HSA mora se dalje istraživati, jer odstupanje od normalnih fizioloških uslova može značajno izmeniti uloge HSA. Jedan od primera je da molekul HSA od antioksidansa može postati pro-oksidans usled povećanja broja MK vezanih za HSA, kada dolazi do kompeticije MK i hema za prvo vezujuće mesto za MK u IB subdomenu, ili se tokom oksidativnog i/ili karbonilnog stresa HSA-Cys34 ostatak modifikuje, menja lokalnu strukturu proteina i smanjuje afinitet N-kraja HSA za jone metala (**Gryzunov i sar., 2003; Penezić i sar., 2019**).

Budući da je shizofrenija patofiziološko stanje koje se najčešće javlja do 35. godine života, zahtevajući doživotnu terapiju lekovima koji se takođe pored endogenih molekula vezuju za HSA, njihovo međudejstvo na strukturu HSA, posledično i na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe, postaje sve kompleksnije. Krajnji efekat vezivanja različitih liganda za HSA na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe Cys34 uslovljeno je afinitetima pojedinačnih liganda za molekul HSA. Poslednjih godina fokus naučnih istraživanja sve više se usmerava na određivanje sadržaja Cys34 tiolne grupe HSA kao specifičnijeg markera za procenu stepena oksidativnog ili karbonilnog stresa, a ne na sadržaj ukupnih tiola u različitim patološkim stanjima. Zato je važno dubinski razumeti sinergističke i/ili antagonističke efekte simultanog vezivanja strukturno različitih liganda (sa različitim afinitetima) za isto ili različito vezujuće mesto na molekulu HSA, te posledice ovih interakcija na njenu dostupnost i reaktivnost HSA-SH grupe.

Polazeći od činjenica da:

- se Cys34 grupa nalazi u okviru IA subdomena molekula HSA;
- se jedan od ispitivanih lekova (ziprazidon) vezuje za IB subdomen koji je u neposrednom kontaktu sa IA subdomenom i u okviru koga se nalazi prvo vezujuće mesto za MK;
- se IA subdomen i Cys34 ostatak nalaze blizu Sudlow I vezujućeg mesta za lekove (mesto vezivanja klopazina);
- nije poznato mesto vezivanja sertindola na molekulu HSA;
- se peto i drugo vezujuće mesto za MK (ona sa najvećim afinitetom) nalaze u IIIB subdomenu i između, redom, dodirnih površina subdomena IA i IIA, a koja se nalaze u neposrednoj blizini vezujućih mesta za lekove u okviru subdomena IB, IIA i IIIA;
- se glukoza (najzastupljeniji mali organski molekul u plazmi) vezuje za Sudlow I vezujuće mesto (kao i klopazin);
- vezivanje liganda za HSA može da dovede do lokalnih strukturnih promena molekula HSA;

opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje efekata primene tri u kliničkoj praksi mnogo korišćena oralna atipična antipsihotika (klozapin, ziprazidon i sertindol) na antioksidativna svojstva molekula HSA.

Ovako (široko) postavljen cilj istraživanja je konkretizovan kroz tri uže određena zadatka. U prvom je, u *in vitro* eksperimentima, ispitano kako tri strukturno različita antipsihotika, sa različitim afinitetima za poznata vezujuća mesta na HSA (klozapin i ziprazidon) i nepoznatim mestom vezivanja (sertindol), samostalno, ili u prisustvu vezane SK, utiču na strukturu molekula HSA i, posledično, na dostupnost i reaktivnost tiolne grupe HSA-Cys34. U drugom delu ispitano je da li dobijeni efekti odabranih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe *in vitro* mogu da se potvrde *in vivo*, u krvi pacova tretiranih sa tri ispitivana antipsihotika. Konačno, ispitano je da li ko-inkubacija HSA u prisustvu MK (na primeru SK) i glukoze, u koncentracijama koje odgovaraju patofiziološkim uslovima u vremenskom periodu koji odgovara poluživotu HSA, pogodan model za ispitivanje uticaja izabranih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije bile su od proizvođača Sigma-Aldrich Chemie (Nemačka) ili Merck (Nemačka), ukoliko nije drugačije navedeno, i p.a. čistoće. Bromkrezol zeleni (BKZ) HSA kit bio je od proizvođača Human (Wiesbaden, Nemačka). HSA rastvor za infuzije (20% rastvor proteina sa 0,2 do 0,4 mol-SH/mol HSA i manje od 1 mol MK/mol HSA) bio je proizvođača Baxter (Beč, Austrija) i nabavljen je u lokalnoj farmaceutskoj apoteci. Glukoza, hlorovodonična kiselina i metanol su nabavljeni od Zorka pharm (Šabac, Srbija), TRIS (tris-(hidroksimetil)-aminometan) od ICN-Galenike (Beograd, Srbija), a natrijum-hidroksid od Lachema (Češka). Antipsihotici Zeldox, Clozapine i Serdolect, i njihove aktivne komponente ziprazidon, klozapin i sertindol su redom obezbeđeni od kompanija Pfizer (Austrija), Remedica Ltd. (Kipar) i H. Lundbeck A/S (Danska). Diazepam je bio poklon od firme Hemofarm (Vršac, Srbija). MiliQ voda (18 MΩ/cm) (Millipore, Bedford, USA) je korišćena u svim eksperimentima.

3.2. Tretman pacova antipsihoticima

Pacovi (28 mužjaka Wistar soj albino, starosti tri meseca i težine od 320 do 350 g) su gajeni pod standardnim uslovima (22°C temperatura i smena dana i noći na 12h). *In vitro* procedura tretmana pacova sa antipsihoticima izvedena je u saglasnosti sa direktivom 2010/63/EU u pogledu zaštite životinja koje se koriste u eksperimentalne svrhe i odobrena je od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu (potvrda broj: 01-374, od 25. aprila 2024. godine) i Uprave za veterinu, Ministarstva privrede šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (rešenje broj: 001396972 2024 14841 002 000 323 022, od 18. aprila 2024. godine).

Pacovi su podeljeni u četiri jednake grupe po 7 životinja (kontrolna grupa i tri grupe tretirane ziprazidonom, klozapinom i sertindolom) i tokom eksperimenta u trajanju od 4 nedelje, merena je njihova telesna masa svake nedelje, a na dnevnom nivou unos hrane i vode.

Kontrolni rastvor (pijaća voda) i lekovi (vodena suspenzija sprasjenih tableta) su aplikovani želudačnom sondom ujutru, na dnevnom nivou, u dozama koje, preračunato, odgovaraju najvećim terapijskim dozama kod ljudi: ziprazidon, 20 mg/kg/dan; klozapin 45 mg/kg/dan i sertindol 2,5 mg/kg/dan (**Raggi i sar., 2004**). Svi pacovi su tretirani sa 1 µL pijaće vode ili suspenzije leka u vodi po gramu telesne mase (1 mL/kg/dan). U zavisnosti od količine aktivne supstance u jednoj tableti (Zeldox: 80 mg ziprazidona; Leponex: 25 mg klozapina; Serdolect: 12 mg sertindola) sprasjene tablete su (redom) resuspendovane u 4 mL, 0,55 mL i 4,8 mL vode.

3.3. Izolovanje plazme pacova

Sa ciljem da se izbegne uticaj vezivanja anestetika za albumin, pacovi su žrtvovani dekapitacijom, nakon 28 dana tretmana lekovima i prekonoćnog posta. Krv iz abdominalne aorte je sakupljena u epruvetu sa antikoagulansom (dinatrjum-EDTA). Iz pune krvi plazma je izolovana nakon taloženja krvnih ćelija centrifugiranjem na 5000 x g u toku 10 minuta na 10°C. Izolovana plazma je odvojena, zamrznuta i čuvana na -80 °C do dalje analize.

3.4. Izolovanje albumina iz plazme pacova taloženjem amonijum-sulfatom

Albumin iz plazme je izolovan metodom dvostepenog taloženja zasićenim rastvorom amonijum-sulfata (ZAS) koju su razvili **Jovanović i sar. (2013)**. U prvom koraku, sa 54% zasićenjem amonijum-sulfatom (AS), talože se globulini, dok se u drugom koraku pri 70% zasićenju taloži albumin.

ZAS se priprema rastvaranjem čvrstog AS u ključaloj destilovanoj vodi. Nakon hlađenja rastvor se procedi i pomoću koncentrovanog NH_4OH podese mu se pH na 7,4. Promena zasićenja AS u rastvoru pri dodavanju ZAS se računa po formuli: $\text{Vol} = 100 * (S_2 - S_1) / 1 - S_2$. Vol je zapremina ZAS (mL) koju treba dodati u 100 mL rastvora zasićenja S_1 da bi se dobilo zasićenje S_2 .

Izračunata zapremina ZAS se kap po kap dodaje u odmerenu (mL) zapreminu plazme sve do zasićenja AS od 54%, uz neprestano mešanje na vorteksu. Nakon toga, centrifugiranjem u toku 5 min na 4000 x g (MiniSpin® centrifuga, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) odvoje se staloženi globulini od supernatanta, u kome se nalazi albumin. U odmerenu zapreminu supernatanta (mL), pažljivo se, kap po kap, dodaje izračunata zapremina ZAS do 70% zasićenja, uz neprestano mešanje na vorteksu. Centrifugiranjem 10 minuta na 6000 x g, odvojen je staloženi albumin od supernatanta koji je uklonjen. Dobijeni talog albumina je rastvoren u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,4 i odmah iskorišćen za određivanje sadržaja i reaktivnosti HSA-Cys34 grupe.

3.5. Biohemijske metode

3.5.1 Određivanje koncentracije ukupnih proteina i albumina u plazmi pacova

Biuretska metoda je iskorišćena za određivanje ukupnih proteina (**Robinson i Hogden, 1940**), a BKZ metoda za određivanje albumina u plazmi pacova (**Dumas i sar., 1997**). Biuretski reagens je pripremljen sukcesivnim mešanjem zasebno pripremljenih vodenih rastvora kalijum-natrijum-tartarata (4,5 g/100 mL vode), natrijum-hidroksida (4 g/100 mL vode), bakar-sulfata pentahidrata (1,5 g/100 mL vode) i kalijum-jodida (2,5 g/100 mL vode) i dopunjavanjem vodom do 500 mL.

Ukupni proteini su određeni mešanjem 20 μL plazme i 1 mL Biuretskog reagensa. Nakon stajanja inkubacione smeše 30 minuta na sobnoj temperaturi, izmerena je A_{546} nm prema slepoj probi reagensa (Shimadzu UV/Vis 1800, Kyoto, Japan). Nakon korekcije apsorbancije za slepu probu uzorka, koncentracija proteina je izračunata na osnovu standardne prave pripremljene od komercijalnog HSA u opsegu od 1 do 100 g/L.

Albumin u plazmi određen je mešanjem 10 μL plazme i 1 mL reagensa komercijalnog kita. Nakon stajanja inkubacione smeše 5 min na sobnoj temperaturi, izmerena je A_{578} nm prema slepoj probi reagensa (Shimadzu UV/Vis 1800, Kyoto, Japan). Nakon korekcije apsorbancije za slepu probu uzorka, koncentracija albumina je izračunata na osnovu standardne prave pripremljene od komercijalnog HSA u opsegu od 1 do 100 g/L. Za izražavanje koncentracije albumina u plazmi (mM) uzeta je molekulska masa HSA od 66468 Da.

3.5.2. Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom

Modifikovanom Ellmanovom metodom, koristeći 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB reagens (**Bulaj i sar., 1998**), određen je sadržaj ukupnih tiola (proteinskih i neproteinskih) u plazmi pacova, albumin-SH grupa u izolovanom albuminu iz plazme pacova i HSA-SH grupa u svim *in vitro* eksperimentima. DTNB reagens je pripremljen rastvaranjem 7,92 mg DTNB (2 mM) i 68 mg natrijum-acetata u vodi do 10 mL.

Inkubaciona smeša je pripremljena sukcesivnim dodavanjem 100 μL uzorka, 100 μL 1 M Tris pufera pH 8,0, 700 μL vode i 100 μL DTNB reagensa. Nakon stajanja inkubacione smeše 30 minuta na sobnoj temperaturi, izmerena je A_{412} nm prema slepoj probi reagensa (Shimadzu UV/Vis 1800, Kyoto, Japan). Nakon korekcije apsorbance za slepu probu uzorka, koncentracija tiola je izračunata koristeći molarni ekstinkcioni koeficijent $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dobijene vrednosti su izražene u mM za albumin u plazmi pacova i M –SH/M proteina (albumina ili HSA).

3.5.3. Određivanje reaktivnosti HSA-SH grupe albumina

Reaktivnost HSA-SH grupe je određena praćenjem kinetike reakcije između redukovane tiolne grupe albumina izolovanog iz plazme pacova ili komercijalnog HSA i DTNB-a, odnosno, određivanjem konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda. Kako bi se postiglo da se reakcija odigrava kao reakcija pseudo-prvog reda, upotrebljena količina DTNB-a u reakcionoj smeši bila je uvek 40 puta viša od ukupnih slobodnih –SH grupa.

Pre određivanja reaktivnosti tiolne grupe, najpre je određen sadržaj redukovane tiolne grupe u albuminu ili HSA, i na osnovu toga je pripremljen odgovarajući radni rastvor DTNB za svaki uzorak, sa 40 puta višom koncentracijom od koncentracije slobodnih –SH grupa. Radni rastvori DTNB su pripremljeni razblaživanjem štok rastvora DTNB koncentracije 6 mM. Pre same reakcije, svi rastvori i uzorci su preinkubirani 5 minuta na 37°C . Inkubaciona smeša je pripremljena sukcesivnim dodavanjem 100 μL uzorka, 100 μL 1 M Tris pufera pH 8,0, 700 μL vode i 100 μL DTNB reagensa. Odmah po dodavanju DTNB, inkubaciona smeša je promešana i A_{412} nm je merena svakih 5 s prvih 90 s, onda svakih 10 s do 270 s i, na kraju, svakih 30 s do završetka reakcije prema slepoj probi reagensa na 37°C (spektrofotometar Shimadzu UV/Vis 1800, opremljen sa peltierom, Kyoto, Japan). Linearizovanjem logaritama sadržaja preostalih –SH grupa u funkciji vremena dobija se prava, čiji nagib predstavlja negativnu vrednost konstante brzine pseudo-prvog reda (k') za reakciju HSA-SH grupa sa DTNB-om.

3.6. Priprema komercijalnog HSA za *in vitro* eksperimente

U svim *in vitro* eksperimentima korišćen je 20% komercijalni rastvor HSA namenjen za kliničku upotrebu (Baxter, Beč, Austrija). Kako je ovaj rastvor HSA imao 0,2-0,4 mol –SH grupa/mol HSA i manje od jednog mol MK/mol HSA, za eksperimente u kojima se simuliraju fiziološki i patofiziološki uslovi komercijalni rastvor HSA je prethodno odmašćen, redukovan i kontrilisan zamašćen.

3.6.1. Odmašćivanje komercijalnog HSA

Iz komercijalnog rastvora HSA vezane MK su uklonjene tretiranjem HSA aktivnim ugljem po metodi koju je razvio **Chen (1967)**.

Ukratko, rastvor HSA (200 g/L ili 3 mM) je razblažen sa destilovanom vodom do 1 mM rastvora, nakon čega je dodato 35 mg aktivnog uglja po 1 mL rastvora HSA i pomoću 0,2 M HCl podešen je pH rastvora na 3,0. Nakon mešanja rastvora 1 sat u ledenom kupatilu, ugalj je uklonjen centrifugiranjem 20 minuta na 10000 g (Eppendorf®, Minispin®, Hamburg, Nemačka). Nakon odvajanja supernatanta, pH rastvora je bio podešen na 7,0 sa 0,2 M NaOH. U sledećem koraku, ultrafiltracijom, HSA je ispran više puta sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 i u poslednjem koraku HSA je skoncentrovan do 1 mM rastvora, koristeći centrikone Ultracel-30K (Millipore, Bedford, USA).

3.6.2. Redukcija komercijalnog HSA

Komercijalni 20% rastvor HSA sadrži nisku nefiziološku koncentraciju HSA-SH grupa od 0,2 do 0,4 mol -SH/mol HSA, čiji se sadržaj dodatno smanjuje tokom odmašćivanja HSA. Za potrebe eksperimenata u kojima se simuliraju fiziološki uslovi, gde je prosečna normalna koncentracija HSA-SH grupa oko 0,6 mol -SH/ mol HSA, odmašćeni HSA je redukovan sa ditioneitolom (DTT) po postupku koji su razvili **Penezić i sar. (2015)**.

Ukratko, pre redukcije, odmašćeni HSA u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,4 je pomešan sa DTT u molarnom odnosu 1:1 (molarni odnos oksidovanih tiol grupa u HSA:DTT). Nakon inkubiranja 1 sat na 37°C, DTT je uklonjen, nakon višestepenog ispiranja sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom, pH 7,4, ultrafiltracijom, korišćenjem centrikona (Ultracel®-30K centrikon, Millipore, USA). U poslednjem koraku, odmašćeni i redukovan HSA je skoncentrovan do oko 100 g/L. Nakon redukcije, sadržaj HSA-SH grupa u redukovanom HSA je bio oko 1,0 mol-SH/mol HSA.

3.6.3. Pripremanje uzoraka HSA željenog sadržaja HSA-SH grupe

Uzorci HSA koji simuliraju fiziološki sadržaj HSA-SH grupa (oko 0,6 mol -SH/mol HSA) su pripremljeni od odmašćenog neredukovanog (<0,2 mol -SH/mol HSA) i odmašćenog redukovanog HSA (oko 1 mol -SH/mol HSA). Pre pripreme uzorka HSA željenog sadržaja HSA: (a) 0,689 mol-SH/mol HSA za eksperimente uticaja vezivanja antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe; (b) 0,54 mol-SH/mol HSA za eksperimente simultanog vezivanja SK i glukoze na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe, određena je koncentracija HSA (mM) i sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH/mol HSA) u odmašćenom neredukovanom i redukovanom HSA. Zatim su oba rastvora HSA razblažena do 0,25 mM, sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4. Na osnovu preračunatog sadržaja HSA-SH grupa u oba rastvora HSA, i željenog finalnog sadržaja HSA-SH grupa, izračunata je potrebna zapremina pojedinačnih rastvora HSA koje treba pomešati da bi se dobio željeni finalni sadržaj HSA-SH grupa.

3.6.4. Zamašćivanje uzorka HSA

Za potrebe eksperimenata u kojima se simuliraju fiziološki i patofiziološki uslovi, odmašćeni i redukovan HSA sa sadržajem HSA-SH grupa od oko 0,6 mol -SH/mol HSA je kontrolisano zamašćen sa SK (**Pavićević i sar., 2014**). Za zamašćivanje je korišćen 50 mM rastvor SK (p.a. čistoće) u 99% etanolu.

Pre koraka kontrolisanog zamašćivanja određena je koncentracija odmašćenog i redukovanog HSA. Nakon toga, ovaj rastvor je razblažen sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 do željene koncentracije (mM), prema kojoj je izračunata potrebna zapremina 50 mM rastvora SK koju je potrebno dodati da bi se postigao molarni odnos HSA/SK od 1:1 do 1:4. Finalna koncentracija dodatog etanola u svim rastvorima HSA bila je manja od 2%. Nakon dodavanja SK u rastvor HSA, inkubaciona smeša je inkubirana 1 sat na 37°C, a zatim centrifugirana 5 minuta na 10000 x g. Pripremljeni, kontrolisano zamašćeni uzorci HSA su iskorišćeni za ispitivanje vezivanja odabranih antipsihotika za HSA i uticaja njihovog vezivanja na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe.

3.6.5. Vezivanje antipsihotika za odmašćeni HSA i zamašćeni HSA sa SK

Uzorak HSA (0,25 mM) sa fiziološkim sadržajem HSA-SH grupa, koji je odmašćen, redukovan i kontrolisano zamašćen sa SK u molarnim odnosima HSA/SK 1:0, 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, je u

sledećem koraku iskorišćen za ispitivanja vezivanja antipsihotika ziprazidona, klopapina i sertindola za ovaj protein.

Odgovarajuće zapremine štok rastvora ziprazidona, klopapina i sertindola (25 mM u DMSO) su dodate u odmašćeni HSA i kontrolisano zamašćene uzorke HSA sa SK, da bi se postigao molarni odnos leka:HSA od 0,5:1, 1,5:1 i 2,0:1. Finalna koncentracija DMSO u inkubacionim smešama bila je u rasponu od 0,2 do 2%. Nakon toga, uzorci su izvorteksirani i inkubirani 1 sat na 37°C pre daljih analiza.

3.6.6. Priprema uzoraka HSA za *in vitro* glikaciju

Da bi se ispitao međusobni uticaj dva značajna endogena molekula (MK i glukoze) na vezivanje odabranih antipsihotika za HSA, kao i njihov uticaj na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupa, prvo je postavljen eksperiment u kojem je praćena promena sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u uslovima koji odgovaraju fiziološkim i patofiziološkim bez prisustva lekova.

Pre *in vitro* eksperimenta glikacije uzoraka HSA sa sadržajem HSA-SH grupa od 0,54 mol –SH/mol HSA), zamašćenog sa SK da se postignu molarni odnosi HSA/SK 1:1, 1:2, i 1:4, kao i kontrolnog uzorka (odmašćenog HSA sa istim sadržajem HSA-SH grupa), sve staklo, plastika (ependorfi, vaje i nastavci) i štok rastvor glukoze (52 mM u milliQ vodi) su sterilisani u autoklavu (CertoClav). Sterilni rastvori HSA, zamašćenog sa SK u molarnim odnosima HSA/SK 1:1, 1:2, i 1:4, i odmašćenog HSA (kontrola), su pripremljeni filtriranjem u sterilnoj zoni rastvora HSA, kroz sterilne nitrocelulozne filtere veličine pora 0,2 µm (Millipore Sigma) u sterilne vaje (50 mL).

Pripremljeni sterilni rastvori HSA su mešani sa štok rastvorom glukoze u molarnim odnosima HSA:glukoza koji odgovaraju srednjoj fiziološkoj koncentraciji HSA u krvi (0,64 mM) i koncentracijama glukoze (5, 10 i 20 mM), uobičajnim za fiziološka i patofiziološka stanja u serumu/plazmi, u vajiama u sterilnoj zoni. Nakon mešanja, ovi rastvori su alikvotirani u sterilne ependorfe (2 mL, punjene do vrha da bi se smanji efekat kiseonika na oksidaciju HSA-SH grupa) i inkubirani 14 dana na 37°C. Pre postavljanja na inkubiranje, i posle 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 i 14 dana inkubacije, u alikvotima inkubacione smeše određen je sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupa.

3.6.7. Vezivanje antipsihotika za HSA sa vezanom SK i glukozom

Nakon *in vitro* eksperimenta u kojem je praćena promena sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u uslovima koji odgovaraju patofiziološkim, ali bez prisustva lekova, ispitano je i da li prisustvo glukoze i njeno vezivanje za HSA u inkubacionim smešama HSA i SK ima uticaja na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe nakon vezivanja klopapina, sertindola i ziprazidona.

Kao i u prethodnom eksperimentu, uzorak HSA sa fiziološkim sadržajem HSA-SH grupa (0,617 mol –SH/mol HSA), bez i sa vezanom SK (odnos HSA:SK 1:1), sve staklo, plastika i štok rastvori glukoze (52 mM) i antipsihotika (50 mM) su sterilisani u autoklavu. Takođe, sterilni rastvori HSA, zamašćenog sa SK u molarnom odnosu HSA/SK 1:1 i odmašćenog HSA (kontrola), su pripremljeni filtriranjem u sterilnoj zoni rastvora HSA kroz sterilne nitrocelulozne filtere 0,2 µm u sterilne vaje (50 mL). Polovina zapremine pripremljenih sterilnih rastvora HSA je mešana sa štok rastvorom glukoze, u molarnom odnosu koji odgovara normalnoj fiziološkoj koncentraciji glukoze (5 mM) u krvi, u vajiama u sterilnoj zoni. Pripremljeni rastvori su razliveni u sterilne ependorfe i inkubirani tokom 19 dana na 37°C. Nakon inkubacije u određenim vremenskim periodima, ispitivani lekovi su dodati u inkubacione smeše u molarnom odnosu HSA:lek 1:2, i nakon inkubiranja ovih smeša 1 sat na 37°C, u njima je određen sadržaj i

reaktivnost HSA grupa. Posle 1, 3, 8, 11 i 16 dana inkubacije, u smeše je dodat sertindol, nakon 1, 2, 5, 10 i 15 dana klozapin i, konačno, nakon 1, 4, 9, 13 i 19 dana dodat je ziprazidon.

3.7. Fluorescentna spektroskopija

Za ispitivanje uticaja vezivanja MK i ispitivanih antipsihotika za odmašćeni i kontrolisano zamašćeni HSA sa SK (u različitim SK:MK molarnim odnosima) na strukturu molekula HSA, određene su konstante gašenja fluorescencije (K_{sv}), određeno je vezujuće mesto i konstanta afiniteta vezivanja sertindola za HSA, kao i za utvrđivanje efekata glikacije HSA na sadržaj AGEs i promenu strukture molekula HSA tokom glikacije, iskorišćena je metoda fluorescentne spektroskopije proteina.

3.7.1. Fluorescentni emisiji i sinhroni spektri HSA

Radni rastvori HSA, HSA/SK ili HSA/SK i glukoza (1 μ M ili 0,5 μ M) su pripremani sveži na dan snimanja, razblaživanjem odgovarajućih štok rastvora HSA 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4. Radni rastvori antipsihotika (200 μ M) su pripremljeni neposredno pre snimanja, razblaživanjem štok rastvora antipsihotika (25 mM rastvori u DMSO).

Fluorescentni emisiji i sinhroni spektri HSA su snimljeni na spektrofotometru Fluoremax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan) u 1 cm kvarenoj kivetu na 37°C. Emisiji spektar rastvora HSA snimljen je od 305 do 420 nm, nakon ekscitacije na 295 ili 280 nm, sa podešenom širinom slitova na 4,5 nm. Finalni spektri su predstavljeni kao srednja vrednost dve akumulacije, korigovani za spektar slepe probe (0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4). Sinhroni fluorescentni spektri rastvora HSA (0,5 μ M) dobijeni su snimanjem emisijih spektara pri istim uslovima, pri čemu su intervali između talasnih dužina emisije i ekscitacije fiksirani na 15 i 60 nm, što odgovara elektronskim prelazima pri pobuđivanju, redom, ostataka tirozina (Tyr), i triptofana (Trp) u proteinu. Emisiji spektri Tyr su snimljeni u opsegu 280–330 nm i Trp 300–380 nm.

3.7.2. Određivanje mesta vezivanja sertindola na molekulu HSA

Za određivanje mesta vezivanja sertindola na molekulu HSA iskorišćen je princip kompeticije dva liganda za isto vezujuće mesto. Diazepam je ligand koji se karakteristično vezuje za Sudlow II vezujuće mesto na HSA; njegova konstanta afiniteta za HSA će se smanjivati u prisustvu sertindola, ukoliko se njihova mesta vezivanja preklapaju.

Za ova određivanja, emisiji fluorescentni spektri rastvora odmašćenog HSA i kontrolisano zamašćenog sa SK u odnosima 1:1 i 1:3, bez i sa dodatkom sertindola u molarnom odnosu HSA:sertindol 1:1, prvo su snimljeni od 290 do 450 nm (λ_{ex} = 280 nm) na 25°C i pH 7,4. Nakon toga, sukcesivno su dodavani alikvoti (3 μ L) diazepama (100 μ M) u 2,5 mL rastvora HSA sa sertindolom (0,5 μ M) i, posle dodavanja svakog alikvota, ponovljeno je snimanje emisijih spektara proteina. Finalni spektri su predstavljeni kao srednja vrednost dve akumulacije u kvarenoj kivetu dužine puta 1 cm, uz širinu slitova od 5 nm, nakon korekcije dobijenog spektra za spektar slepe probe (0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4).

3.7.3. Određivanje Stern–Volmer-ove konstante kvenčovanja i konstante vezivanja

Za određivanje Stern–Volmerove konstante gašenja (kvenčovanja) fluorescencije (K_{sv}) i konstante afiniteta (K_a) ispitivanih lekova za HSA, ili SK za HSA u prisustvu glukoze, dobijene vrednosti fluorescencije su prvo korigovane za efekat unutrašnjeg filtera, tj. apsorbanciju lekova ili SK na ekscitacionoj i emisijoj talasnoj dužini HSA, prema jednačini (Van de Weert i Stella, 2011):

$$F = F_u \times 10^{(A_{ex} + A_{em})/2}$$

gde je F_u izmeren, nekorigovan intenzitet emisije, F je korigovan intenzitet fluorescencije koji bi bio izmeren u odsustvu efekta unutrašnjeg filtera, a A_{ex} i A_{em} su apsorbancije kvenčera (lekova), na talasnoj dužini ekscitacije (295 nm) i talasnoj dužini maksimuma emisije (340 nm).

K_{sv} HSA kompleksa sa ispitivanim lekovima, ili SK u prisustvu glukoze, je određena prema jednačini (**Lakowicz, 2006**):

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

gde je F_0 i F intenzitet fluorescencije proteina na 340 nm pre i posle dodavanja kvenčera (ispitivanih lekova ili SK), K_{sv} je Stern-Volmerova konstanta kvenčovanja, k_q konstanta brzine kvenčovanja fluorescencije biomolekula, τ_0 je prosečan polужivot biomolekula bez kvenčera (10^{-8} s), a $[Q]$ je ukupna koncentracija kvenčera.

Procena broja vezujućih mesta (n) za ispitivane lekove i K_a je urađena na osnovu jednačine (**Bi i sar., 2004**):

$$\log(F_0 - F)/F = -n \log(1/([L] - [P] \times (F_0 - F)/F_0) + n \log K_a$$

gde je $[L]$ ukupna koncentracija lekova, a $[P]$ ukupna koncentracija proteina (HSA) u uzorku.

3.7.4. Fluorimetrijsko praćenje stukturnih promena HSA tokom *in vitro* glikacije

Fluorescencija HSA prevashodno potiče od ostataka Tyr i Trp u proteinu i fluorescentne osobine AGEs su iskorišćene za praćenje strukturnih promena molekula HSA tokom *in vitro* glikacije. Uzorci HSA, odmašćeni i zamašćen sa SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:1, 1:2 i 1:4, bez i u prisustvu 5, 10 i 20 mM glukoze, su pre i nakon određenog perioda inkubacije (1–14 dana) razblaženi sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 do 2 μ M HSA. Emisioni spektri rastvora HSA snimljeni su od 290 do 420 nm (prirodna fluorescencija HSA) i od 350 do 500 nm (fluorescencija od AGEs), nakon ekscitacije na 280 nm (ekscitacija ostataka Tyr i Trp) i 335 nm (AGEs ekscitacija), sa podešenom širinom ekscitacionog i emisionog slita na 3 nm, u kiveti od 1 cm na 37°C. Snimljeni spektri predstavljaju srednju vrednost tri akumulacije. Nakon što su spektri korigovani za spektar slepe probe (0,1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7,4), dobijeni spektri AGEs su normalizovani (**Takić i sar., 2016**). Normalizovani spektri su prikazani kao *količnik* intenziteta fluorescencije pentozidnog pika od 350 do 500 nm i intenziteta fluorescencije HSA pika na 340 nm; dobijena vrednost količnika je potom pomnožena sa faktorom 10000.

3.8. Obrada rezultata

Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Eksperimenti su izvedeni u duplikatu, a određivanja analiziranih parametara u triplicatu. Za obradu rezultata iskorišćeni su programi Origin Lab 8.0 (Origin Corporation, USA) ili IBM SPSS Statistics 20. Normalnost distribucije podataka je ispitana korišćenjem Shapiro-Wilk-ovog i Kolmogorov-Smirnov-og testa. Za parametrijske i neparametrijske podatke iskorišćeni su Student two t-test i Kolmogorov-Smirnov test. Odnosi između varijabli su ocenjeni Pirsonovom korelacionom analizom. U *in vitro* eksperimentu glikacije, one-way analiza varijanse (engl. *Analysis of Variance* – ANOVA) test je iskorišćen za statističko poređenje između rezultata dobijenih različitih inkubacionih smeša tokom istih vremenskih tačaka, Levene-ovim testom je proverena homogenost varijansi, dok su Turkey-HSD i Games-Howell testovi iskorišćeni za post-hoc višestruka poređenja. Vrednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. *In vitro* eksperimenti uticaja vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na reaktivnost i sadržaj HSA-SH grupa

Shizofrenija, patološko stanje praćeno oksidativnim stresom, najćešće zahteva doživotnu terapiju antipsihoticima koji se u krvi vezuju za HSA (**Patel i sar., 2014**). HSA zbog prisutne Cys34 tiolne grupe (HSA-SH) predstavlja najvaćniji antioksidans u krvi i vanćelijskom tećnostima kakva je cerebrospinalna tećnost (**Peters 1996; Otagiri i sar., 2009**). Odrećivanje sadržaja HSA-SH grupe se poslednjih godina predlaće kao specifićniji marker za procenu nivoa oksidativnog ili karbonilnog stresa u razlićitim patoloćkim stanjima u odnosu na sadržaj ukupnih tiola u seruma/plazmi. Molekul HSA je strukturno fleksibilan protein i vezivanje razlićitih liganda za HSA moće da menja njegovu strukturu na naćin koji će uticati na dostupnost i reaktivnost HSA-SH grupe.

U prvom delu ove disertacije, u *in vitro* eksperimentima, je ispitano kako tri strukturno razlićita antipsihotika, sa razlićitim afinitetima za poznata vezujuća mesta na HSA (klopapin i ziprazidon) i nepoznatim mestom vezivanja (sertindol), samostalno, ili u prisustvu vezane SK, utiću na promene u strukturi molekula HSA i, posledićno, na dostupnost i reaktivnost njegove tiolne grupe Cys34 (HSA-SH).

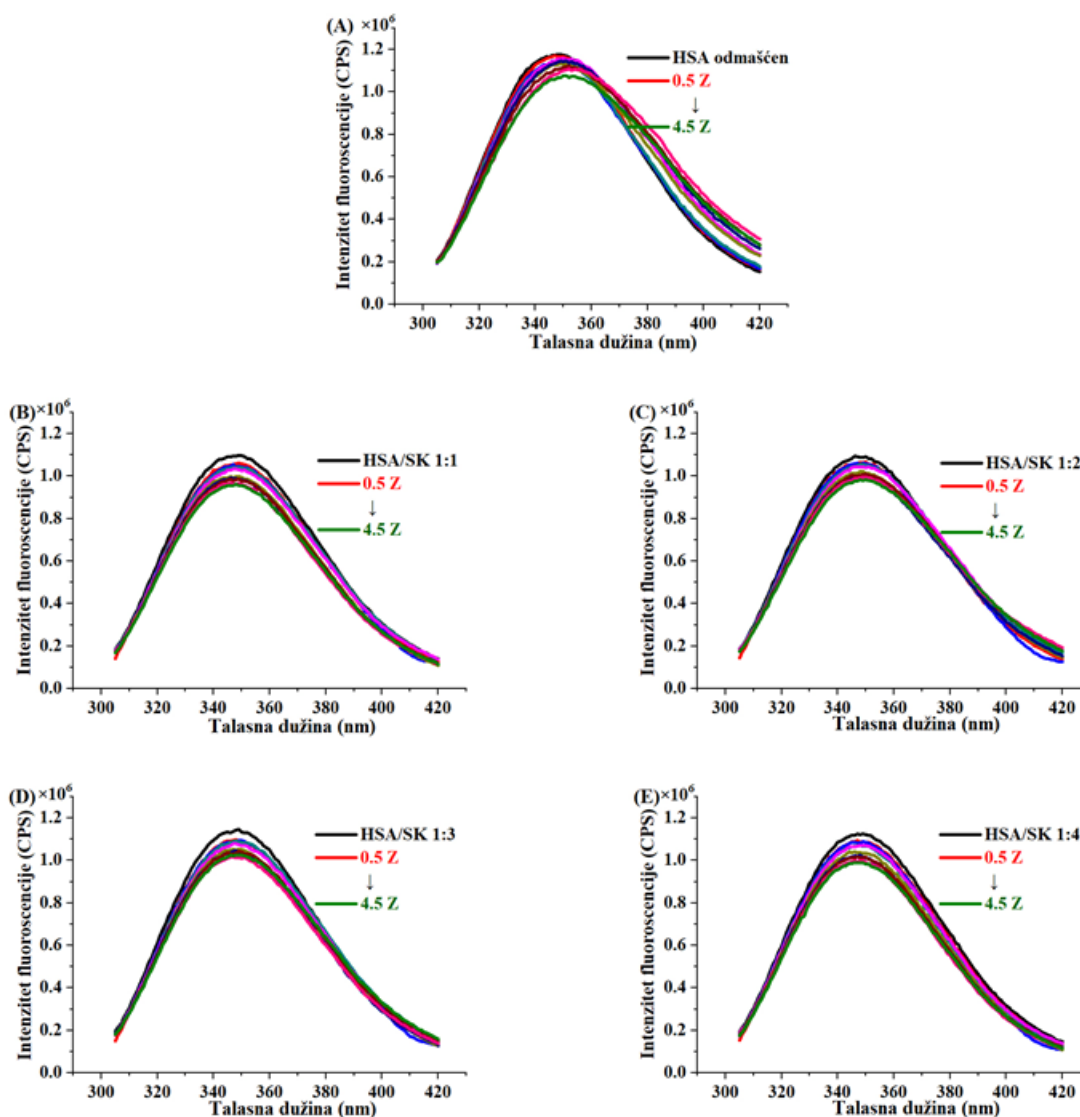
4.1.1. Ispitivanje uticaja vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na triptofanske emisije spektre

Polazeći od podataka iz literature da se: (a) ziprazidon vezuje za domen I molekula HSA, koji je u neposrednom kontaktu sa domenom II u kome je smešćen jedini ostatak Trp214 u Sudlow I vezujućem mestu; (b) da se klopapin vezuje za Sudlow II vezujuće mesto; i (c) da nije poznato vezujuće mesto za sertindol, praćene su promene fluorescencije molekula HSA tokom vezivanja ispitivanih antipsihotika za ovaj protein.

Za ovu shvrhu iskorišćen je odmašćeni HSA, kao i kontrolisano zamašćen HSA sa SK u molarnim odnosima koji imitiraju fizioloćke i patofizioloćke uslove. Eksperimentalni uslovi su ovako postavljeni pošto je sadržaj MK u plazmi znaćajno povećan kod osoba obolelih od shizofrenije usled energetske metabolićke disfunkcije (**Orešić i sar., 2011; Yang i sar., 2017**). Kako nedostaju literaturni podaci o efektima simultanog vezivanja MK i ispitivanih antipsihotika na strukturu molekula HSA i, posledićno, na njegovu sposobnost vezivanja liganda, prvo su snimljeni emisijski fluorescentni spektri koji potiću od ostatka Trp214 u molekulu HSA bez i sa vezanom SK u molarnim odnosima HSA:SK od 1:1 do 1:4, tokom titracije ispitivanim antipsihoticima u molarnim odnosima HSA:lek od 1:0,5 do 1:4,5.

Nakon ekscitacije na 295 nm (ekscitacija Trp 214 ostatka), za sve uzorke dobijeni su emisijski fluorescentni spektri sa maksimumom emisije na oko 350 nm (**Slike 14–16**), tipićnim za HSA (**Gorinstein i sar., 2000**). Dodavanje sva tri leka odmašćenom HSA, kao i HSA zamašćenom sa SK (molarni odnosi od 1:1 do 1:4 HSA:SK), doveo je do postepenog smanjenja intenziteta ovog pika sa povećanjem odnosa HSA/lek od 1:0,5 do 1:4,5. Izuzetak od ovog trenda uoćen je samo pri titraciji odmašćenog HSA i HSA/SK (1:2 i 1:4 mol/mol) sa sertindolom, gde se postepeno smanjenje intenziteta signala dobija do odnosa HSA/lek 1:3,0, 1:4,0 i 1:4,0, redom (**Slike 16A, 16C i 16E**). Nakon dostizanja ovih odnosa HSA:sertindol, u sva tri slućaja došlo je do rasta fluorescencije u smešama (ovi emisijski spektri nisu prikazani na **slikama 16A, 16C i 16E**).

Ako se posmatra krajnja promena intenziteta fluorescencije pri najvišem molarnom odnosu HSA:lek, u odnosu na početnu vrednosti za odgovarajući rastvor HSA bez prisustva leka, uočava se da gašenje fluorescencije Trp214 nije isto za tri ispitana atipična antipsihotika.

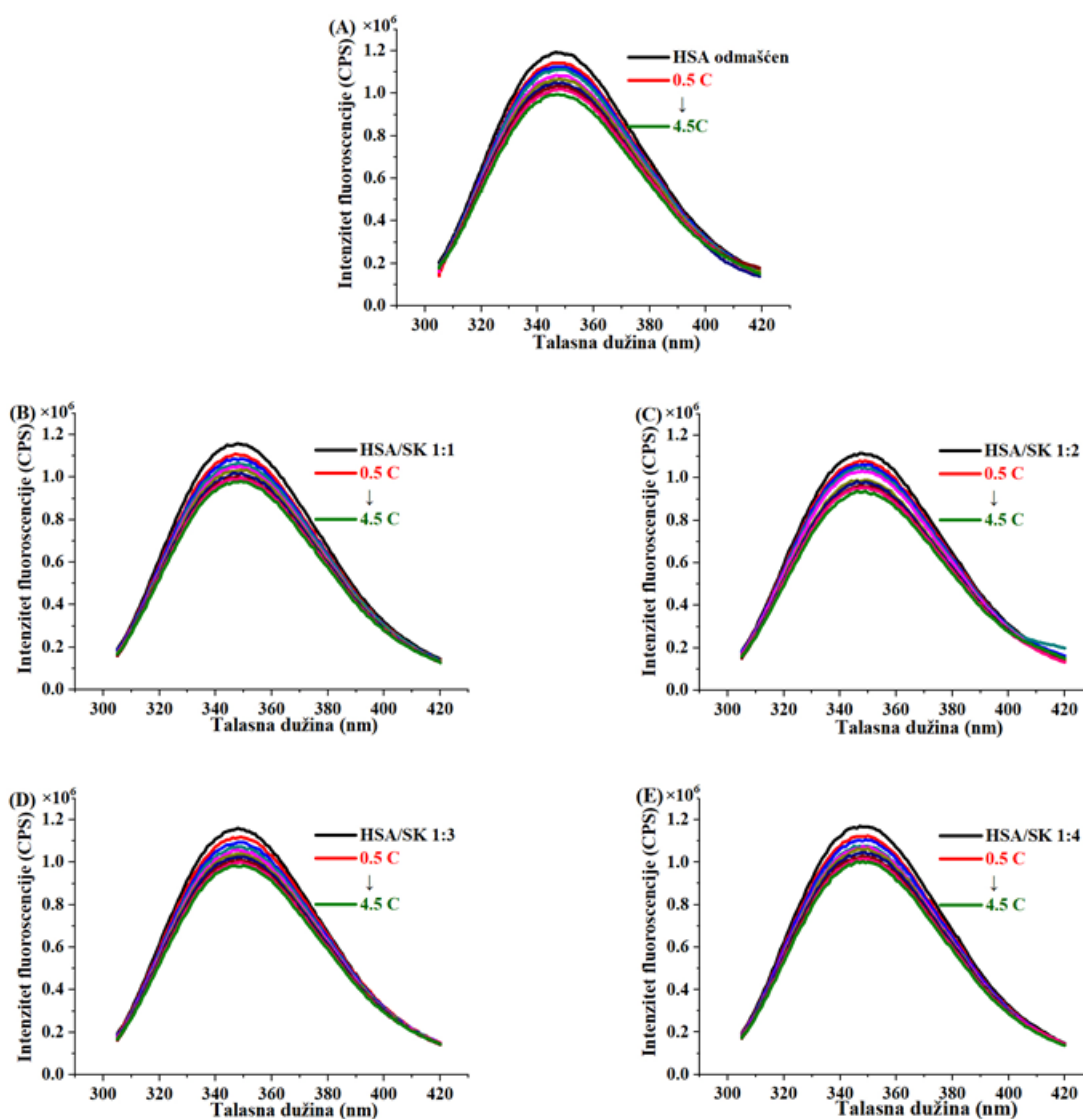


Slika 14. Emisioni fluorescentni spektri odmašćenog HSA (A), HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom (SK) u molarnim odnosima 1:1 (B), 1:2 (C), 1:3 (D) i 1:4 (E), tokom titracije proteina ziprazidonom (Z) od 1:0,5 do 1:4,5 HSA:Z odnosa (mol/mol), nakon ekscitacije HSA na 295 nm.

Titracija HSA ziprazidonom imala je za posledicu smanjenje intenziteta fluorescentnog pika za, redom, 12,1%, 12,5%, 10,7%, 10,3% i 12% u odnosu na odmašćeni HSA i odgovarajući zamašćeni HSA sa SK u odnosu (mol/mol) HSA/SK od 1:1 do 1:4. Pored toga, uočava se da dolazi do pomeranja maksimuma signala ka *većim* talasnim dužinama pri titraciji odmašćen HSA i HSA/SK 1:2, odnosno, do pomeranja maksimuma signala ka *manjim* talasnim dužinama kod HSA/SK 1:4 (mol/mol). Pomeranje maksimuma pika je izraženije sa porastom molarnog odnosa

HSA/lek. Kod odnosa HSA:SK 1:1 i 1:3 (mol/mol), ne dolazi do pomeranja maksimuma pika (Slika 14).

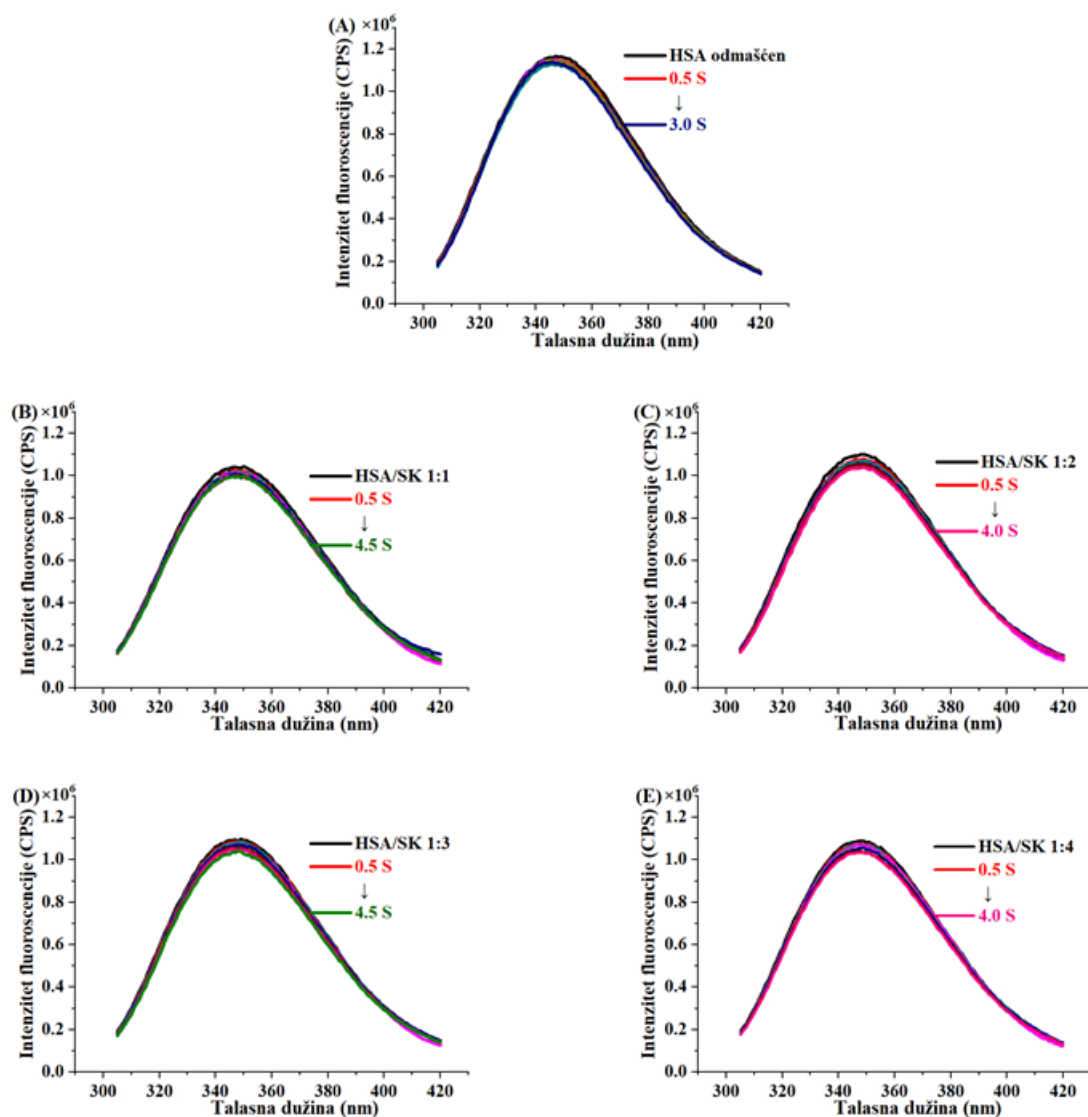
Titracija HSA klopazinom u molarnim odnosima HSA/klopazin od 1:0,5 do 1:4,5 dovela je do smanjenja intenziteta pika fluorescencije za, redom, 15,8%, 16%, 11%, 14,7% i 14,6% u odnosu na odmašćen HSA i odgovarajući zamašćen HSA pri molarnim odnosima HSA/SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4. Jedino prilikom titracije HSA/SK 1:2 (mol/mol) klopazinom se uočava blago pomeranje maksimuma fluorescencije ka *manjim* talasnim dužinama (Slika 15C).



Slika 15. Emisioni fluorescentni spektri odmašćenog HSA (A) i HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom (SK) u molarnim odnosima 1:1 (B), 1:2 (C), 1:3 (D) i 1:4 (E), tokom titracije HSA klopazinom (C) od 1:0,5 do 1:4,5 HSA:C odnosima (mol/mol), nakon ekscitacije proteina na 295 nm.

Titracija HSA sertindolom imala je najmanji uticaj na smanjenje inteziteta fluorescentnog pika proteina. U odnosu na odmašćeni HSA i (odgovarajući) zamašćen HSA sa SK, pri molarnim odnosima HSA/SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, dobijeno smanjenje intenziteta pika bilo je 2,7%, 4,7%,

5,7%, 6,2% i 4,8%, redom. U odnosu na ziprazidon i klopazin, malo pomeranje maksimuma fluorescencije prema *nižim* talasnim dužinama je uočeno samo tokom titracije odmašćenog HSA sertindolom (**Slika 16**).



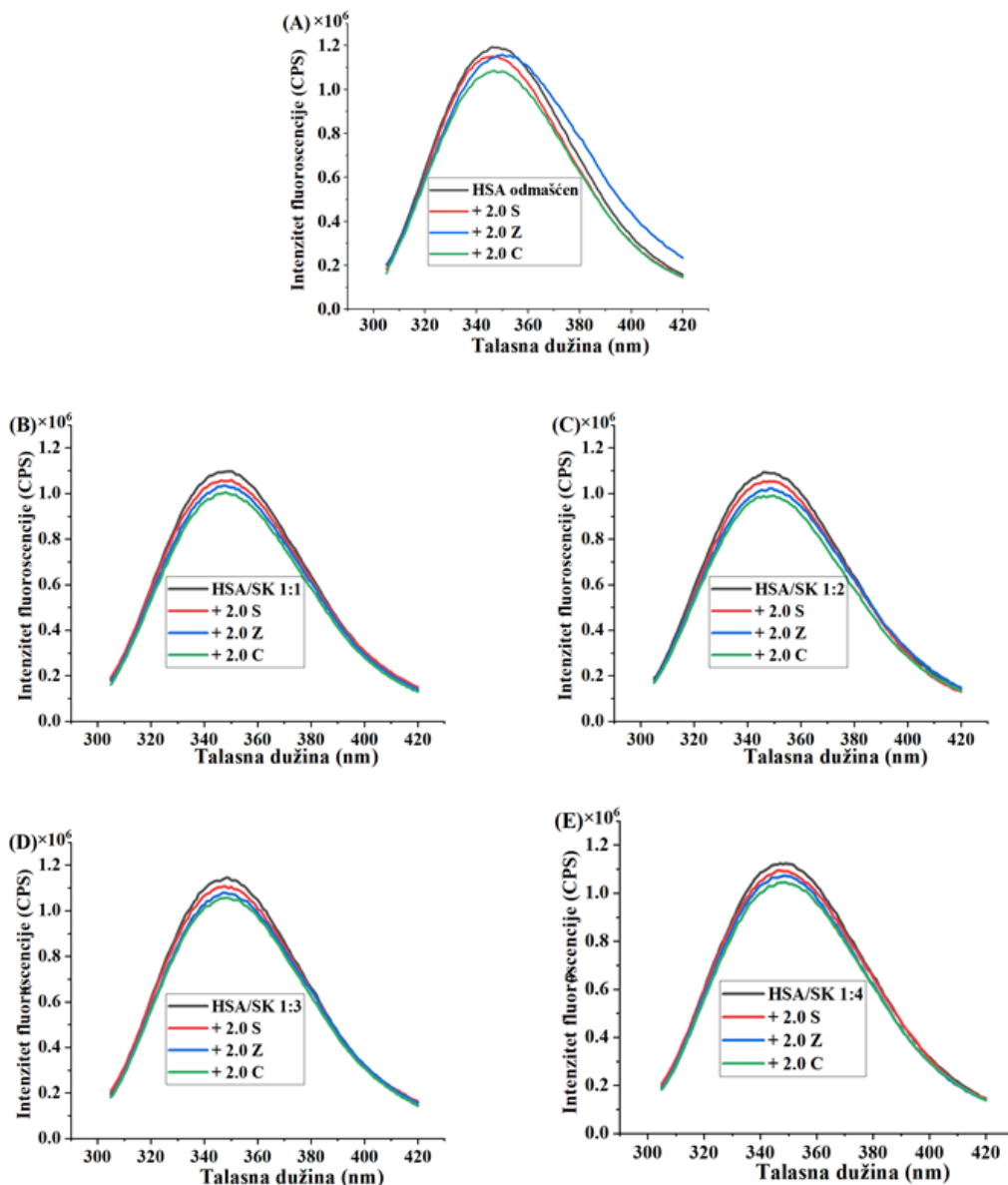
Slika 16. Emisioni fluorescentni spektri odmašćenog HSA (**A**) i HSA zamašćenog sa stearinskom kiselinom (SK) u molarnim odnosima 1:1 (**B**), 1:2 (**C**), 1:3 (**D**) i 1:4 (**E**), tokom titracije HSA sertindolom (**S**) od 1:0,5 do 1:4,5 HSA:S odnosa (mol/mol), nakon ekscitacije proteina na 295 nm.

Da bi se uočili (različiti) uticaji ispitivanih lekova na emisione spektre HSA, nakon ekscitacije na 295 nm, prikazani su emisioni spektri dobijeni za odmašćeni HSA i sva četiri zamašćena uzorka HSA kada je molarni odnos HSA i ispitivanih lekova nakon titracije bio 1:2 (**Slika 17**).

Različiti efekti tri ispitana leka na emisione spektre Trp214 najbolje se uočavaju kod odmašćenog uzorka HSA, gde je dobijena značajna razlika u poziciji maksimuma emisionog pika. Titracija sertindolom dovodi do pomeranja maksimuma emisije ka *manjim* talasnim dužinama (engl. Blue shift, ili plavo pomeranje), dok titracija ziprazidonom ima kontra efekat,

odnosno, dolazi do pomeranja maksimuma emisije ka *većim* talasnim dužinama (engl. Red shift, ili crveno pomeranje), pri čemu su intenziteti pikova bili (približno) jednaki.

Sa druge strane, vezivanje klopazina ne pomera emisijski pik proteina koji potiče od ostatka triptofana u odnosu na emisijski pik dobijen za odmašćeni HSA u odsustvu leka, ali značajno jače gasi fluorescenciju Trp214. Pri svim odnosima HSA:SK (od 1:1 do 1:4; mol/mol), gubi se lako uočljiv efekat ziprazidona i sertindola na pomeranje maksimuma ovog pika, tako da se dobijaju pikovi skoro poravnati sa onim za odmašćeni HSA. Dalje, uočava se da ziprazidon uvek više gasi fluorescenciju proteina od sertindola, a manje u odnosu na klopazin, bez obzira na molarni odnos HSA:SK u smeši.



Slika 17. Emisioni fluorescentni spektri odmašćenog HSA (A) i HSA zamašćenog stearinskom kiselinom (SK) u (molarnim) odnosima HSA:SK 1:1 (B), 1:2 (C), 1:3 (D) i 1:4 (E), pri titraciji HSA sertindolom (S), ziprazidonom (Z) i klopazinom (C) u odnosu HSA:lek 1:2 (mol proteina/mol liganda).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da titracija odmašćenog HSA i odgovarajućih HSA uzoraka zamašćenih sa SK u molarnom odnosu od 1:1 do 1:4, sa sva tri leka, dovodi do smanjenja intenziteta emisionog pika proteina na oko 350 nm, koji potiče od fluorescencije Trp214. U većini nativnih proteina, hidrofobni Trp ostatak je okružen drugim hidrofobnim amino-kiselinskim ostacima, tako da nakon ekscitacije, emituje fluorescenciju sa pikom na oko 330 nm. Kod HSA se triptofanski emisioni pik obično nalazi oko 340 nm, ali može biti pomeren na 350 nm usled promene mikrokruženja Trp214 ostatka, jedinog triptofana u molekulu, koji je pozicioniran unutar hidrofobne šupljine Sudlow I vezujućeg mesta (**Peters, 1996**). Pored doprinosa u formiranju hidrofobnog vezujućeg mesta u okviru subdomena IIA, ovaj Trp214 ostatak učestvuje i u formiranju hidrofobnih sila između dodirnih površina subdomena IIA i IIIA (**He i Carter, 1992; Peters, 1996**). Usled površinskog pozicioniranja Trp214 ostatka u strukturi molekula HSA, dobija se karakterističan emisioni pik na 350 nm. Tokom titracije odmašćenog HSA ziprazidonom došlo je do dodatnog crvenog pomeraja u odnosu na kontrolni HSA, što ukazuje na dodatno izlaganje Trp214 manje hidrofobnom okruženju (**Lakowicz, 2006**). Ovo pomeranje emisionog maksimuma sugerise indukovanje strukturnih promena molekula HSA, usled vezivanja ziprazidona za domen I koji je u neposrednom kontaktu sa domenom II (**Zsila, 2013**).

Procentualna smanjenja intenziteta fluorescencije, dobijena pri svim molarnim odnosima HSA/lek i pri molarnim odnosima HSA/SK, pokazuju da klopapin najviše, a sertindol najmanje gasi intenzitet fluorescencije koji potiče od HSA-Trp214. Do gašenja fluorescencije dolazi usled različitih procesa, kao što su reakcije u pobuđenom stanju, kolizioni energetske transfer (gašenje signala usled sudara molekula), prenos energije i reakcije formiranja kompleksa (**Airinei i sar., 2011**). Na osnovu dobijenih rezultata u ovom eksperimentu, smanjenje intenziteta fluorescencije HSA primarno je uzrokovano vezivanjem klopapina za Sudlow I vezujuće mesto (**Wu i sar., 2011**), ili ziprazidona za IB vezujuće mesto (**Zsila, 2013**). Kako se klopapin vezuje u neposrednoj blizini Trp214, on najviše doprinosi smanjenju intenziteta fluorescencije, dok ziprazidon, koji se vezuje dalje od Trp214, pokazuje manji efekat na gašenje signala u odnosu na klopapin. Za sertindol ne postoje literaturni podaci o mestu vezivanja na molekulu HSA, ali njegovo vezivanje nesumljivo pokazuje najmanji efekat na smanjenje intenziteta fluorescencije HSA-Trp214.

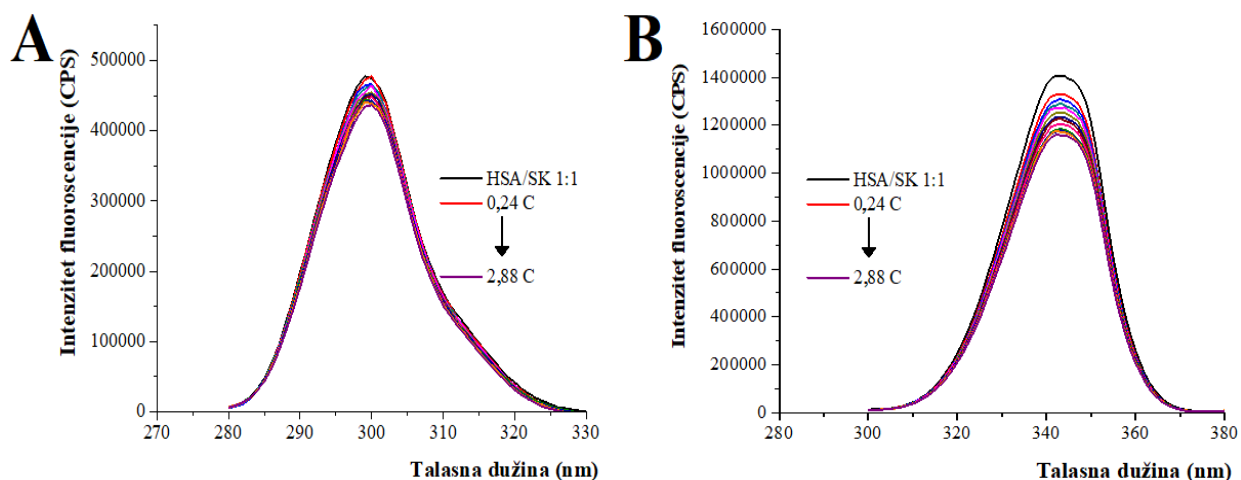
Opšti zaključak ovog eksperimenta je da vezivanje ispitanih lekova za odmašćeni i zamašćeni HSA dovodi do smanjenja intenziteta fluorescence HSA na način koji ukazuje na promene u strukturi molekula HSA u okolini ostatka Trp214, kao i da na ove promene utiče broj vezanih molekula SK za HSA, tip leka koji se vezuje za protein i molarni odnos HSA:lek.

4.1.2. Uticaj vezivanja lekova ziprazidona, klopapina i sertindola za HSA na promene u strukturi molekula HSA - Sinhroni fluorescentni spektri

Prilikom snimanja emisionih fluorescentnih spektara nakon dodavanja lekova (sertindola, klopapina i ziprazidona) u rastvor HSA zamašćen sa SK u odnosu HSA/SK od 1:1 do 1:4 (mol/mol) uočeno je da se pri nekim odnosima HSA/SK (1:2 i 1:4) i za neke lekove (klopapin i ziprazidon) dešavaju promene talasne dužine maksimuma emisionog fluorescentnog spektra proteina (**Slike 14 i 15**). Pomaci u poziciji maksimuma emisije, ka većim ili manjim talasnim dužinama, ukazuju na promenu polarnosti oko fluorofore u molekulu. Zbog najvišeg doprinosa Trp ostatka intenzitetu fluorescencije HSA molekula (**Lakowicz, 2006**), i kako se ekscitacijom na 295 nm pobuđuje samo Trp214, snimanje klasičnih emisionih spektara omogućilo je da se proceni da li dolazi do promene hidrofobnosti oko ovog ostatka vezivanjem ispitivanih lekova.

S obzirom da se dva od tri ispitana leka vezuju za dobro poznata mesta različito udaljena od ostatka Trp214, sinhrona fluorescentna spektroskopija je iskorišćena za detaljnije proučavanje uticaja vezivanja lekova na promenu strukture molekula HSA po njihovom vezivanju. Selektivno praćenje promene izgleda sinhronih fluorescentnih spektara HSA, koji potiču od 18 ostataka Tyr, i 1 ostatka Trp u strukturi molekula HSA (**Slika 8**), omogućuje šire sagledavanje promena uticaja interakcija lekova sa molekulom HSA na polarnost (oko ovih) fluorofora koje su asimetrično raspoređene unutar proteina.

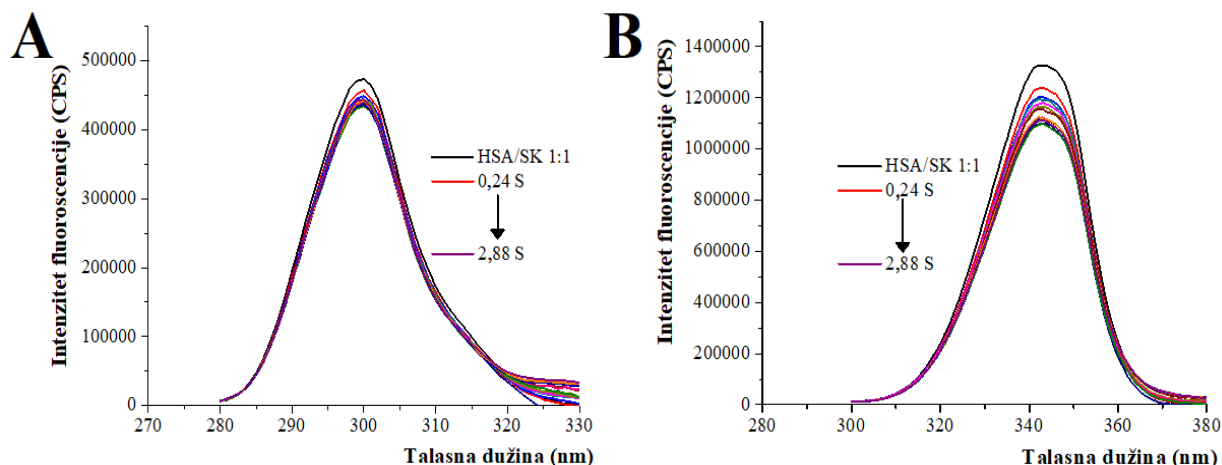
Sinhroni fluorescentni spektari su snimljeni samo za uzorke HSA zamašćene sa SK u odnosu HSA:SK 1:1 (mol/mol), tokom titracije klopazinom, sertindolom i ziprazidonom u odnosu HSA:lek od 1:0,24 do 1:2,88 (mol/mol). Prilikom snimanja sinhronih fluorescentnih spektara za svaki tip ostataka aromatičnih amino-kiselina ispoštovan je karakterističan interval skeniranja $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{emisije}} - \lambda_{\text{ekscitacije}}$), koji iznosi ($\Delta\lambda$) 15 nm za Tyr ostatke i 60 nm za Trp ostatak. Na osnovu spektara prikazanih na **slikama 18–20**, uočava se da pri najmanjem molarnom odnosu HSA:lek (1:0,24) sva tri leka gase intenzitet fluorescencije Tyr i Trp ostataka u odnosu na početnu vrednost fluorescencije, osim kod sinhronog spektra Tyr nakon dodatka klopazina (**Slika 18A**). Dalje povećanje odnosa HSA:lek do 1:2,88 (mol/mol) ima za posledicu dalje smanjenje intenziteta fluorescencije. U odnosu na sertindol i klopazin, titracija ziprazidonom je dovela do najvećeg smanjenja intenziteta fluorescencije, u oba sinhrona spektra (34,4% za Tyr i 41,8% za Trp).



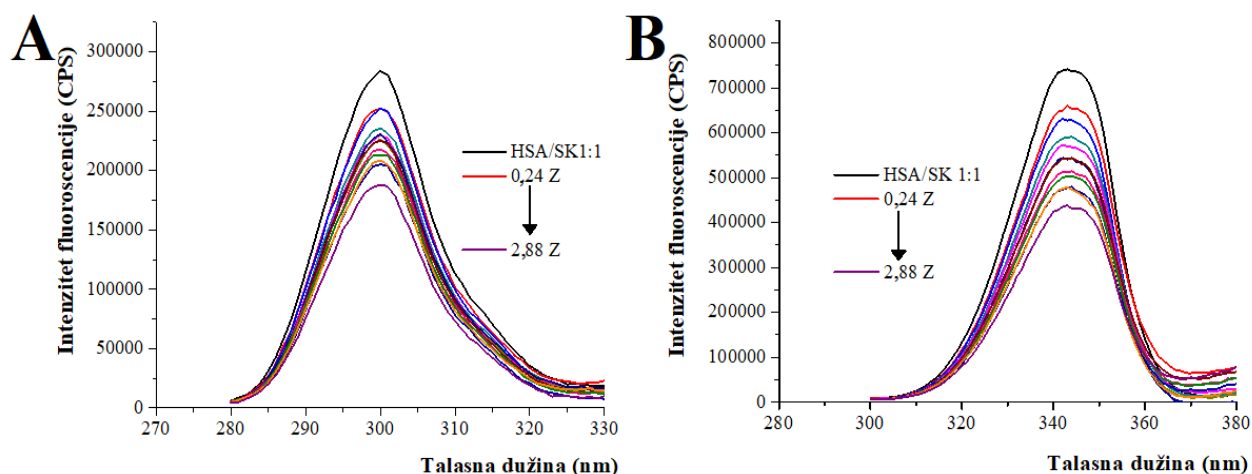
Slika 18. Sinhroni fluorescentni spektri Tyr ostataka (**A**) i Trp ostatka (**B**) HSA zamašćenog sa SK u molarnom odnosu HSA/SK 1:1, tokom titracije klopazinom (C) pri odnosima HSA/lek od 1:0,24 do 1:2,88 (mol/mol).

Kod klopazina se uočava blago pomeranje maksimuma fluorescencije ka *većim* talasnim dužinama za Tyr ostatak (**Slika 18A**) i *manjim* talasnim dužinama za Trp ostatak (**Slika 18B**). Prilikom vezivanja sertindola za HSA ne uočava se pomeranje maksimuma fluorescencije niti u jednom sinhronom spektru, dok vezivanje ziprazidona za HSA/SK 1:1 (mol/mol) dovodi do pomeranja maksimuma fluorescencije Tyr ka *manjim* talasnim dužinama (plavi pomeraj) (**Slika 20A**). Može se iz ovog rezultata zaključiti da pri odnosu HSA/SK 1:1 (mol/mol) i rastućem odnosu HSA/lek od 1:0,24 do 1:2,88 (mol/mol), sva tri ispitana leka dovode do *različitih* efekata na promenu polarnosti oko ostataka aromatičnih amino-kiselina u molekulu HSA. Vezivanje klopazina ima za posledicu povećanje polarnosti oko Tyr ostataka i smanjenje polarnosti

(povećanje hidrofobnosti) oko Trp ostatka. Vezivanje ziprazidona dovodi do smanjenja polarnosti oko ostatka Tyr, a da se pri tome ne menja polarnost oko Trp ostatka. Vezivanje sertindola ne dovodi do promene polarnosti u okruženju bilo kojeg ostatka aromatičnih amino-kiselina.



Slika 19. Sinhroni fluorescentni spektri Tyr ostatka (**A**) i Trp ostatka (**B**) HSA zamašćenog sa SK u molarnom odnosu HSA/SK 1:1, tokom titracije sertindolom (S) pri odnosima HSA/lek od 1:0,24 do 1:2,88 (mol/mol).



Slika 20. Sinhroni fluorescentni spektri Tyr ostatka (**A**) i Trp ostatka (**B**) HSA zamašćenog sa SK u molarnom odnosu HSA/SK 1:1, tokom titracije ziprazidonom (Z) pri odnosima HSA/lek od 1:0,24 do 1:2,88 (mol/mol).

Kako je iz literaturnih podataka poznato da se klopazipin vezuje za Sudlow I vezujuće mesto na HSA (**Wu i sar., 2011**) koje je u neposrednoj blizini ostatka Trp214, interesantno je da je snimanje sinhronizovanih emisijonih spektara za Trp pokazalo da samo za klopazipin dolazi do povećanja hidrofobnosti oko Trp214. Dobijeni rezultat da ziprazidon i sertindol ne dovode do promene polarnosti oko Trp ostatka, pokazujući time manji efekat u okolini Trp214, ukazuje da se ova dva leka ne vezuju za Sudlow I vezujuće mesto. Kako je poznato da se ziprazidon vezuje za IB subdomen (**Zsila, 2013**), i kako njegovo vezivanje dovodi do promene u polarnosti oko

Tyr (7 od 18 ostataka u domenu I), a sertindol ne pokazuje slične efekte, dobijeni rezultati sugerišu da se sertindol verovatno ne vezuje u IB subdomenu HSA i pretpostavljeno je da se vezujuće mesto za sertindol verovatno nalazi u okviru domena III u molekulu HSA.

4.1.3. Određivanje vezujućeg mesta za sertindol na molekulu HSA

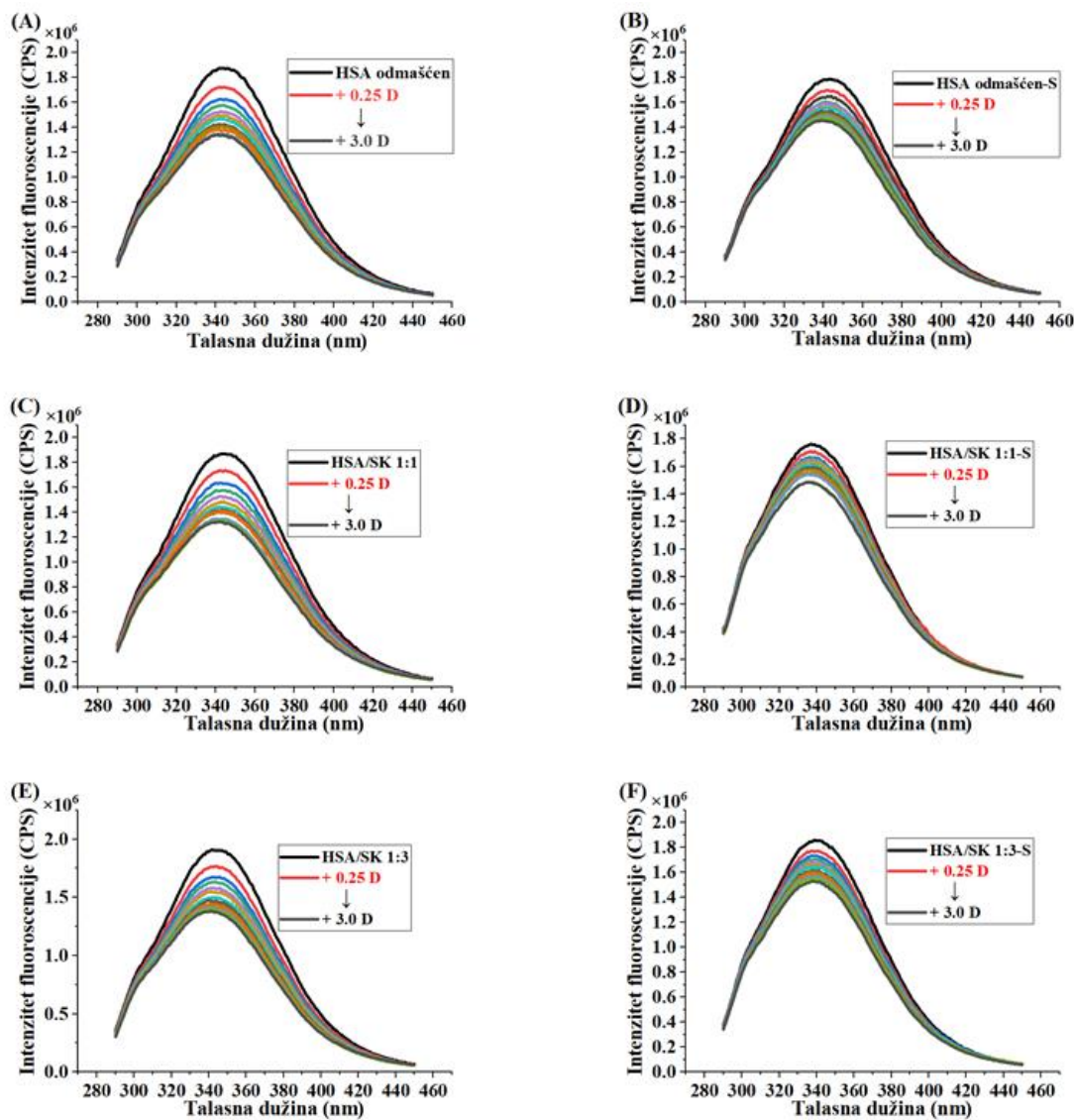
Ne postoje literaturni podaci o mestu vezivanja sertindola na molekulu HSA. Na osnovu zaključaka izvedenih u poglavlju 4.1.2., pretpostavljeno je da se u domenu III HSA verovatno nalazi vezujuće mesto za ovaj lek. Kako je već istaknuto, u okviru molekula HSA identifikovana su dva glavna vezujuća mesta za ksenobiotike, lokalizovana u subdomenima IIA (Sudlow I) i IIIA (Sudlow II) (**Sudlow i sar., 1975; Sudlow i sar., 1976**). Prilikom ispitivanja mesta vezivanja nekog leka za HSA koriste se stereotipični ligandi za Sudlow I i II vezujuće mesto (redom, varfarin i diazepam) i primenjuju se dve strategije:

- u prvoj se HSA sa stereospecifičnim vezanim ligandom (varfarin ili diazepam) titruje sa lekom, uz istovremeno praćenje promene intenziteta fluorescencije;
- u drugoj se HSA sa vezanim lekom titruje sa stereospecifičnim ligandom, uz istovremeno praćenje promene intenziteta fluorescencije.

S obzirom da je titracija odmašćenih i kontrolisano zamašćenih HSA sertindolom, do odnosa HSA:lek 1:4,5 (mol/mol), dovela do najvećeg smanjenja intenziteta fluorescencije na 350 nm, nakon ekscitacije na 295 nm, od 2,7 do 6,2% (sa srednjom vrednošću od 4,8%), što je u domenu eksperimentalne greške, kao i da nije primećen pravilan pad intenziteta signala sa porastom molarnog odnosa HSA:lek (**Slika 16**), primenjena je *druga* strategija za određivanje vezivnog mesta sertindola na molekulu HSA. Praćena je promena intenziteta fluorescencije odmašćenog HSA i zamašćenog sa SK u molarnim odnosima 1:1 i 1:3, bez i sa prisutnim sertindolom u molarnom odnosu HSA:lek 1:1 (HSA-S), tokom titracije diazepamom u molarnim odnosima HSA:diazepam od 1:0,25 do 1:3, nakon ekscitacije proteina na 280 nm. Određene su konstante vezivanja (K_a) diazepama i broj vezujućih mesta (**Materijali i metode, odeljak 3.7.3.**) u svim ispitivanim molarnim odnosima HSA:SK:S (**Slika 21; Tabela 2**).

Vezivanje diazepama za odmašćeni i zamašćeni HSA (HSA/SK 1:1 i 1:3; mol/mol), bez i sa vezanim sertindolom u odnosu HSA:S 1:1 (mol/mol), imalo je za posledicu smanjenje intenziteta fluorescencije, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji sa porastom odnosa HSA/diazepam (1:0,25 do 1:3,0; mol/mol). U svim uzorcima HSA sa prisutnim sertindolom, smanjenje intenziteta fluorescencije tokom titracije diazepamom bilo je uvek *manje* u odnosu na odgovarajuće kontrole (HSA bez vezanog sertindola), pri datom molarnom odnosu HSA:diazepam.

Sa povećanjem broja vezanih molekula SK za HSA, vezivanje diazepama za HSA dovodi do pomeranja maksimuma fluorescencije ka *manjim* talasnim dužinama (plavi pomeraj), bez obzira na prisustvo sertindola u inkubacionoj smeši (**Slika 21**). S obzirom da su emisijski spektri proteina dobijeni nakon ekscitacije na 280 nm, kada se pobuđuju sve aromatične aminokiseline, pozicija maksimuma emisijonog pika svih uzoraka HSA bez prisutnog diazepama je pomerena na 340 nm u odnosu na poziciju maksimum pika (350 nm) kada se pobuđuje samo Trp214 ostatak (**Slike 14–16**). Ovaj plavi pomeraj ukazuje da su ostaci Tyr više uronjeni u hidrofobno okruženje u odnosu na Trp214, kao i da vezivanje diazepama za Sudlow II vezujuće mesto dodatno doprinosi povećanju hidrofobnosti oko aromatičnih aminokiselina u proteinu.



Slika 21. Fluorescentni spektri odmašćenog HSA i HSA zamašćenog sa SK u molarnom odnosu HSA/SK 1:1 i 1:3 bez (**A**, **C** i **E**) i sa (**B**, **D** i **F**) vezanim sertindolom (S) u odnosu HSA/S 1:1 (mol/mol) tokom titracije diazepamom (D) u odnosu HSA:lek od 1:0,25 do 1:3,0 (mol/mol). Ekscitacija proteina je urađena na 280 nm.

Da bi se uporedio uticaj broja vezanih molekula SK za HSA i prisustva sertindola na vezivanje diazepama za Sudlow II vezujuće mesto na proteinu određene su konstante vezivanja (asocijacije) i broj vezujućih mesta diazepama po molekulu HSA (**Tabela 2**). Na osnovu dobijenih vrednosti K_a diazepama za odmašćeni HSA i HSA zamašćen SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:1 i 1:3 – 17,40, 16,05 i 13,40 $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ – može se zaključiti da povećanje broja vezanih molekula SK za HSA dovodi do *smanjenja* K_a diazepama za HSA za 7,8% i 23% u odnosu na odmašćeni HSA. Kada je za odmašćeni HSA i HSA zamašćen SK (u molarnim odnosima HSA:SK 1:1 i 1:3) vezan sertindol, dobijene K_a diazepama su, redom, za 73,1%, 74,3% i 60%, manje u odnosu na odgovarajući HSA bez sertindola.

Tabela 2. Konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) diazepama za odmašćeni HSA i HSA zamašćen SK u odnosima HSA/SK 1:1 i 1:3 (mol/mol), bez i sa vezanim sertindolom (S) u odnosu HSA:S 1:1 (mol/mol) na 298K i pH 7,4.

Kompleks	$K_a \times 10^4 (M^{-1})$	n
Diazepam +		
odmašćen HSA	17,40	0,551
odmašćen HSA-S	4,68	0,525
HSA/SK 1:1	16,05	0,616
HSA/SK 1:1-S	4,13	0,681
HSA/SK 1:3	13,40	0,553
HSA/SK 1:3-S	5,37	0,585

Dobijena K_a diazepama za odmašćeni HSA sa vezanim sertindolom smanjuje se za 3,7 puta u odnosu na vrednost dobijenu za odmašćeni HSA, što ukazuje da se vezujuća mesta diazepama i sertindola poklapaju. Potvrdu navedenoj pretpostavci predstavljaju i dobijeni rezultati za određene K_a diazepama pri vezivanju za HSA:SK 1:1 (mol/mol) bez i sa vezanim sertindolom. Kada se vezuje prvi molekul SK za odmašćeni HSA, dolazi do strukturnih promena molekula HSA koje dovode do male promene K_a diazepama u odnosu na odmašćeni HSA (redom, 17,40 i $16,05 \times 10^4 M^{-1}$), što znači da se vezujuća mesta diazepama i masnih kiselina ne preklapaju potpuno. CD spektroskopija u dalekoj oblasti je pokazala da vezivanje do četiri molekula SK za HSA ne dovodi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi HSA, ali dovodi do promena u okruženju ostataka aromatičnih aminokiselina (Jovanović, 2013). Kada je vezan molekul sertindola za odmašćeni HSA ili HSA:SK 1:1 (mol/mol) dolazi do smanjenja K_a diazepama za 3,7 i 3,9 puta, a kako je sinhronim spektrima potvrđeno da vezivanje sertindola za HSA:SK 1:1 (mol/mol) ne dovodi do promena u okruženju ostataka Trp i Tyr, time i velikih promena u strukturi molekula HSA, tako i 3D strukturi vezujućeg Sudlow II mesta, može se zaključiti da je kompeticija između diazepama i sertindola za isto vezujuće mesto *jedini* uzrok uočenog smanjenja K_a diazepama u prisustvu sertindola vezanog za HSA.

Na osnovu činjenica da se u okviru domena IIIA nalazi Sudlow II vezujuće mesto, ali i dva vezujuća mesta za MK (mesta 3, 4), i da se u neposrednoj blizini subdomena IIIA nalazi subdomen IIIB, u okviru kojeg je peto vezujuće mesto za MK, ono sa najvećim afinitetom vezivanja (Fanali i sar., 2012), može se zaključiti da zajedničko vezivanje jednog molekula SK, uglavnom u IIIB subdomenu, i sertindola za Sudlow II mesto, dovodi do dodatnog smanjenja K_a diazepama u odnosu na vrednost kada je vezan samo sertindol (redom, 3,9 i 3,7 puta). Dalji porast broja vezanih molekula SK za HSA dovodi do daljeg pada vrednosti K_a diazepama za HSA, što ukazuje na kompeticiju između SK i diazepama za Sudlow II vezivno mesto.

Verovatno se nakon vezivanja prvog molekula SK (pre svega peto vezujuće mesto za MK), sledeći molekul SK vezuje više za drugo vezujuće mesto za MK, između dodirnih površina IA i IIA (sledeće po afinitetu vezivanja), a tek potom se treći molekul SK u značajnijoj meri smešta u četvrto vezujuće mesto, u okviru Sudlow II domena (Fanali i sar., 2012). Ono što je interesantno da je, pri molarnom odnosu HSA:SK 1:3, u prisustvu sertindola dobijena vrednost K_a za diazepam bila viša u odnosu na vrednosti dobijene za odmašćeni HSA i HSA:SK 1:1 (mol/mol) u prisustvu sertindola. Jedno od objašnjenja za ovaj nalaz mogao bi biti sinergistički efekat vezivanja SK i sertindola za molekul HSA. Vezivanje drugog molekula SK za HSA, na dodirnoj površini IA i IIA subdomena, uz vezivanje prvog molekula SK u IIIB, dovodi do većih

konformacionih promena molekula HSA (**Jovanović, 2013**), što može lokalno da se odrazi na strukturu Sudlow II vezujućeg mesta, stoga i njegovu sposobnost da sa većim afinitetom veže treći molekul SK ili sertindol.

U vezi dobijenih vrednosti za broj vezujućih mesta za diazepam na molekulu HSA, one su bile u rasponu od 0,525 do 0,681. Najmanja vrednost za broj vezujućih mesta (0,525) dobijena je za odmašćeni HSA, dok su najveće vrednosti nađene kod molarnog odnosa HSA:SK 1:1, bez i sa vezanim sertindolom (redom, 0,616 i 0,681). Prema tome, prisustvo sertindola izgleda da dodatno dovodi do porasta broja vezujućih mesta na HSA. Ovaj rezultat dalje ukazuje na značaj vezivanja barem jednog liganda za molekul HSA na promenu afiniteta i broja vezujućih mesta na molekulu HSA za drugi ligand, odnosno, potvrđuje kooperativne i antagonističke efekte sinergističkog vezivanja različitih liganda za molekul HSA (**Curry i sar., 1998; Curry i sar., 1999; Rondeau i Bourdon 2011; Gryzunov i sar., 2003; Penezić i sar., 2019**). Nakon vezivanja prvog molekula SK za IIIB subdomen HSA dolazi do lokalne promene strukture HSA, koja se prenosi na susedni IIIA subdomen u kome se nalazi Sudlow II vezujuće mesto, koje tako poprma povoljniju konformaciju za vezivanje sertindola ili diazepama.

4.1.4. Određivanje mehanizma i konstanti vezivanja antipsihotika za molekul HSA

U cilju sagledavanja uzročno-posledničnih veza između istovremenog vezivanja različitog broja molekula liganda (SK i/ili ispitivanih antipsihotika) za HSA i uočenog različitog nivoa smanjenja intenziteta dobijenih emisionih i sinhronih spektara, određeni su mehanizmi i konstante vezivanja ispitivanih antipsihotika za molekul HSA. Tip mehanizma gašenja fluorescencije Trp, statičko ili dinamičko, u uzorcima odmašćenog HSA i HSA zamašćenog sa SK u odnosima HSA:SK od 1:1 do 1:4 (mol/mol), nakon titracije klozapinom i ziprazidonom do odnosa HSA:lek 1:4,5 (mol/mol), analiziran je određivanjem parametara Stern-Volmerove jednačine, kao što su Stern-Volmerova konstanta gašenja (K_{sv}) i bimolekularna konstanta gašenja fluorescencije (k_q). Merenje promena intenziteta fluorescencije, osim što pruža informacije o mehanizmu gašenja fluorescencije, dodatno pruža korisne informacije o vezivanju malih molekula za protein, tj. konstantama njihovog vezivanja i broju vezujućih mestu na molekulu proteina, ukoliko se primene odgovarajuće jednačine (**Materijali i metode, odeljak 3.7.3.**).

Nakon određivanja vezujućeg mesta za sertinol u IIIA subdomenu HSA, ponovo je određena K_a sertindola za HSA, snimanjem fluorescentnih spektara pri ekscitaciji HSA na 280 nm, pri čemu je praćeno smanjenje intenziteta fluorescence na 340 nm. Kao i pri ekscitaciji na 295 nm, dobijeni maksimalni procenti gašenja fluorescencije bili su u granicama eksperimentalne greške (oko 5%; rezultati nisu prikazani), bez postepenog pada intenziteta signala sa povećanjem molarnog odnosa HSA:lek. Ovo je verovatno jedan od razloga zašto ne postoji u literaturi podatak za K_a sertindola za HSA.

Iz rezultata datih u Tabeli 3, uočava se da vrednosti određenih parametara (K_{sv} , k_q , K_a i n) opadaju postepeno sa porastom broja vezanih molekula SK za HSA za oba leka. Dalje, dobijene vrednosti K_{sv} , k_q , K_a i n su uvek veće za klozapin u odnosu na one za ziprazidon, za odgovarajući uzorak HSA (odmašćeni HSA ili kontrolisano zamašćeni HSA sa SK u molarnim odnosima HSA:SK od 1:1 do 1:4). Konačno, povećanje broja vezanih molekula SK za HSA ima manji efekat na smanjenje parametara vezivanja klozapina nego ziprazidona na molekul HSA.

Korišćenjem dobijenih Stern-Volmerovih konstanti gašenja, izračunato je da su vrednosti bimolekularne konstante gašenja bile $1,02 - 2,89 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ za oba antipsihotika. Kako su dobijene vrednosti k_q bile dva reda veličine veće od limita za difuzionu konstantu (10^{10} M^{-1}),

zaključeno je da je *statičko* vezivanje antipsihotika za HSA uzrok smanjenja intenziteta fluorescencije na 340 nm, a ne dinamičke interakcije HSA i ispitivanih lekova (Li i sar., 2014).

Do sada je bilo poznato mesto vezivanja ziprazidona za HSA (Zsila, 2013), ne i kvantitativna karakterizacija vezivanja ovog leka. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da K_a ziprazidona za odmašćeni HSA iznosi $0,95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C , te da se ona značajno smanjuje sa povećanjem broja vezanih molekula SK za HSA.

Tabela 3. Stern-Volmerova konstanta gašenja (K_{sv}), bimolekularna konstanta gašenja fluorescencije (k_q), konstanta vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) za vezivanje klopazina i ziprazidona za uzorke odmašćene HSA i HSA/SK (molarni odnos proteina prema SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4) na 37°C i pH 7,4. Vrednosti K_{sv} , K_a i n su izražene kao srednja vrednost ($\pm$ SD) iz dva nezavisna eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu.

		$K_{sv} (\text{M}^{-1})$ $\times 10^4$	$k_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ $\times 10^{12}$	$K_a (\text{M}^{-1})$ $\times 10^4$	n
Klopazin	HSA odmašćen	$2,89 \pm 0,078$	2,89	$1,90 \pm 0,032$	$0,792 \pm 0,013$
	HSA:SK 1:1	$2,48 \pm 0,045$	2,48	$1,73 \pm 0,050$	$0,789 \pm 0,023$
	HSA:SK 1:2	$2,45 \pm 0,064$	2,45	$1,20 \pm 0,048$	$0,690 \pm 0,022$
	HSA:SK 1:3	$2,36 \pm 0,031$	2,36	$0,99 \pm 0,032$	$0,666 \pm 0,021$
	HSA:SK 1:4	$2,34 \pm 0,072$	2,34	$0,82 \pm 0,019$	$0,592 \pm 0,014$
Ziprazidon	HSA odmašćen	$2,18 \pm 0,040$	2,18	$0,95 \pm 0,015$	$0,786 \pm 0,013$
	HSA:SK 1:1	$1,90 \pm 0,028$	1,90	$0,62 \pm 0,021$	$0,661 \pm 0,017$
	HSA:SK 1:2	$1,54 \pm 0,034$	1,54	$0,38 \pm 0,016$	$0,653 \pm 0,018$
	HSA:SK 1:3	$1,12 \pm 0,032$	1,12	$0,29 \pm 0,014$	$0,572 \pm 0,024$
	HSA:SK 1:4	$1,02 \pm 0,021$	1,02	$0,25 \pm 0,005$	$0,545 \pm 0,012$

Dobijene konstante vezivanja klopazina i ziprazidona za odmašćeni HSA i HSA:SK komplekse kretale su se od $0,25$ do $1,90 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, što ukazuje na umereno jako vezivanje antipsihotika za HSA. Dobijena vrednost K_a klopazina za odmašćeni HSA ($1,90 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) odgovara prethodno objavljenoj vrednosti (Wu i sar., 2011).

Uočeno smanjenje afiniteta vezivanja klopazina i ziprazidona za HSA, paralelno sa povećanjem sadržaja vezanih molekula SK za HSA, verovatno je posledica preklapanja njihovih mesta vezivanja. Primarna visoko-afinitetna mesta vezivanja MK za HSA označena su brojevima 5, 2 i 4, a ona umerenog afiniteta sa 1, 3, 6 i 7 (van der Vusse, 2009). Sudlow I vezujuće mesto u subdomenu IIA preklapa se sa sedmim vezujućim mestom za MK na HSA, dok se vezujuće mesto ziprazidona nalazi u subdomenu IB, koje se preklapa sa prvim mestom vezivanja MK (Fasano i sar., 2005; Zsila, 2013). Dobijeni rezultati sugerišu da se sa povećanjem broja vezanih MK za HSA smanjuje dostupnost i ukupni afinitet mesta vezivanja za ispitivane antipsihotike. Sa povećanim vezivanjem SK, procenjeni broj mesta vezivanja za klopazin je smanjen sa 0,792 na 0,592, a za ziprazidon sa 0,786 na 0,545. Ovaj efekat je najverovatnije posledica konformacionih promena veoma fleksibilne native strukture HSA, izazvane kompetitivnim vezivanjem MK i lekova (Reichenwallner i Hinderberger, 2013; Tramarin i sar., 2019).

Dobijeni rezultati otvaraju zanimljiva pitanja vezana za farmakološka i toksikološka svojstva ovih lekova u kliničkim uslovima. Prvo se odnosi na stvarnu koncentraciju slobodnog leka u cirkulaciji kod hronično tretiranih pacijenata. Usled energetske metaboličke disfunkcije, sadržaj

MK u plazmi može biti značajno povećan kod osoba obolelih od shizofrenije (**Orešić i sar., 2011; Yang i sar., 2017**), dovodeći do povećanja koncentracije slobodnog leka u cirkulaciji u odnosu na vrednosti pri normalnom nivou MK u cirkulaciji. Dalje, shizofrenija je bolest koja najčešće zahteva doživotnu terapiju (**Patel i sar., 2014**), uz koju pacijenti često imaju i dijabetes ili hiperlipidemiju, koje su takođe praćene povećanjem sadržaja MK u cirkulaciji (**Cistola, 1991**). Zbog toga, bioraspoloživost antipsihotika, tako i njihov farmakološki/toksikološki efekat, može značajno biti izmenjen u poređenju sa patofiziološkim stanjima koja nisu praćena povećanim sadržajem slobodnih MK u sistemske cirkulaciji.

4.1.5. Uticaj vezivanja ziprazidona, klopazina i sertindola na sadržaj HSA-SH grupe

Oksidativni stres je jedna od karakteristika shizofrenije koji može da dovede do smanjenja sadržaja redukovanih tiola (**Huang i sar., 2010; Topcuoglu i sar., 2017**). Tiolna grupa Cys34 HSA najviše doprinosi ukupnom sadržaju tiola u cirkulaciji i cerebrospinalnoj tečnosti (**Otagiri i sar., 2009; Peters, 1996**). Bočni ostatak Cys34 nalazi se u hidrofobnom džepu na površini IA subdomena, sa 12,6% površine tiolne grupe dostupne spoljašnjoj sredini za reakciju sa molekulima iz okruženja (**Gerstein, 1992**). Promena strukture HSA, usled vezivanja liganda za protein, može da poveća ili smanji dostupnost tiolne grupe. Vezivanje svih ispitivanih antipsihotika u ovom radu dovodi do promene strukture HSA. Kako se ziprazidon, klopazin i sertindol vezuju za mesta različite udaljenosti od Cys34, njihov efekat na dostupnost tiolne grupe HSA, zato i sadržaj HSA-SH grupe može biti različit.

Da bi se proverila ova hipoteza, određen je sadržaj HSA-SH grupa u odmašćenom HSA i kontrolisano zamašćenom HSA SK u odnosu HSA:SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 (mol/mol) bez (kontrolni uzorci) i u prisustvu tri ispitivana leka pri molarnom odnosu HSA:lek 1:0,5, 1:1,5 i 1:2,0, nakon 1h inkubacije HSA sa lekovima na 37°C. U kontrolnim uzorcima, sadržaj HSA-SH grupa je iskazan kao mol-SH grupa/mol HSA, dok je u svim uzorcima HSA sa lekovima sadržaj HSA-SH grupa dat kao procenat (%) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (**Tabela 4; Slika 22**).

Na početku eksperimenta pripremljen je rastvor odmašćenog HSA u kome je sadržaj HSA-SH grupa bio 0,689 mol SH grupa/mol HSA (**Materijali i metode, odeljak 3.6.3.**). U sledećem koraku, od ovog rastvora pripremljeni su rastvori kontrolisano zamašćenih uzoraka HSA:SK (kontrole) (**Materijali i metode, odeljak 3.6.4.**), da bi u poslednjem koraku u njih dodali ispitivane lekove u prethodno definisanim molarnim odnosima HSA:lek.

Iz Tabele 4 se vidi se da je u toku pripreme rastvora zamašćenog HSA:SK u molarnim odnosima 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 (inkubacija sa SK, 1 sat na 37°C, i stajanje pripremljenih rastvora preko noći na 4°C do početka eksperimenta sa lekovima), došlo do pada sadržaja HSA-SH grupa u ovim uzorcima za, redom, 1,5%, 6,1%, 10,5% i 14,9%, u odnosu na odmašćeni HSA, čija je vrednost HSA-SH grupa ostala nepromenjena do početka eksperimenta sa lekovima. Početne vrednosti sadržaja HSA-SH grupa u kontrolnim uzorcima HSA:SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 (mol/mol), iznosile su, redom, $0,679 \pm 0,003$, $0,647 \pm 0,010$, $0,617 \pm 0,007$ i $0,586 \pm 0,010$ mol-SH grupa/mol HSA. Na osnovu vrednosti za sadržaj HSA-SH grupa u uzorcima koji su zamašćeni, u odnosu na odmašćeni HSA, vidi se da porast broja vezanih molekula SK za HSA dovodi do bržeg pada sadržaja HSA-SH grupa. Kod HSA:SK 1:1 (mol/mol) došlo je do smanjenja sadržaja HSA-SH grupa u odnosu na odmašćeni HSA koje nije statistički značajno. Dalje povećanje broja SK vezanih za HSA (od 2 do 4), ne samo da je doveo do statistički značajnog pada HSA tiola u odnosu na odmašćeni i HSA:SK 1:1 (mol/mol) uzorak, već i između njih (**Tabela 4**).

Tabela 4. Sadržaj HSA-SH grupa u odmašćenom HSA i kontrolisano zamašćenom HSA sa stearinskom kiselinom (SK) u molarnim odnosima HSA:SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, bez (kontrolni uzorci) i u prisustvu klopapina, ziprazidona i sertindola, pri odnosu HSA:lek 1:0,5, 1:1,5 i 1:2,0 (mol/mol). Sadržaj HSA-SH grupa je izražen u mol-SH grupa/mol HSA u kontrolama, ili kao procenat (%) u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak HSA. Dobijene vrednosti za sadržaj HSA-SH grupa prikazane su kao srednja vrednost $\pm$ SD.

Sadržaj HSA-SH grupa (mol-SH grupa/mol HSA)						
Lek:HSA molarni odnos	HSA	HSA:SK	HSA:SK	HSA:SK	HSA:SK	
	odmašćen	1:1	1:2	1:3	1:4	
	0,689±0,020	0,679±0,003	0,647±0,010 ^a	0,617±0,007 ^{ab}	0,586±0,010 ^{abc}	
Sadržaj HSA-SH grupa (%)						
Klozapin	0,5	96,3 ± 2,2	96,8 ± 4,6	101,5 ± 1,5	100,3 ± 1,6	98,8 ± 1,7
	1,5	98,7 ± 2,0	95,0 ± 1,1	98,3 ± 0,7	101,8 ± 3,2	100,5 ± 3,4
	2,0	99,3 ± 0,4	97,2 ± 3,0	94,0 ± 3,3	103,7 ± 1,1	96,6 ± 3,3
	X±SD	97,1 ± 1,5	96,3 ± 2,9	97,9 ± 1,8	101,9 ± 2,0	98,6 ± 2,8
Ziprazidon	0,5	98,4 ± 1,2	105,0 ± 1,0*	105,4 ± 0,5*	106,1 ± 2,0*	106,3 ± 0,5*
	1,5	103,4 ± 0,4	115,1 ± 1,3*	116,8 ± 0,2*	116,9 ± 2,8*	118,9 ± 1,9*
	2,0	104,3 ± 0,4	119,4 ± 0,3*	120,5 ± 0,8*	124,0 ± 2,1*	124,1 ± 2,5*
	X±SD	102,0 ± 0,7	113,2 ± 0,9*	114,2 ± 0,5*	115,7 ± 2,3*	116,4 ± 1,6*
Sertindol	0,5	97,7 ± 0,5	99,5 ± 1,7	101,9 ± 0,3	97,2 ± 5,8	99,1 ± 2,3
	1,5	96,7 ± 0,8	96,5 ± 1,7	102,2 ± 3,4	95,1 ± 1,2	95,5 ± 2,5
	2,0	98,0 ± 0,3	97,4 ± 1,7	92,5 ± 1,9*	97,4 ± 1,2	94,1 ± 2,5*
	X±SD	97,5 ± 0,5	97,8 ± 1,7	98,9 ± 1,9	96,6 ± 2,7	96,2 ± 2,4

^a p<0,05 u odnosu na odmašćeni HSA i HSA:SK 1:1

^b p<0,05 u odnosu na HSA:SK 1:2

^c p<0,05 u odnosu na HSA:SK 1:3

*p<0,05 (t-test) u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak

Normalizovani rezultati za sadržaj HSA-SH grupa (**Slika 22**) pokazuju da antipsihotici, nakon vezivanja za odmašćeni i zamašćeni HSA u različitim molarnim odnosima HSA:lek, pokazuju različiti efekat na sadržaj HSA-SH grupa u odnosu na odgovarajuće kontrole bez vezanog leka.

Sadržaj HSA-SH grupa nakon vezivanja klopapina u odnosima HSA:lek od 1:0,5 do 1:2 (mol/mol) za odmašćeni ili zamašćeni HSA bio je od 94 do 103,7%, bez statistički značajne promene u odnosu na početne vrednosti HSA-SH grupa u odgovarajućim kontrolama (normalizovane kao 100%). Kod odmašćenog HSA i HSA:SK 1:3 (mol/mol) primećuje se rastući trend, a kod HSA:SK 1:2 (mol/mol) opadajući trend za sadržaj HSA-SH grupa sa porastom molarnog odnosa HSA:lek od 1:0,5 do 1:2 (**Tabela 4**). Za HSA:SK 1:1 (mol/mol) dobijene su najmanje varijacije u sadržaju HSA-SH grupe.

Vezivanje sertindola dovodi do promene sadržaja HSA-SH grupa u rasponu od 92,5 do 102,2%, u zavisnosti od molarnog odnosa HSA:lek i zasićenja HSA sa SK. Osim pri vezivanju leka za HSA:SK 1:2 do odnosa HSA:lek 1:1,5 (mol/mol) gde je dobijeno blago povećanje sadržaja HSA-SH grupa, u svim ostalim uzorcima dobijeno je smanjenje u sadržaju ove grupe, koje

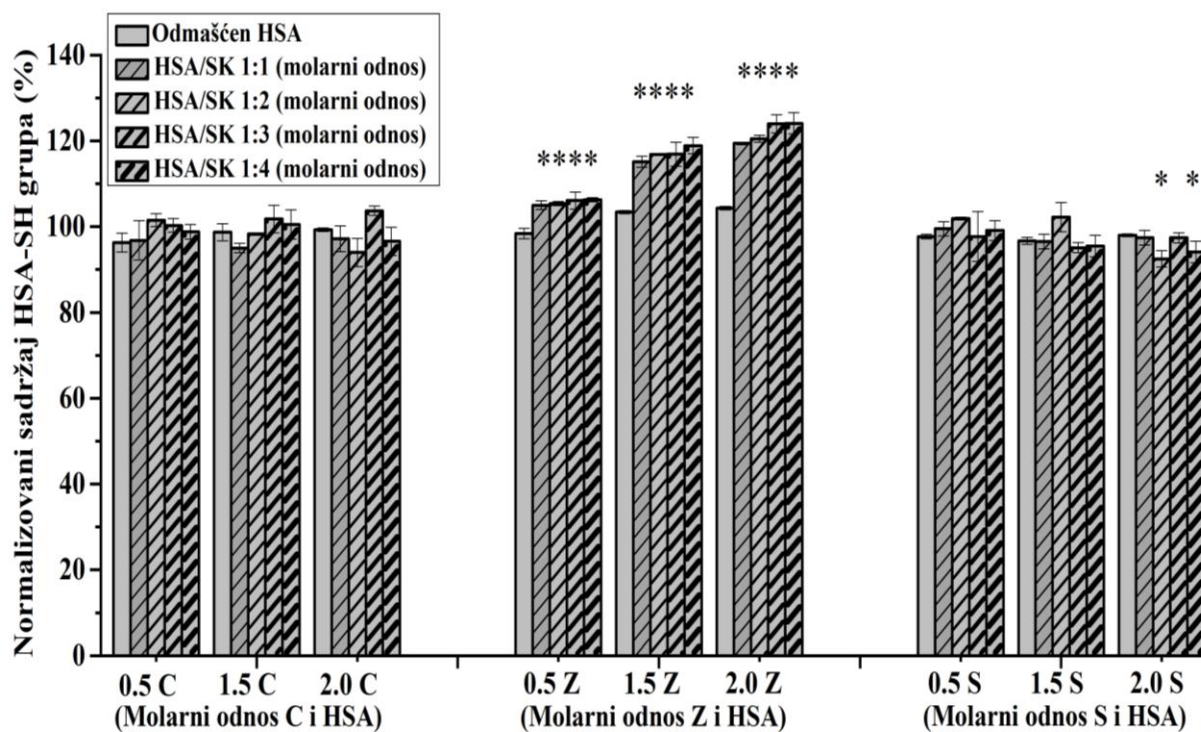
dostiže statističku značajnost ($p < 0,05$) samo kod uzoraka HSA:SK 1:2 i 1:4 pri odnosu HSA:lek 1:2 (sve mol/mol). Što se tiče trenda promene sadržaja HSA-SH grupe sa porastom molarnog odnosa HSA:lek, samo kod HSA:SK 1:4 je dobijeno njeno kontinualno opadanje u sadržaju.

Nasuprot klopazinu i sertindolu, porast odnosa HSA:ziprazidon u svim uzorcima proteina doveo je do rastućeg trenda sadržaja HSA-SH grupa. Interesantno, u svim zamašćenim uzorcima HSA sadržaj HSA-SH grupe je bio statistički značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrole, pri čemu porast zasićenja HSA sa SK i lekovima takođe pokazuju pozitivan efekat na sadržaj HSA-SH grupa. Samo kod odmašćenog HSA u prisustvu najnižeg molarnog odnosa HSA:lek dobijeno je smanjenje sadržaja HSA-SH grupa (**Tabela 4**).

Primećene promene sadržaja HSA-SH grupa, nakon vezivanja SK i/ili ispitivanih antipsihotika za HSA, potvrdile su hipotezu da promene u strukturi molekula HSA, uslovljene vezivanjem ovih liganda za protein, mogu da se odraze na sadržaj HSA-SH grupa. Prostorna udaljenost vezivnih mesta za pojedine ligande (SK ili ispitivane lekove) na molekulu HSA, u odnosu na Cys34 ostatak, je faktor koji određuje stepen promene sadržaja HSA-SH grupe. Na osnovu lokalizacije vezivnih mesta i njihovih afiniteta za MK na molekulu HSA (**Curry i sar., 1998; Bhattacharya i sar., 2000; Kragh-Hansen i sar., 2002; Reichenwallner i Hinderberger, 2013; Simard i sar., 2006**), primećene promene sadržaja HSA-SH grupa tokom povećanja zasićenja molekula HSA sa SK mogle bi se lako objasniti. Nakon vezivanja jednog molekula SK za HSA promena sadržaja HSA-SH grupe ostala je gotovo ista kao i kod odmašćenog HSA, što je verovatno posledica vezivanja ovog molekula SK za peto vezujuće mesto najvećeg afiniteta za MK u subdomenu IIIB (**Fanali i sar., 2012**), koje je prostorno veoma udaljeno od Cys34 ostatka u IA subdomenu (**Slika 11**). Dalji porast zasićenja HSA sa SK imao je za posledicu popunjavanje drugih vezujućih mesta za MK nižeg afiniteta, prvo drugo vezujuće mesto za MK (između dodirnih površina subdomena IA i IIA), a zatim četvrto (deo Sudlow II vezujućeg mesta u okviru IIIA subdomena) (**Simard i sar., 2006**). Vezivanje drugog molekula SK, verovatno za drugo vezujuće mesto u neposrednoj blizini Cys34 ostatka, dovelo je do promene konformacije u ovom delu molekula HSA, što je imalo za posledicu značajan pad ($p < 0,05$) u sadržaju HSA-SH grupe u odnosu na odmašćeni HSA i HSA:SK 1:1 (mol/mol). Dalji porast zasićenja HSA:SK (do molarnog odnosa 1:4) doveo je do daljeg značajnog smanjenja sadržaja HSA-SH, ukazujući na još veće promene u strukturi HSA koje uslovljavaju promenu sadržaja HSA-SH grupe.

Kada se u odmašćeni ili zamašćeni HSA dodaju ispitivani antipsihotici, promena sadržaja HSA-SH grupe bila je određena kako brojem vezanih molekula SK za HSA, tako i lokalizacijom vezujućeg mesta za lek i stepenom zasićenja HSA sa lekom. Najveći efekat na sadržaj HSA-SH grupa je uočen nakon vezivanja ziprazidona. Ovaj rezultat bi se mogao objasniti činjenicom da se ziprazidon vezuje u subdomenu IB u neposrednoj blizini Cys34 ostatka (**Zsila, 2013**). Takođe, uočeno sinergističko dejstvo vezivanja SK i ziprazidona za HSA na porast sadržaja HSA-SH grupa izgleda da je posledica zajedničkog doprinosa oba molekula na promenu strukture molekula HSA, usled ne postojanja preklapanja njihovih vezujućih mesta na HSA pri ispitivanim molarnim odnosima HSA:SK. Nepravilni trend istovremenog vezivanja klopazina, ili sertindola i SK, za HSA na sadržaj HSA-SH grupa mogao bi se objasniti postojanjem kompeticije između SK i ispitivanog leka za isto vezujuće mesto (sertindola i SK za četvrto vezujuće mesto za MK na HSA), ili vezivanjem SK u neposrednoj blizini vezujućeg mesta za lek (drugo vezujuće mesto za MK je u kontaktu sa Sudlow I vezujućim mestom u kome se vezuje klopazin) (**Wu i sar., 2011**). Vezivanje klopazina gotovo da nema efekta na sadržaj HSA-SH grupa, što bi se moglo objasniti njegovim vezivanjem u relativno prostrani džep Sudlow I vezujućeg mesta i promenom

strukture molekula HSA koja ima negativni efekat na sadržaj HSA-SH grupe. Ovaj negativni efekat vezivanja klopazina uočava se i kod odmašćenog HSA, i kod zamašćenog HSA do odnosa HSA:SK 1:2 (mol/mol). Suprotan efekat vezivanja klopazina i SK najuočljiviji je pri molarnom odnosu HSA:SK 1:2, kada povećanje zasićenja HSA klopazinom dovodi do konstantnog pada sadržaja HSA-SH grupa. Što se tiče uticaja sertindola, koji se vezuje za Sudlow II vezujuće mesto, na sadržaj HSA-SH grupa, može se zaključiti da i on, kao i klopazin, dovodi do strukturnih promena sa negativnim efektom na sadržaj HSA-SH grupe.



Slika 22. Promena sadržaja HSA-SH grupe u odmašćenom i zamašćenom HSA sa stearinskom kiselinom (SK) u molarnim odnosima HSA:SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, nakon vezivanja lekova (klopazin (C), ziprazidon (Z) ili sertindol (S)) u HSA:lek 1:0,5, 1:1,5 i 1:2 (mol/mol), u odnosu na odgovarajuće uzorke HSA bez vezanog leka. Sadržaj HSA-SH grupa je izražen kao procenat u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak HSA normalizovan kao 100%. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ SD. * $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da promene u strukturi molekula HSA, nastale usled vezivanja SK i ispitivanih antipsihotika za ovaj protein, mogu značajno da utiču na sadržaj HSA-SH grupa. Ziprazidon dovodi do statistički značajnog povećanja ($p < 0,05$) njegovog sadržaja, dok vezivanje klopazina i sertindola ne dovode do značajne promene u sadržaju HSA-SH grupe. Sadržaj HSA-SH grupe zavisi, sa jedne strane, od dostupnosti tiolne grupe, a sa druge, od njene reaktivnosti. Dostupnost tiolne grupe je određena površinom kojom je izložena okolnoj sredini, a reaktivnost njenim nukleofilnim svojstvima (Bonanata i sar., 2017).

4.1.6. Uticaj vezivanja sertindola, klopapina i ziprazidona na reaktivnost HSA-SH grupe

Da bi se proverilo da li je promena reaktivnosti HSA-SH grupa, usled vezivanja lekova, bila uzrok promene sadržaja HSA-SH grupa, u istim uzorcima HSA (odmašćen i zamašćen sa SK u molarnim odnosima HSA:SK od 1:1 do 1:4), bez i u prisustvu ziprazidona, klopapina i sertindola, u odnosima HSA:lek od 1:0,5 do 1:2 (mol/mol), određena je konstanta brzine pseudo-prvog reda (k') za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB-om. Da bi bio zadovoljen uslov kinetike reakcije pseudo-prvog reda, količina DTNB u reakcionoj smeši bila je 40 puta veća od sadržaja ukupnih slobodnih HSA-SH grupa u svim pojedinačnim uzorcima. Određene k' vrednosti su prikazane u **Tabeli 5**, a pojedinačni doprinos antipsihotika smanjenju ili povećanju reaktivnosti HSA-SH grupa, predstavljeni kao $\Delta k'$, u odnosu na dobijene vrednosti k' za odmašćeni HSA i HSA zamašćeni sa SK u ispitivanim odnosima, prikazan je na **slici 23**.

Tabela 5. Konstante brzine pseudo prvog reda (k') za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB-om, u odmašćenom HSA i u HSA:SK u molarnim odnosima 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, bez i u prisustvu sertindola, klopapina i ziprazidona u odnosima HSA:lek 1:0,5, 1:1,5 i 1:2 (mol/mol). Dobijene vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\times 10^{-3} \pm \text{SD}$.

		$k' \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$				
HSA:lek		HSA	HSA:SK	HSA:SK	HSA:SK	HSA:SK
molarni odnos		odmašćen	1:1	1:2	1:3	1:4
		$18,3 \pm 0,6$	$22,8 \pm 0,6^a$	$25,2 \pm 0,7^{ab}$	$28,3 \pm 1,1^{abc}$	$32,7 \pm 1,1^{abcd}$
Sertindol	0,5	$21,8 \pm 0,8^*$	$23,7 \pm 0,1$	$25,3 \pm 0,4$	$29,0 \pm 0,4$	$31,7 \pm 0,7$
	1,5	$23,5 \pm 0,6^*$	$25,1 \pm 0,3^*$	$26,9 \pm 0,3^*$	$28,4 \pm 0,4$	$31,3 \pm 0,3$
	2,0	$26,7 \pm 0,3^*$	$26,6 \pm 0,5^*$	$27,2 \pm 0,1^*$	$29,4 \pm 0,5$	$32,3 \pm 0,2$
X$\pm$SD		$24,0 \pm 0,6^*$	$25,1 \pm 0,3^*$	$26,5 \pm 0,3$	$28,9 \pm 0,4$	$31,8 \pm 0,4$
Klopapin	0,5	$19,2 \pm 0,9$	$23,9 \pm 0,5$	$25,5 \pm 0,2$	$23,8 \pm 0,5^*$	$27,2 \pm 0,4^*$
	1,5	$20,2 \pm 0,7^*$	$24,7 \pm 0,1^*$	$26,6 \pm 0,6$	$24,3 \pm 0,5^*$	$29,6 \pm 0,1^*$
	2,0	$20,4 \pm 0,3^*$	$25,7 \pm 0,2^*$	$27,9 \pm 0,3^*$	$25,8 \pm 0,4^*$	$30,1 \pm 0,7^*$
X$\pm$SD		$19,9 \pm 0,6^*$	$24,8 \pm 0,3^*$	$26,7 \pm 0,3$	$24,6 \pm 0,5^*$	$29,0 \pm 0,4^*$
Ziprazidon	0,5	$24,0 \pm 0,7^*$	$23,9 \pm 0,5$	$26,2 \pm 0,5$	$29,1 \pm 0,5$	$35,1 \pm 0,1$
	1,5	$29,1 \pm 0,5^*$	$29,3 \pm 0,2^*$	$28,7 \pm 0,7^*$	$32,1 \pm 0,3^*$	$38,4 \pm 0,2^*$
	2,0	$29,6 \pm 0,3^*$	$30,6 \pm 0,6^*$	$30,8 \pm 0,5^*$	$33,3 \pm 0,5^*$	$38,6 \pm 0,7^*$
X$\pm$SD		$27,6 \pm 0,5^*$	$27,9 \pm 0,4^*$	$28,6 \pm 0,6^*$	$31,5 \pm 0,4^*$	$37,4 \pm 0,3^*$

* $p < 0,05$ (t-test) u odnosu sa odgovarajućim odmašćenim HSA i HSA/SK uzorcima bez lekova; ^a $p < 0,05$ u odnosu na odmašćeni HSA; ^b $p < 0,05$ prema HSA:SK 1:1; ^c $p < 0,05$ prema HSA:SK 1:2; ^d $p < 0,05$ prema HSA:SK 1:3 (sve mol/mol).

Za odmašćeni i redukovani HSA, dobijena vrednost k' ($18,3 \pm 0,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) je bila statistički značajno manja ($p < 0,05$) od dobijenih vrednosti za HSA zamašćen sa SK pri molarnom odnosu 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 (redom, $22,8 \pm 0,6$; $25,2 \pm 0,7$; $28,3 \pm 1,1$; $32,7 \pm 1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (**Tabela 5**).

Sukcesivno povećanje broja (od 1 do 4) molekula SK vezanih za HSA statistički značajno povećava dobijene vrednosti k' ($p < 0,05$). Dakle, može se zaključiti da sa povećanjem broja vezanih molekula SK za HSA dolazi do povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe.

Za odmašćen HSA nakon vezivanja sertindola, u svim molarnim odnosima HSA:lek, dobijene k' vrednosti bile su statistički značajno više ($p < 0,05$) u odnosu na početnu vrednost k' ($18,3 \pm 0,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Dobijeni porast vrednosti k' prati povećanje molarnog odnosa HSA:lek, i takav trend porasta k' vrednosti sa povećanjem zasićenja HSA sertindolom dobijen je i kod uzoraka HSA:lek 1:1 i 1:2 (mol/mol). Međutim, u ova dva uzorka statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje vrednosti k' dobijano je tek pri molarnom odnosu HSA:lek 1:1,5 i 1:2. Vrednosti k' ($25,1 \pm 0,3$; $26,6 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), dobijene za HSA:SK 1:1 pri odnosu HSA:lek 1:1,5 i 1:2 (sve mol/mol), redom, bile su slične vrednosti k' dobijene za molarni odnos HSA:SK od 1:2 ($25,2 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) bez prisutnog leka. Dalje povećanje broja molekula SK vezanih za HSA, uz istovremeno vezivanje sertindola, ima za posledicu blago povišene vrednosti k' kod HSA:SK od 1:3, ili blago smanjene vrednosti kod HSA:SK 1:4 (sve mol/mol) bez statističke značajnosti. Takođe, kod ova dva uzorka trend promene k' vrednosti ne prati trend porasta HSA:lek molarnog odnosa.

Srednje vrednosti k' za odmašćeni HSA i HSA:SK 1:1 (mol/mol) uzorak, dobijene za sva tri ispitivana molarna odnosa HSA:sertindol, bile su značajno više ($p < 0,05$) (redom, za 31,1% i 10,1%) u odnosu na odgovarajući rastvor HSA bez vezanog leka. Izračunate srednje vrednosti k' za HSA:SK 1:2 i 1:3 (mol/mol) bile su veće za 5,2% i 2,1%, dok je za molarni odnos HSA:SK 1:4 srednja vrednost k' bila niža za 2,8% ($p > 0,05$) u poređenju sa odgovarajućim kontrolama.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da:

- sa porastom broja vezanih molekula SK za HSA doprinos vezivanja sertindola na reaktivnost HSA-SH grupa se smanjuje;
- ne postoji kompeticija za isto vezujuće mesto na molekulu HSA kada se vezuje jedan molekul SK i dva molekula sertindola, čak i kad su vezana dva molekula SK;
- kod vezivanja tri i četiri molekula SK za HSA dolazi do slabljenja efekta vezivanja sertindola na reaktivnost HSA-SH grupe, usled takmičenja SK i sertindola za isto vezujuće mesto na HSA;
- smanjenje k' vrednosti pri svim odnosima sertindola vezanim za HSA:SK 1:4 (mol/mol), u odnosu na odgovarajuću kontrolu, ukazuje da četiri vezana molekula SK za HSA više doprinose reaktivnosti HSA-SH grupe nego kada su vezana tri molekula SK i sertindol u odnosu HSA:lek 1:2 (mol/mol), ukazujući da se sertindol vezuje manjim afinitetom u odnosu na SK za Sudlow II vezujuće mesto HSA.

Postepeno povećanje molarnog odnosa HSA:klozapin od 1:0,5 do 1:2, u svim uzorcima HSA, imalo je za posledicu povećanje dobijenih vrednosti k' . Međutim, ove vrednosti su bile više u odmašćenom i HSA:SK 1:1 i 1:2, ili niže u HSA:SK 1:3 i 1:4 (sve mol/mol), u odnosu na odgovarajuće kontrole bez vezanog leka (**Tabela 5; Slika 23**). Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) vrednosti k' dobijeno je samo pri molarnim odnosima HSA:lek 1:1,5 i 1:2,0 za odmašćeni i HSA:SK 1:1, dok je statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) dobijeno za sva tri molarna odnosa HSA:klozapin u uzorcima HSA:SK 1:3 i 1:4. Kod molarnog odnosa HSA:SK 1:2, tek pri odnosu HSA:lek 1:2 (mol/mol) dobija se statistički značajno povećanje vrednosti k' ($27,9 \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), u odnosu na kontrolu ($25,2 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Izračunate srednje vrednosti k' za odmašćeni HSA ($19,9 \pm 0,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) i HSA:SK 1:1 (mol/mol) ($24,8 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), dobijene za sva tri ispitana molarna odnosa HSA:klozapin, bile su statistički značajno više ($p < 0,05$), za 8,7% i 8,8%, dok su za molarne odnose HSA:SK 1:3 ($24,6 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) i 1:4 ($29,0 \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) one bile statistički značajno niže ($p < 0,05$), za 14,1% i 11,3 %, redom, u odnosu na odgovarajuće uzorke HSA bez vezanog leka.

Sa porastom broja vezanih molekula SK za HSA uočava se negativni trend doprinosa vezivanja klozapina za HSA na reaktivnost HSA-SH grupa, u odnosu na odgovarajuće kontrole bez leka (**Slika 23**).

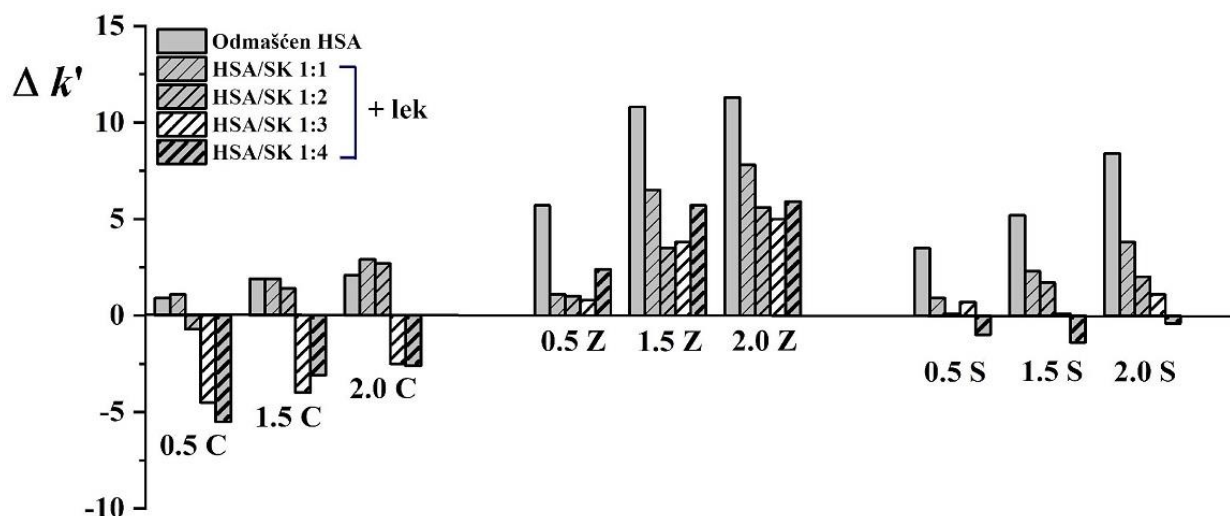
Na osnovu svih ovih rezultata može se zaključiti da:

- sa porastom broja vezanih molekula SK za HSA, uticaj vezivanja klozapina na reaktivnost HSA-SH grupa se smanjuje, tj. ispoljava se antagonistički efekat pri istovremenom vezivanju SK i klozapina na reaktivnost HSA-SH grupa;
- ne postoji kompeticija za isto vezujuće mesto na molekulu HSA, ako su vezana do dva molekula SK i klozapin, a da pri vezivanju trećeg molekula SK za HSA dolazi do negativnog efekta doprinosa klozapina i SK na reaktivnost HSA-SH grupe;
- smanjenje k' vrednosti, pri svim molarnim odnosima HSA:klozapina vezanim za HSA:SK 1:3 i 1:4 (mol/mol), u odnosu na odgovarajuću kontrolu (HSA:SK 1:3 i 1:4; mol/mol), ukazuje da klozapin ima veći uticaj na smanjenje reaktivnosti HSA-SH grupa u odnosu na sertindol;
- zato što klozapin već pri molarnom odnosu HSA:SK 1:3 ispoljava uticaj na smanjenje reaktivnosti HSA-SH grupa, on se jače vezuje za molekul HSA u odnosu na SK prilikom kompeticije za isto vezujuće mesto na proteinu.

Dobijene vrednosti k' , nakon vezivanja ziprazidona za odmašćeni HSA i HSA:SK od 1:1 do 1:4 (mol/mol), pri svim molarnim odnosima HSA:lek (mol/mol), bile su veće u odnosu na vrednosti k' za odgovarajuće uzorke HSA bez vezanog leka (**Tabela 5; Slika 23**). Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) vrednosti k' dobijeno je za sve uzorke HSA kada je molarni odnos HSA:lek bio veći od 1:1,5, osim kod odmašćenog HSA, gde je dobijena statistička značajnost i pri molarnom odnosu HSA:lek 1:0,5, u odnosu na odgovarajuće kontrole. Takođe, pri svim molarnim odnosima HSA:SK, porast molarnog odnosa HSA:lek praćen je porastom vrednosti k' . Sa **slike 23** se vidi da, za razliku od sertindola i klozapina, porast broja vezanih molekula SK za HSA ne pokazuje pravilan trend smanjenja doprinosa vezivanja ziprazidona za protein na reaktivnost HSA-SH grupa. Najveći doprinosi vezivanja ziprazidona za HSA na reaktivnost HSA-SH grupa dobijen je za odmašćeni HSA pri molarnom odnosu HSA:lek 1:1,5 i 1:2, redom, 59% i 61,7%, dok su za sve zamašćene uzorke HSA oni bili u rasponu od 2,8% do 18%.

Na osnovu rezultata može se zaključiti i da:

- vezivanje ziprazidona dovodi do povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe;
- najveći doprinos vezivanja ziprazidona za HSA na reaktivnost HSA-SH grupe dobijen je kod odmašćenog HSA i HSA:SK 1:1 (mol/mol);
- sa povećanjem broja vezanih molekula SK i ziprazidona za HSA smanjuje se njihov sinergistički efekat na reaktivnost HSA-SH grupe.



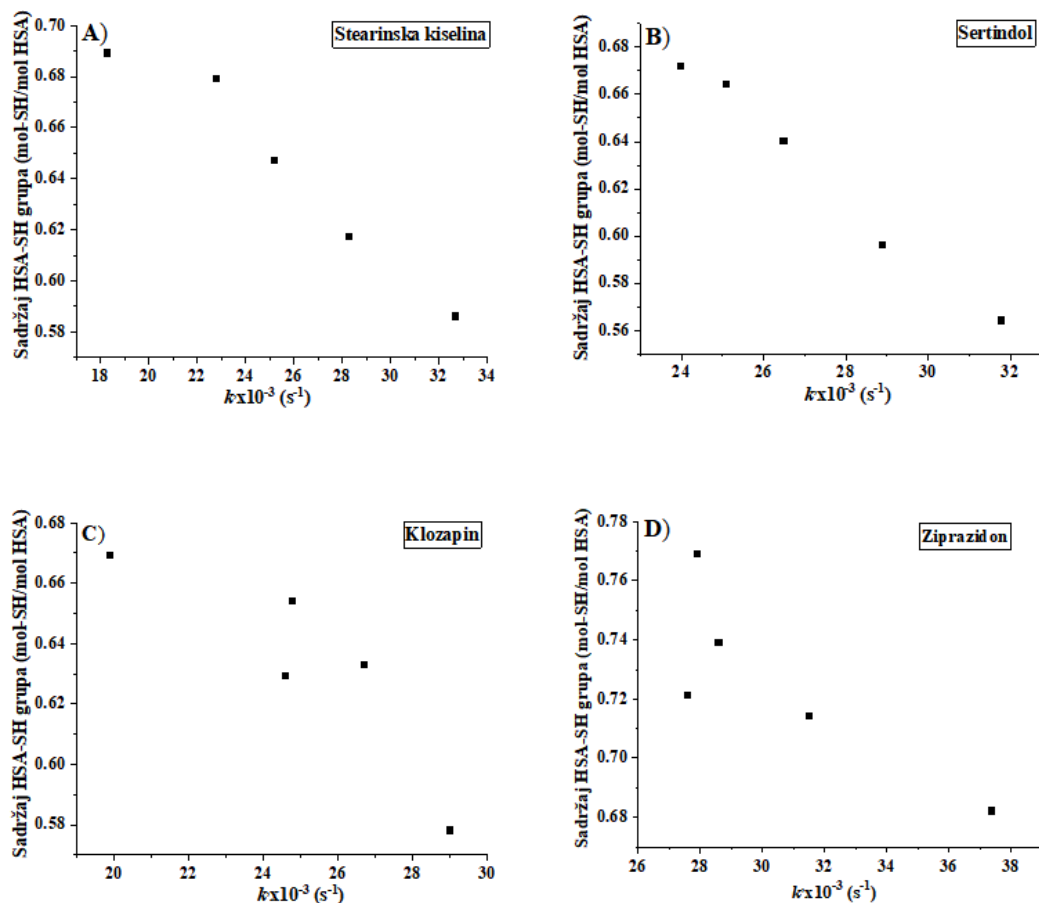
Slika 23. Pojedinačni doprinosi vezivanja antipsihotika (klozapina (C), ziprazidona (Z) i sertindola (S)) za HSA na smanjenje ili povećanje reaktivnosti HSA-SH grupe, predstavljeni kao $\Delta k'$ u odnosu na dobijene vrednosti k' za odmašćeni HSA i HSA zamašćen SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4, pri odnosu HSA:lek 1:0,5, 1:1,5 i 1:2 (mol/mol).

Rezultati pokazuju da ispitani lekovi pokazuju različiti uticaj na reaktivnost HSA-SH grupa pri istovremenom porastu broja vezanih molekula SK za HSA. Vezivanje klozapina i sertindola za HSA zamašćen sa SK, pri molarnim odnosima koji odgovaraju fiziološkim: HSA:MK 1:1 i 1:2 (Wu i sar., 2011), dovode do povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe, pri čemu je uticaj sertindola izraženiji u odnosu na klozapin. Pri molarnim odnosima HSA:MK 1:3 i 1:4, koji odgovaraju nekim patološkim stanjima i stanju tokom intenzivnih fizičkih vežbi (Brodersen i sar., 1990; Cistola i Small 1991; Curry i saradnici, 1998), ili zapaženom povećanju slobodnih MK kod pacijenata sa shizofrenijom (Orešić i sar., 2011; Yang i sar., 2017), oba ova leka dovode do smanjenja reaktivnosti HSA-SH grupe, s tim da je uticaj klozapina izraženiji u odnosu na sertindol. Istovremeno vezivanje ziprazidona i MK do molarnog odnosa HSA:MK 1:4 dovodi do kumulativnog (sinergističkog) efekta oba liganda na povećanje reaktivnosti HSA-SH grupe.

Dobijeni rezultati i izvedeni zaključci u saglasnosti su sa podacima da na molekulu HSA ima 7 vezujućih mesta različitih afiniteta za MK (Kragh-Hansen i sar., 2002), kao i da se ispitani lekovi vezuju za različita vezujuća mesta na molekulu HSA (Wu i sar., 2011; Zsila, 2013). Uočeni pozitivni efekat vezivanja ispitivanih antipsihotika za odmašćeni HSA, i sinergistički pozitivni efekat istovremenog vezivanja svih antipsihotika i SK za HSA:SK 1:1 (mol/mol), mogu se objasniti udaljenošću vezujućih mesta za lekove (ziprazidon u IB, klozapin u IIA i sertindol u IIIA) u odnosu na Cys34 ostatak kao i nepreklapanjem ovih vezujućih mesta za antipsihotike i petog vezujućeg mesta za MK (najvećeg afiniteta vezivanja) u okviru subdomena IIIB (Fanali i sar., 2012). Porast broja vezanih molekula SK za HSA ima za posledicu i pojavu kompeticije između lekova i SK za isto vezujuće mesto (sertindol i MK u Sudlow II vezujuće mesto; klozapin i MK u Sudlow I vezujuće mesto). Finalni efekat simultanog vezivanja lekova i SK na reaktivnost HSA-SH grupe određen je afinitetom ovih liganda za isto vezujuće mesto i veličinom strukturnih promena molekula HSA u blizini Cys34 ostatka, koje nastaju vezivanjem SK ili lekova za HSA.

4.1.7. Reaktivnosti i/ili dostupnosti Cys34 tiol grupe kao uzrok promene sadržaja HSA-SH grupe

Strukturne promene molekula HSA, uslovljene vezivanjem ispitivanih lekova i SK za HSA, mogu da utiču na dostupnost/otkrivenost tiolne grupe Cys34 okolnoj sredini bez promene njene reaktivnosti, na reaktivnost ove grupe usled promene njene nukleofilnosti bez promene dostupnosti, ili na oba ova faktora. Da bi dalje sagledali koji od ovih procesa doprinosi dobijenoj promeni sadržaja HSA-SH grupe pri vezivanju antipsihotika za HSA, bez i sa vezanom SK za protein, kao i uticaj vezivanja same SK za HSA, ispitano je postojanje korelacije između izračunatih srednjih vrednosti sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupa, za sva tri molarna odnosa HSA:lek u svim ispitivanim uzorcima HSA, kao i između sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u uzorcima odmašćenog i zamašćenog HSA:SK u molarnim odnosima 1:1 do 1:4 (**Slika 24**).



Slika 24. Zavisnost između sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u rastvorima odmašćenog i zamašćenog HSA:SK u molarnim odnosima 1:1, 1:2, 1:3 i 1:4 (**A**), kao i nakon vezivanja sertindola (**B**), klozapina (**C**) i ziprazidona (**D**) za odmašćeni i sve zamašćene uzorke HSA. Na slikama **B**, **C** i **D** su prikazane samo izračunate srednje vrednosti sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe za sva tri molarna odnosa HSA:lek.

Na osnovu rezultata sa **slike 24A**, uočava se da postoji linearna zavisnost između smanjenja sadržaja HSA-SH grupe i reaktivnosti HSA-SH grupe sa povećanjem broja vezanih molekula SK za HSA, što potvrđuje i visoka vrednost Pearsonovog koeficijenta korelacije ($-0,976$; $p < 0,01$).

Dobijena negativna vrednost ovog koeficijenta korelacije ukazuje da sa povećanjem reaktivnosti HSA-SH grupa dolazi do statistički značajno bržeg pada sadržaja HSA-SH grupa.

Mada pad sadržaja HSA-SH grupe HSA molekula za koji je vezana SK, na prvi pogled, može da se učini kao negativan uticaj MK sa aspekta antioksidativnih svojstava proteina. Ipak, biće da ovaj rezultat u osnovi samo ukazuje na jedan od mehanizama kojim se aktivira ispoljavanje antioksidativne uloge HSA. Naime, pri povećanim molarnim odnosima HSA:MK, koji odgovaraju patološkim stanjima kao što su dijabetes, shizofrenija, bolesti jetre i srca (**Spector, 1986; Brodersen i sar., 1990; Cistola, 1991; Peters, 1996; Curry i sar. 1998; Yang i sar., 2017**), ili usled intenzivnog fizičkog rada (**Takić i sar., 2023**), povećanje reaktivnosti HSA-SH grupe je pozitivno po telo, pošto su sva ova stanja najčešće udružena sa oksidativnim i/ili karbonilnim stresom (**Oettl i sar., 2008; Matsuyama i sar., 2009; Guerin-Dubourg i sar., 2012**). Usled povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe verovatnije je da tiolna grupa Cys34 brže odreaguje sa oksidativnim vrstama iz okruženja i na taj način da HSA, kao glavni antioksidans, zaštiti ostale molekule u krvi i ekstravaskularnim tečnostima, kao što je cerebrospinalna tečnost, od oksidativnih oštećenja. Zato bi povećanje sadržaja slobodnih MK u shizofreniji (**Orešić i sar., 2011; Yang i sar., 2017**) moglo biti rezultat ne samo izmenjenog metabolizma lipida usled primene lekova, već i aktivirani zaštitni mehanizam za regulaciju antioksidativne uloge HSA.

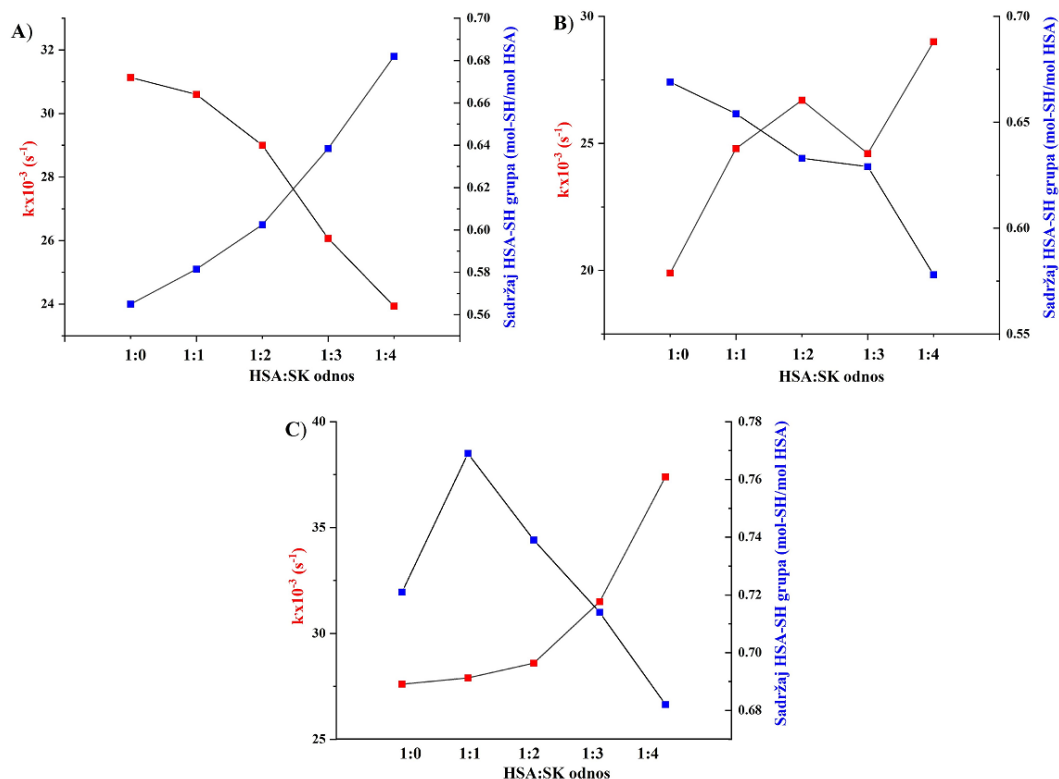
Vezivanjem sertindola zadržava se linearnost između sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe (**Slika 24B**), što se ogleda u dobijenoj visokoj vrednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije ($-0,994$; $p < 0,001$). U poređenju sa vezivanjem samo SK, simultano vezivanje sertindola i SK sinergistički doprinosi porastu reaktivnosti HSA-SH grupe i, posledično tome, smanjenju sadržaja HSA-SH grupe u proteinu. Međutim, usled vezivanja klopazina i ziprazidona, gubi se jasno uočljiva linearnost između sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe, iako su i dalje dobijeni visoki koeficijenti korelacije, ali bez statističke značajnosti, redom, $-0,875$ i $-0,830$.

Na osnovu rezultata uticaja vezivanja ispitanih antipsihotika za odmašćeni i zamašćene uzorke HSA na sadržaj HSA-SH grupa, može se zaključiti da je povećanje reaktivnost ove grupe glavni uzrok smanjenja sadržaja HSA-SH nakon vezivanja sertindola za odmašćeni i zamašćene uzorke HSA. Za klopazin i ziprazidon, promena sadržaja HSA-SH grupe i uticaj dodatnih faktora usled vezivanja ova dva leka za protein od značaja je za ispoljavanje efekata na reaktivnost Cys34 grupe, s tim da je on izraženiji kod ziprazidona nego kod klopazina (**Slike 24C i 24D**).

Da bi se bolje uočio efekat promene dostupnosti HSA-SH grupe na njen sadržaj, prikazani su trendovi reaktivnosti i sadržaja HSA-SH grupe u odmašćenom HSA (HSA:SK 1:0; mol/mol) i zamašćenim uzorcima HSA (HSA:SK od 1:1 do 1:4; mol/mol) u prisustvu vezanih antipsihotika. Sadržaj HSA-SH grupe je predstavljen kao izračunata srednja vrednost dobijena za sva tri molarna odnosa HSA:lek (**Slika 25**). Na osnovu prikazanih trendova može se videti da se jedino kod sertindola dobijaju krive koje su simetrične kao predmet i lik u ogledalu, što ukazuje na doprinos samo reaktivnosti na sadržaj HSA-SH grupe.

Kod klopazina simetričnost krivi se gubi kod molarnog odnosa HSA:SK 1:3, a kod ziprazidona kod molarnog odnosa HSA:SK 1:0 i 1:1. Vezivanje klopazina za HSA sa rastućim brojem vezanih molekula SK (od 0 do 2) ima za posledicu nagli trend porasta reaktivnosti, uz slabiji trend pada sadržaja HSA-SH grupe, što ukazuje da vezivanje klopazina, uz prisustvo maksimalno dva molekula SK, dovodi do povećanja dostupnosti HSA-SH grupe. Od trenutka vezivanja trećeg molekula SK, reaktivnost HSA-SH grupe opada na nivo koji odgovara njenoj reaktivnosti kada je vezan jedan molekul SK za HSA, pri čemu je sadržaj HSA-SH grupe

statistički značajno niži u odnosu na sadržaj pri odnosu HSA:SK 1:1 (mol/mol), što ukazuje da se pozitivni efekat klopapina na dostupnost HSA-SH grupe smanjuje. Dalje, vezivanje SK za HSA dovelo je do statistički značajnog porasta reaktivnosti i pada sadržaja HSA-SH grupe.



Slika 25. Trendovi sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u odmašćenom (HSA:SK 1:0; mol/mol) i HSA:SK od 1:1 do 1:4 (mol/mol) u prisustvu sertindola (**A**), klopapina (**B**) i ziprazidona (**C**).

Vezivanje ziprazidona za HSA sa rastućim brojem vezanih molekula SK (od 0 do 1) ima za posledicu blagi trend porasta reaktivnosti HSA-SH grupe, uz statistički značajan porast sadržaja HSA-SH grupe, koji za HSA:SK 1:1 (mol/mol) dostiže maksimalnu vrednost. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da vezivanje ziprazidona za HSA u prisustvu jednog molekula vezane SK dovodi do promene ne samo reaktivnosti, već i dostupnosti HSA-SH grupe, u poređenju za HSA:SK sistem bez vezanog ziprazidona (**Slika 22; Tabela 5**).

Nalaz ove disertacije je i da se sertindol vezuje za Sudlow II vezujuće mesto na HSA i da njegovo vezivanje, bez i sa vezanim MK za HSA u rasponu koji odgovara normalnim do patološkim odnosima, dovodi do povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe koje je u korelaciji sa povećanjem sadržaja tiolne grupe. Vezivanje lekova prostorno bliže Cys34 ostatku, klopapina za Sudlow I vezujuće mesto na HSA i ziprazidona za vezujuće mesto u okviru IB subdomena (**Wu i sar. 2011; Zsila, 2013**), izgleda dovodi do strukturnih promena molekula HSA u okolini HSA-SH grupe koji vodi i promeni njene reaktivnosti. Ziprazidon značajno više utiče na dostupnost HSA-SH grupe u odnosu na klopapin, što statistički značajno povećava sadržaj HSA-SH grupe u svim zamašćenim uzorcima HSA u odnosu na odgovarajuće kontrole (**Slika 22**).

Poznavanje uticaja međusobnog vezivanja ispitivanih lekova i MK za HSA na reaktivnost i dostupnost HSA-SH grupe može pomoći rasvetljavanju mehanizama negativnih efekata primene

ovih lekova, kao i kod izbora optimalne terapije za lečenje shizofrenije, kao oboljenja povezanog sa pojavom oksidativnog stresa (**Walker i Tessner, 2008; Ciobica i sar. 2011; Emiliani i sar., 2014**). Poredeći efekte tri antipsihotika na antioksidativna svojstva HSA, terapija ziprazidonom mogla bi biti najpovoljniji izbor u pogledu održavanja redoks statusa u krvi bolesnika. Naime, usled pokazanog pozitivnog uticaja ziprazidona na reaktivnost i dostupnost HSA-SH grupe, antioksidativni kapacitet HSA bi bio znatno veći u odnosu na tretman sertindolom, koji povećava reaktivnosti, ne i dostupnosti HSA-SH grupe. Povećanje njene reaktivnosti ima za posledicu brže ukljanjanje oksidativnih vrsta iz cirkulacije. Ako je povećana i dostupnost HSA-SH grupe, gubitak sadržaja HSA-SH grupe delimično je kompenzovan, održavajući duže efikasanost HSA kao antioksidansa u krvi. Nepovoljniji efekat sertindola u odnosu na druga dva ispitana leka na antioksidativni potencijal HSA-SH grupe može biti još izraženiji, zbog njegovog dužeg poluživota (3 dana) u telu, u odnosu na poluživot klopazina i ziprazidona (7–8 sati).

4.2. Uticaj terapije sertindolom, klopazinom i ziprazidonom na reaktivnost i sadržaj tiol grupe serum-albumina *in vivo*

Drugi cilj ove doktorske disertacije bio je potvrda *in vitro* efekata odabranih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe *in vivo*. Zato je određena tiol homeostaza (sadržaj ukupnih tiola, sadržaj i reaktivnost Cys34 grupe serum-albumina) u plazmi pacova (n=28) hronično (28 dana) tretiranim antipsihoticima klopazinom, sertindolom i ziprazidonom u dozama koje, preračunato, odgovaraju najvećim terapijskim dozama kod ljudi.

4.2.1 Uticaj sertindola, klopazina i ziprazidona na sadržaj ukupnih tiola u plazmi i sadržaj albumin-SH grupa kod pacova

U shizofreniji se smanjuje sadržaj ukupnih tiola u serumu usled oksidativnog stresa uzrokovanog samim oboljenjem i/ili primenom antipsihotika (**Huang i sar., 2010**), ali nema podataka o sadržaju HSA-SH grupe. Kako se glavna strategija tretmana shizofrenije zasniva na primeni oralnih antipsihotika (**Patel i sar., 2014**), najpre je provereno da, li i u kojem stepenu, terapija sertindolom, klopazinom i ziprazidonom u terapijskim dozama koje odgovaraju ljudima utiče na redoks-homeostazu u plazmi pacova, u odnosu na kontrolnu grupu pacova. Promena u redoks-homeostazi praćena je određivanjem ukupnih redukovanih tiola u plazmi i kroz sadržaj slobodne (redukovane) tiolne grupe serum-albumina, nakon njegovog izolovanja iz plazme taloženjem AS (**Materijali i metode, odeljak 3.4.**). Pošto ispitivani antipsihotici utiču na metabolizam i mogu da dovedu do promene telesne mase (**Muscatello i sar., 2010; Patel i sar., 2014**), tokom četvoronedeljnog tretmana pacova je na nedeljnom nivou kontrolisana masa životinja. Kako sadržaju ukupnih (redukovanih) tiola u krvi najviše doprinosi tiol grupa albumina (sa oko 80%), potom tiolne grupe na drugim proteinima i, u najmanjem udelu, slobodni tioli male molekulske mase, kao GSH, Cys, cisteinil-glicin i homocistein (**Turell i sar., 2009**), određen je i sadržaj albumina i ukupnih proteina u plazmi pacova (**Tabela 6**).

Nakon 28 dana tretmana pacova ispitivanim antipsihoticima došlo je do statistički značajnog smanjenja ($p < 0,05$) telesne mase, koncentracije ukupnih proteina i albumina u plazmi pacova koji su tretirani antipsihoticima, u poređenju sa kontrolnom grupom (**Tabela 6**). Iako su najniže srednje vrednosti ukupnih proteina i albumina dobijene u grupi pacova tretiranih sertindolom, a najveće u grupi pacova tretiranih ziprazidonom, ove razlike nisu bile statistički značajne.

Niže prosečne vrednosti ukupnih proteina i albumina dobijene u ovom radu, uz niže vrednosti triglicerola, holesterola i mokraćne kiseline u krvi pacova tretiranih istim antipsihoticima

(Arizanović, 2014) mogle bi se objasniti činjenicom da su antipsihotici lekovi koji direktno utiču na CNS, prevashodno modulacijom delovanja dopaminskog sistema, ako, u manjem ili većem obimu, se menja aktivnost i drugih neurotransmitera (serotonina i histamin) (Farah, 2005). Pošto sinergističkim delovanjem CNS i endokrini sistem reguliše sve metaboličke procese u organizmu, za očekivati je da će delimičnim narušavanjem normalnog funkcionisanja jednog od dva regulatorna sistema doći i do narušavanja odvijanja pojedinih metaboličkih procesa, što se reflektuje i u izmenjenim vrednostima biohemijskih parametara krvi. Poređenje ovih parametara krvi, između grupa pacova tretiranih ispitivanim lekovima, je pokazalo da razlike nisu statistički značajne niti za jedan od njih (ova studija i Arizanović (2014)), što potvrđuje da svi izabrani lekovi pripadaju istom tipu antipsihotika (druge generacije), slične selektivnosti prema receptorskim sistemima u CNS.

Tabela 6. Vrednosti izabranih parametara nakon četvoredeljnog tretmana pacova sertindolom (2,5 mg/kg/dan), klopazinom (45 mg/kg/dan) i ziprazidonom (20 mg/kg/dan), kao i u kontrolnoj grupi pacova. Svaku grupu činilo je 7 životinja. Podaci su izraženi kao srednja vrednost ($\pm$ SD) iz tri merenja.

Parametar	Kontrola	Sertindol	Klopazin	Ziprazidon
Telesna masa (g)	383 $\pm$ 27	329 $\pm$ 22*	314 $\pm$ 35*	304 $\pm$ 21*
Ukupni proteini (g/L)	70,7 $\pm$ 5,7	55,4 $\pm$ 6,2*	58,1 $\pm$ 5,3*	60,5 $\pm$ 1,7*
Albumin (g/L)	33,0 $\pm$ 5,5	21,1 $\pm$ 5,1*	22,0 $\pm$ 2,8*	23,3 $\pm$ 2,7*
Ukupni tioli (mM)	0,188 $\pm$ 0,041	0,136 $\pm$ 0,039	0,109 $\pm$ 0,011*	0,157 $\pm$ 0,027
Albumin-SH (mol-SH/mol albumina)	0,215 $\pm$ 0,060	0,229 $\pm$ 0,036	0,169 $\pm$ 0,035*	0,243 $\pm$ 0,045**

*p < 0,05 (t-test) u poređenju sa kontrolnom grupom

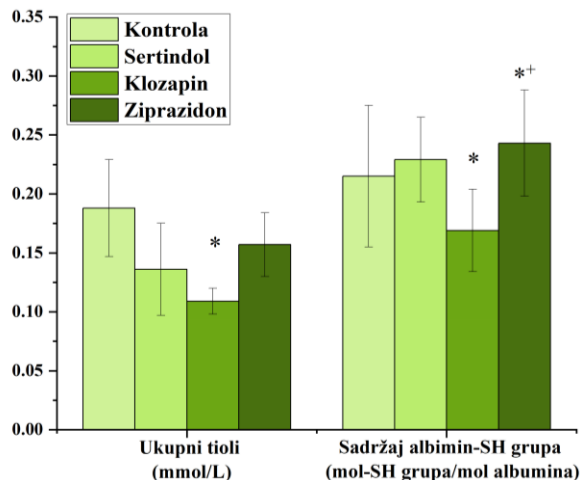
+ p < 0,05 (t-test) u poređenju sa grupom tretiranom klopazinom

Dobijene srednje vrednosti za sadržaj ukupnih tiola u plazmi pacova tretiranih sertindolom, klopazinom i ziprazidonom bile su *niže* u odnosu na kontrolnu grupu (0,188 $\pm$ 0,041 mM), međutim, samo u grupi tretiranoj klopazinom (0,109 $\pm$ 0,011 mM) razlika je bila statistički značajna (p<0,05). Između grupa pacova tretiranih lekovima nije nađena statistički značajna razlika u ovom parametru (**Slika 26**).

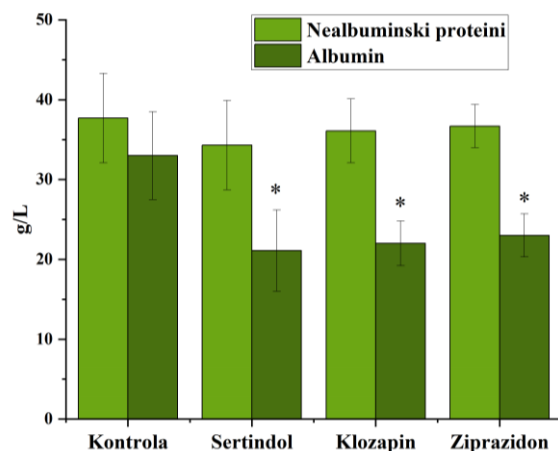
Može se zaključiti iz ovih rezultata da primena sertindola, klopazina i ziprazidona na pacovima, bez prisustva bolesti/shizofrenije, dovodi do narušavanja redoks-homeostaze u krvi, što se ogleda u smanjenju sadržaja ukupnih tiola u plazmi. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima **Huanga i sar. (2010)**, koji su pokazali da u shizofreniji dolazi do smanjenja ukupnih tiola u serumu u odnosu na zdrave osobe, kao i da primena antipsihotika tome dodatno doprinosi. Klopazin je imao najveći uticaj na smanjenje ukupnih tiola u plazmi, što bi se moglo objasniti i njegovom prooksidativnom aktivnošću, pokazanom kroz smanjenje aktivnosti enzima SOD i glutation-reduktaze u hemolizatima pacova tretiranim na identičan način (**Arizanović, 2014**).

Kako je statistički značajno smanjen sadržaj ukupnih proteina i albumina u tretiranim pacovima u odnosu na kontrolu (**Tabela 6**), zaključuje se da smanjenju ukupnih tiola podjednako doprinosi tiol grupa i albumina i nealbuminskih proteina u plazmi. Međutim, ako se uporede *razlike* u

uprosečenim vrednostima ukupnih proteina za kontrolnu grupu i grupe životinja tretirane antipsihoticima (15,3 g/L za sertindol, 12,6 g/L za klozapin i 10,2 g/L za ziprazidon), odnosno, isto i za sadržaj albumina (11,9 g/L za sertindol, 11 g/L za klozapin i 9,7 g/L za ziprazidon), tretman antipsihoticima dovodi do statistički značajnijeg pada samo nivoa albumina ($p < 0,05$), dok je sadržaj nealbuminskih proteina neznatno smanjen u odnosu na kontrolu (**Slika 27**).



Slika 26. Sadržaj ukupnih tiola u plazmi (mmol/L) i albumin-SH grupa (mol-SH grupa/mol albumina) kod netretiranih pacova (kontrola) i pacova hronično tretiranih sertindolom, klozapinom i ziprazidonom. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ($\pm$ SD) iz tri merenja. * $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa kontrolnom grupom; ⁺ $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa grupom tretiranom klozapinom



Slika 27. Sadržaj nealbuminskih proteina i albumina (g/L) u plazmi kod netretiranih pacova (kontrola) i pacova hronično tretiranih sertindolom, klozapinom i ziprazidonom. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ($\pm$ SD) iz tri merenja. * $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa kontrolnom grupom.

Kod pacova tretiranih sertindolom i ziprazidonom sadržaj albumin-SH grupe bio je povećan u odnosu na kontrolu ($0,215 \pm 0,060$ mol-SH grupa/mol albumina), pri čemu je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje dobijeno samo za tretman ziprazidonom. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sadržaja albumin-SH grupa u odnosu na kontrolu dobijeno je u grupi pacova tretiranih klozapinom. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između grupa pacova tretiranih ispitivanim antipsihoticima nađena je samo između grupa tretiranih klozapinom i ziprazidonom (**Slika 26**).

Ako se uporede efekti koje primenjeni lekovi pokazuju na ukupne tirole i sadržaj albumin-SH grupe (**Slika 26**), uočava se da tretman sertindolom i ziprazidonom dovodi do pada ukupnih tiola u plazmi koji nije statistički značajan i do povećanja sadržaja albumin-SH grupa za, redom, 6,5% i 13%. Sa druge strane, tretman klopazinom dovodi do statističkog značajnog pada ($p < 0,05$) ukupnih tiola za 42% i albumin-SH grupa za 21,4%.

Dobijeni rezultati za ziprazidon i klopazin *in vivo* saglasni su sa onima *in vitro*: ziprazidon je doveo do povećanja, a klopazin do smanjenja sadržaja HSA-SH grupa nakon vezivanja ova dva leka za odmašćeni HSA i za kontrolisano zamašćene uzorke HSA. Što se tiče efekta sertindola na sadržaj albumin-SH grupa *in vivo* i sadržaj HSA-SH grupe *in vitro*, u oba eksperimenta nije dobijena statistička značajnost između kontrolne i grupa pacova tretiranih lekovima.

Na osnovu rezultata oba ova eksperimenta, zaključuje se da postoji korelacija između *in vitro* rezultata efekta vezivanja antipsihotika za HSA i *in vivo* rezultata tretmana antipsihoticima, na sadržaj HSA-SH grupa ili albumin-SH grupa. Kako je lakše kontrolisati uslove u *in vitro* eksperimentima u odnosu na *in vivo*, važno je da korišćeni model sistem što je moguće više simulira *in vivo* (pato)fiziološke uslove.

4.2.2. Uticaj antipsihotika sertindola, klopazina i ziprazidona na reaktivnost albumin-SH grupa kod pacova

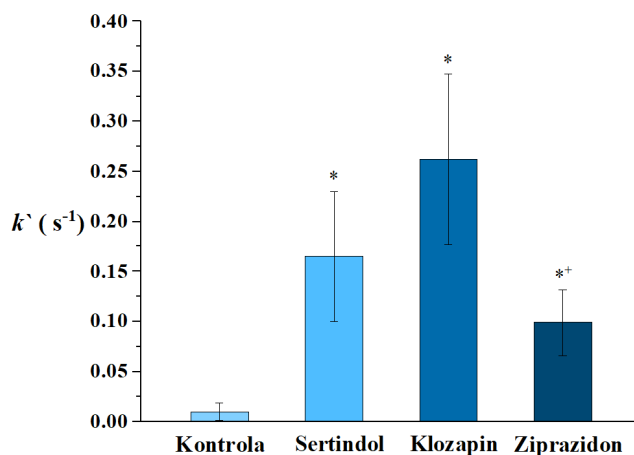
Da bi se utvrdilo da li postoji saglasnost rezultata *in vitro* eksperimenata uticaja vezivanja klopazina, sertindola i ziprazidona za HSA na promene u reaktivnosti HSA-SH grupe i *in vivo* efekata, određena je reaktivnost albumin-SH grupa nakon izolovanja albumina iz plazme pacova taloženjem AS. Reaktivnost albumin-SH grupe je procenjena na osnovu određivanja k' za reakciju albumin-SH grupe sa DTNB-om, čija koncentracija je bila 40 puta veća od sadržaja albumin-SH grupa (**Tabela 7; Slika 28**).

Nakon tretmana pacova antipsihoticima, dobijene k' vrednosti su bile statistički ($p < 0,05$) značajno veće u svim tretiranim grupama pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Najmanji uticaj na povećanje k' je dobijen u grupi pacova tretiranih ziprazidonom, a najveći u grupi tretiranoj klopazinom. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između grupa tretiranih lekovima dobijena je između ziprazidona i klopazina. Međutim, ako se uporede dobijene srednje vrednosti konstanti brzina, od 10 do $262 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, u grupama životinja tretiranih lekovima one su do nekoliko puta veće u odnosu na *in vitro* vrednosti ($18,3$ do $37,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; **Tabela 5**), uz napomenu da su standardne devijacije bile visoke (od 32% do 90% uprosječenih vrednosti).

Tabela 7. Konstante brzine psedo-prvog reda (k') (s^{-1}) za reakciju albumin-SH grupe sa DTNB-om, nakon izolovanja albumina iz plazmi pacova netretiranih lekovima (kontrola) i hronično tretiranih sertindolom, klopazinom i ziprazidonom. Dobijene vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\pm$ SD.

Tretman	$k' (\text{s}^{-1})$
Kontrola	$0,010 \pm 0,009$
Sertindol	$0,165 \pm 0,065^*$
Klopazin	$0,262 \pm 0,085^*$
Ziprazidon	$0,099 \pm 0,033^{*+}$

* $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa kontrolnom grupom; + $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa grupom tretiranom klopazinom.



Slika 28. Konstante brzine psedo-prvog reda (k') (s^{-1}) dobijene za reakciju albumin-SH grupe sa DTNB-om, nakon izolovanja albumina iz plazmi pacova netretiranih lekovima (kontrola) i hronično tretiranih sertindolom, klozapinom i ziprazidonom. Dobijene vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\pm$ SD. * $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa kontrolnom grupom; ⁺ $p < 0,05$ (t-test) u poređenju sa grupom tretiranom klozapinom.

Na osnovu rezultata ovog eksperimenta zaključuje se da nakon tretmana pacova ispitivanim lekovima dolazi do povećanja reaktivnosti albumin-SH grupa, u saglasnosti sa *in vitro* rezultatima. Diskrepanca između određenih k' vrednosti nakon primene odgovarajućeg leka u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima može se objasniti nepouzdanosti određivanja k' vrednosti *in vivo*. U drugom eksperimentu u našoj laboratoriji, u kojem je određena reaktivnost albumin-SH grupe (nakon izolovanja proteina iz seruma pacova tretiranih antidepresivom fluoksetinom), takođe su dobijene veoma visoke vrednosti za k' . U oba slučaja primećeno je da dolazi do završetka reakcije između albumin-SH grupe i DTNB-a pre nego što se nakon 10 s očita prva vrednost A_{412} nm. Zbog čega albumin-SH grupe pacova pokazuju toliku reaktivnost u odnosu na HSA-SH, iako je sadržaj -SH grupa istog reda veličine (od 0,2 do 0,6 mol-SH/mol albumina ili HSA), nije poznato i zahteva detaljnije ispitivanje. Stoga, ovakav model sistem za ispitivanje uticaja antipsihotika i drugih supstanci na reaktivnost albumin-SH grupa nije dobar. Mali broj životinja u svakoj grupi ($n=7$), kratko vreme završetka reakcije između -SH grupe i DTNB (ispod 10 s), ograničena količina plazme iz pacova za određivanje ukupnih tiola, izolovanje dovoljnih količina albumina u koncentracijama koje odgovaraju onima u plazmi, kao i terapijske doze antipsihotika koje odgovaraju ljudima, neki su od uzroka visokih vrednosti za SD u ovim određivanjima.

Ako se uporede vrednosti ukupnih tiola u plazmi, sadržaj albumin-SH grupa i njihova reaktivnost, može se zaključiti da najviša reaktivnost albumin-SH grupa, dobijena za klozapin, je glavni uzrok statistički značajnog pada sadržaja albumin-SH grupa i, poslednično, ukupnih tiola u plazmi. Tretman sertindolom uzrokuje veću reaktivnost albumin-SH grupa u odnosu na ziprazidon, tako da su u ovoj grupi životinja vrednosti sadržaja albumin-SH grupa i ukupnih tiola u plazmi nešto niže u odnosu na onu tretiranu ziprazidonom. Takođe, prethodni rezultati su pokazali da reaktivnost tiolne grupe albumina značajno zavisi od broja vezanih MK za molekul HSA, međutim, zbog ograničene količine uzoraka ova analiza nije mogla biti urađena.

I pored diskrepanci u *in vitro* i *in vivo* vrednostima k' , rezultati *in vivo* imaju svoju vrednost, pošto potvrđuju da sami lekovi, i bez prisustva shizofrenije, dovode do smanjenja ukupnih tiola u plazmi, kao i da vezivanje antipsihotika za albumin povećava reaktivnost albumin-SH grupe.

4.3. Uticaj vezivanja endogenih liganda (SK i glukoze) i antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe

U trećem delu ove disertacije ispitano je da li ko-inkubacija HSA u prisustvu MK (konkretno SK) i glukoze, u koncentracijama koje odgovaraju patofiziološkim uslovima u vremenskom periodu koji odgovara poluživotu HSA, relevantan model za utvrđivanje uticaja ispitivanih antipsihotika na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe. U normalnim fiziološkim uslovima, molekul HSA nosi 0,2 do 2 molekula MK (Fanali i sar., 2012; Mishra i Heath, 2021) i okružen je vanćelijskom tečnošću u kojoj je koncentracija glukoze 3,8 – 7,8 mM (Rao i sar., 2004).

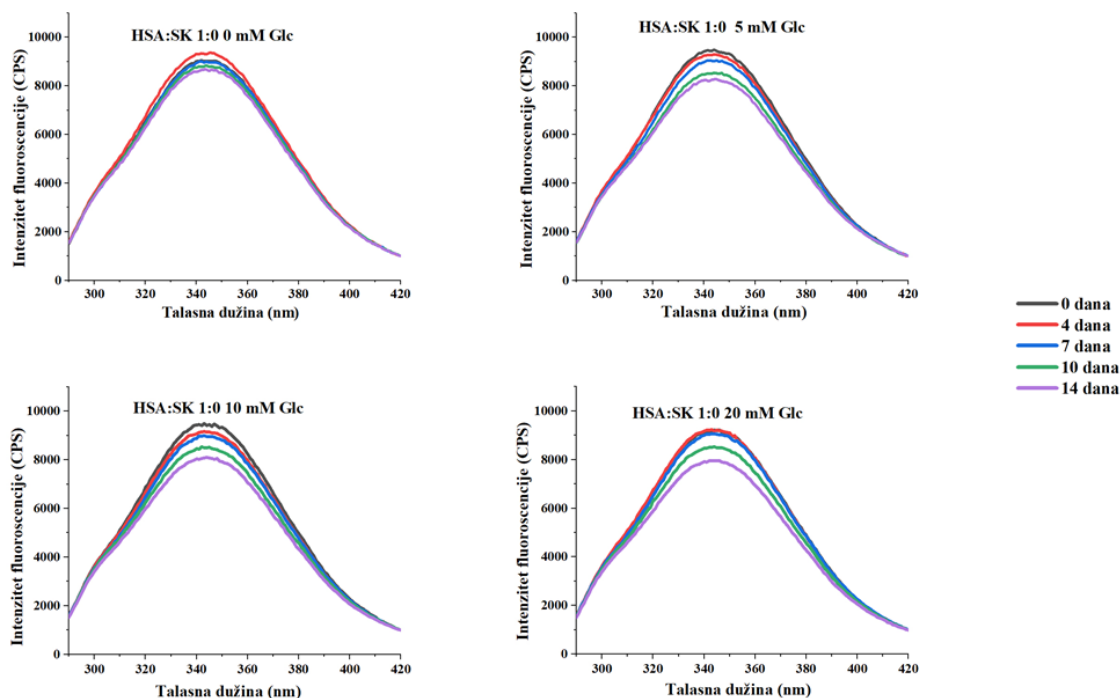
Na osnovu sposobnosti HSA da veže dva molekula glukoze u Sudlow I mestu (Wang i sar., 2013), pretpostavili smo da su oba sveprisutna liganda u plazmi važna za održavanje strukture i funkcije HSA u patofiziološkim uslovima, kao i da se molekul HSA u njihovom prisustvu ponaša drugačije. Odnosno, da postoji zajedničko sinergističko delovanje MK i glukoze u održanju antioksidativne i/ili transportne uloge HSA. Da bi proverili ovu hipotezu, najpre je praćen uticaj SK i glukoze, u uslovima koji imitiraju njihove patofiziološke koncentracije (molarni odnos HSA:SK 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4; sadržaj glukoze 5, 10 i 20 mM), na strukturne promene HSA i sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe tokom 14 dana ko-inkubacije HSA sa SK i glukozom na 37°C. Strukturne promene HSA, usled glikacije molekula HSA glukozom praćene su promenom unutrašnje fluorescencije HSA molekula i pojavom fluorescencije nastalih AGEs.

Potom je ispitan uticaj vezivanja antipsihotika druge generacije (ziprazidon, klozapin i sertindol) za HSA, u odsustvu ili prisustvu glukoze, i/ili SK, na reaktivnost i sadržaj HSA-SH grupe tokom 19 dana inkubacije. Svrha ovog eksperimenta bila je da ispita da li će ovaj uticaj biti isti ili različiti ukoliko neki od ova dva endogena liganda nisu prisutni, kao i da li je primenjeni model relevantan za patofiziološke uslove simulacije vezivanja lekova i drugih ksenobiotika za HSA.

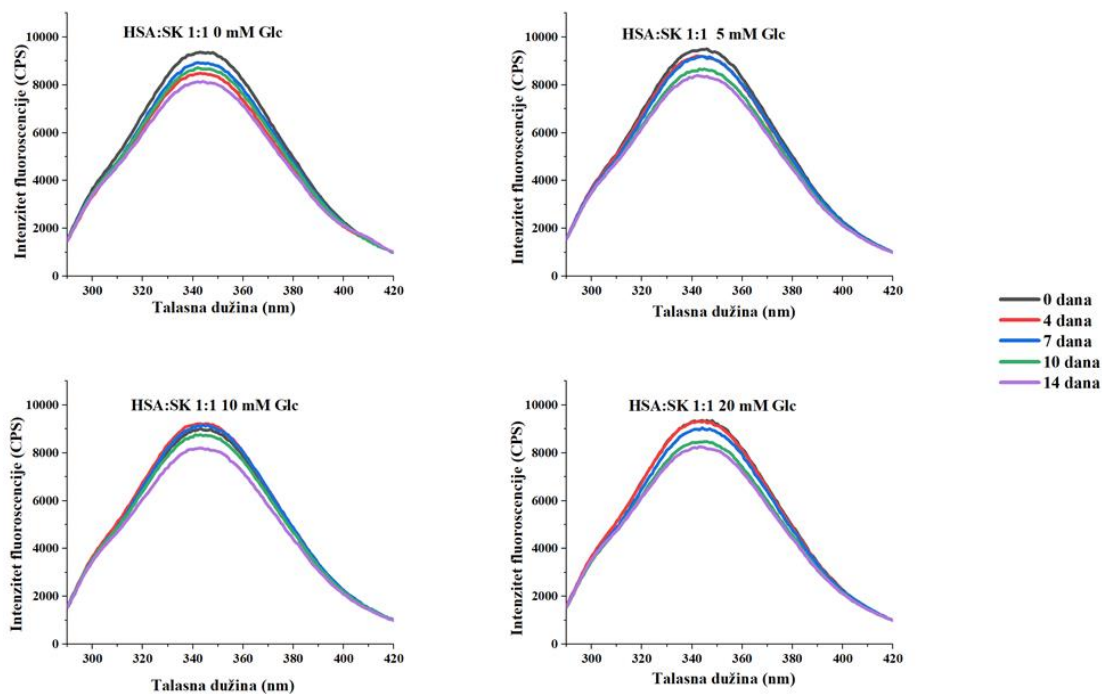
4.3.1. Strukturne promene HSA tokom glikacije – Trp214 emisijski spektri

Sopstvena fluorescencija molekula HSA iskorišćena je za praćenje strukturnih promena proteina izazvanih glikacijom. Smeše HSA i SK pripremljene su pri različitim HSA:SK molarnim odnosima (1:0, 1:1, 1:2 i 1:4) i inkubirane u odsustvu (kontrola) i prisustvu 5, 10 i 20 mM glukoze tokom 14 dana na 37°C. Fluorescentni spektri snimljeni su pre (0 dana) i posle 4, 7, 10 i 14 dana inkubacije smeša na 37°C. Razblaženi uzorci HSA (2 µM) ekscitovani su na 280 nm, čime se pobuđuju svi Tyr ostaci i jedini Trp214 ostatak u molekulu HSA, tako da se dobija karakterističan emisijski spektar HSA sa maksimum emisije na 340 nm. Svi emisijski spektri su snimljeni na 37°C i, nakon korekcije za emisiju pufera, su normalizovani, kako bi se sprečilo dobijanje emisijskih spektara različitih intenziteta usled grešaka tokom razblaživanja uzoraka, a ne kao posledica strukturnih promena HSA tokom inkubacije uzoraka.

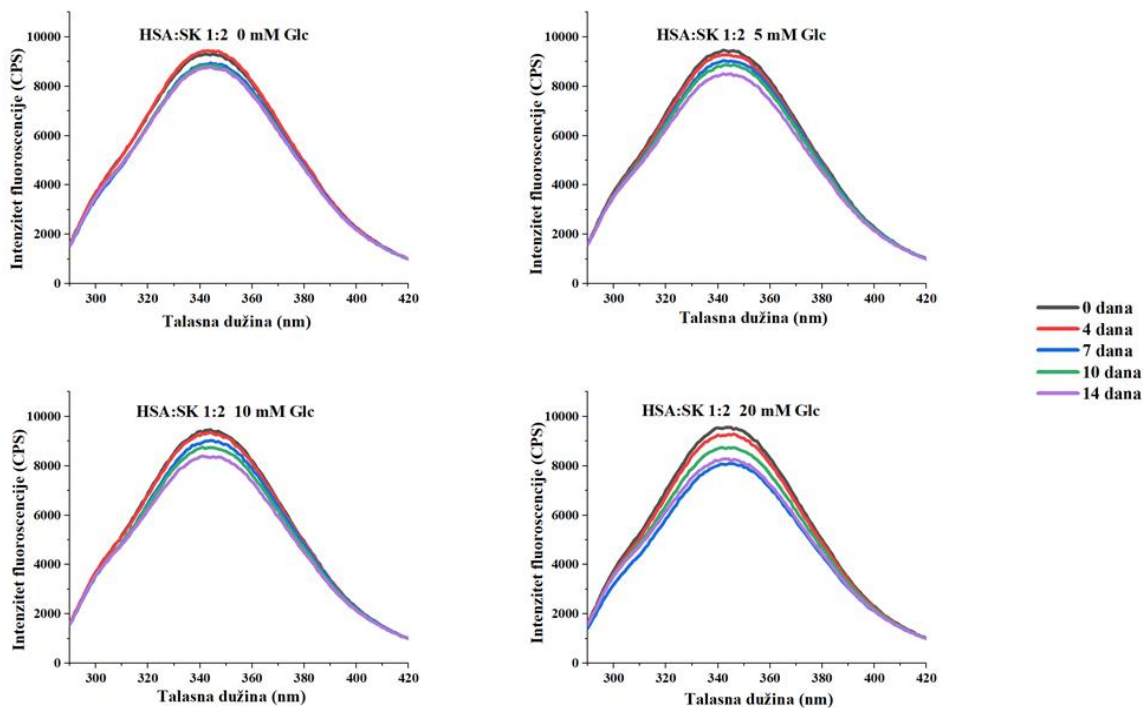
U svim inkubacionim smešama, emisijski pik na 340 nm, koji uglavnom predstavlja fluorescenciju Trp214, bio je oko 5–14 % niži na kraju, u poređenju sa početkom inkubacije (Slike 29–32). Postepeno smanjenje intenziteta ovog pika, sa progresijom vremena inkubacije, primećeno je za molarne odnose HSA:SK 1:0 i 1:2 sa 10 mM glukozom, dok su za ostale uzorke trendovi promena intenziteta signala bili nepravilni (Slike 29–32). Dobijeni rezultati ukazuju da se tokom inkubacije okruženje Trp214 stalno menjalo i da je razlog za to glikacija molekula HSA, kao i da su na promene okruženja ostatka Trp214 uticali kako molarni odnos HSA:SK, tako i koncentracija glukoze u smešama.



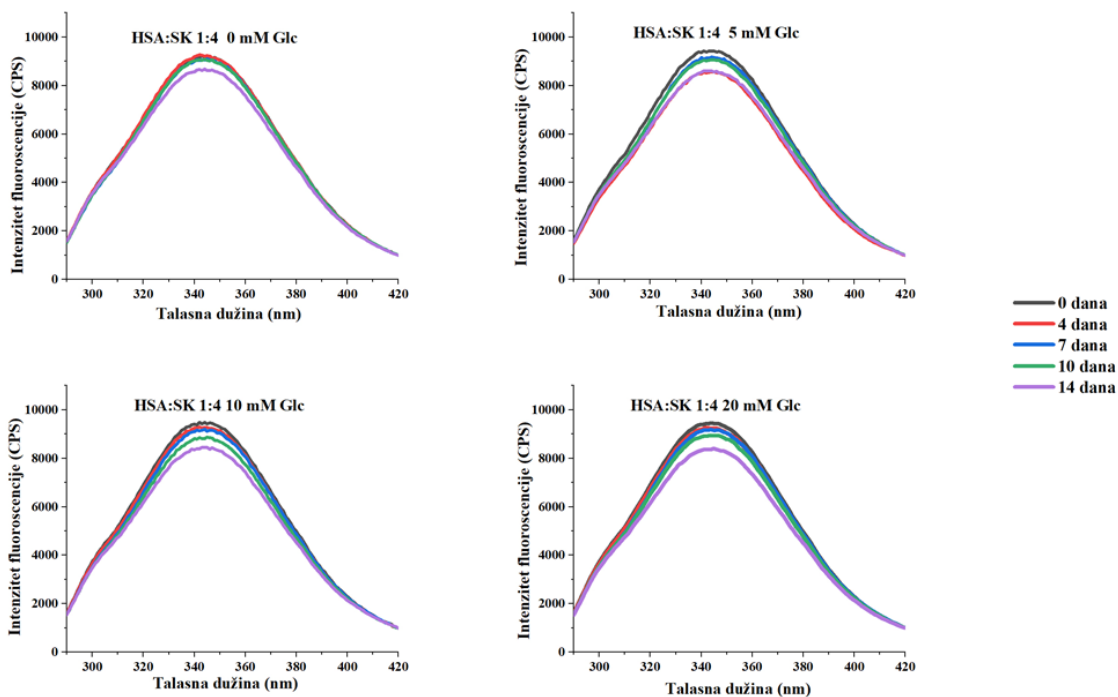
Slika 29. Efekti koncentracija glukoze (Glc) (5, 10 i 20 mM) na normalizovani intenzitet fluorescencije Trp214, tokom 14 dana inkubacije HSA u odsustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:0 (mol/mol).



Slika 30. Efekti koncentracija glukoze (Glc) (5, 10 i 20 mM) na normalizovani intenzitet fluorescencije Trp214, tokom 14 dana inkubacije HSA u prisustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:1 (mol/mol).



Slika 31. Efekti koncentracija glukoze (Glc) (5, 10 i 20 mM) na normalizovani intenzitet fluorescencije Trp214, tokom 14 dana inkubacije HSA u prisustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:2 (mol/mol).

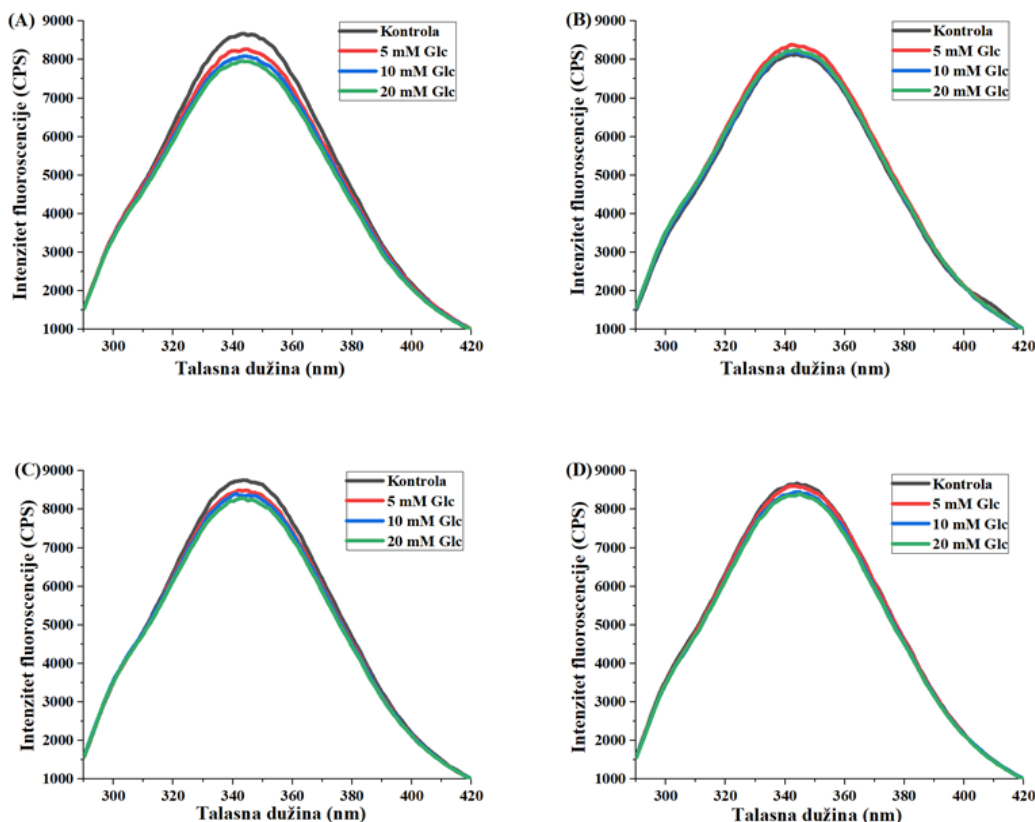


Slika 32. Efekti koncentracija glukoze (Glc) (5, 10 i 20 mM) na normalizovani intenzitet fluorescencije Trp214, tokom 14 dana inkubacije HSA u prisustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:4 (mol/mol).

4.3.1.1. Efekti koncentracija glukoze na fluorescenciju Trp214

Da bi se jasnije uočio efekat različitih koncentracije glukoze i glikacije na strukturne promene molekula HSA sa različitim brojem vezanih molekula SK za protein (1:0 do 1:4; mol/mol), upoređeni su emisijski spektri HSA nakon 14 dana inkubacije na 37°C. Povećanje koncentracije glukoze od 5 do 20 mM u inkubacionim smešama dovelo je do postepenog smanjenja intenziteta fluorescencije u uzorcima HSA:SK 1:0 i 1:2 (mol/mol) nakon 14 dana inkubacije, u odnosu na kontrolu bez prisustva glukoze. Ovaj efekat se više ispoljio kod uzorka HSA:SK 1:0 (mol/mol) nego kod molarnog odnosa 1:2 (**Slike 33A i 33C**). Trend smanjenja intenziteta fluorescencije, iako ne mnogo izražen, bio je u skladu sa literaturom (**Lautenslager i sar., 2011; Szkudlarek, 2023**). Zanimljivo je da nije bilo promene intenziteta fluorescencije Trp214 u poređenju sa HSA kontrolom (spektri se potpuno poklapaju na svim talasnim dužinama), kada su, redom, molarni odnosi HSA:SK bili 1:1 i 1:4, a koncentracije glukoze 10 i 5 mM (**Slike 33B i 33D**). Uočljivo je i da se pri istim molarnim odnosima HSA:SK uočava samo mala promena u intenzitetu pika fluorescencija u odnosu na kontrolu i sa 20 mM glukozom, što odgovara patološkim stanjima.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je pod fiziološkim uslovima (jedna MK vezana za HSA) efekat glikacije molekula HSA na strukturne promene HSA zanemarljiv sa sadržajem glukoze od normalnih do patoloških vrednosti. Takođe, doprinos broja vezanih molekula SK za molekul HSA, na strukturne promene HSA izazvane glikacijom, je izraženiji od nivoa glukoze.

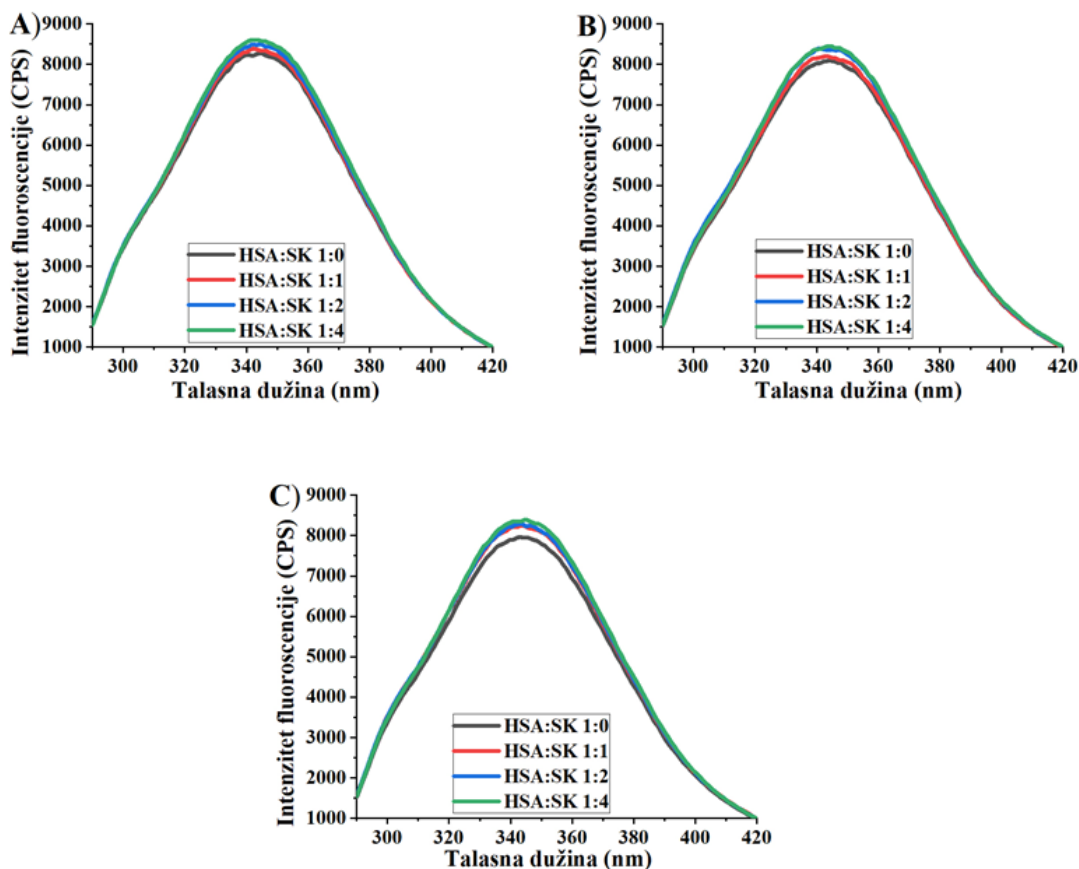


Slika 33. Efekti koncentracija glukoze (Glc) na normalizovane spektre fluorescencije Trp214. Inkubacione smeše su pripremljene od HSA i SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:0 (**A**), 1:1 (**B**), 1:2 (**C**) i 1:4 (**D**), nakon 14 dana inkubacije na 37°C u odsustvu (kontrola), ili u prisustvu 5,10 i 20 mM glukoze.

4.3.1.2. Efekti molarnog odnosa HSA:SK na fluorescenciju Trp214

Da bi se uočio efekat broja vezanih molekula SK za molekul HSA na strukturne promene HSA usled glikacije, prikazani su emisijski spektri nakon 14 dana inkubacije HSA na 37°C u uzorcima sa različitim molarnim odnosima HSA:SK od 1:0 do 1:4 i istim koncentracijama glukoze (**Slika 34**). Svi uzorci HSA sa vezanim SK imali su veći intenzitet fluorescencije od onih bez SK u prisustvu sve tri koncentracije glukoze. Povećanje molarnog odnosa HSA:SK od 1:1 do 1:4 doveo je do postepenog povećanja intenziteta fluorescencije jedino u prisustvu 5 mM glukoze (**Slika 34A**). Kada je sadržaj glukoze bio u patološkom opsegu (10 i 20 mM), intenziteti fluorescencije su bili skoro identični za molarne odnose HSA:SK 1:2 i 1:4 (**Slike 34B i 34C**). Takođe, pri odnosu HSA:SK 1:4 (mol/mol) razlike u intenzitetima pikova skoro da ne postoje, u uzorcima sa koncentracijama glukoze od 5 do 20 mM.

Dobijeni rezultati ove disertacije, o uticaju zajedničkog prisustva MK i glukoze na strukturne promene HSA tokom glikacije, su jedinstveni, pošto nema studije koja je pratila efekte međusobnog vezivanja različitih HSA:SK molarnih odnosa u prisustvu različitih koncentracija glukoze na strukturu HSA, odražavajući uslove *in vivo* koji odgovaraju istovremeno normalnim i patološkim stanjima.

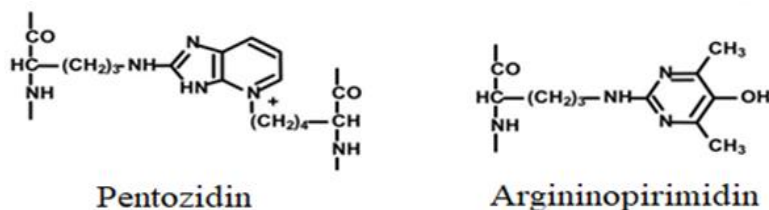


Slika 34. Efekti različitih molarnih odnosa HSA:SK na normalizovane spektre fluorescencije Trp214 pri normalnim i patološkim nivoima glukoze (Glc). Inkubacione smeše su pripremljene od HSA i SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4, nakon 14 dana inkubacije na 37°C u prisustvu 5 mM (A), 10 mM (B) i 20 mM (C) glukoze.

Dobijeno smanjenje intenziteta fluorescencije Trp214, kod svih inkubacionih smeša nakon 14 dana inkubacije (**Slike 29–32**), bilo je umereno u poređenju sa baznom fluorescencijom i u skladu sa prethodnim studijama (**Szkudlarek i sar., 2022; Szkudlarek, 2023**). U obe ove studije praćena je glikacija HSA u prisustvu MK. U studiji sa nefiziološkim molarnim odnosima HSA:glukoze za ispitivanje reakcije glikacije u odsustvu MK, dobijeno smanjenje intenziteta fluorescencije Trp214 bilo je izraženije (**Liu i sar., 2019**). HSA se značajno modifikuje oksidativnim i karbonilnim stresom, ukoliko su koncentracije stresora veće nego u fiziološkim uslovima, ili u periodu inkubacije dužem od poluživota HSA (**Blache i sar., 2015; Yamazaki i sar., 2005; Liu i sar., 2019**). Međutim, u *in vivo* i *in vitro* studijama nađena je blaga modifikacija strukture HSA kada je koncentracija stresora bila u patofiziološkom opsegu vrednosti (**Szkudlarek i sar., 2022; Paar i sar., 2023; Anguizola i sar., 2013**). Na primer, posle 21 dana inkubacije, sa 0,63 mM HSA u prisustvu 15 mM glukoze na pH 7,4 i 37°C, nađen je samo jedan mol heksoze na mol HSA (**Anguizola i sar., 2013**) što ukazuje na unutrašnje mehanizme kojima HSA održava svoju strukturu i antioksidativnu i transportnu ulogu. Ova smanjenja intenziteta fluorescencije nisu bila postepena u svim uzorcima tokom inkubacije (**Slike 29–32**), i zavisila su od molarnog odnosa HSA:SK i od koncentracije glukoze. Dalja analiza dobijenih emisionih spektara je pokazala da, zavisno od molarnog odnosa HSA:SK i koncentracije glukoze, strukturne promene u molekulu HSA mogu da budu zanemarljive i nakon 14 dana inkubiranja HSA u prisustvu različitih koncentracija glukoze (**Slike 33 i 34**), kao i da postoji međusobni efekat ova esencijalna endogena liganda u cirkulaciji.

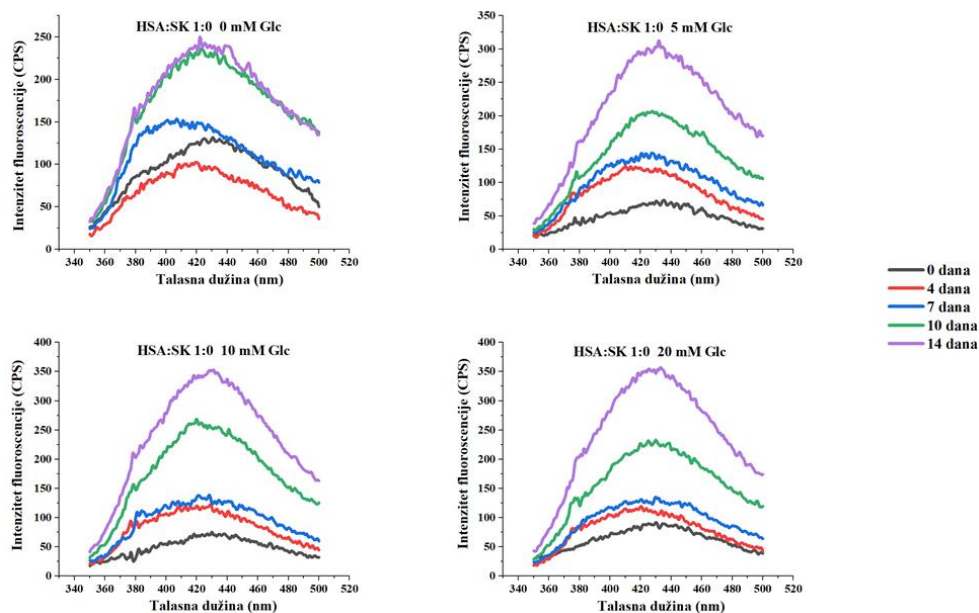
4.3.2. Strukturne promene HSA tokom glikacije – emisioni spektri pentozidina

U svim pripremljenim inkubacionim smešama (HSA:SK u molarnim odnosima 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4), u odsustvu (kontrola) i prisustvu 5, 10 i 20 mM glukoze, fluorescentna svojstva AGEs koji nastaju tokom glikacije HSA su iskorišćena za praćenje stuktturnih promena HSA. Naime, tokom glikacije bočnih aminokiselinskih ostataka Lys i Arg dolazi do nastajanja adukata pentozidina i argininopirimidina (**Slika 35**), čije prisustvo se može dokazati snimanjem fluorescentnih spektara. Tokom glikacije, usled nastajanja AGEs, dolazi do promene boje inkubacionih smeša od žute do braon. Nakon snimanja emisionih spektara Trp214, isti uzorak HSA je eksцитован na 335 nm i snimljen je emisioni spektar (od 350 do 500 nm) koji potiče od pentozidina, sa maksimumom emisije na 430 nm (**Westwood i Thornalley, 1995**).



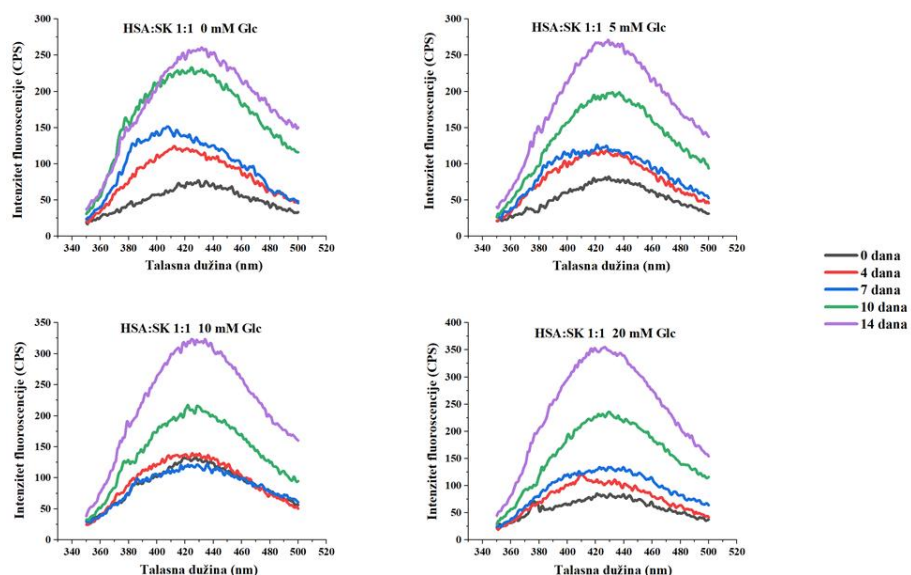
Slika 35. Strukturne formule fluorofora nastalih tokom produženog glikozilovanja proteina.

Kako i u slučaju emisionih spektara Trp214, emisioni spektri pentozidina su normalizovani kako bi se sprečilo dobijanje spektara različitih intenziteta usled grešaka nastalih tokom razblaživanja uzoraka. Normalizacijom spektara omogućeno je praćenje nastajanja AGEs sa vremenom (od 1. do 14. dana) u analiziranim uzorcima (**Slike 36–39**).



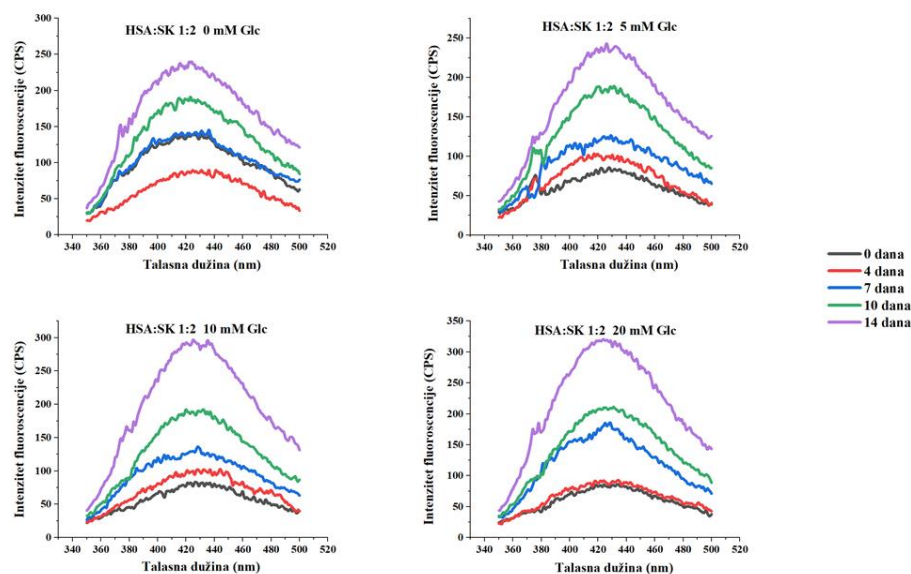
Slika 36. Efekti koncentracija glukoze (5, 10 i 20 mM) na emisione spektre pentozidina tokom 14 dana inkubacije HSA u odsustvu stearinske kiseline (SK).

Na osnovu dobijenih emisionih spektara pentozidina uočava se da u svim inkubacionim smešama HSA, koje sadrže SK u prisustvu glukoze, dolazi do postepenog povećanja intenziteta pikova sa progresijom vremena inkubacije (**Slika 36–39**). Dalje, u ovim uzorcima porast intenziteta pikova nije pravilan i on zavisi kako od koncentracije glukoze tako i molarnog odnosa HSA:SK. U uzorcima HSA sa različitim molarnim odnosima HSA:SK, a bez prisutne glukoze, primetno je povećanje intenziteta fluorescencije sa vremenom, međutim, postepeni porast intenziteta fluorescencije uočljiv je samo kod HSA:SK 1:1 (mol/mol) uzorka (**Slika 37**).

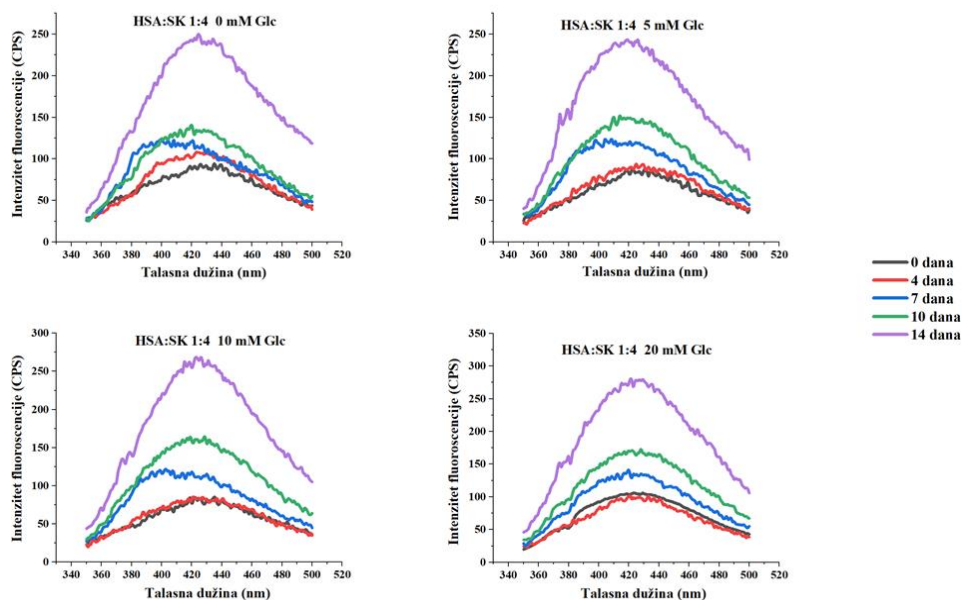


Slika 37. Efekti koncentracija glukoze (5, 10 i 20 mM) na emisione spektre pentozidina, tokom 14 dana inkubacije HSA sa stearinskom kiselinom (SK), HSA:SK 1:1 (mol/mol).

Pojava porasta fluorescencije i u uzorcima HSA koji nisu inkubirani sa glukozom može se objasniti činjenicom da je za sve eksperimente korišćen HSA koji se koristi u kliničke svrhe i koji je dobijen izolovanjem iz plazme zdravih osoba, a koji je verovatno već glukonovan.



Slika 38. Efekti koncentracija glukoze (5, 10 i 20 mM) na emisione spektre pentozidina, tokom 14 dana inkubacije HSA u prisustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:2 (mol/mol).



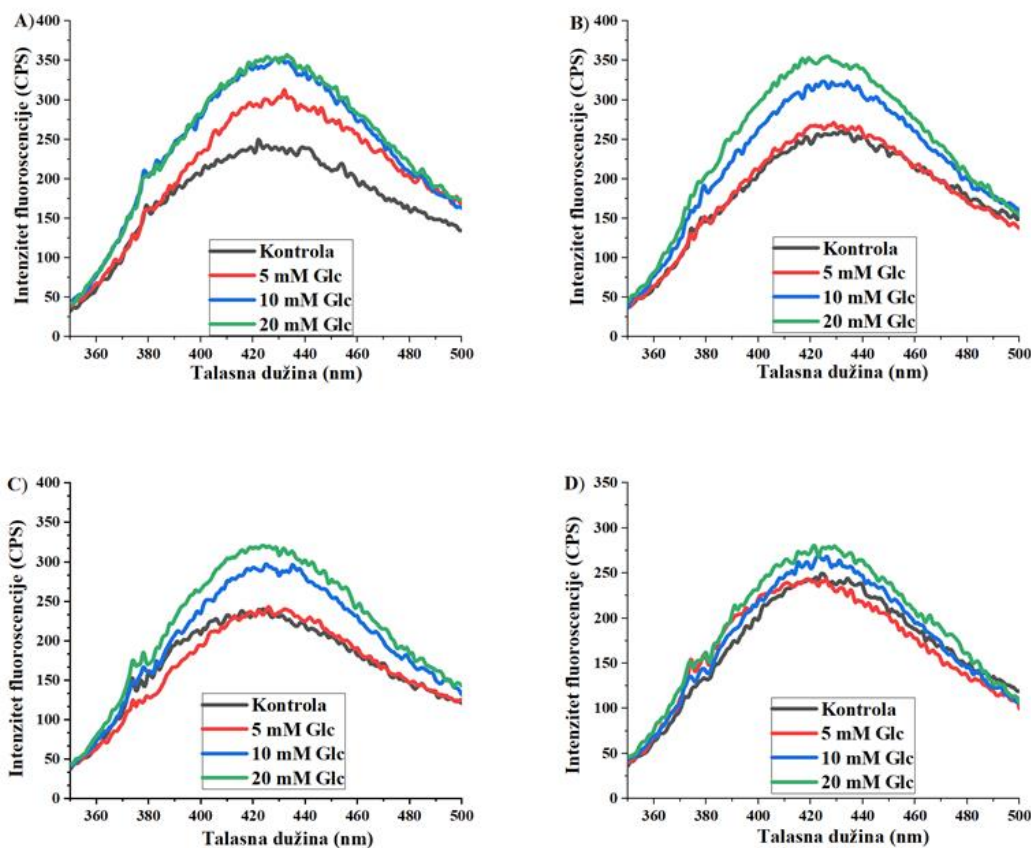
Slika 39. Efekti koncentracija glukoze (5, 10 i 20 mM) na emisione spektre pentozidina, tokom 14 dana inkubacije HSA u prisustvu stearinske kiseline (SK), HSA:SK 1:4 (mol/mol).

4.3.2.1. Efekti koncentracije glukoze na formiranje pentozidnog adukta

Da bi se bolje uočio efekat rastuće koncentracije glukoze na formiranje pentozidnog adukta tokom glikacije HSA, upoređeni su emisijski spektri pentozidina nakon 14 dana inkubacije na

37°C u uzorcima HSA sa različitim molarnim odnosima HSA:SK 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4 (**Slika 40**). Na osnovu dobijenih spektara vidi se da postepeno povećanje koncentracija glukoze od 5 do 20 mM dovodi do najvećeg povećanja intenziteta pentoziidnog pika pri molarnom odnosu HSA:SK 1:0, u poređenju sa kontrolom (**Slika 40A**). Interesantno, povećanje koncentracije glukoze sa 10 mM na 20 mM nije imalo dodatnog uticaja na povećanje intenziteta ovog pika.

Intenzitet fluorescencije za sva tri molarna odnosa HSA:SK, u prisustvu 5 mM glukoze, bio je na istom nivou u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. U uzorku HSA:SK 1:4 (mol/mol), koji je model sistem za patološka stanja kao što je dijabetes, ili fiziološka stanja kao što je gladovanje ili intenzivni fizički rad (**Cistola, 1991; Fanali i sar., 2012; Mishra i Heath, 2021**), intenzitet pentoziidnog pika u prisustvu 10 i 20 mM glukoze bio je samo blago povišen u poređenju sa kontrolom (**Slika 40D**).

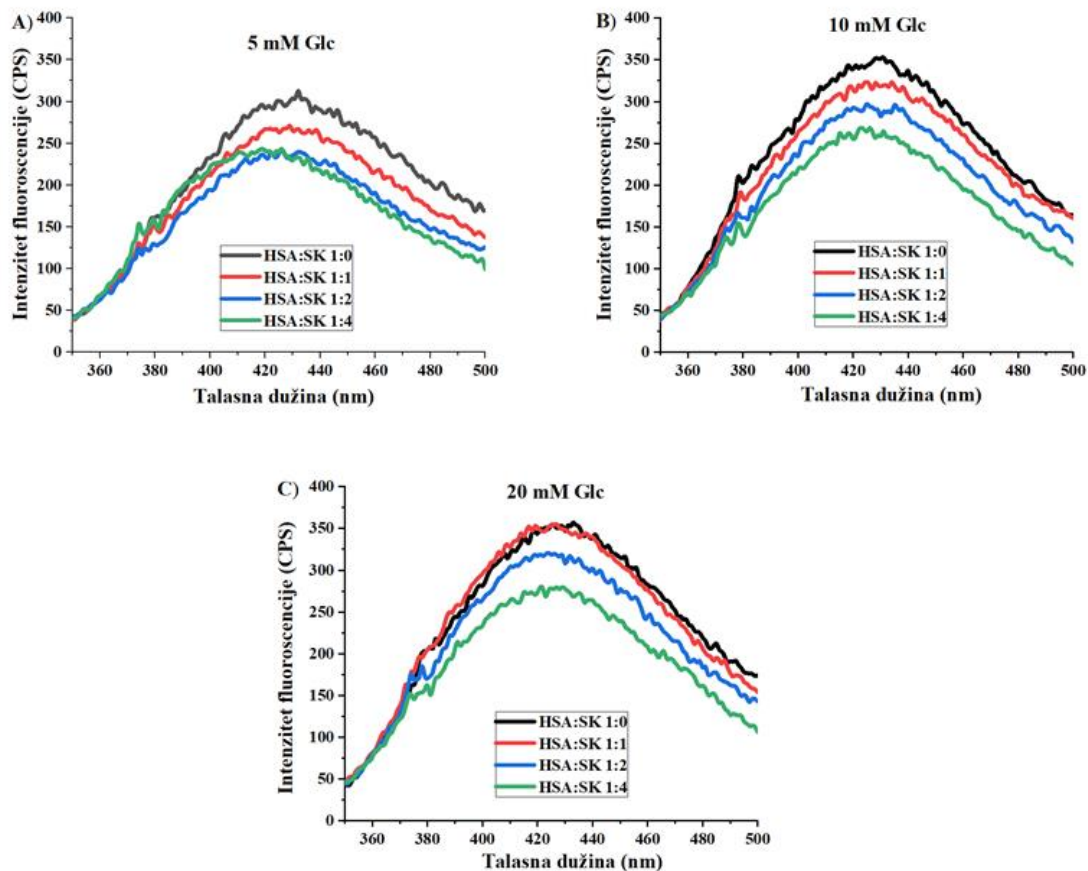


Slika 40. Efekti koncentracija glukoze (Glc) (5, 10 i 20 mM) na emisione spektre pentoziidina nakon 14 dana inkubacije na 37°C uzoraka (sve mol/mol) HSA:SK 1:0 (**A**), 1:1 (**B**), 1:2 (**C**) i 1:4 (**D**).

Ovi rezultati su pokazali da je formiranje pentoziidnog adukta (AGEs) usled glikacije HSA glukozom u normalnoj fiziološkoj koncentraciji (5mM) sprečeno ako je SK vezana za HSA. Zaštitni efekat većeg broja molekula SK vezanih za HSA (HSA:SK 1:4; mol/mol) posebno je primetan u patološkim koncentracijama glukoze (10 i 20 mM). Slično prethodnim rezultatima dobijenim za emisione spektre Trp214, i ovi rezultati predstavljaju originalni naučni doprinos u ovoj oblasti, pošto nema objavljenih rezultata sličnih eksperimenata.

4.3.2.2. Efekti molarnih odnosa HSA:SK na formiranje pentozidnog adukta

Da bi se bolje uočio zaštitni efekat rastućeg broja vezanih molekula SK za HSA na formiranje pentozidnog adukta tokom glikacije, prikazani su emisijski spektri pentozidina nakon 14 dana inkubacije HSA na 37°C sa različitim molarnim odnosima HSA:SK (od 1:0 do 1:4 mol/mol) i istim koncentracijama glukoze (**Slika 41**). Za sve tri testirane koncentracije glukoze, intenziteti pentozidnih pikova bili su niži u uzorcima HSA sa vezanom SK nego u kontroli (HSA:SK 1:0; mol/mol), osim u uzorku HSA:SK 1:1 (mol/mol) u prisustvu 20 mM glukoze, gde su intenziteti fluorescencije bili isti nakon 14 dana inkubacije (**Slika 41C**).



Slika 41. Efekti različitih molarnih odnosa HSA:SK (1:0, 1:1, 1:2 i 1:4) na emisijske spektre pentozidina, nakon 14 dana inkubacije na 37°C, uzoraka HSA:SK u prisustvu 5 mM (**A**), 10 mM (**B**) i 20 mM (**C**) glukoze (Glc).

Postepeno povećanje HSA:SK molarnog odnosa od 1:1 do 1:4 dovodi do postepenog smanjenja intenziteta signala i ovo je bilo najuočljivije pri koncentracijama glukoze 10 i 20 mM (**Slika 41B** i **Slika 41C**). Pri koncentraciji glukoze od 5 mM, najniži intenzitet fluorescencije je postignut sa dva vezana molekula SK za HSA; dalje povećanje molarnog odnosa SK prema HSA nije imalo dodatnog efekta na intenzitet signala (**Slika 41A**). Nasuprot tome, sa koncentracijom glukoze u patološkom opsegu (20 mM), najmanje 2 molekula SK vezana za HSA su potrebna da bi se ispoljio zaštitni efekat, i dalje povećanje broja vezanih molekula SK za molekul HSA (do molarnog odnosa 4:1) samo pojačava ovaj efekat (**Slika 41C**).

Ovi rezultati potvrđuju da je nivo glikacije HSA određen zajedničkim delovanjem molekula MK i glukoze. Prema tome, molekul HSA detektuje promene u koncentraciji MK i glukoze u unutar/vanćelijskim prostorima. Ova osetljivost HSA je naročito važna kada se koncentracije MK i glukoze brzo menjaju, kao, na primer, pre i posle jela, tokom intenzivne fizičke aktivnosti, ili patoloških stanja kakvi su dijabetes i smanjena tolerancija na glukozu.

Dobijeni rezultati i izvedeni zaključci o uticaju MK na stepen glikacije HSA su u skladu sa studijom **Lautenslager i sar. (2011)**. Ova studija je pokazala da fiziološka smeša, ili pojedinačne MK u molarnom odnosu HSA:MK 1:1, imaju zaštitnu ulogu u formiranju Amadori adukata glikacije tokom 7 dana inkubacije proteina u prisustvu 20 mM glukoze. Za razliku od ove studije, rezultati ove disertacije obuhvataju različite patofiziološke odnose HSA:SK i koncentracije glukoze, što omogućava bolju ekstrapolaciju nekih patoloških stanja kod kojih postoje specifični odnosi sadržaja HSA:MK i koncentracije glukoze.

4.3.3. Efekat ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na sadržaj HSA Cys34 tiolne grupe

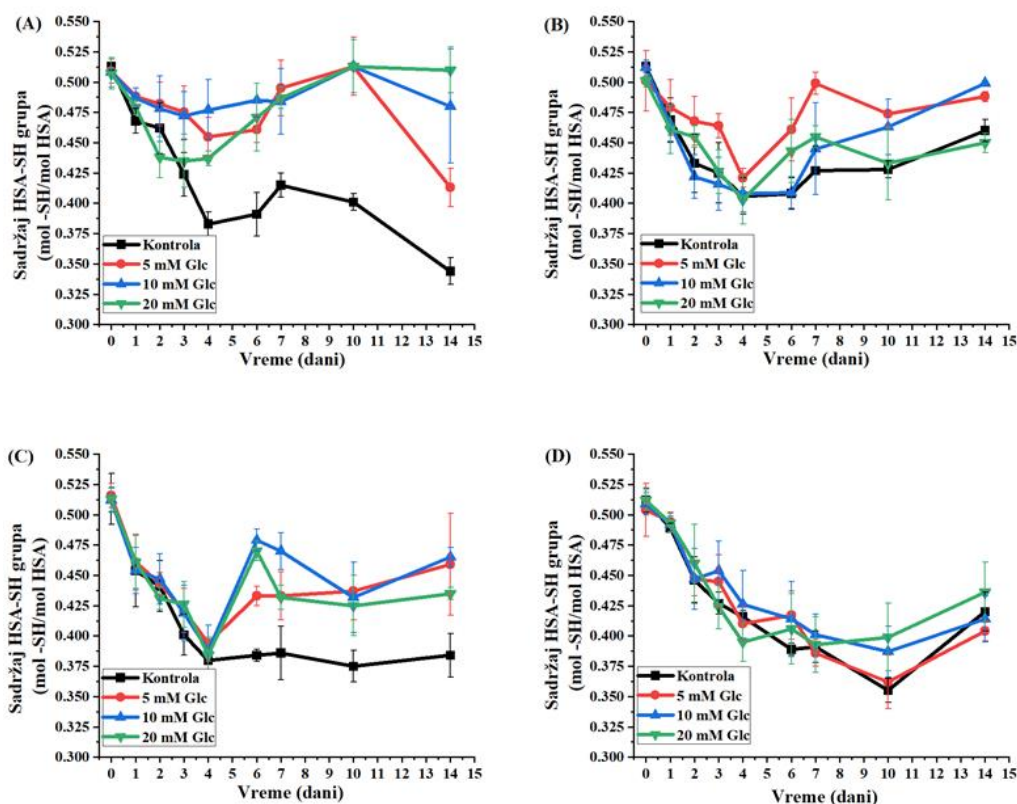
Molekul HSA ima jednu slobodnu tiolnu grupu (ostatak Cys34), koja je pri fiziološkom pH jači nukleofil od amino- i guanidino- grupe, tako da brže neenzimski reaguje sa reaktivnim karbonilnim jedinjenjima, uz nastajanje hemitioaceta (Aćimović i sar., 2010). Međutim, ova reakcija je reverzibilna, tako da može doći do prolaznog pada sadržaja HSA-SH grupa. Uticaj glikacije, i strukturnih promena HSA izazvanih glikacijom, na sadržaj HSA-SH grupa, praćen je tokom 14 dana inkubacije u svim pripremljenim smešama. Pre (0 dana) i nakon 1–4, 6, 7, 10 i 14 dana inkubacije određen je sadržaj slobodnih HSA-SH grupa spektrofotometrijskom metodom sa DTNB-om (Elmanova metoda). Vrednosti dobijene za statistička poređenja korišćenjem one-way ANOVA, između sadržaja HSA-SH grupa u svim vremenskim tačkama inkubacionih smeša, prikazane su u **Prilogu 1**, i u **Tabelama 1–4**. Zbog dokazanih efekata da prisustvo glukoze i broj vezanih molekula SK za HSA utiče na emisione spektre Trp214 (unutar Sudlow I vezujućeg mesta) i nastajanje pentozidnog adukta, kao i da se oba liganda vezuju za vezujuća mesta u neposrednoj blizini Cys34 ostatka (**Kragh-Hansen i sar., 2002; Wang i sar., 2013**), razmatrani su efekti glukoze i HSA:SK molarnog odnosa na sadržaj HSA-SH grupe.

4.3.3.1. Efekti koncentracije glukoze na sadržaj HSA-SH grupe

U svim inkubacionim smešama sa glukozom uočava se smanjenje sadržaja HSA-SH grupe tokom prva 4 dana, koji se nakon toga povećava, osim kod molarnog odnosa HSA:SK 1:4, gde se smanjenje HSA-SH grupe nastavlja do 10. dana inkubacije (**Slika 42**). Nakon 4 dana od inkubacije, najmanje smanjenje sadržaja HSA-SH grupa, u odnosu na početnu vrednost, dobijeno je za uzorke HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa 10 mM glukozom (6,1%), a najveće za HSA:SK 1:2 (mol/mol) sa 20 mM glukozom (25,2%).

Posle 14 dana inkubacije, u uzorku HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa 20 mM glukozom, sadržaj HSA-SH grupe je vraćen na nivo pre inkubacije, dok su u ostalim smešama sa glukozom ove vrednosti bile 2,5–19,9 % niže u odnosu na početnu vrednost (nulti dan). Zanimljivo je da su srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupe, dobijene za smeše u prisustvu glukoze u odabranim vremenskim tačkama, uglavnom bile veće od odgovarajuće kontrole. Ovaj efekat je bio najuočljiviji u uzorku HSA:SK 1:0 (mol/mol) (**Slika 42A**). Trend smanjenja sadržaja HSA-SH grupe, tokom reakcije glikacije, bio je u skladu sa ranije objavljenim podacima (**Penezić i sar., 2019; Tupe i Agte, 2010**). Dobijeni rezultati ukazuju da na sadržaj HSA-SH grupe utiče zajedničko delovanje MK i glukoze, u skladu sa rezultatima **Szkudlarek i sar. (2023)**.

Iznenadjujuće je da patološke koncentracije glukoze (10 i 20 mM) pokazuju zaštitnu ulogu, u smislu „oporavka” sadržaja HSA-SH grupa i antioksidativnog kapaciteta HSA, posebno pri molarnom odnosu HSA:SK 1:0 (Slika 42A).



Slika 42. Efekti koncentracija glukoze (Glc) na sadržaj HSA-SH grupa tokom 14 dana inkubacije na 37°C, inkubacionih smeša pripremljenih od HSA i SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C) i 1:4 (D) u odsustvu (kontrola) ili u prisustvu 5, 10 i 20 mM Glc. Statističke razlike između vremenskih tačaka i smeša nisu prikazane zbog jasnoće. (Prilog 1 Tabele 1 i 2)

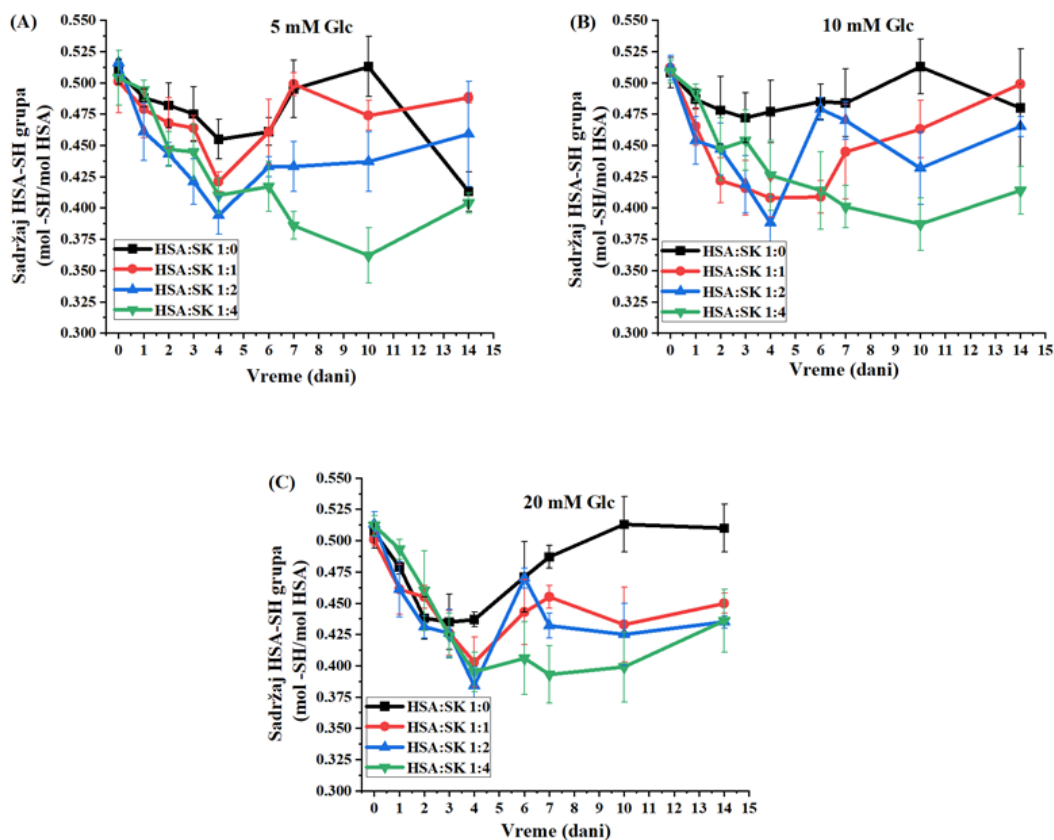
4.3.3.2. Efekti molarnih odnosa HSA:SK na sadržaj HSA-SH grupe

Za sve tri koncentracije glukoze, primećeno je postepeno smanjenje sadržaja HSA-SH grupe, nakon 14 dana inkubacije, sa povećanjem molarnog odnosa HSA:SK od 1:1 do 1:4 (Slika 43). U većini vremenskih tačaka (za svaku koncentraciju glukoze), dobijene srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupe za HSA:SK 1:0 (mol/mol) bile su veće od dobijenih srednjih vrednosti u smešama u prisustvu SK. Ovaj trend je bio najočigledniji u smešama sa 20 mM glukozom (Slika 43C). Pri normalnoj fiziološkoj koncentraciji glukoze (5 mM), oporavak sadržaja HSA-SH grupe od 6. do 14. dana inkubacije se povećao sa smanjenjem molarnog odnosa HSA:SK (Slika 43A). Isti trend dobijen je i u smešama sa 20 mM glukozom od 7. do 14. dana inkubacije (Slika 43C).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je povećanje molarnog odnosa HSA:SK negativno uticalo na „oporavak” sadržaja HSA-SH grupa.

U ovoj studiji po prvi put su ispitani i zajednički efekti glukoze i molarnih odnosa HSA:MK, koji simuliraju patofiziološke koncentracije, na sadržaj HSA-SH grupe tokom perioda koji odgovara

poluživotu HSA u cirkulaciji (12–21 dan) (Anguizola i sar., 2013). Brojne *in vivo* studije dokazale su smanjen sadržaj HSA-SH grupa u različitim patološkim stanjima, u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ili onima koji su bili oboleli od različitih hroničnih oboljenja (Paar i sar., 2023; Setoyama i sar., 2017; Oettl i Marsche, 2010; Mera i sar., 2005; Paar i sar., 2022). Malo je studija u kojima su promene sadržaja HSA-SH grupe praćene u realnom vremenu *in vivo* (Fu i sar., 2019) i *in vitro* (Penezić i sar., 2019; Tupe i Agte, 2010). Dobijeni rezultati *in vitro* studije u ovoj disertaciji su pokazali da se sadržaj HSA-SH grupe može donekle povratiti, nakon prvobitnog smanjenja, tokom prva četiri dana inkubacije; taj oporavak je rezultat zajedničkog uticaja SK i glukoze (Slika 42). Ovi rezultati su u skladu sa studijom Szkudlarek (2023), gde je dobijeno da je sadržaj HSA-SH grupe veći u prisustvu palmitinske kiseline, nego u njenom odsustvu, posle 21 dana glikacije HSA mešavinom glukoze/fruktoze.



Slika 43. Efekti molarnih odnosa HSA:SK na sadržaj HSA-SH grupa tokom 14 dana inkubacije na 37°C smeša HSA i SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4, u prisustvu 5 mM (A), 10 mM (B) i 20 mM (C) glukoze (Glc). Statističke razlike između vremenskih tačaka i smeša nisu prikazane zbog jasnoće (**Prilog 1; Tabele 3 i 4**).

Rezultati ove disertacije su pokazali da je najveći “oporavak” HSA-SH grupe postignut za smeše HSA:SK 1:1 (mol/mol) sa 5 i 10 mM glukozom i HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa 20 mM glukozom (Slika 42). Povećanje broja MK vezanih za HSA, sa dva na četiri, imalo je negativan efekat na “oporavak” sadržaja HSA-SH grupa (Slika 43). Dobijeni rezultati su fiziološki relevantni, jer omogućavaju da se objasni uzrok uočenog nižeg sadržaja HSA-SH u patološkim stanjima praćenim povišenim sadržajem slobodnih MK i koncentracijama glukoze, kao što su tip II

dijabetesa ili insulinska rezistencija (**Blache i sar., 2015; Shetty i Kumari, 2021; Paar i sar., 2023**), u odnosu na viši sadržaj HSA-SH grupa kod tipa I dijabetesa, praćenog smanjenim sadržajem slobodnih MK i povećanim koncentracijama glukoze (**Shetty i Kumari, 2021; Paar i sar., 2023**). Kod loše kontrolisanih pacijenata sa tipom I dijabetesa, nađen je smanjeni nivo slobodnih MK u poređenju sa zdravim osobama (**Sobczaka i sar., 2021**). Ovo patološko stanje je oponašano u inkubacionim smešama HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa 10 i 20 mM glukozom i dobijeno je da se, nakon 14 dana inkubacije, sadržaj HSA-SH grupe vraća na početni nivo kada je koncentracija glukoze 20 mM (**Slika 42A**). Sadržaj HSA-SH grupe kod bolesnika sa loše kontrolisanom glikemijom sa tipom I dijabetesa bio je isti kao u kontrolnoj grupi, pošto je “oporavak” HSA-SH najveći. Nasuprot tome, kod pacijenata sa tipom II dijabetesa sadržaj HSA-SH grupa bio je niži nego u kontrolnoj grupi (**Paar i sar., 2023**). Povišene slobodne MK u plazmi pacijenata sa tipa II dijabetesa ili insulinskom rezistencijom (**Shetty i Kumari, 2021**), i veće koncentracije glukoze, mogu dovesti do manje efikasnog „oporavka” sadržaja HSA-SH kod ovih osoba tokom poluživota HSA (**Blache i sar., 2015; Paar i sar., 2023**). Ovo patološko stanje je oponašano u našim inkubacionim smešama HSA:MK 1:2 i 1:4 (mol/mol) sa 10 i 20 mM glukozom, gde je “oporavak” sadržaja HSA-SH grupe bio najmanji (**Slika 43**).

4.3.4. Efekat ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na reaktivnost HSA-SH grupe

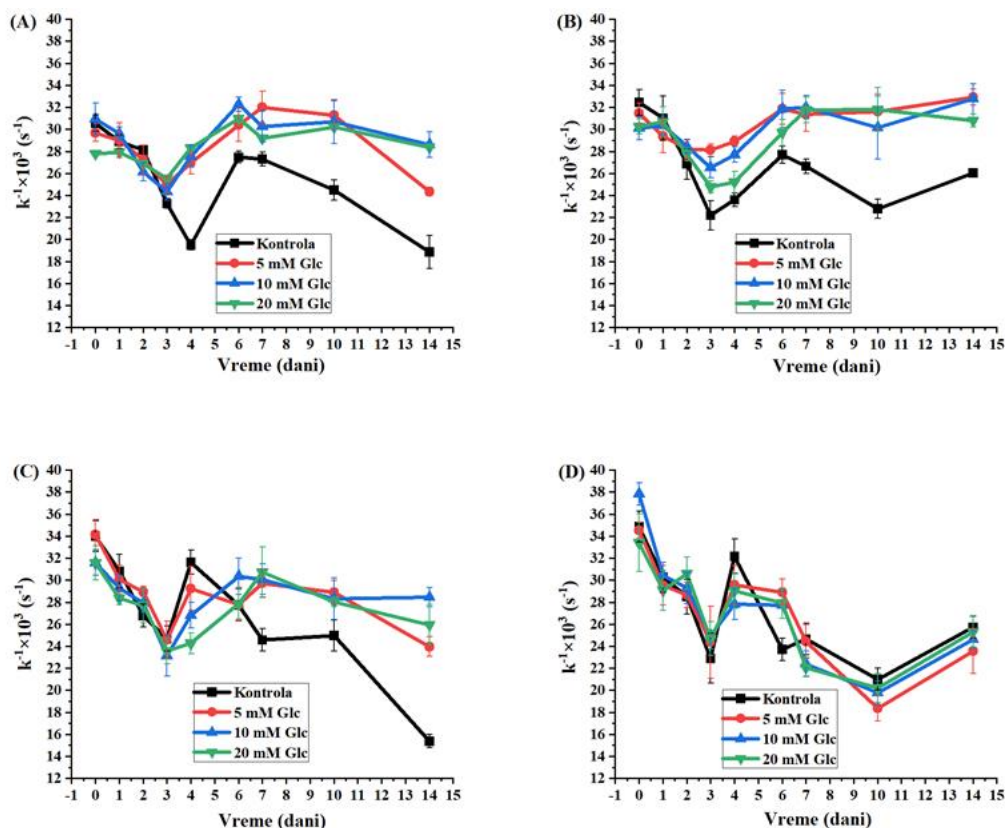
Uticaj ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na reaktivnost HSA-SH grupe određen je pre (0 dana) i nakon 1-4, 6,7,10 i 14 dana inkubacije svih uzoraka na 37°C. Određivanje konstante pseudo-prvog reda k^{-1} za reakciju HSA-SH grupe sa DTNB iskorišćeno je za procenu njene reaktivnosti. Statistička poređenja između vrednosti k' u uzorcima u različitim vremenskim tačkama prikazana su u **Prilogu 2** u **Tabelama 1-4**. Zbog dokazanih efekata prisustva glukoze i broja vezanih molekula SK na HSA na strukturu HSA tokom ispitivanog vremena inkubacije, kao i da oba liganda pokazuju uticaj na “oporavak” sadržaja HSA-SH, i u ovom delu su razmatrani pojedinačni efekti glukoze i HSA:SK molarnog odnosa na reaktivnost HSA-SH grupe.

4.3.4.1. Efekti koncentracije glukoze na reaktivnost HSA-SH grupe

Oblik krivih dobijenih za reaktivnost HSA-SH grupe u svim smešama u prisustvu glukoze bio je sličan onima za sadržaj HSA-SH grupe. U početnim danima inkubacije smanjena je reaktivnost HSA-SH grupe, dok se kasnije tokom inkubacije ona povećava (**Slike 42 i 44**).

Nakon 14 dana inkubacije, “oporavak” reaktivnosti HSA-SH u uzorcima HSA:SK 1:1 (mol/mol) sa svim koncentracijama glukoze i HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa 20 mM glukozom je bio 100% (**Slike 44A i 44B**), dok je u ostalim uzorcima od 65 do 92%. Dodatno, nakon 6 dana inkubacije u smešama u prisustvu glukoze, dobijene srednje vrednosti za HSA-SH reaktivnost su bile veće ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolom, osim u smešama koje su imale odnos HSA:SK 1:4 (mol/mol).

Dobijeni nalazi predstavljaju originalne rezultate koji značajno doprinose naučnoj oblasti, pošto je ovo prva studija u kojoj je praćena reaktivnosti HSA-SH grupe tokom glikacije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da molekul HSA ima sposobnost da povрати reaktivnost HSA-SH grupe. Nivo ovog „oporavka” HSA-SH reaktivnosti zavisi od molarnog odnosa HSA:SK i koncentracije glukoze u smeši. Prisustvo svake koncentracije glukoze pokazalo je pozitivan efekat, dok je povećanje HSA:SK odnosa pokazalo negativan efekat na reaktivnost HSA-SH. Sposobnost HSA da povрати reaktivnost svoje tiolne grupe od fiziološkog je značaja, pošto je HSA-SH grupa glavni antioksidans u krvi i vanćelijskim tečnostima. Zato je održanje njene reaktivnosti ključno za zaštitu drugih proteina tokom oksidativnog i karbonilnog stresa.



Slika 44. Efekti koncentracija glukoze (Glc) na reaktivnost HSA-SH grupe ($k^{-1} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) smeša pripremljenih od HSA i SK u molarnim odnosima HSA:SK 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C) i 1:4 (D) u odsustvu (kontrola), ili u prisustvu 5, 10 i 20 mM Glc, tokom 14 dana inkubacije na 37°C. Statističke razlike između vremenskih tačaka i smeša nisu prikazane zbog jasnoće (**Prilog 2; Tabele 1 i 2**).

4.3.4.2. Efekti molarnih odnosa HSA:SK na reaktivnost HSA-SH grupe

Nakon 14-dnevne inkubacije, samo u prisustvu 10 mM glukoze dobijeno je postepeno smanjenje reaktivnosti HSA-SH grupe sa povećanjem molarnog odnosa HSA:SK od 1:1 do 1:4 (**Slika 45B**). Interesantno, za odnos HSA:SK 1:1 (mol/mol) u prisustvu sve tri koncentracije glukoze, nakon 14 dana inkubacije, reaktivnost HSA-SH grupe je bila statistički značajno veća (za 5 i 10 mM glukozu), ili jednaka (za 20 mM glukozu), u odnosu na početnu vrednost za reaktivnost HSA-SH grupe (**Slika 45**). U odabranim vremenskim tačkama od 6. do 14. dana inkubacije, za sve tri koncentracije glukoze, dobijene k^{-1} vrednosti za HSA:SK 1:0 i 1:1 (mol/mol) bile su ili veće ili jednake u odnosu na dobijene k^{-1} vrednosti za molarni odnos HSA:SK 1:2 i 1:4 (**Slika 45**).

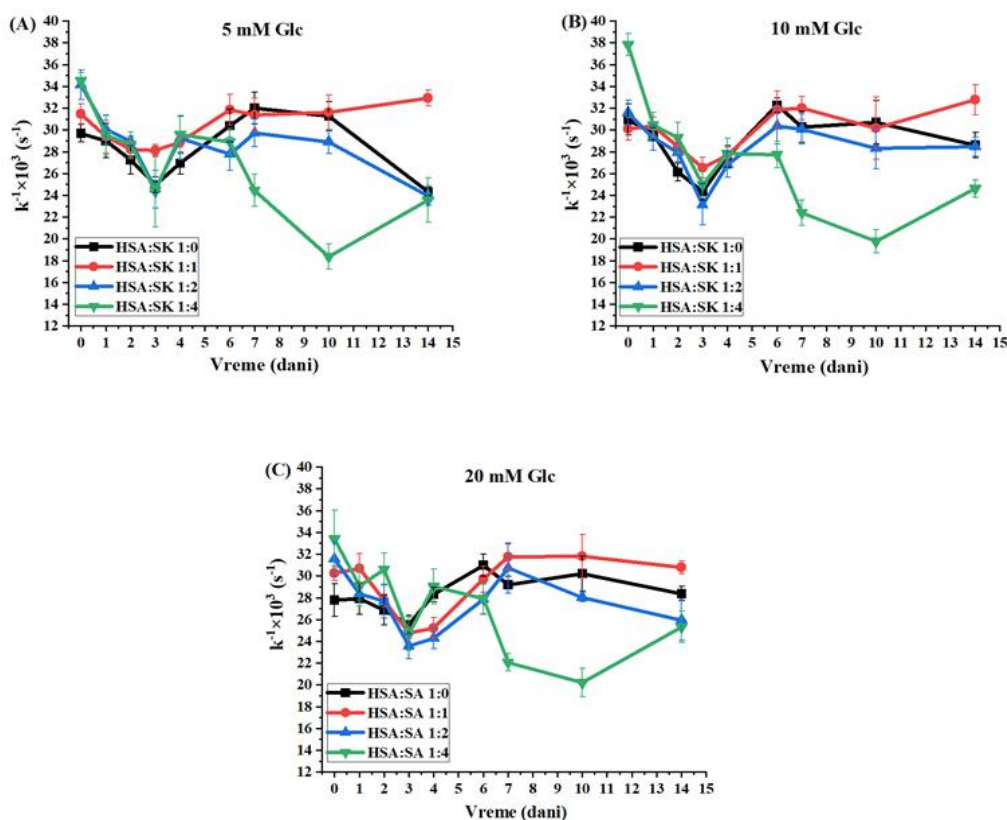
Rezultati ove disertacije pokazuju da povećanje broja molekula MK vezanih za molekul HSA, osim što negativno utiče na “oporavak” sadržaja HSA-SH grupa, sprečava i “oporavak” reaktivnosti HSA-SH grupa. Ovo znači da u patološkim stanjima praćenim porastom glukoze i slobodnih MK (dijabetes tipa II), antioksidativna uloga HSA-SH grupe bila bi manje ispoljena, usled smanjenja sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe (**Blache i sar., 2015; Paar i sar., 2023**).

Reaktivnost HSA-SH grupe određivana je u više *in vitro* studija (**Pavićević i sar., 2014; Penezić i sar., 2019; Takić i sar., 2016; Torres i sar., 2012**) i u malom broju *in vivo* studija (**Jovanović i sar., 2014; Takić i sar., 2023**). U samo jednoj *in vivo* studiji je praćena promena reaktivnosti

HSA-SH grupe u realnim patofiziološkim uslovima (Takić i sar., 2023). Da bi se odredila reaktivnost HSA-SH grupe *in vivo* neophodno je prethodno izolovati HSA iz seruma ili plazme.

Afinitetna hromatografija sa Cibacron Blue Sephorose nosačem je uobičajena metoda za izolovanje HSA (Blache i sar., 2015), međutim, zbog dugog trajanja, izolovanja i selektivnosti matriksa prema molekulima HSA koji nose zasićene MK (Jovanovic i sar., 2014), ona nije pogodna za ispitivanje reaktivnosti HSA-SH grupe u realnim uzorcima. Razvojem brze metode izolovanja HSA iz seruma/plazme, zasnovanoj na dvostepenom taloženju AS (Jovanović i sar., 2013), dobijaju se uzorci HSA pogodni za određivanje reaktivnosti HSA-SH grupe. U *in vivo* studiji Takić i sar. (2023), u kojoj je praćena promena reaktivnosti HSA-SH grupe 15 i 60 minuta, kao i 24 h nakon polumaratonske trke u odnosu na vrednosti pre trke, ustanovljeno je da dolazi do prolaznog povećanje reaktivnosti HSA-SH grupe kod molarnog odnosa HSA:MK 1:2,34 i 1:1,27, redom, 15 i 60 minuta nakon trke. Nakon 24 sata nakon trke, reaktivnost HSA-SH grupe i molarni odnos HSA:MK (1:0,84) vraćeni su na početne vrednosti.

Na osnovu rezultata *in vivo* studije (Takić i sar., 2023) i dobijenih rezultata *in vitro* studije u ovoj disertaciji, zaključuje se da je reaktivnost HSA-SH grupe ključna u cilju održanja redoks homeostaze u cirkulaciji i vanvaskularnom prostoru gde je molekul HSA glavni antioksidans (Peters 1996; Otagiri i sar., 2009).



Slika 45. Efekti molarnih odnosa HSA:SK na reaktivnost HSA-SH grupa ($k^{-1} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) u uzorcima pripremljenim od HSA i SK u molarnim odnosima 1:0, 1:1, 1:2 i 1:4, u prisustvu 5 mM (A), 10 mM (B) i 20 mM (C) glukoze (Glc), tokom 14 dana inkubacije na 37°C. Statističke razlike između vremenskih tačaka i smeša nisu prikazane zbog jasnoće (Prilog 2; Tabele 3 i 4).

Početno smanjenje reaktivnosti HSA-SH grupe tokom prva tri dana inkubacije praćeno je „oporavkom” njene reaktivnosti u većini testiranih inkubacionih smeša (**Slika 44**). Kada je molarni odnos HSA:SK bio 1:1, što odgovara normalnim fiziološkim vrednostima sadržaja MK vezanih za HSA, nakon 14 dana inkubacije reaktivnost HSA-SH se vratila na početne vrednosti, iako su vrednosti koncentracije glukoze bile u širokom rasponu vrednosti (od normalnih do patoloških). Zanimljivo, smanjena reaktivnost HSA-SH grupe bila je izraženija u smeši bez glukoze za molarne odnose HSA:SK 1:0, 1:1 i 1:2, dok za molarni odnos 1:4 nema razlike u trendu reaktivnosti HSA-SH grupe u odsustvu ili prisustvu glukoze. Prisustvo glukoze u inkubacionoj smeši je pokazalo pozitivan efekat, dok povećanje HSA:SK molarnog odnosa ima negativan efekat na „oporavak“ HSA-SH reaktivnosti.

Dobijeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da se u inkubacionim smešama sa glukozom dva molekula glukoze nalaze u okviru Sudlow I vezujućeg mesta (**Wang i sar., 2013; Pongprayoon i Mori, 2018; Awang i sar., 2017**). Ciklični oblik glukoze je lokalizovan dublje unutar Sudlow I vezujućeg mesta, dok se otvoreni oblik nalazi na ulazu ovog vezujućeg mesta (**Pongprayoon i Mori, 2018; Awang i sar., 2017**). Simulacija molekulске dinamike otkrila je da je za intenzivnije interakcije dimera šećera u velikoj šupljini Sudlow I vezujućeg mesta neophodno formiranje vodoničnih veza između dva molekula šećera (**Pongprayoon i Mori, 2018**). Štaviše, prisustvo dva molekula monosaharida (glukoze ili galaktoze) u Sudlow I vezujućem mestu povećava fleksibilnost ovog mesta vezivanja liganda, ali i Sudlow II vezujućeg mesta (**Awang i sar., 2017; Szkudlarek i sar., 2015**). Pored toga, prisutni šećeri u Sudlow I vezujućem mestu čine ostatak Trp214 fleksibilnijim u poređenju sa Trp214 u odmašćenom HSA, ili HSA zasićenim sa miristinskom kiselinom u molarnom odnosu HSA:MK 1:7 (**Awang i sar., 2017**).

U molekulu HSA potpuno zasićenim sa MK, indolni prsten Trp214 je rigidan i inicijalno poravnat okomito na osu polipeptidne kičme, pošto se miristinska kiselina vezuje za Sudlow I vezujuće mesto. Prisustvo dva molekula glukoze, umesto miristinske kiseline, za Sudlow I vezujuće mesto, izaziva rotaciju Trp214 indolnog prstena iz uspravnog u paralelni položaj sa osom kičme, što je najpovoljnija konformacija za indolni prsten (**Awang i sar., 2017**). Prema ovim literaturnim podacima i našim rezultatima, zaključuje se da je prisustvo glukoze u Sudlow I vezujućem mestu u blizini Cys34, neophodno za održavanje reaktivnosti HSA-SH grupe. Održavanje sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe je ključno i za druge proteine plazme sa slobodnim tiol grupama u strukturi. Bez zaštitne uloge HSA-SH grupe, tiolne grupe drugih proteina bile bi izložene oksidativnom i karbonilnom stresu, što može dovesti do gubitka njihove aktivnosti i funkcije.

4.3.5. Uticaj prisustva glukoze na gašenje fluorescencije Trp214 pri vezivanju SK za HSA

U daljem radu je ispitano kako različite koncentracije glukoze utiču na interakcije SK sa odmašćenom HSA, tj. na okolini ostatak Trp214, određivanjem Stern-Volmerove konstante (K_{sv}) gašenja njegove fluorescencije. U **Tabeli 8** prikazane su vrednosti K_{sv} određene na 37°C kada se SK vezuje za odmašćeni HSA u odsustvu glukoze (kontrola) i u njenom prisustvu, u istim koncentracijama šećera (5, 10 i 20 mM) kao u prethodnim eksperimentima.

U prisustvu 5 i 10 mM glukoze vrednosti K_{sv} bile su 1,5 i 1,3 puta veće od vrednosti za kontrolu ($1,26 \pm 0,03 \times 10^4$), dok je u prisustvu 20 mM glukoze dobijena vrednost jednaka kontrolnoj. Dakle, prisustvo glukoze u smeši sa odmašćenim HSA dovelo je do povećanja vrednosti K_{sv} , pri čemu efekat uticaja koncentracija glukoze na ovaj parametar opada sa povećanjem koncentracije šećera. Tokom eksperimenta primećeno je da prilikom titracije odmašćenog HSA do molarnog

odnosa HSA:SK 1:4 dolazi postepeno do smanjenja intenziteta fluorescencije. Dodatno povećanje HSA:SK molarnog odnosa dovelo je najpre do prolaznog povećanja intenziteta fluorescencije, dok je dalje dodavanje SK rezultiralo smanjenjem fluorescencije. Ove fluktuacije intenziteta fluorescencije verovatno su uzrokovane vezivanjem SK za mesta vezivanja sa nižim afinitetom za MK u molekulu HSA, što ne utiče na promenu strukture HSA u okolini Trp214 ostatka. Usled toga, za izračunavanje K_{sv} izabrani su intenziteti fluorescencije do molarnog odnosa HSA:SK 1:4. Gašenje fluorescencije fluorofore Trp214 (u Sudlow I vezujućem mestu), odmašćenog HSA sa SK u patofiziološkom opsegu HSA:SK molarnih odnosa (do 1:4), može biti rezultat zajedničkog delovanja molekula glukoze prisutnih u Sudlow I mestu (**Wang i sar., 2013; Pongprayoon i Mori, 2018; Awang i sar., 2017**) i molekula SK vezanih za jedno od dva vezujuća mesta za MK na HSA sa najvećim afinitetom (**Fanali i sar., 2012**). Peto vezujuće mesto sa najvećim afinitetom za MK nalazi se unutar domena III HSA, dok je četvrto, sa sledećim najvišim afinitetom za MK, u Sudlow II vezujućem mestu (**Fanali i sar., 2012**).

Tabela 8. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}) vezivanja SK za HSA u odsustvu (kontrola) ili u prisustvu 5, 10 i 20 mM glukoze (Glc). Eksperiment je izveden dva puta na 37°C.

	$K_{sv} \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \times \text{L})$			
	Kontrola	HSA + 5 mM Glc	HSA + 10 mM Glc	HSA + 20 mM Glc
Eksperiment 1	1,28	1,98	1,60	1,42
Eksperiment 2	1,24	1,83	1,65	1,14
Srednja vrednost $\pm$ SD	1,26 $\pm$ 0,03	1,91 $\pm$ 0,10 *	1,63 $\pm$ 0,04**	1,28 $\pm$ 0,19⁺

*p < 0,01 u poređenju sa kontrolnom vrednošću; **p < 0,05 u poređenju sa kontrolnom vrednošću; ⁺p < 0,05 u poređenju sa HSA i 5 mM glukozom (Glc).

Na osnovu rezultata ovog eksperimenta, u kojima je ispitan efekat ko-inkubacije SK i glukoze sa HSA na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe, može se predložiti mehanizam kojim ova dva važna endogena liganda HSA doprinose održavanju njegove antioksidativne uloge. Nakon oslobađanja nascentnog (odmašćenog) HSA iz hepatocita u cirkulaciji, dolazi do pozicioniranja dva molekula glukoze unutar Sudlow I vezujućeg mesta (**Wang i sar., 2013**). Uspostavljene interakcije između molekula glukoze i HSA uzrokuju povećanje fleksibilnosti Sudlow II vezujućeg mesta (**Awang i sar., 2017**), gde se nalazi jedno od dva vezujuća mesta za MK na molekulu HSA sa najvišim afinitetom (**Fanali i sar., 2012**). Na ovo ukazuje povećanje vrednosti dobijenih konstanti gašenja fluorescencije za 1,5 i 1,3 puta u prisustvu (redom) 5 i 10 mM glukoze u odnosu na dobijenu vrednost K_{sv} bez glukoze.

Vezivanje MK u Sudlow II vezujućem mestu dovodi do formiranja vodonične veze između Lys195 i Asp451 na dodirnoj površini između Sudlow I i Sudlow II vezujućeg mesta. Ova novoformirana vodonična veza pomaže u približavanju subdomena IIA i IIIA na HSA, istovremeno primoravajući subdomene IIIB i IB da se razdvoje (**Awang i sar., 2017**). Pomeranje subdomena IB izaziva promene konformacije molekula HSA u blizini Cys34 ostatka, koji se nalazi u plitkoj pukotini na ~10 Å od vrha srcolike strukture HSA (**Bonanata i sar., 2017**). Kako posebne karakteristike proteinskog okruženja moduliraju reaktivnost HSA-SH grupe, promene strukture HSA izazivaju da sumpor iz Cys34 ostatka naizmenično prelazi iz uvučene u izloženu konformaciju (**Christodoulou i sar., 1995**). **Pavićević i sar. (2014)** su pokazali da se reaktivnost HSA-SH grupe povećava kada su različite MK vezane za HSA. Štaviše, nakon vezivanja MK za Sudlow II vezujuće mesto, Lys195 formira vodoničnu vezu sa Asp451 i nije dostupan za

glikaciju, putem otvorenog oblika glukoze u Sudlow I vezujućem mestu. **Anguizola i sar. (2013)** su izvestili da je Lys525 najčešće mesto glikacije, kako u *in vivo* tako i *in vitro* studijama.

U fiziološkim uslovima, neki molekuli HSA ne prenose MK (**Mishra i Heath, 2021**) i oni su skloniji glikaciji u položaju Lys195 (**Anguizola i sar., 2013**). Tokom odsustva slobodnih MK u cirkulaciji, vodonična veza između Lys195 i Asp451 povremeno se javlja u HSA sa vezanom glukozom (**Awang i sar., 2017**). Ovaj nalaz se slaže sa dobijenim rezultatom ove disertacije da je povećano formiranje AGEs nakon 14 dana inkubacije u prisustvu 5 mM glukoze uočeno samo u odsustvu SK, dok je u prisustvu SK molekula nivo formiranja AGEs isti kao kod kontrole.

Na osnovu svega može se zaključiti da:

- molekul HSA nije tako “ranjiv”, te da postoje mehanizmi koji mu omogućavaju održanje ključnih uloga i u patološkim uslovima;
- MK i glukoza zajednički učestvuju u mehanizmima koji omogućavaju održanje antioksidativne uloge HSA;
- MK štite HSA od glikacije i da je ovaj efekat izraženiji sa povećanjem broja vezanih molekula MK za molekul HSA;
- prisustvo glukoze povećava afinitet i reguliše vezivanje MK za HSA;
- dobijeni rezultati omogućavaju razumevanje uočenih fenomena kod patoloških stanja kao što je tip I i II dijabetesa;
- za studije u kojima se ispituje vezivanje različitih egzogenih liganda (lekova) za HSA treba koristiti model sistem koji uključuje prisustvo MK i glukoze u (pato)fiziološkim odnosima.

4.3.6. Uticaj vazivanja antipsihotika za HSA u prisustvu SK i glukoze na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe

Da bi se utvrdilo da li prisustvo glukoze i glikacije HSA u inkubacionim smešama sa SK utiče na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe nakon vezivanja ispitivanih antipsihotika, postavljen je eksperiment u kome je HSA, bez i sa vezanom SK u molarnom odnosu HSA:SK 1:1, inkubiran bez i u prisustvu glukoze (5 mM) tokom 19 dana na 37°C. U prethodno određenim vremenskim periodima za svaki ispitani lek, u inkubacione smeše je dodat odgovarajući antipsihotik u odnosu HSA:lek 1:2 (mol/mol) i nakon toga je određen sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe.

4.3.6.1. Uticaj vezivanja antipsihotika na sadržaj HSA-SH grupe kod (ne)glukonovanog HSA

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 9**, vidi se da, pre početka inkubiranja na 37°C, vrednosti sadržaja HSA-SH grupe su statistički značajno više ($p < 0,05$) nakon vezivanja ziprazidona za HSA bez i sa vezanom SK, kao i sa i bez vezane glukoze, u odnosu na vrednosti bez dodatka leka. Vezivanje sertindola za ove uzorke HSA dovelo je do blagog povećanja sadržaja HSA-SH grupe bez statističke značajnosti, osim kod uzorka HSA:SK 1:0 (mol/mol) sa glukozom. Vezivanje klopazina pokazuje pozitivan efekat na sadržaj HSA-SH grupe kod HSA:SK 1:0 (mol/mol) bez glukoze, dok u svim ostalim uzorcima dolazi do smanjenja sadržaja HSA-SH grupe, koje za HSA:SK 1:1 (mol/mol) dostiže statističku značajnost ($p < 0,05$). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima u kojima je ispitan efekat vezivanja antipsihotika za odmašćeni HSA i kontrolisano zamašćeni protein, HSA:SK odnosima od 1:1 do 1:4 (Rezultati i diskusija; **odeljak 4.1.5**).

Tabela 9. Sadržaj HSA-SH grupe (mol-SH grupa/mol HSA) nakon vezivanja sertindola (S), klopazina (K) i ziprazidona (Z) za zamašćeni HSA stearinskom kiselinom (SK) u molarnom odnosu HSA:SK 1:1 i za odmašćeni HSA (HSA:SK 1:0), tokom inkubacije 19 dana na 37°C bez (kontrolni uzorci) i u prisustvu glukoze (Glc) u normalnoj fiziološkoj koncentraciji (5 mM). Dobijene vrednosti sadržaja HSA-SH grupe prikazane su kao srednja vrednost $\pm$ SD.

Sadržaj HSA-SH grupe (mol -SH grupe/ mol HSA)				
Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+S	+Glc	+Glc+S
1	0,617 $\pm$ 0,003	0,628 $\pm$ 0,010	0,595 $\pm$ 0,004	0,589 $\pm$ 0,010
3	0,504 $\pm$ 0,006	0,498 $\pm$ 0,013	0,515 $\pm$ 0,009	0,508 $\pm$ 0,009
8	0,440 $\pm$ 0,005	0,392 $\pm$ 0,013*	0,461 $\pm$ 0,003	0,328 $\pm$ 0,003*
11	0,353 $\pm$ 0,016	0,333 $\pm$ 0,009	0,469 $\pm$ 0,010	0,242 $\pm$ 0,013*
16	0,282 $\pm$ 0,008	0,259 $\pm$ 0,012	0,274 $\pm$ 0,005	0,130 $\pm$ 0,007*
Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+K	+Glc	+Glc+K
1	0,617 $\pm$ 0,003	0,621 $\pm$ 0,007	0,595 $\pm$ 0,004	0,585 $\pm$ 0,005
2	0,515 $\pm$ 0,007	0,520 $\pm$ 0,003	0,526 $\pm$ 0,021	0,485 $\pm$ 0,009*
5	0,435 $\pm$ 0,003	0,448 $\pm$ 0,014	0,471 $\pm$ 0,003	0,429 $\pm$ 0,003*
10	0,371 $\pm$ 0,003	0,345 $\pm$ 0,009*	0,487 $\pm$ 0,003	0,256 $\pm$ 0,005*
15	0,292 $\pm$ 0,003	0,277 $\pm$ 0,005*	0,320 $\pm$ 0,007	0,151 $\pm$ 0,007*
Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+Z	+Glc	+Glc+Z
1	0,617 $\pm$ 0,003	0,707 $\pm$ 0,003*	0,595 $\pm$ 0,004	0,680 $\pm$ 0,007*
4	0,486 $\pm$ 0,009	0,527 $\pm$ 0,012*	0,494 $\pm$ 0,009	0,541 $\pm$ 0,013*
9	0,391 $\pm$ 0,004	0,435 $\pm$ 0,009*	0,480 $\pm$ 0,014	0,375 $\pm$ 0,003*
13	0,332 $\pm$ 0,004	0,391 $\pm$ 0,009*	0,347 $\pm$ 0,004	0,248 $\pm$ 0,003*
19	0,282 $\pm$ 0,008	0,261 $\pm$ 0,012	0,274 $\pm$ 0,005	0,132 $\pm$ 0,005*
HSA:SK 1:1 (mol/mol)				
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+S	+Glc	+Glc+S
1	0,618 $\pm$ 0,012	0,645 $\pm$ 0,015	0,598 $\pm$ 0,011	0,614 $\pm$ 0,006
3	0,502 $\pm$ 0,018	0,472 $\pm$ 0,015	0,498 $\pm$ 0,011	0,498 $\pm$ 0,010
8	0,396 $\pm$ 0,013	0,378 $\pm$ 0,005	0,463 $\pm$ 0,009	0,297 $\pm$ 0,003*
11	0,400 $\pm$ 0,008	0,330 $\pm$ 0,007*	0,412 $\pm$ 0,005	0,232 $\pm$ 0,008*
16	0,282 $\pm$ 0,007	0,270 $\pm$ 0,005	0,268 $\pm$ 0,003	0,145 $\pm$ 0,003*
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+K	+Glc	+Glc+K
1	0,618 $\pm$ 0,012	0,589 $\pm$ 0,010*	0,598 $\pm$ 0,011	0,589 $\pm$ 0,013
2	0,506 $\pm$ 0,013	0,471 $\pm$ 0,010*	0,498 $\pm$ 0,016	0,470 $\pm$ 0,009
5	0,446 $\pm$ 0,005	0,466 $\pm$ 0,003*	0,420 $\pm$ 0,018	0,416 $\pm$ 0,006
10	0,394 $\pm$ 0,005	0,347 $\pm$ 0,005*	0,448 $\pm$ 0,005	0,259 $\pm$ 0,006*
15	0,327 $\pm$ 0,008	0,280 $\pm$ 0,007*	0,285 $\pm$ 0,006	0,138 $\pm$ 0,003*
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+Z	+Glc	+Glc+Z
1	0,618 $\pm$ 0,012	0,694 $\pm$ 0,003*	0,598 $\pm$ 0,011	0,725 $\pm$ 0,003*
4	0,477 $\pm$ 0,007	0,535 $\pm$ 0,010*	0,480 $\pm$ 0,003	0,525 $\pm$ 0,009*
9	0,386 $\pm$ 0,015	0,441 $\pm$ 0,006*	0,485 $\pm$ 0,014	0,316 $\pm$ 0,003*
13	0,403 $\pm$ 0,004	0,370 $\pm$ 0,010*	0,320 $\pm$ 0,009	0,311 $\pm$ 0,003
19	0,282 $\pm$ 0,007	0,285 $\pm$ 0,007	0,268 $\pm$ 0,003	0,126 $\pm$ 0,003*

*p<0,05 u odnosu na odgovarajući kontrolni HSA (bez SK), ili HSA:SK (1:1; mol/mol) bez prisutnog leka.

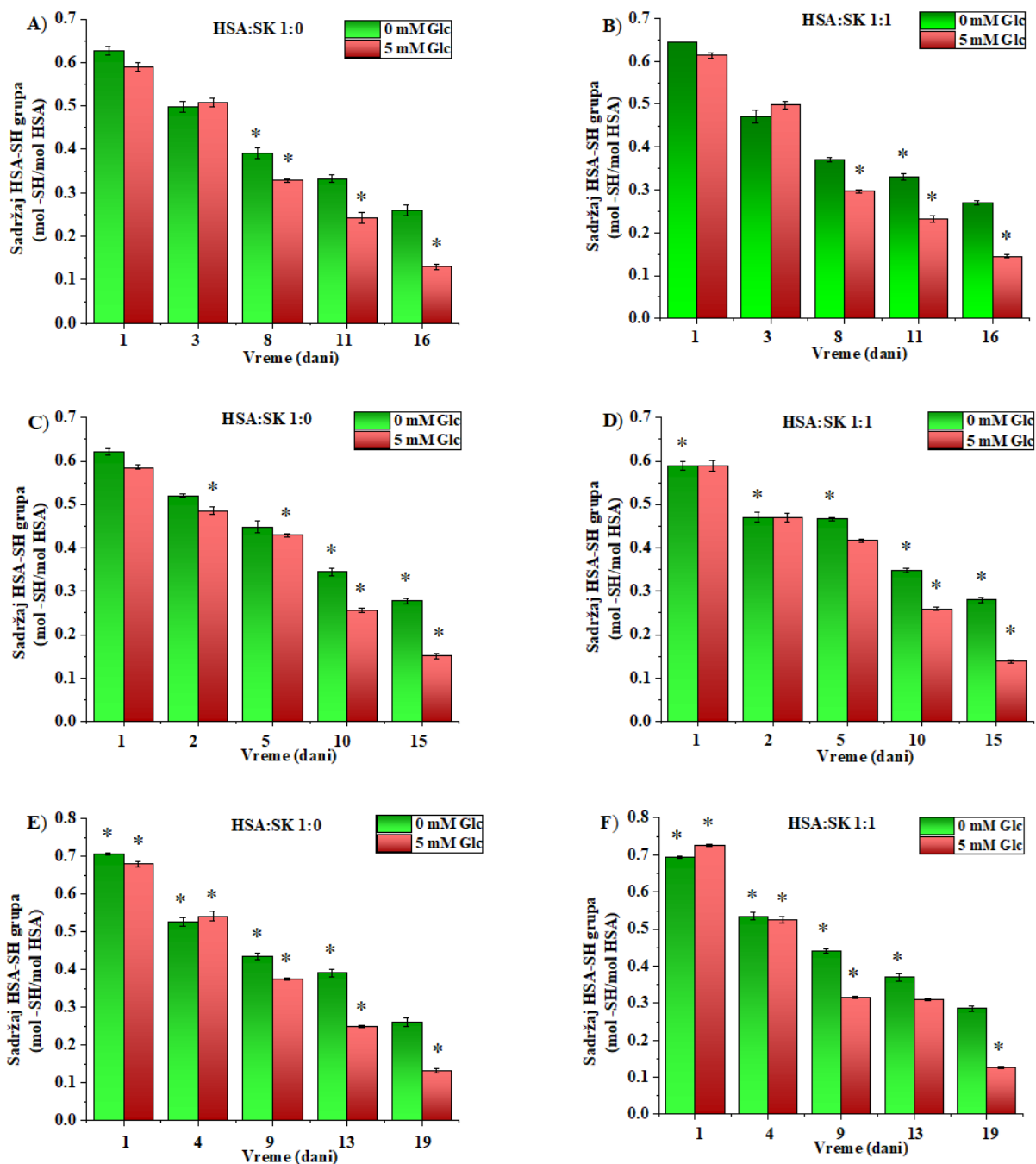
U uslovima koji simuliraju fiziološke (HSA bez ili sa vezanom jednom do dve MK, koncentracija glukoze manja od 6 mM i 19 dana inkubiranja smeša na 37°C, što odgovara poluzivotu HSA), u svim uzorcima dobijeno je postepeno smanjenje sadržaja HSA-SH grupe, sa trendom privremenog „oporavka” između 8. i 11. dana, da bi dalje inkubiranje do 19. dana dovelo do dodatnog pada sadržaja HSA-SH. Privremeni porast sadržaja HSA-SH grupe posle 5 do 6 dana inkubiranja primećen je i u prethodnom eksperimentu, gde je praćen efekat različitih koncentracija glukoze i broja vezanih molekula SK za HSA na sadržaj HSA-SH grupe (Rezultati i diskusija; **odjeljak 4.3.3.**). Dalje, i u ovom eksperimentu dobijen je pozitivni efekat prisustva glukoze na očuvanje sadržaja HSA-SH grupa u odnosu na odmašćeni HSA bez prisutne glukoze.

Efekat prisustva glukoze i glukonovanja HSA na sadržaj HSA-SH grupe nakon vezivanja ispitivanih antipsihotika prikazan je na **sllici 46**. Za sva tri ispitivana leka, kod odmašćenog HSA u prisustvu glukoze, dobijene su statistički značajno niže vrednosti sadržaja HSA-SH grupa u svim vremenskim tačkama ($p < 0,05$), osim nakon, redom, 3 i 4 dana inkubiranja sa sertindolom i ziprazidonom. Za sva tri leka, sa produžetkom vremena inkubiranja od 5. do 19. dana, dolazi do postepenog porasta u razlici dobijenih srednjih vrednosti sadržaja HSA-SH grupe između glukonovanog i neglukonovanog HSA (**Tabela 9**).

U zamašćenom HSA nakon vezivanja sva tri leka, tek od 5. dana inkubiranja, dobijene srednje vrednosti sadržaja HSA-SH grupe bile su statistički značajno više u neglukonovanom HSA u odnosu na glukonovani. Do 5. dana inkubiranja, u zavisnosti od leka, dobijene vrednosti bile su više, jednake ili niže kod glukonovanog u odnosu na HSA bez vezane glukoze. Ovi rezultati mogu se objasniti već uočenim efektima simultanog vezivanja lekova i SK za HSA, naročito pozitivnim efektom vezivanja ziprazidona za HSA na povećanje sadržaja HSA-SH grupe. Takođe, glukoza, koja može da se veže za Sudlow I vezujuće mesto (**Wang i sar., 2013**) gde se vezuje klopazin (**Wu i sar., 2011**), ili da neenzimski modifikuje bočne amino-kiselinske ostatke u HSA (**Wang i sar., 2013**), dodatno usložnjava međudejstvo pojedinačnih liganda koji se vezuju za HSA na sadržaj HSA-SH grupe. U prethodnim odeljcima je detaljno ispitana međuzavisnost vezivanja pojedinačnih lekova, vezujućih mesta za MK i njihove udaljenosti od Cys34 ostatka.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da je, pored vezivanja MK za HSA, i prisustvo glukoze neophodno da bi se stekao uvid kako pojedini ligandi (koje vezuje HSA) mogu da utiču na sadržaj HSA-SH grupe. Takođe, uvođenje glukoze i glukonovanog modela zamašćenog HSA u ispitivanje konstanti vezivanja liganda (lekova) daje informacije o farmakokinetici datog leka i može da objasni neke njegove uočene neželjene efekte. Tako, uzrok nekih neželjenih efekata lekova može biti i njihovo promenjeno vezivanje za HSA u prisustvu vezane glukoze za protein, što menja koncentraciju slobodnog (farmakološki aktivnog) leka u cirkulaciji.

Primećeni dodatni oksidativni stres kod pacijenata na terapiji antipsihoticima (**Huang i sar., 2010**) može se objasniti promenom sadržaja HSA-SH grupe usled istovremenog vezivanja lekova i fizioloških molekula (MK i glukoza) za molekul HSA. U ovom radu je pokazano da vezivanje sertindola, klopazina i ziprazidona za odmašćeni i kontrolisano zamašćeni HSA u prisustvu glukoze izaziva postepeni pad sadržaja HSA-SH grupa sa vremenom glukonovanja HSA, što bi moglo predstavljati jedan od mehanizama u osnovi pojave oksidativnog stresa kod pacijenata sa šizofrenijom na tretmanu ovim lekovima (**Huang i sar., 2010**).



Slika 46. Sadržaj HSA-SH grupe (mol-SH grupa/mol HSA) nakon vezivanja sertindola (A, B), klopazina (C, D) i ziprazidona (E, F) za zamašćeni HSA stearinskom kiselinom (SK) u molarnom odnosu HSA:SK 1:1 i odmašćeni HSA (HSA:SK 1:0), tokom inkubacije 19 dana na 37°C, bez i u prisustvu glukoze (5 mM Glc). Dobijene vrednosti sadržaja HSA-SH grupe prikazane su kao srednja vrednost $\pm$ SD. * $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajući kontrolni HSA (bez SK), ili HSA:SK (1:1; mol/mol) bez prisutnog leka.

4.3.6.2. Uticaj vezivanja antipsihotika na reaktivnost HSA-SH grupe kod (ne)glukonovanog HSA

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 10**, vidi se da pre početka inkubiranja uzoraka na 37°C, nakon vezivanja svih ispitanih lekova za odmašćeni i zamašćeni HSA bez i sa prisutnom glukozom, dolazi do povećanja reaktivnosti HSA-SH grupe osim kod vezivanja sertindola i klopazina za HSA:SK 1:1 (mol/mol) u prisustvu glukoze. Kao i u prethodnom eksperimentu, gde je ispitivan efekat vezivanja ovih antipsihotika za odmašćeni HSA i kontrolisano zamašćen HSA:SK u molarnim odnosima od 1:1 do 1:4 (Rezultati i diskusija; **odeljak 4.1.6.**), vezivanje ziprazidona je najviše doprinosilo povećanju reaktivnosti HSA-SH grupe bez obzira na prisustvo glukoze u inkubacionoj smeši. Najmanji efekat na povećanje reaktivnosti HSA-SH grupa dobijen je nakon vezivanja klopazina za HSA, u saglasnosti sa *in vitro* rezultatima (**Slika 23**).

Kao za sadržaj HSA-SH grupe, u svim inkubacionim smešama se sa vremenom inkubiranja postepeno smanjivala reaktivnost HSA-SH grupe, sa trendom privremenog „oporavka” između 8. i 11. dana inkubacije, da bi dalje inkubiranje do 19. dana dovelo do dodatnog pada reaktivnosti ovog tiola. Privremeni porast reaktivnosti HSA-SH grupe posle 5 do 6 dana inkubiranja, u saglasnosti je sa rezultatima eksperimenta u kome je praćen efekat različitih koncentracija glukoze i broja vezanih molekula SK za HSA na reaktivnost HSA-SH grupe (Rezultati i diskusija; **odeljak 4.3.4.**).

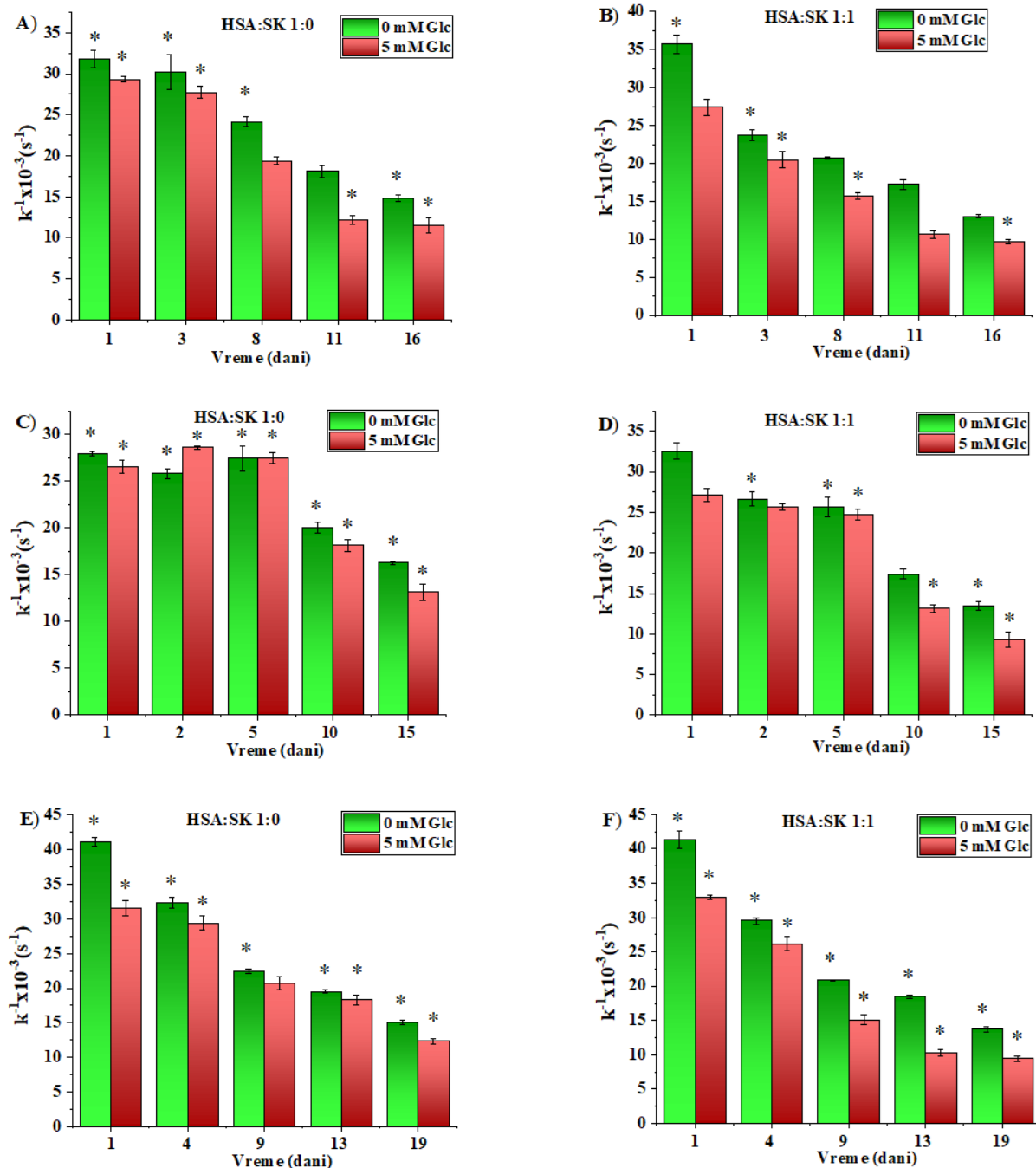
Da bi se uočio uticaj prisustva glukoze i glukonovanja HSA na reaktivnost HSA-SH grupe nakon vezivanja ispitivanih antipsihotika, upoređena je reaktivnost HSA-SH grupe u inkubacionoj smeši HSA:SK 1:0 i 1:1 (mol/mol) bez i sa dodatkom glukoze (**Slika 47**). Kod odmašćenog HSA u prisustvu glukoze, za sertindol i ziprazidon su dobijene niže vrednosti reaktivnosti HSA-SH grupe u svim vremenskim tačkama u odnosu na odmašćeni HSA bez glukoze. Isti trend je dobijen i kod zamašćenog HSA. Nakon vezivanja klopazina za odmašćeni HSA, posle 2 dana inkubiranja reaktivnost HSA-SH grupe bila je statistički značajno viša ($p < 0,05$) u glukonovanom HSA nego nemodifikovanom, da bi posle 5. dana inkubiranja ta vrednost bila jednaka (**Slika 47 C**). Kod zamašćenog HSA, u istom vremenskom periodu, dobijene vrednosti reaktivnosti HSA-SH grupe bile su niže, ali bez statističke značajnosti razlika (**Slika 47D**).

Za ispitivanje doprinosa vezivanja ispitivanih antipsihotika na reaktivnost HSA-SH nakon njihovog vezivanja za odmašćeni i zamašćeni HSA, bez i u prisustvu glukoze tokom inkubiranja, prikazana je razlika u reaktivnosti HSA-SH grupa sa i bez leka u svim ispitivanim uzorcima. Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 48**, uočava se da vezivanje ziprazidona uvek ima pozitivni doprinos na reaktivnost HSA-SH grupe, osim 9. dana inkubiranja, u odmašćenom i zamašćenom HSA u prisustvu glukoze, gde je dobijen negativni doprinos. Kod sertindola u 1. danu dobijen je negativni doprinos zajedničkog vezivanja SK i glukoze na reaktivnost HSA-SH grupe, koji raste do 8. dana, da bi zatim prešao u pozitivni doprinos. Sa vremenom inkubiranja, nakon 3. dana, negativni doprinos vezivanja sertindola na reaktivnost Cys34 grupe prvo se uočava u inkubacionoj smeši u kojoj je prisutna samo SK, da bi kasnije, 8. dana, on bio uočen samo sa glukozom u smeši, a 11. dana i u odmašćenom HSA bez prisutne glukoze. I kod klopazina je prisustvo SK i glukoze smanjilo reaktivnost HSA-SH grupe u početnim danima inkubacije (1. i 2. dana), da bi se 10. dana isti efekat uočio i kod odmašćenog HSA bez i u prisustvu glukoze.

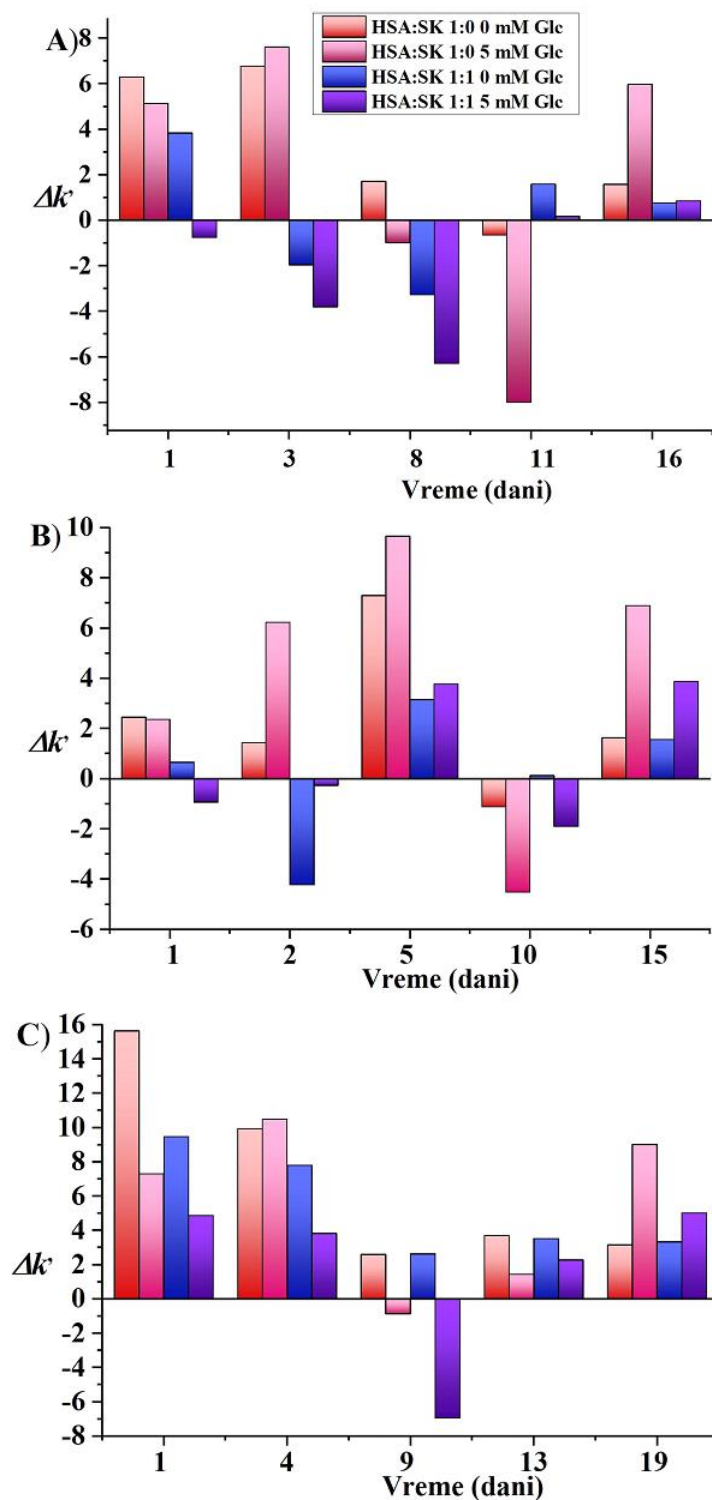
Tabela 10. Reaktivnost HSA-SH grupe ($k^{-1} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) nakon vezivanja sertindola (S), klopapina (K) i ziprazidona (Z) za zamašćeni HSA stearinskom kiselinom (SK) u molarnom odnosu HSA:SK 1:1 i za odmašćeni HSA (HSA:SK 1:0) tokom inkubacije 19 dana na 37°C bez (kontrolni uzorci) i u prisustvu glukoze (Glc) u fiziološkoj koncentraciji od 5 mM. Dobijene vrednosti reaktivnosti HSA-SH grupe prikazane su kao srednja vrednost $\pm$ SD.

Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+S	+Glc	+Glc+S
1	25,5 $\pm$ 0,7	31,8 $\pm$ 1,1*	24,2 $\pm$ 0,2	29,3 $\pm$ 0,3*
3	23,4 $\pm$ 0,5	30,2 $\pm$ 2,1*	20,1 $\pm$ 0,4	27,7 $\pm$ 0,7*
8	22,4 $\pm$ 1,0	24,1 $\pm$ 0,6*	20,3 $\pm$ 1,0	19,4 $\pm$ 0,5
11	18,7 $\pm$ 0,8	18,1 $\pm$ 0,7	20,1 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,6*
16	13,3 $\pm$ 0,8	14,8 $\pm$ 0,4*	5,57 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 1,0*
Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+K	+Glc	+Glc+K
1	25,5 $\pm$ 0,7	27,9 $\pm$ 0,3*	24,2 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 0,7*
2	24,3 $\pm$ 0,7	25,8 $\pm$ 0,5*	22,3 $\pm$ 0,8	28,6 $\pm$ 0,1*
5	20,1 $\pm$ 0,2	27,4 $\pm$ 1,3*	17,9 $\pm$ 0,3	27,5 $\pm$ 0,6*
10	21,1 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,6*	22,6 $\pm$ 0,3	18,1 $\pm$ 0,6*
15	14,6 $\pm$ 0,4	16,3 $\pm$ 0,2*	6,2 $\pm$ 0,3	13,1 $\pm$ 0,9*
Dan	HSA:SK 1:0 (mol/mol)			
	-	+Z	+Glc	+Glc+Z
1	25,5 $\pm$ 0,7	41,1 $\pm$ 0,7*	24,2 $\pm$ 0,2	31,5 $\pm$ 1,1*
4	22,4 $\pm$ 1,2	32,3 $\pm$ 0,8*	19,0 $\pm$ 1,0	29,4 $\pm$ 1,0*
9	19,8 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 0,2*	21,5 $\pm$ 0,7	20,7 $\pm$ 0,9
13	15,8 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,3*	16,9 $\pm$ 0,4	18,3 $\pm$ 0,7*
19	11,9 $\pm$ 0,8	15,0 $\pm$ 0,4*	3,3 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,4*
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+S	+Glc	+Glc+S
1	31,9 $\pm$ 0,4	35,7 $\pm$ 1,2*	28,1 $\pm$ 0,1	27,4 $\pm$ 1,1
3	25,7 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,7*	24,2 $\pm$ 0,6	20,4 $\pm$ 1,1*
8	20,8 $\pm$ 0,4	20,8 $\pm$ 0,2	22,0 $\pm$ 0,2	15,7 $\pm$ 0,5*
11	17,2 $\pm$ 0,3	17,2 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 0,5
16	13,1 $\pm$ 0,5	13,1 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,4	9,7 $\pm$ 0,3*
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+K	+Glc	+Glc+K
1	31,9 $\pm$ 0,4	32,6 $\pm$ 1,0	28,1 $\pm$ 0,1	27,2 $\pm$ 0,8
2	30,8 $\pm$ 0,8	26,6 $\pm$ 0,9*	26,0 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 0,4
5	22,6 $\pm$ 0,8	25,7 $\pm$ 1,2*	20,9 $\pm$ 0,8	24,7 $\pm$ 0,6*
10	17,3 $\pm$ 0,6	17,4 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 0,9	13,2 $\pm$ 0,5*
15	11,9 $\pm$ 0,3	13,4 $\pm$ 0,5*	5,4 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 1,0*
Dan	HSA:SK 1:1 (mol/mol)			
	-	+Z	+Glc	+Glc+Z
1	31,9 $\pm$ 0,4	41,4 $\pm$ 1,2*	28,1 $\pm$ 0,1	33,0 $\pm$ 0,4*
4	21,7 $\pm$ 0,6	29,5 $\pm$ 0,5*	22,3 $\pm$ 1,0	26,2 $\pm$ 1,0*
9	18,2 $\pm$ 0,7	20,9 $\pm$ 0,1*	22,1 $\pm$ 0,4	15,1 $\pm$ 0,7*
13	15,0 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,3*	8,0 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 0,5*
19	10,4 $\pm$ 0,5	13,7 $\pm$ 0,4*	4,4 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,3*

*p<0,05 u odnosu na odgovarajući kontrolni HSA (HSA:SK 1:0 ili 1:1; mol/mol) bez prisutnog leka.



Slika 47. Reaktivnost HSA-SH grupa ($k^{-1} \times 10^3 s^{-1}$) nakon vezivanja sertindola (A, B), klopazina (C, D) i ziprazidona (E, F) za zamašćeni HSA stearinskom kiselinom (SK) u molarnom odnosu HSA:SK 1:1 i odmašćeni HSA (HSA:SK 1:0), tokom inkubacije 19 dana na 37°C bez i u prisustvu glukoze (5 mM Glc). Dobijene vrednosti reaktivnosti HSA-SH grupe prikazane su kao srednja vrednost $\pm$ SD. * $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajući kontrolni HSA (HSA:SK 1:0 ili 1:1; mol/mol) bez prisutnog leka.



Slika 48. Pojedinačni doprinos ($\Delta k'$) sertindola (A), klopazina (B) i zaprazidona (C) povećanju ili smanjenju reaktivnosti HSA-SH grupe nakon njihovog vezivanja za zamašćeni HSA stearinskom kiselinom (SK) (HSA:SK 1:1; mol/mol) i odmašćeni HSA (HSA:SK 1:0; mol/mol), tokom inkubacije 19 dana na 37°C bez i u prisustvu glukoze (5 mM Glc).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da je doprinos vezivanja ispitivanih antipsihotika na reaktivnost HSA-SH grupe uslovljen udaljenošću vezivnog mesta svakog leka od Cys34 ostatka, kao i vezivanjem endogenih liganda SK i glukoze za svoja mesta na HSA. Kod sertindola, koji se vezuje za Sudlow II vezujuće mesto, se najlakše uočava pravilnost doprinosa vezivanja SK i glukoze sa vremenom inkubiranja na reaktivnost HSA-SH grupe. Naime, pri eksperimentalnim uslovima koji simuliraju (fiziološke) koncentracije glukoze i HSA:MK odnos do 1:1 (mol/mol), ne postoji kompeticija između vezujućih mesta SK, glukoze i sertindola za HSA. Glukoza se vezuje u Sudlow I mestu (**Wang i sar., 2013**), dok se SK najvećim delom, najverovatnije, vezuje za peto vezujuće mesto u subdomenu IIIB HSA (**Fanali i sar., 2012**). Vezivanje ziprazidona za IB subdomen HSA (**Zsila, 2013**), mesto u neposrednoj blizini Cys34, pokazuje jači pozitivni doprinos na reaktivnost HSA-SH grupe nego vezivanje SK i glukoze, tako da tek nakon 9. dana inkubiranja u prisustvu glukoze, bez i sa prisutnom SK, ovaj doprinos na reaktivnost postaje negativan, verovatno uslovljeno glukonovanjem amino-kiselinskih ostataka HSA, što menja strukturu molekula HSA i reaktivnost Cys34 tiol grupe. Kod klopazina je dobijen bifazni efekat na reaktivnost HSA-SH grupe, što se objašnjava kompeticijom leka i glukoze za isto vezujuće mesto na proteinu, tako i kasnijom posledičnom promenom strukture molekula HSA.

Rezultati i tumačenja uticaja prisustva glukoze i glukonovanja odmašćenog i zamašćenog HSA na vezivanje lekova za ovaj protein, te njihov efekat na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe, upućuju da model HSA (zamašćen SK i sa glukozom u fiziološkim koncentracijama), koji je razvijen u ovoj disertaciji, realnije odslikava fiziološke uslove u odnosu na druge korišćene modele HSA (odmašćeni HSA i/ili glukonovani HSA). Za dublje razumevanje farmakokinetike i farmakodinamike lekova, posebno onih koji se vezuju za HSA poput ispitanih antipsihotika, uslovljeno dostupnošću slobodnog (nevezanog) leka u cirkulaciji, razvijanje modela koji realno odslikavaju fiziološke uslove je od krucijalnog značaja. S obzirom da je shizofrenija bolest koja zahteva doživotni tretman pacijenta, a uz koju se javljaju i bolesti pridružene sa starenjem (dijabetes, hipertenzija, hiperlipidemije i druge), model HSA koji uključuje patofiziološke koncentracije glukoze i slobodnih MK može dodatno doprineti razumevanju složenih mehanizama bolesti.

5. ZAKLJUČCI

Vezivanje antipsihotika za HSA je važan farmakokinetički aspekt delovanja lekova koji direktno utiče na njihovu biodostupnost, distribuciju, metabolizam i eliminaciju iz organizma. HSA je najzastupljeniji protein u plazmi, koji vezuje širok spektar endogenih i egzogenih molekula. Vezivanje ksenobiotika je obično reverzibilno i zasniva se na slabim interakcijama (hidrofobne sile, vodonične veze, van der Valsove interakcije). U određenim uslovima i stanjima, kao što je oksidativni stres, uremija, glikacija, afinitet vezivanja lekova za HSA može biti promenjen. Stoga su pažljivo osmišljeni eksperimenti i postavljeni modeli HSA, u okviru ove disertacije, koji simuliraju fiziološke uslove, kao i uslove koji nastaju u organizmu usled oksidativnog stresa i glikacije (relevantno i za shizofreniju), kako bi dobili detaljniji uvid u neke farmakokinetičke aspekte delovanja tri atipična antipsihotika: klopazina, sertindola i ziprazidona.

Na osnovu opisanih i diskutovanih rezultata u ovoj disertaciji zaključujemo da:

- ✓ Vezivanje klopazina sertindola i ziprazidona za HSA izaziva strukturne promene u molekulu HSA, smanjujući unutrašnju fluorescenciju bez ili sa pomeranjem emisijonog maksimuma karakterističnog pika na oko 350 nm, zavisno od broja molekula SK vezanih za HSA, vrste leka koji se vezuje kao i molarnog odnosa HSA:lek;
- ✓ Sinhroni fluorescentni spektri su pokazali da vezivanje antipsihotika dovodi do različitih promena polarnosti oko fluorofora Tyr i Trp u molekulu HSA, što zajedno sa emisijonim fluorescentnim spektrima ukazuje na različita vezujuća mesta sertindola klopazina i ziprazidona na molekulu HSA;
- ✓ Sudlow II je vezujuće mesto sertindola na molekulu HSA, u subdomenu IIIA proteina;
- ✓ Određene Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescencije (K_{sv}) i konstante vezivanja (K_a) za klopazin i ziprazidon ukazuju na njihov umereni afinitet vezivanja za HSA. Sa rastom broja molekula SK koja je vezana za HSA, što je stanje tipično za shizofreniju, vezivanje klopazina i ziprazidona za ovaj protein se smanjuje.

Praćenje unutrašnje fluorescencije molekula HSA, parametar iskorišćen za praćenje strukturnih promena proteina izazvanih glikacijom/glukonovanjem, pokazalo je da:

- ✓ MK štite HSA od glikacije, pri čemu stepen zaštite zavisi od molarnog odnosa prema HSA: zaštitni efekat je najistaknutiji za molarni odnos HSA:SK od 1:4;
- ✓ Afinitet vezivanja SK za HSA je značajno povećan (1,5 i 1,3 puta; $p < 0,01$) u prisustvu, redom, 5 i 10 mM glukoze u poređenju sa kontrolom, pri čemu izloženost glukozi reguliše afinitet vezivanja MK za HSA. Iako je u ovom ogledu ispitan samo uticaj SK, dobijeni rezultati pružaju dovoljno dokaza da se zajednički efekat MK i glukoze mora uzeti u obzir u budućim sličnim eksperimentima.
- ✓ Dobijeni efekti SK i glukoze su od značaja za proučavanje reakcije glikacije HSA, ili kod određivanja konstante vezivanja različitih lekova za HSA. Dobijeni rezultati produbljuju znanje o regulaciji antioksidativne uloge HSA u dijabetesu i drugim patofiziološkim uslovima, te olakšavaju dizajn budućih studija HSA-lek, od važnosti za kliničare prilikom izbora leka za tretman bolesti.

Uloga ukupnih tiola u krvi, pre svega, sadržaja i reaktivnosti albumin-SH grupe (ili HSA-SH grupe) u sistemu antioksidativne zaštite je od presudne važnosti za održanje redoks ravnoteže i zaštitu organizma od oksidativnih oštećenja. Cys34 tiolna grupa HSA ne samo da direktno učestvuje u neutralisanju slobodnih radikala, već i moduliše vezivanje drugih antioksidativnih molekula, što omogućava ulogu HSA kao (kvantitativno) glavnog antioksidansa u plazmi. Kako tipični i atipični antipsihotici mogu izazvati oksidativni stres tokom korišćenja u tretmanu shizofrenije, što je tema brojnih istraživanja u poslednjim decenijama, u ovoj disertaciji je sagledan njihov uticaj na antioksidativnu ulogu HSA, praćenjem sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima. Iz ovog seta eksperimenata je zaključeno da:

- ✓ Četvoronedeljni tretman pacova sa klopazinom statistički je značajno ($p < 0,05$) smanjio ukupne tiole u plazmi, kao i sadržaj albumin –SH grupe u poređenju sa kontrolama, dok tretman pacova ziprazidonom dovodi do suprotnog efekta na nivo albumin-SH grupa;
- ✓ Sva tri antipsihotika menjaju reaktivnost Cys34 tiolne grupe, što je modulirano sadržajem SK u proteinskim kompleksima. Reaktivnost –SH grupe je povećana nakon vezivanja sertindola i klopazina, a posebno ziprazidona, za HSA komplekse sa nižim nivoima SK karakterističnim za fiziološke uslove. Ovo može imati pozitivan efekat na ukupan antioksidativni status u plazmi, naročito sa ziprazidonom koji je povećao sadržaj plazma albumin-SH grupa i *in vitro*;
- ✓ Kompenzatorno povećanje reaktivnosti slobodnih tiolnih grupa proteina je mogući mehanizam za očuvanje ukupnog sadržaja tiola u plazmi *in vivo*;
- ✓ Ziprazidon može imati dodatni koristan terapijski efekat, svojim doprinosom ukupnoj homeostazi tiola u plazmi.

Dobijeni rezultati praćenja sadržaja i reaktivnosti HSA-SH grupe *in vitro* su upotpunjeni ispitivanjem efekata glikacije HSA na sadržaj i reaktivnost HSA-SH grupe, kao i ispitivanjem uticaja simultanog vezivanja MK, antipsihotika i glukoze, na antioksidativnu ulogu molekula HSA. Glavni zaključci ovog dela disertacije su da:

- ✓ MK i glukoza zajedno učestvuju u mehanizmu koji održava kritičnu ulogu HSA kao glavnog vanćelijskog antioksidansa, što suštinski osigurava antioksidativnu homeostazu u krvi;
- ✓ *In vitro* model HSA (protein zamašćen SK sa prisutnom glukozom u fiziološkim koncentracijama), razvijen u ovom radu, realnije odlikava fiziološke uslove u odnosu na druge korišćene *in vitro* modele HSA (odmašćeni HSA i/ili glukonovani HSA).

6. LITERATURA

- Aćimović JM, Stanimirović BD, Todorović N, Jovanović VB, Mandić LM. Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal. *Chem Biol Interact*. 2010;188(1):21-30.
- Airinei A, Tigoianu R, Rusu E, Ortansa DD. Fluorescence quenching of anthracene by nitroaromatic compounds. *Digest J Nanomaterials Biostructures*. 2011;6(3):1265-1272.
- Akyol Ö, Herken H, Uz E, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: the possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002;26(5):995-1005.
- Allison WS, Benitez LV, Johnson CL. The formation of a protein sulfenamide during the inactivation of the acyl phosphatase activity of oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by benzylamine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973;52(4):1403-1409.
- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, et al. Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta*. 2013;425:64-76.
- Anuradha A, Kalekar MG, Gadekar K. Oxidative stress, MDA, ascorbic acid, and vitamin E in newly diagnosed schizophrenia. *Indian J Basic Appl Med Res*. 2015;4(4):157-161.
- Arai M, Yuzawa H, Nohara I, et al. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(6):589-597.
- Arizanović L. *Metabolički efekti atipičnih antipsihotika kod pacova in vivo: Diplomski rad*. Beograd: Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2014.
- Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Menegatti E, Fasano M. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(2):481-486.
- Ascenzi P, Fasano M. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. *Biophys Chem*. 2010;148:16–22.
- Au E, Panganiban KJ, Wu S, et al. Antipsychotic-induced dysregulation of glucose metabolism through the central nervous system: a scoping review of animal models. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2025;10(3):244-257.
- Avval FZ, Mahmoudi N, Tirkani AN, et al. Determining pro-oxidant antioxidant balance (PAB) and total antioxidant capacity (TAC) in patients with schizophrenia. *Iran J Psychiatry*. 2018;13(3):222-226.
- Awang T, Wiriyatanakorn N, Saparpakorn P, Japrun D, Pongprayoon P. Understanding the effects of two bound glucose in Sudlow site I on structure and function of human serum albumin: Theoretical studies. *J Biomol Struct Dyn*. 2017;35(4):781–790.
- Baroni S, Mattu M, Vannini A, et al. Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin. A spectroscopic study. *Eur J Biochem*. 2001;268(23):6214-6220.
- Beckett GJ, Armstrong P, Percy-Robb IW. A comparison of bile salt binding to lymph and plasma albumin in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1981;664(3):602-610.
- Behrens PQ, Spiekerman AM, Brown JR. Structure of human serum albumin. *Fed Proc*. 1975;34:591.

- Beleslin BB, Jovanović DZ. Resistivity of leech Retzius nerve cells to long-lasting oxidant. In: Teelkem A, Krof J, eds. Cellular Molecular and Clinical Aspects. 1997:983-986.
- Berk M, Copolov D, Dean O, et al. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia—a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry*. 2008;64:361-368.
- Berner RA, Vandenbrooks JM, Ward PD. Evolution: oxygen and evolution. *Science*. 2007;316(5824):557-558.
- Bhattacharya AA, Grune T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol*. 2000;303:721-732.
- Bi S, Ding L, Tian Y, et al. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J Mol Struct*. 2004;703:37-45.
- Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(4):954-959.
- Bitanhirwe BY, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):878-893.
- Blache D, Bourdon E, Salloignon P, et al. Glycated albumin with loss of fatty acid binding capacity contributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: Relevance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2015;64:960-972.
- Bocedi A, Notari S, Menegatti E, et al. Allosteric modulation of anti-HIV drug and ferric heme binding to human serum albumin. *FEBS J*. 2005;272(24):6287-6296.
- Bonanata J, Turell L, Antmann L, et al. The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:952-962.
- Bošković M, Vovk T, Koprivšek J, Plesničar BK, Grabnar I. Vitamin E and essential polyunsaturated fatty acids supplementation in schizophrenia patients treated with haloperidol. *Nutr Neurosci*. 2016;19(4):156-161.
- Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9:301-312.
- Bošković M, Vovk T. Can supplementation with vitamin E or C and omega-3 or -6 fatty acids improve the outcome of schizophrenia? *Rev Sci Artic*. 2008;59:167-173.
- Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(2):293-311.
- Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, Pedersen AO. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur J Biochem*. 1990;189(2):343-349.
- Bulaj G, Kortemme T, Goldenberg DP. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*. 1998;37:8965-8972.
- Cardno AG, Gottesman II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to Star Wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet*. 2000;97(1):12-17.
- Carletti B, Banaj N, Piras F, Bossù P. Schizophrenia and glutathione: a challenging story. *J Pers Med*. 2023;13(11):1526.

- Carter DC, He XM, Munson SH, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*. 1989;244(4909):1195-1198.
- Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*. 1994;45:153-203.
- Chen RF. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J Biol Chem*. 1967;242:173-181.
- Christodoulou J, Sadler PJ, Tucker A. ¹H NMR of albumin in human blood plasma: Drug binding and redox reactions at Cys34. *FEBS Lett*. 1995;376(1-2):1-5.
- Chuang VT, Otagiri M. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? *Pharm Res*. 2002;19(10):1458-1464.
- Chun KS, Kim DH, Surh YJ. Role of reductive versus oxidative stress in tumor progression and anticancer drug resistance. *Cells*. 2021;10(4):758.
- Ciobica A, Padurariu M, Dobrin I, Stefanescu C, Dobrin R. Oxidative stress in schizophrenia—focusing on the main markers. *Psychiatr Danub*. 2011;23(3):237-245.
- Cistola DP, Small DM, Hamilton JA. Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites. *J Biol Chem*. 1987;262(23):10971-10979.
- Cistola DP, Small DM. Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*. 1991;87(4):1431-1441.
- Curry S, Brick P, Franks NP. Fatty acid binding to human serum albumin: New insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1441(2-3):131-140.
- Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol*. 1998;5(9):827-835.
- Curry S. Plasma albumin as a fatty acid carrier. *Adv Mol Cell Biol*. 2003;33:29-46.
- da Silva GM, da Silva MC, Nascimento DVG, et al. Nitric oxide as a central molecule in hypertension: Focus on the vasorelaxant activity of new nitric oxide donors. *Biology (Basel)*. 2021;10(10):1041.
- Dadheech G, Mishra S, Gautam S. Oxidative stress, alpha tocopherol, ascorbic acid and reduced glutathione status in schizophrenics. *Indian J Clin Biochem*. 2006;21(2):34-38.
- Dahake HS, Ghangle S, Warade J, Pawade Y, Kansara GS. Study of non-enzymatic antioxidants in schizophrenic patients. *Int J Res Med Sci*. 2016;4:3768–3772.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991;148(11):1474-1486.
- Davison GC, Neale JM. Psihologija abnormalnog doživljaja i ponašanja. 1999.
- Desai KM, Chang T, Wang H, et al. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(3):273-284.
- Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis induced oxidative stress: Biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2001;14:193-199.

Dietrich-Muszalska A, Kolodziejczyk-Czepas J, Nowak P. Comparative study of the effects of atypical antipsychotic drugs on plasma and urine biomarkers of oxidative stress in schizophrenic patients. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2021;17:555-565.

Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, et al. Schizophrenia: Glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci*. 2000;12:3721-3728.

Dobretsov GE, Syreishchikova TI, Smolna NV, Uzbekov MG. Effects of fatty acids on human serum albumin binding centers. *Biophysics and Biochemistry*. 2010;:300-303.

Dudzińska E, Szymona K, Bogucki J, et al. Increased markers of oxidative stress and positive correlation with low-grade inflammation and positive symptoms in the first episode of schizophrenia in drug-naïve patients. *J Clin Med*. 2022;11(9):2551.

Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1997;258:21-30.

Elkashef AM, Ruskin PE, Bacher N, et al. Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry*. 1990;147:505-506.

Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:321-347.

Emiliani FE, Sedlak TW, Sawa A. Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story. *Curr Opin Psychiatry*. 2014;27:185–190.

Faizi M, Salimi A, Rasoulzadeh M, Naserzadeh P, Pourahmad J. Schizophrenia induces oxidative stress and cytochrome C release in isolated rat brain mitochondria: a possible pathway for induction of apoptosis and neurodegeneration. *Iran J Pharm Res*. 2014;13:93–100.

Fanali G, di Masi A, Trezza V, et al. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Asp Med*. 2012;33:209-290.

Fanali G, Fesce R, Agrati C, Ascenzi P, Fasano M. Allosteric modulation of myristate and Mn(III)heme binding to human serum albumin. Optical and NMR spectroscopy characterization. *FEBS J*. 2005;272(18):4672-4683.

Fang J, Coutts RT, McKenna KF, Baker GB. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;358(5):592-599.

Farah AM. Atypicality of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry*. 2005;7(6):268-274.

Farruggia B, Pico G. The identity of the binding sites of bile salts on bovine serum albumin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993;80(2):234-240.

Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57(12):787-796.

Fasano M, Mattu M, Coletta M, Ascenzi P. The heme-iron geometry of ferrous nitrosylated heme-serum lipoproteins, hemopexin, and albumin: a comparative EPR study. *J Inorg Biochem*. 2002;91(3):487-490.

Feldhoff RC, Taylor JM, Jefferson LS. Synthesis and secretion of rat albumin in vivo, in perfused liver, and in isolated hepatocytes. *J Biol Chem*. 1977;252(11):3611-3616.

Firth J, Stubbs B, Sarris J, et al. The effects of vitamin and mineral supplementation on symptoms of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med*. 2017;47(9):1515-1527.

- Fischer MJ, Bos OJ, van der Linden RF, Wilting J, Janssen LH. Steroid binding to human serum albumin and fragments thereof. Role of protein conformation and fatty acid content. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(12):2411-2416.
- Fu X, Cate SA, Dominguez M, et al. Cysteine disulfides (Cys-ss-X) as sensitive plasma biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep.* 2019;9:115.
- Gerstein MA. Resolution-sensitive procedure for comparing protein surfaces and its application to the comparison of antigen-combining sites. *Acta Crystallogr A.* 1992;48:271-276.
- Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005;353(1):38-52.
- Giroux E, Schoun J. Copper and zinc ion binding by bovine, dog, and rat serum albumins. *J Inorg Biochem.* 1981;14(4):359-362.
- Glennon JD, Sarkar B. Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine. *Biochem J.* 1982;203(1):15-23.
- Goodman DS, Gordon RS Jr. The metabolism of plasma unesterified fatty acid. *Am J Clin Nutr.* 1958;6(6):669-680.
- Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J Protein Chem.* 2000;19(8):637-642.
- Grajales D, Ferreira V, Valverde ÁM. Second-generation antipsychotics and dysregulation of glucose metabolism: beyond weight gain. *Cells.* 2019;8(11):1336.
- Grima G, Benz B, Parpura V, Cuénod M, Do KQ. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: Implication for schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003;62:213-224.
- Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, et al. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2003;413(1):53-66.
- Guerin-Dubourg A, Catan A, Bourdon E, Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* 2012;38(2):171-178.
- Güneş M, Camkurt MA, Bulut M, et al. Evaluation of paraoxonase, arylesterase and malondialdehyde levels in schizophrenia patients taking typical, atypical and combined antipsychotic treatment. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2016;14(4):345-350.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2012.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-255.
- Halliwell B. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol.* 1988;37(4):569-571.
- Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992;6(9):2675-2683.
- He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 1992;358(6383):209-215.
- Hoffer A, Osmond H, Smythies J. Schizophrenia: a new approach. *J Ment Sci.* 1954;100:29-45.

- Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS. Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants* (Basel). 2024;13(3):312.
- Hsu MC, Huang YS, Ouyang WC. Beneficial effects of omega-3 fatty acid supplementation in schizophrenia: possible mechanisms. *Lipids Health Dis*. 2020;19(1):159.
- Huang TL, Liou CW, Lin TK. Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res*. 2010;177:18–21.
- Hurşitoğlu O, Durmuş HT, Orhan FÖ, Kurutaş EB, Kopar H. Diagnostic performance of increased malondialdehyde level and oxidative stress in patients with schizophrenia. *Arch Neuropsychiatry*. 2021;58:184–188.
- Ishida H, Miyashita M, Oshima K, et al. Carbonyl stress-sensitive brain regions in the patient with treatment-resistant schizophrenia with a glyoxalase 1 frameshift mutation: Autopsy study. *Psychiatry Res Case Rep*. 2022;1(2).
- Jawlikar CV, Deshmane GB, Ambardar NR, Mali SM, Ghate U, Kadam AD. Study of lipid peroxidation, vitamin C and total antioxidant capacity and their association with schizophrenia. *J Appl Bioanal*. 2024;6(2):145-152.
- Jcsbergcr JA. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci*. 1991;57:1-17.
- Jovanović BV. *Tiolna grupa Cys 34 humanog seruma albumina: mogućnosti i značaj određivanja u kliničkoj praksi*. Doktorska teza. Beograd: Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2013.
- Jovanovic VB, Pavicevic ID, Takic MM, et al. The influence of fatty acids on determination of human serum albumin thiol group. *Anal Biochem*. 2014;448:50-57.
- Jovanović VB, Penezić-Romanjuk AZ, Pavićević ID, Aćimović JM, Mandić LM. Improving the reliability of human serum albumin-thiol group determination. *Anal Biochem*. 2013;439(1):17-22.
- Kecmanović D. *Psihijatrija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga; 1990.
- Khan MM, Evans DR, Gunna V, et al. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res*. 2002;58(1):1-10.
- Kim DD, Barr AM, Fredrikson DH, Honer WG, Procyshyn RM. Association between serum lipids and antipsychotic response in schizophrenia. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2019;17(9):852–860.
- Kingsbury SJ, Fayek M, Trufasiu D, Zada J, Simpson GM. The apparent effects of ziprasidone on plasma lipids and glucose. *J Clin Psychiatry*. 2001;62(5):347-349.
- Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res*. 2016;176:52–71.
- Kouidrat Y, Amad A, Arai M, et al. Advanced glycation end products and schizophrenia: A systematic review. *J Psychiatr Res*. 2015;66-67:112-117.
- Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:695-704.
- Kropp S, Kern V, Lange K, et al. Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005;17(2):227-231.

Lakowicz JR. Quenching of fluorescence. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer; 2006:277-330.

Lau S, Sarkar B. Inorganic mercury(II)-binding components in normal human blood serum. *J Toxicol Environ Health*. 1979;5(5):907-916.

Laussac JP, Sarkar B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 1984;23(12):2832-2838.

Lautenslager GT, Shearman CW, Hud E, Cohen MP. Effects of nonenzymatic glycation and fatty acids on functional properties of human albumin. *Metabolism*. 2011;60:1683-1691.

Lawrie SM, McIntosh AM, Hall J, Owens DG, Johnstone EC. Brain structure and function changes during the development of schizophrenia: the evidence from studies of subjects at increased genetic risk. *Schizophr Bull*. 2008;34(2):330-340.

Lexa KW, Dolgih E, Jacobson MP. A structure-based model for predicting serum albumin binding. *PLoS One*. 2014;9(4):e93323.

Li M, Gao Y, Wang D, et al. Impaired membrane lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2022;48(5):1125-1135.

Li Q, Yang W, Qu L, Qi H, Huang Y, Zhang Z. Interaction of warfarin with human serum albumin and effect of ferulic acid on the binding. *J Spectrosc*. 2014;2014:1-7.

Liu L, Liu Y, Xiao A, et al. Influence of human serum albumin glycation on the binding affinities for natural flavonoids. *Open Chem*. 2019;17:806-812.

Loban A, Kime R, Powers H. Iron-binding antioxidant potential of plasma albumin. *Clin Sci (Lond)*. 1997;93:445-451.

Lohr JB, Cadet JL, Lohr MA, et al. Alpha-tocopherol in tardive dyskinesia. *Lancet*. 1987;1:913-914.

Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, Glatz JF. Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: Involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res*. 1997;38(4):745-758.

Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010;125(3):376-393.

Mandrioli R, Protti M, Mercolini L. Evaluation of the pharmacokinetics, safety and clinical efficacy of ziprasidone for the treatment of schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(1):149-174.

Manzoor S, Khan A, Hasan B, Mushtaq S, Ahmed N. Expression analysis of 4-hydroxynonenal modified proteins in schizophrenia brain: relevance to involvement in redox dysregulation. *Curr Proteomics*. 2022;19(1):102-113.

Martin NH. Preparation and properties of serum and plasma proteins; interactions with bilirubin. *J Am Chem Soc*. 1949;71(4):1230-1232.

Matsuyama Y, Terawaki H, Terada T, Era S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13(4):308-315.

- Mattu M, Vannin A, Coletta M, Fasano M, Ascenzi P. Effect of bezafibrate and clofibrate on the heme-iron geometry of ferrous nitrosylated heme-human serum albumin: an EPR study. *J Inorg Biochem.* 2001;84(3-4):293-296.
- Medina-Hernández V, Ramos-Loyo J, Luquin S, et al. Increased lipid peroxidation and neuron specific enolase in treatment refractory schizophrenics. *J Psychiatr Res.* 2007;41(8):652-658.
- Meloun B, Moravek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* 1975;58(1):134-137.
- Meltzer HY. Clozapine: balancing safety with superior antipsychotic efficacy. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 2012:134-144.
- Mera K, Anraku M, Kitamura K, et al. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1322-1328.
- Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Unraveling the mysteries of serum albumin—More than just a serum protein. *Front Physiol.* 2014;5:299.
- Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, et al. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem.* 1986;261(15):6747-6757.
- Mishra R, Heath RJ. Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):8411.
- Mitra S, Natarajan R, Ziedonis D, Fan X. Antioxidant and anti-inflammatory nutrient status, supplementation, and mechanisms in patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;78:1-11.
- Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y. UDP glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 2005;33:672-675.
- Muscatello MR, Bruno A, Bellinghieri P, Pandolfo P, Zoccali R. Sertindole in schizophrenia: efficacy and safety issues. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(13):1-11.
- Muscatello MRA, Bruno A, Pandolfo G, et al. Emerging treatments in the management of schizophrenia – focus on sertindole. *Drug Des Devel Ther.* 2010;4:187–201.
- Negi R, Pande D, Karki K, Khanna RS, Khanna HD. Oxidative stress and preeclampsia. *Adv Life Sci.* 2011;1(1):20-23.
- Neuzil J, Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 1993;331(3):281-284.
- Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1994;269(24):16712-16719.
- Newcomer JW, Haupt DW, Fucetola R, et al. Abnormalities in glucose regulation during antipsychotic treatment of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2002;59(4):337-345.
- Newcomer JW, Nasrallah HA. A review of metabolic issues in atypical antipsychotic treatment. 2004;4:1045-1058.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(6):851-876.

- Nummenmaa L, Seppälä K, Putkinen V. Molecular imaging of the human emotion circuit. 2022 Nov 29. In: [Book Chapter, naslov nije naveden].
- Oetl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol.* 2010;474:181-195.
- Oetl K, Stadlbauer V, Petter F, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(7-8):469-473.
- Olesen OV, Linet K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. *J Clin Pharmacol.* 2001;41:823-832.
- Orešič M, Tang J, Seppänen-Laakso T, et al. Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: A general population-based study. *Genome Med.* 2011;3:19.
- Otagiri M, Chuang VT. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(4):527-534.
- Paar M, Cvirn G, Hoerl G, et al. Albumin of people with diabetes mellitus is more reduced at low HbA1c. *Int J Mol Sci.* 2023;24:16256.
- Paar M, Seifried K, Cvirn G, et al. Redox state of human serum albumin in multiple sclerosis: A pilot study. *Int J Mol Sci.* 2022;23:15806.
- Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(11):1941-1958.
- Pappadopulos E, Newcomer JW, Kolluri S. Changes in weight, plasma lipids, and glucose in adults treated with ziprasidone: a comprehensive analysis of Pfizer-initiated clinical trials. *J Clin Psychiatry.* 2012;73(6):e742-748.
- Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: Overview and treatment options. *PT.* 2014;39:638-645.
- Pavićević ID, Jovanović VB, Takić MM, et al. Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. *Chem Biol Interact.* 2014;224:42-50.
- Pavlovic D, Tamburic V, Stojanovic I. Oxidative stress as marker of positive symptoms in schizophrenia. *Facta Univ.* 2002;9(2):157-161.
- Pazvantoglu O, Selek S, Okay IT, et al. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(5):693-700.
- Peet M, Laugharne J, Rangarajan N, et al. Tardive dyskinesia, lipid peroxidation, and sustained amelioration with vitamin E treatment. *Int Clin Psychopharmacol.* 1993;8:151-153.
- Penezić AZ, Aćimović JM, Pavićević ID, et al. The interplay between copper (II), human serum albumin, fatty acids, and carbonylating agent interferes with Cys 34 thiol reactivity and copper binding. *J Biol Inorg Chem.* 2019;24:61-70.
- Penezić AZ, Jovanović VB, Pavićević ID, Aćimović JM, Mandić LM. HSA carbonylation with methylglyoxal and the binding/release of copper (II) ions. *Metall.* 2015;7:1431-1438.
- Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Rubio-Ruiz ME. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2098.

Perquin LN, Steinert T. A review of the efficacy, tolerability and safety of sertindole in clinical trials. *CNS Drugs*. 2004;18(Suppl 2):19–30.

Peters T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetic and Medical Applications*. New York: Academic Press; 1996.

Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Feix JB, Bhagavan NV. A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin. *J Biol Chem*. 2000;275(28):20985-20995.

Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22804-22809.

Pillai A, Parikh V, Terry AV Jr, Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res*. 2007;41(5):372-386.

Poimenova LA, Sozarukova MM, Ratova DM, et al. Analytical methods for assessing thiol antioxidants in biological fluids: A review. *Molecules*. 2024;29(18):4433.

Pongprayoon P, Mori T. The critical role of dimer formation in monosaccharides binding to human serum albumin. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20:3249-3257.

Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry*. 2004;9:684-697.

Prakash C, Kamel A, Cui D, et al. Identification of the major human liver cytochrome P450 isoform(s) responsible for the formation of the primary metabolites of ziprasidone and prediction of possible drug interactions. *J Clin Pharmacol*. 2000;49(1):35S-42S.

Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem*. 2007;79(12):2325-2338.

Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005;41:1211–1219.

Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JM, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 2004;32:755-759.

Raffaa M, Mechrib A, Othman LB, et al. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:1178–1183.

Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res*. 2003;121(2):109-122.

Rao SS, Disraeli P, McGregor T. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am Fam Physician*. 2004;69(8):1961-1968.

Reddy RR, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003;62:205–212.

Reed RG, Feldhoff RC, Clute OL, Peters T Jr. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. *Biochemistry*. 1975;14(21):4578-4583.

Reichenwallner J, Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5382-5393.

- Remington G. Alterations of dopamine and serotonin transmission in schizophrenia. *Prog Brain Res.* 2008;172:117-140.
- Robinson HW, Hogden CG. The biuret reaction in the determination of serum proteins. I. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J Biol Chem.* 1940;135:707-725.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008;582(13):1783-1787.
- Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie.* 2011;93(4):645-658.
- Sadler PJ, Tucker A, Viles JH. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺, and Al³⁺. *Eur J Biochem.* 1994;220(1):193-200.
- Saucan L, Palade GE. Membrane and secretory proteins are transported from the Golgi complex to the sinusoidal plasmalemma of hepatocytes by distinct vesicular carriers. *J Cell Biol.* 1994;125(4):733-741.
- Schnitzer JE, Oh P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J Biol Chem.* 1994;269(8):6072-6082.
- Scottish Schizophrenia Research Group. Smoking habits and plasma lipid peroxide and vitamin E levels in never-treated first-episode patients with schizophrenia: preliminary report. *Br J Psychiatry.* 2000;176:290-293.
- Sebekova K, Klenovicsova K, Ferenczova J, et al. Advanced oxidation protein products and advanced glycation end products in children and adolescents with chronic renal insufficiency. *J Ren Nutr.* 2012;22(1):143-148.
- Setoyama H, Tanaka M, Nagumo K, et al. Oral branched-chain amino acid granules improve structure and function of human serum albumin in cirrhotic patients. *J Gastroenterol.* 2017;52:754-765.
- Shapiro DI, Larson MK, Walker EF. Schizophrenia. In: *Encyclopedia of Adolescence.* 2011:283-292.
- Shetty SS, Kumari S. Fatty acids and their role in type-2 diabetes. *Exp Ther Med.* 2021;22:706.
- Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J Mol Biol.* 2006;361(2):336-351.
- Sirangelo I, Iannuzzi C. Understanding the role of protein glycation in the amyloid aggregation process. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6609.
- Sjodin T, Hansson R, Sjöholm I. Isolation and identification of a trypsin-resistant fragment of human serum albumin with bilirubin- and drug-binding properties. *Biochim Biophys Acta.* 1977;494(1):61-75.
- Skinner AO, Mahadik SP, Garver DL. Thiobarbituric acid reactive substances in the cerebrospinal fluid in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2005;76(1):83-87.

Sobczaka AIS, Pitt SJ, Smith TK, et al. Lipidomic profiling of plasma free fatty acids in type-1 diabetes highlights specific changes in lipid metabolism. *BBA Mol Cell Biol Lipids*. 2021;1866:158823.

Spector AA. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzymol*. 1986;128:320-339.

Stadman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1105-1112.

Stahl SM, Shayegan DK. The psychopharmacology of ziprasidone: receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. *J Clin Psychiatry*. 2003;64(19):6-12.

Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. 1976;12(6):1052-1061.

Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. 1975;11(6):824-832.

Szkudlarek A, Maciazek-Jurczyk M, Chudzik M, Rownicka-Zubik J, Sulkowska A. Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation: Spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;153:560-565.

Szkudlarek A, Pozycka J, Kulig K, et al. Changes in glycated human serum albumin binding affinity for losartan in the presence of fatty acids in vitro spectroscopic analysis. *Molecules*. 2022;27:401.

Szkudlarek A. Effect of palmitic acid on tertiary structure of glycated human serum albumin. *Processes*. 2023;11:2746.

Takić M, Uzelac T, Stevanovic V, et al. Acute Aronia Juice Consumption Affect HSA Thiol Group Content in Recreational Runners after Simulation of Half-Marathon Race. *Proceedings*. 2023;91.

Takić MM, Jovanović VB, Pavićević ID, et al. Binding of enterolactone and enterodiol to human serum albumin: Increase of cysteine-34 thiol group reactivity. *Food Funct*. 2016;7:1217-1226.

Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care*. 2013;3(4):1-7.

Thornalley PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems: role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*. 2008;23(1-2):125-150.

Tonsgard JH, Meredith SC. Characterization of the binding sites for dicarboxylic acids on bovine serum albumin. *Biochem J*. 1991;276(Pt 3):569-575.

Topcuoglu C, Bakirhan A, Yilmaz FM, Neselioglu S, Ozcan Erel O, Sahiner SY. Thiol/disulfide homeostasis in untreated schizophrenia patients. *Psychiatry Res*. 2017;251:212-216.

Torres MJ, Turell L, Botti H, et al. Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch Biochem Biophys*. 2012;521:102-110.

Toyoshima M, Jiang X, Ogawa T, et al. Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis. *Life Sci Alliance*. 2019;2(5):e201900478.

Tramarin D, Tedesco M, Naldi M, et al. New insights into the altered binding capacity of pharmaceutical-grade human serum albumin: Site-specific binding studies by induced circular dichroism spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;162:171-178.

- Tupe RS, Agte VV. Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation. *Br J Nutr*. 2010;103:370-377.
- Turell L, Carballal S, Botti H, Radi R, Alvarez B. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol*. 2009;42(4):305-311.
- Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:244-253.
- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*. 1993;73(1):79-118.
- Van de Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *J Mol Struct*. 2011;998:144-150.
- Van der Vusse GJ. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24(4):300-307.
- Virit O, Altindag A, Yumru M, et al. A defect in the antioxidant defense system in schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009;60(2):87-93.
- Vona R, Pallotta L, Cappelletti M, et al. The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants*. 2021;10(2):201.
- Walker E, Tessner K. Schizophrenia. *Perspect Psychol Sci*. 2008;3:30–37.
- Wang Y, Yu H, Shi X, Luo Z, Lin D, Huang M. Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin. *J Biol Chem*. 2013;288:15980-15987.
- Wardell M, Wang Z, Ho JX, Robert J, Ruker F, Ruble J, et al. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(4):813-819.
- Watanabe S, Tani T, Watanabe S, Seno M. Transport of steroid hormones facilitated by serum proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1073(2):275-284.
- Westwood ME, Thornalley PJ. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J Protein Chem*. 1995;14(5):359-372.
- Wu X, Liu J, Wang Q, et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. *J Pharm Sci*. 2011;79(5):1202-1209.
- Xiao J, Kai G, Yamamoto K, Chen X. Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(8):818-836.
- Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, et al. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1432(2):313-323.
- Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T. Kinetics of fatty acid binding ability of glycated human serum albumin. *J Biosci*. 2005;30:475-481.
- Yang M, Wang C, Zhao G, et al. Comparative analysis of the pre- and post-medication effects of antipsychotic agents on the blood-based oxidative stress biomarkers in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Curr Neuropharmacol*. 2023;21:340-352.
- Yang X, Sun L, Zhao A, et al. Serum fatty acid patterns in patients with schizophrenia: A targeted metabolomics study. *Transl Psychiatry*. 2017;7:e1176.

Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):2011-2035.

Yao JK, Reddy RD, van Kammen DP. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2001;15(4):287-310.

Younus H, Anwar S. Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): implication in the treatment of diabetic complication. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2016;10(2):261–277.

Zargar S, Wani TA. Exploring the binding mechanism and adverse toxic effects of persistent organic pollutant (dicofol) to human serum albumin: A biophysical, biochemical and computational approach. *Chem Biol Interact*. 2021;350:109707.

Zhang XY, Tan YL, Cao LY, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res*. 2006;81:291–300.

Zsila F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. *Mol Pharmaceutics*. 2013;10:1668-1682.

Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J Mol Biol*. 2008;381(2):394-406.

7. PRILOZI

Prilog 1.

Tabela 1. ANOVA

HSA:SK molarni odnos

A) HSA:SK 1:0		B) HSA:SK 1:1		C) HSA:SK 1:2		D) HSA:SK 1:4	
ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.
0. dan	0,765	0. dan	0,273	0. dan	0,956	0. dan	0,717
1. dan	0,002	1. dan	0,431	1. dan	0,911	1. dan	0,813
2. dan	0,006	2. dan	0,002	2. dan	0,398	2. dan	0,742
3. dan	0,001	3. dan	0,011	3. dan	0,154	3. dan	0,048
4. dan	0,000	4. dan	0,180	4. dan	0,566	4. dan	0,212
6. dan	0,690	6. dan	0,002	6. dan	0,000	6. dan	0,671
7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,547
10. dan	0,000	10. dan	0,002	10. dan	0,001	10. dan	0,006
14. dan	0,000	14. dan	0,000	14. dan	0,000	14. dan	0,229

Tabela 2. Post-hoc višestruka poređenja

Koncentracija glukoze

Multiple Comparisons ^a Games-Howell				Multiple Comparisons ^a Games-Howell				Multiple Comparisons ^a Games-Howell				Multiple Comparisons ^a Games-Howell			
A) HSA:SK 1:0			Sig.	B) HSA:SK 1:1			Sig.	C) HSA:SK 1:2			Sig.	D) HSA:SK 1:4			Sig.
Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze		
0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,785	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,716	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,987	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,859
		10 mM Glc	0,784			10 mM Glc	0,991			10 mM Glc	0,999			10 mM Glc	0,952
		20 mM Glc	0,714			20 mM Glc	0,013			20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	1,000
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,785		5 mM Glc	0 mM Glc	0,716		5 mM Glc	0 mM Glc	0,987		5 mM Glc	0 mM Glc	0,859
		10 mM Glc	0,998			10 mM Glc	0,763			10 mM Glc	0,879			10 mM Glc	0,958
		20 mM Glc	0,989			20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	0,945			20 mM Glc	0,829
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,784		10 mM Glc	0 mM Glc	0,991		10 mM Glc	0 mM Glc	0,999		10 mM Glc	0 mM Glc	0,952
		5 mM Glc	0,998			5 mM Glc	0,763			5 mM Glc	0,879			5 mM Glc	0,958
		20 mM Glc	0,999			20 mM Glc	0,027			20 mM Glc	0,997			20 mM Glc	0,911
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,714		20 mM Glc	0 mM Glc	0,013		20 mM Glc	0 mM Glc	1,000		20 mM Glc	0 mM Glc	1,000
		5 mM Glc	0,989			5 mM Glc	1,000			5 mM Glc	0,945			5 mM Glc	0,829
		10 mM Glc	0,999			10 mM Glc	0,027			10 mM Glc	0,997			10 mM Glc	0,911
1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,023	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,851	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,975	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,678
		10 mM Glc	0,025			10 mM Glc	0,959			10 mM Glc	1,000			10 mM Glc	0,973
		20 mM Glc	0,175			20 mM Glc	0,862			20 mM Glc	0,976			20 mM Glc	0,835
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,023		5 mM Glc	0 mM Glc	0,851		5 mM Glc	0 mM Glc	0,975		5 mM Glc	0 mM Glc	0,678
		10 mM Glc	0,997			10 mM Glc	0,627			10 mM Glc	0,931			10 mM Glc	0,934
		20 mM Glc	0,268			20 mM Glc	0,522			20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	0,995
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,025		10 mM Glc	0 mM Glc	0,959		10 mM Glc	0 mM Glc	1,000		10 mM Glc	0 mM Glc	0,973

Prilog 1; Tabela 2. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a		
Games-Howell			Games-Howell			Games-Howell			Games-Howell		
A) HSA:SK 1:0			B) HSA:SK 1:1			C) HSA:SK 1:2			D) HSA:SK 1:4		
Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.
1.	5 mM Glc	0,997	1.	5 mM Glc	0,627	1.	5 mM Glc	0,931	1.	5 mM Glc	0,934
	20 mM Glc	0,291		20 mM Glc	0,982		20 mM Glc	0,929		20 mM Glc	0,984
	0 mM Glc	0,175		0 mM Glc	0,862		0 mM Glc	0,976		0 mM Glc	0,835
	5 mM Glc	0,268		5 mM Glc	0,522		5 mM Glc	1,000		5 mM Glc	0,995
2.	10 mM Glc	0,291	2.	10 mM Glc	0,982	2.	10 mM Glc	0,929	2.	10 mM Glc	0,984
	5 mM Glc	0,369		5 mM Glc	0,086		5 mM Glc	0,994		5 mM Glc	0,998
	10 mM Glc	0,657		10 mM Glc	0,822		10 mM Glc	0,946		10 mM Glc	0,999
	20 mM Glc	0,251		20 mM Glc	0,239		20 mM Glc	0,753		20 mM Glc	0,813
	5 mM Glc	0,369		5 mM Glc	0,086		5 mM Glc	0,994		5 mM Glc	0,998
	10 mM Glc	0,990		10 mM Glc	0,011		10 mM Glc	0,969		10 mM Glc	1,000
	20 mM Glc	0,007		20 mM Glc	0,554		20 mM Glc	0,202		20 mM Glc	0,829
	0 mM Glc	0,657		0 mM Glc	0,822		0 mM Glc	0,946		0 mM Glc	0,999
	5 mM Glc	0,990		5 mM Glc	0,011		5 mM Glc	0,969		5 mM Glc	1,000
	20 mM Glc	0,049		20 mM Glc	0,023		20 mM Glc	0,389		20 mM Glc	0,884
	0 mM Glc	0,251		0 mM Glc	0,239		0 mM Glc	0,753		0 mM Glc	0,813
	5 mM Glc	0,007		5 mM Glc	0,554		5 mM Glc	0,202		5 mM Glc	0,829
	10 mM Glc	0,049		10 mM Glc	0,023		10 mM Glc	0,389		10 mM Glc	0,884
	5 mM Glc	0,014		5 mM Glc	0,039		5 mM Glc	0,253		5 mM Glc	0,358
	10 mM Glc	0,008		10 mM Glc	0,916		10 mM Glc	0,506		10 mM Glc	0,137
	20 mM Glc	0,817		20 mM Glc	1,000		20 mM Glc	0,138		20 mM Glc	0,979
	5 mM Glc	0,014		5 mM Glc	0,039		5 mM Glc	0,253		5 mM Glc	0,358
	10 mM Glc	0,992		10 mM Glc	0,008		10 mM Glc	0,999		10 mM Glc	0,888
	20 mM Glc	0,059		20 mM Glc	0,011		20 mM Glc	0,963		20 mM Glc	0,371
	0 mM Glc	0,008		0 mM Glc	0,916		0 mM Glc	0,506		0 mM Glc	0,137
	5 mM Glc	0,992		5 mM Glc	0,008		5 mM Glc	0,999		5 mM Glc	0,888
	20 mM Glc	0,057		20 mM Glc	0,837		20 mM Glc	0,947		20 mM Glc	0,150
	0 mM Glc	0,817		0 mM Glc	1,000		0 mM Glc	0,138		0 mM Glc	0,979
	5 mM Glc	0,059		5 mM Glc	0,011		5 mM Glc	0,963		5 mM Glc	0,371
	10 mM Glc	0,057		10 mM Glc	0,837		10 mM Glc	0,947		10 mM Glc	0,150
	5 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0,188		5 mM Glc	0,513		5 mM Glc	0,789
	10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,995		10 mM Glc	0,895		10 mM Glc	0,829
	20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,988		20 mM Glc	0,968		20 mM Glc	0,340
	5 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0,188		5 mM Glc	0,513		5 mM Glc	0,789
	10 mM Glc	0,297		10 mM Glc	0,288		10 mM Glc	0,938		10 mM Glc	0,618
	20 mM Glc	0,124		20 mM Glc	0,238		20 mM Glc	0,666		20 mM Glc	0,588
	0 mM Glc	0,000		0 mM Glc	0,995		0 mM Glc	0,895		0 mM Glc	0,829
	5 mM Glc	0,297		5 mM Glc	0,288		5 mM Glc	0,938		5 mM Glc	0,618
	20 mM Glc	0,036		20 mM Glc	0,953		20 mM Glc	0,983		20 mM Glc	0,247
	0 mM Glc	0,000		0 mM Glc	0,988		0 mM Glc	0,968		0 mM Glc	0,340
	5 mM Glc	0,124		5 mM Glc	0,238		5 mM Glc	0,666		5 mM Glc	0,588
	10 mM Glc	0,036		10 mM Glc	0,953		10 mM Glc	0,983		10 mM Glc	0,247

Prilog 1; Tabela 2. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a			
Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell			
A) HSA:SK 1:0			Sig.	B) HSA:SK 1:1			Sig.	C) HSA:SK 1:2			Sig.	D) HSA:SK 1:4			Sig.
Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze		
6.	0 mM Glc	5 mM Glc	1,000	6.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,020	6.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,008	6.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,158
		10 mM Glc	0,822			10 mM Glc	0,995			10 mM Glc	0,000			10 mM Glc	0,636
		20 mM Glc	0,990			20 mM Glc	0,151			20 mM Glc	0,002			20 mM Glc	0,851
	5 mM Glc	0 mM Glc	1,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,020		5 mM Glc	0 mM Glc	0,008		5 mM Glc	0 mM Glc	0,158
		10 mM Glc	0,011			10 mM Glc	0,025			10 mM Glc	0,009			10 mM Glc	0,984
		20 mM Glc	0,934			20 mM Glc	0,703			20 mM Glc	0,018			20 mM Glc	0,861
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,822		10 mM Glc	0 mM Glc	0,995		10 mM Glc	0 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0 mM Glc	0,636
		5 mM Glc	0,011			5 mM Glc	0,025			5 mM Glc	0,009			5 mM Glc	0,984
		20 mM Glc	0,505			20 mM Glc	0,187			20 mM Glc	0,464			20 mM Glc	0,985
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,990		20 mM Glc	0 mM Glc	0,151		20 mM Glc	0 mM Glc	0,002		20 mM Glc	0 mM Glc	0,851
		5 mM Glc	0,934			5 mM Glc	0,703			5 mM Glc	0,018			5 mM Glc	0,861
		10 mM Glc	0,505			10 mM Glc	0,187			10 mM Glc	0,464			10 mM Glc	0,985
7.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	7.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	7.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,015	7.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,929
		10 mM Glc	0,004			10 mM Glc	0,763			10 mM Glc	0,000			10 mM Glc	0,674
		20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0,070			20 mM Glc	0,015			20 mM Glc	0,997
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,015		5 mM Glc	0 mM Glc	0,929
		10 mM Glc	0,865			10 mM Glc	0,061			10 mM Glc	0,022			10 mM Glc	0,394
		20 mM Glc	0,871			20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	0,920
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,004		10 mM Glc	0 mM Glc	0,763		10 mM Glc	0 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0 mM Glc	0,674
		5 mM Glc	0,865			5 mM Glc	0,061			5 mM Glc	0,022			5 mM Glc	0,394
		20 mM Glc	0,989			20 mM Glc	0,914			20 mM Glc	0,018			20 mM Glc	0,902
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0 mM Glc	0,070		20 mM Glc	0 mM Glc	0,015		20 mM Glc	0 mM Glc	0,997
		5 mM Glc	0,871			5 mM Glc	0,000			5 mM Glc	1,000			5 mM Glc	0,920
		10 mM Glc	0,989			10 mM Glc	0,914			10 mM Glc	0,018			10 mM Glc	0,902
10.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	10.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	10.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,003	10.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,893
		10 mM Glc	0,000			10 mM Glc	0,049			10 mM Glc	0,014			10 mM Glc	0,045
		20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0,979			20 mM Glc	0,012			20 mM Glc	0,039
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,003		5 mM Glc	0 mM Glc	0,893
		10 mM Glc	1,000			10 mM Glc	0,769			10 mM Glc	0,990			10 mM Glc	0,237
		20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	0,069			20 mM Glc	0,824			20 mM Glc	0,115
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0 mM Glc	0,049		10 mM Glc	0 mM Glc	0,014		10 mM Glc	0 mM Glc	0,045
		5 mM Glc	1,000			5 mM Glc	0,769			5 mM Glc	0,990			5 mM Glc	0,237
		20 mM Glc	1,000			20 mM Glc	0,270			20 mM Glc	0,962			20 mM Glc	0,858
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0 mM Glc	0,979		20 mM Glc	0 mM Glc	0,012		20 mM Glc	0 mM Glc	0,039
		5 mM Glc	1,000			5 mM Glc	0,069			5 mM Glc	0,824			5 mM Glc	0,115
		10 mM Glc	1,000			10 mM Glc	0,270			10 mM Glc	0,962			10 mM Glc	0,858
14.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	14.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,048	14.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,024	14.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,631
		10 mM Glc	0,009			10 mM Glc	0,034			10 mM Glc	0,000			10 mM Glc	0,921
		20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0,497			20 mM Glc	0,003			20 mM Glc	0,598
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0 mM Glc	0,048		5 mM Glc	0 mM Glc	0,024		5 mM Glc	0 mM Glc	0,631
		10 mM Glc	0,106			10 mM Glc	0,080			10 mM Glc	0,869			10 mM Glc	0,684

Prilog 1; Tabela 2. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a							
Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell							
A) HSA:SK 1:0			Sig.	B) HSA:SK 1:1			Sig.	C) HSA:SK 1:2			Sig.	D) HSA:SK 1:4			Sig.				
Dan	Koncentracija glukoze				Dan	Koncentracija glukoze				Dan	Koncentracija glukoze				Dan	Koncentracija glukoze			
		20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0,018			20 mM Glc	0,614			20 mM Glc	0,515			20 mM Glc	0,515
14.	10 mM Glc	0 mM Glc	0,009	14.	10 mM Glc	0 mM Glc	0,034	14.	10 mM Glc	0 mM Glc	0,000	14.	10 mM Glc	0 mM Glc	0,921	14.	10 mM Glc	0 mM Glc	0,921
		5 mM Glc	0,106			5 mM Glc	0,080			5 mM Glc	0,869			5 mM Glc	0,684				
		20 mM Glc	0,568			20 mM Glc	0,020			20 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0,353				
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,000			20 mM Glc	0 mM Glc		0,497		20 mM Glc		0 mM Glc	0,003			20 mM Glc	0 mM Glc	0,598
		5 mM Glc	0,000			5 mM Glc	0,018			5 mM Glc	0,614			5 mM Glc	0,515			5 mM Glc	0,515
		10 mM Glc	0,568			10 mM Glc	0,020			10 mM Glc	0,000			10 mM Glc	0,353			10 mM Glc	0,353

Tabela 3. ANOVA

Koncentracija glukoze

A) 5mM glukoza		B) 10mM glukoza		C) 20mM glukoza	
ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.
0. dan	0,000	0. dan	0,000	0. dan	0,001
1. dan	0,729	1. dan	0,170	1. dan	0,013
2. dan	0,057	2. dan	0,002	2. dan	0,002
3. dan	0,012	3. dan	0,005	3. dan	0,074
4. dan	0,039	4. dan	0,402	4. dan	0,000
6. dan	0,000	6. dan	0,000	6. dan	0,002
7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,000
10. dan	0,000	10. dan	0,000	10. dan	0,000
14. dan	0,000	14. dan	0,000	14. dan	0,002

Tabela 4. Post-hoc višestruka poređenja

Molarni odnos HSA:SK

Multiple Comparisons ^a Tukey HSD				Multiple Comparisons ^a Tukey HSD				Multiple Comparisons ^a Tukey HSD			
A) 5mM glukoza			Sig.	B) 10mM glukoza			Sig.	C) 20mM glukoza			Sig.
Molarni odnos Dan HSA:SK				Molarni odnos Dan HSA:SK				Molarni odnos Dan HSA:SK			
0.	1:0	1:1	0,099	0.	1:0	1:1	0,752	0.	1:0	1:1	0,312
		1:2	0,000			1:2	0,807			1:2	0,021
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,001
	1:1	1:0	0,099		1:1	1:0	0,752		1:1	1:0	0,312
		1:2	0,013			1:2	0,311			1:2	0,761
		1:4	0,006			1:4	0,000			1:4	0,121
	1:2	1:0	0,000		1:2	1:0	0,807		1:2	1:0	0,021
		1:1	0,013			1:1	0,311			1:1	0,761
		1:4	0,919			1:4	0,000			1:4	0,349

Prilog 1; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a Tukey HSD				Multiple Comparisons ^a Tukey HSD				Multiple Comparisons ^a Tukey HSD			
A) 5mM glukoza			Sig.	B) 10mM glukoza			Sig.	C) 20mM glukoza			Sig.
Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK		
0.	1:4	1:0	0,000	0.	1:4	1:0	0,000	0.	1:4	1:0	0,001
		1:1	0,006			1:1	0,000			1:1	0,121
		1:2	0,919			1:2	0,000			1:2	0,349
1.	1:0	1:1	0,974	1.	1:0	1:1	0,643	1.	1:0	1:1	0,015
		1:2	0,675			1:2	0,939			1:2	0,955
		1:4	0,944			1:4	0,471			1:4	0,583
	1:1	1:0	0,974		1:1	1:0	0,643		1:1	1:0	0,015
		1:2	0,893			1:2	0,353			1:2	0,033
		1:4	0,999			1:4	0,999			1:4	0,275
	1:2	1:0	0,675		1:2	1:0	0,939		1:2	1:0	0,955
		1:1	0,893			1:1	0,353			1:1	0,033
		1:4	0,952			1:4	0,207			1:4	0,825
	1:4	1:0	0,944		1:4	1:0	0,471		1:4	1:0	0,583
		1:1	0,999			1:1	0,999			1:1	0,275
		1:2	0,952			1:2	0,207			1:2	0,825
2.	1:0	1:1	0,437	2.	1:0	1:1	0,007	2.	1:0	1:1	0,772
		1:2	0,057			1:2	0,047			1:2	0,739
		1:4	0,119			1:4	0,001			1:4	0,001
	1:1	1:0	0,437		1:1	1:0	0,007		1:1	1:0	0,772
		1:2	0,651			1:2	0,801			1:2	1,000
		1:4	0,887			1:4	0,521			1:4	0,025
	1:2	1:0	0,057		1:2	1:0	0,047		1:2	1:0	0,739
		1:1	0,651			1:1	0,801			1:1	1,000
		1:4	0,958			1:4	0,179			1:4	0,011
	1:4	1:0	0,119		1:4	1:0	0,001		1:4	1:0	0,001
		1:1	0,887			1:1	0,521			1:1	0,025
		1:2	0,958			1:2	0,179			1:2	0,011
3.	1:0	1:1	0,068	3.	1:0	1:1	0,086	3.	1:0	1:1	0,748
		1:2	0,987			1:2	0,531			1:2	0,051
		1:4	0,962			1:4	0,870			1:4	0,624
	1:1	1:0	0,068		1:1	1:0	0,086		1:1	1:0	0,748
		1:2	0,026			1:2	0,003			1:2	0,400
		1:4	0,018			1:4	0,278			1:4	1,000
	1:2	1:0	0,987		1:2	1:0	0,531		1:2	1:0	0,051
		1:1	0,026			1:1	0,003			1:1	0,400
		1:4	0,998			1:4	0,148			1:4	0,358
	1:4	1:0	0,962		1:4	1:0	0,870		1:4	1:0	0,624
		1:1	0,018			1:1	0,278			1:1	1,000
		1:2	0,998			1:2	0,148			1:2	0,358
4.	1:0	1:1	0,159	4.	1:0	1:1	0,996	4.	1:0	1:1	0,003
		1:2	0,077			1:2	0,652			1:2	0,000

Prilog 1; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a			
Tukey HSD				Tukey HSD				Tukey HSD			
A) 5mM glukoza			Sig.	B) 10mM glukoza			Sig.	C) 20mM glukoza			Sig.
Molarni odnos				Molarni odnos				Molarni odnos			
Dan	HSA:SK			Dan	HSA:SK			Dan	HSA:SK		
4.	1:1	1:4	0,037	4.	1:1	1:4	0,973	4.	1:1	1:4	0,752
		1:0	0,159			1:0	0,996			1:0	0,003
		1:2	0,976			1:2	0,513			1:2	0,503
		1:4	0,858			1:4	0,997			1:4	0,000
	1:2	1:0	0,077		1:2	1:0	0,652		1:2	1:0	0,000
		1:1	0,976			1:1	0,513			1:1	0,503
		1:4	0,981			1:4	0,403			1:4	0,000
		1:4	1:0		0,037	1:4	1:0		0,973	1:4	1:0
	1:1	0,858	1:1		0,997		1:1		0,000		
	1:2	0,981	1:2		0,403		1:2		0,000		
	6.	1:0	1:1		0,313		6.		1:0	1:1	0,947
1:2			0,022	1:2	0,134	1:2		0,004			
1:4			0,295	1:4	0,000	1:4		0,005			
1:1			0,313	1:1	0,947	1:1		0,405			
1:1		1:2	0,000	1:1	1:2	0,310		1:1	1:2	0,092	
		1:4	0,009		1:4	0,001			1:4	0,107	
		1:2	0,022		1:2	0,134			1:2	0,004	
		1:1	0,000	1:1	1:1	0,310		1:1	1:1	0,092	
1:4		0,533	1:4		0,048	1:4			1,000		
1:4		1:0	0,295		1:4	1:0			0,005		
1:1		0,009	1:1			0,001		1:1	0,107		
1:2	0,533	1:2	0,048	1:2		1,000					
7.	1:0	1:1	0,901	7.	1:0	1:1	0,132	7.	1:0	1:1	0,065
		1:2	0,134			1:2	0,895			1:2	0,387
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,000
		1:1	0,901			1:1	0,132			1:1	0,065
	1:1	1:2	0,362		1:1	1:2	0,400		1:1	1:2	0,709
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,000
		1:2	1:0			0,134	1:2			1:0	0,387
		1:1	0,362		1:1	0,400			1:1	0,709	
	1:4	0,000	1:4		0,000	1:4			0,000		
	1:4	1:0	0,000		1:4	1:0	0,000		1:4	1:0	0,000
	1:1	0,000	1:1			0,000	1:1			0,000	
1:2	0,000	1:2	0,000	1:2		0,000					
10.	1:0	1:1	0,973	10.	1:0	1:1	0,970	10.	1:0	1:1	0,373
		1:2	0,036			1:2	0,393			1:2	0,275
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,000
		1:1	0,973			1:1	0,970			1:1	1:0
	1:1	1:2	0,010		1:1	1:2	0,599		1:2		0,018
		1:4	0,000			1:4	0,000		1:4		0,000
		1:2	0,036			1:2	0,393		1:2	0,275	
		1:1	0,036			1:1	0,400		1:1	0,709	
	1:4	0,000	1:4		0,000	1:4	0,000				
	1:2	0,000	1:2		0,000	1:2	0,000				

Prilog 1; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a Tukey HSD			Multiple Comparisons ^a Tukey HSD			Multiple Comparisons ^a Tukey HSD		
A) 5mM glukoza			B) 10mM glukoza			C) 20mM glukoza		
Molarni odnos HSA:SK			Molarni odnos HSA:SK			Molarni odnos HSA:SK		
Dan			Dan			Dan		
10.	1:1	0,010	10.	1:1	0,599	10.	1:1	0,018
	1:4	0,000		1:4	0,000		1:4	0,000
	1:0	0,000		1:0	0,000		1:0	0,000
	1:1	0,000		1:1	0,000		1:1	0,000
14.	1:2	0,000	14.	1:2	0,000	14.	1:2	0,000
	1:0	0,001		1:0	0,006		1:0	0,160
	1:2	0,991		1:2	0,998		1:2	0,156
	1:4	0,955		1:4	0,008		1:4	0,066
	1:1	0,001		1:1	0,006		1:1	0,160
	1:2	0,000		1:2	0,005		1:2	0,006
	1:4	0,001		1:4	0,000		1:4	0,003
	1:2	0,991		1:2	0,998		1:2	0,156
	1:1	0,000		1:1	0,005		1:1	0,006
	1:4	0,857		1:4	0,010		1:4	0,925
	1:4	0,955		1:4	0,008		1:4	0,066
	1:1	0,001		1:1	0,000		1:1	0,003
	1:2	0,857		1:2	0,010		1:2	0,925

Prilog 2.

Tabela 1. ANOVA

HSA:SK molarni odnos

A) HSA:SK 1:0		B) HSA:SK 1:1		C) HSA:SK 1:2		D) HSA:SK 1:4	
ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.
0. dan	0,001	0. dan	0,056	0. dan	0,005	0. dan	0,008
1. dan	0,152	1. dan	0,285	1. dan	0,021	1. dan	0,487
2. dan	0,081	2. dan	0,058	2. dan	0,041	2. dan	0,094
3. dan	0,001	3. dan	0,000	3. dan	0,240	3. dan	0,420
4. dan	0,000	4. dan	0,000	4. dan	0,000	4. dan	0,001
6. dan	0,000	6. dan	0,000	6. dan	0,020	6. dan	0,000
7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,015
10. dan	0,000	10. dan	0,000	10. dan	0,001	10. dan	0,005
14. dan	0,000	14. dan	0,000	14. dan	0,000	14. dan	0,876

Tabela 2. Post-hoc višestruka poređenja

Koncentracija glukoze

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a						
Tukey HSD				Tukey HSD				Tukey HSD				Tukey HSD						
A) HSA:SK 1:0			Sig.	B) HSA:SK 1:1			Sig.	C) HSA:SK 1:2			Sig.	D) HSA:SK 1:4			Sig.			
Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze			Dan	Koncentracija glukoze					
0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,552	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,636	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,999	0.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,995			
		10 mM Glc	0,945				10 mM Glc			0,071				10 mM Glc	0,043		10 mM Glc	0,148
		20 mM Glc	0,004				20 mM Glc			0,094				20 mM Glc	0,039		20 mM Glc	0,650
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,552	5 mM Glc	0 mM Glc	0,636	5 mM Glc	0 mM Glc	0,999	5 mM Glc	0 mM Glc	0,995						
		10 mM Glc	0,293			10 mM Glc		0,366			10 mM Glc	0,032		10 mM Glc	0,064			
		20 mM Glc	0,056			20 mM Glc		0,459			20 mM Glc	0,029		20 mM Glc	0,752			
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,945	10 mM Glc	0 mM Glc	0,071	10 mM Glc	0 mM Glc	0,043	10 mM Glc	0 mM Glc	0,148						
		5 mM Glc	0,293			5 mM Glc		0,366			5 mM Glc	0,032		5 mM Glc	0,064			
		20 mM Glc	0,002			20 mM Glc		0,997			20 mM Glc	1,000		20 mM Glc	0,005			
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,004	20 mM Glc	0 mM Glc	0,094	20 mM Glc	0 mM Glc	0,039	20 mM Glc	0 mM Glc	0,650						
		5 mM Glc	0,056			5 mM Glc		0,459			5 mM Glc	0,029		5 mM Glc	0,752			
		10 mM Glc	0,002			10 mM Glc		0,997			10 mM Glc	1,000		10 mM Glc	0,005			
1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,997	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,254	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,726	1.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,855			
		10 mM Glc	0,692				10 mM Glc			0,890				10 mM Glc	0,213		10 mM Glc	0,998
		20 mM Glc	0,534				20 mM Glc			0,976				20 mM Glc	0,020		20 mM Glc	0,627
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,997	5 mM Glc	0 mM Glc	0,254	5 mM Glc	0 mM Glc	0,726	5 mM Glc	0 mM Glc	0,855						
		10 mM Glc	0,805			10 mM Glc		0,748			10 mM Glc	0,690		10 mM Glc	0,767			
		20 mM Glc	0,424			20 mM Glc		0,452			20 mM Glc	0,093		20 mM Glc	0,969			
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,692	10 mM Glc	0 mM Glc	0,890	10 mM Glc	0 mM Glc	0,213	10 mM Glc	0 mM Glc	0,998						
		5 mM Glc	0,805			5 mM Glc		0,748			5 mM Glc	0,690		5 mM Glc	0,767			
		20 mM Glc	0,107			20 mM Glc		0,985			20 mM Glc	0,517		20 mM Glc	0,528			
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,534	20 mM Glc	0 mM Glc	0,976	20 mM Glc	0 mM Glc	0,020	20 mM Glc	0 mM Glc	0,627						
		5 mM Glc	0,424			5 mM Glc		0,452			5 mM Glc	0,093		5 mM Glc	0,969			
		10 mM Glc	0,107			10 mM Glc		0,985			10 mM Glc	0,517		10 mM Glc	0,528			
2.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,544	2.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,141	2.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,026	2.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,997			
		10 mM Glc	0,061				10 mM Glc			0,050				10 mM Glc	0,350		10 mM Glc	0,810
		20 mM Glc	0,266				20 mM Glc			0,517				20 mM Glc	0,533		20 mM Glc	0,098
	5 mM Glc	0 mM Glc	0,544	5 mM Glc	0 mM Glc	0,141	5 mM Glc	0 mM Glc	0,026	5 mM Glc	0 mM Glc	0,997						
		10 mM Glc	0,416			10 mM Glc		0,965			10 mM Glc	0,477		10 mM Glc	0,888			
		20 mM Glc	0,939			20 mM Glc		0,870			20 mM Glc	0,247		20 mM Glc	0,136			
	10 mM Glc	0 mM Glc	0,061	10 mM Glc	0 mM Glc	0,050	10 mM Glc	0 mM Glc	0,350	10 mM Glc	0 mM Glc	0,810						
		5 mM Glc	0,416			5 mM Glc		0,965			5 mM Glc	0,477		5 mM Glc	0,888			
		20 mM Glc	0,713			20 mM Glc		0,616			20 mM Glc	0,976		20 mM Glc	0,523			
	20 mM Glc	0 mM Glc	0,266	20 mM Glc	0 mM Glc	0,517	20 mM Glc	0 mM Glc	0,533	20 mM Glc	0 mM Glc	0,098						
		5 mM Glc	0,939			5 mM Glc		0,870			5 mM Glc	0,247		5 mM Glc	0,136			
		10 mM Glc	0,713			10 mM Glc		0,616			10 mM Glc	0,976		10 mM Glc	0,523			
3.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,008	3.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,000	3.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,999	3.	0 mM Glc	5 mM Glc	0,679			

Prilog 2; Tabela 2. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a		
Tukey HSD			Tukey HSD			Tukey HSD			Tukey HSD		
A) HSA:SK 1:0			B) HSA:SK 1:1			C) HSA:SK 1:2			D) HSA:SK 1:4		
Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.
3.	10 mM Glc	0,124	3.	10 mM Glc	0,000	3.	10 mM Glc	0,306	3.	10 mM Glc	0,411
	20 mM Glc	0,001		20 mM Glc	0,004		20 mM Glc	0,587		20 mM Glc	0,542
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,008		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,999		5 mM Glc 0 mM Glc	0,679
	10 mM Glc	0,519		10 mM Glc	0,047		10 mM Glc	0,376		10 mM Glc	0,967
	20 mM Glc	0,592		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,673		20 mM Glc	0,996
	10 mM Glc 0 mM Glc	0,124		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,306		10 mM Glc 0 mM Glc	0,411
	5 mM Glc	0,519		5 mM Glc	0,047		5 mM Glc	0,376		5 mM Glc	0,967
	20 mM Glc	0,072		20 mM Glc	0,041		20 mM Glc	0,955		20 mM Glc	0,996
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,001		20 mM Glc 0 mM Glc	0,004		20 mM Glc 0 mM Glc	0,587		20 mM Glc 0 mM Glc	0,542
	5 mM Glc	0,592		5 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0,673		5 mM Glc	0,996
	10 mM Glc	0,072		10 mM Glc	0,041		10 mM Glc	0,955		10 mM Glc	0,996
	0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,044		0 mM Glc 5 mM Glc	0,048
4.	10 mM Glc	0,000	4.	10 mM Glc	0,000	4.	10 mM Glc	0,000	4.	10 mM Glc	0,001
	20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,007		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,014
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,044		5 mM Glc 0 mM Glc	0,048
	10 mM Glc	0,613		10 mM Glc	0,043		10 mM Glc	0,030		10 mM Glc	0,270
	20 mM Glc	0,106		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,940
	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,001
	5 mM Glc	0,613		5 mM Glc	0,043		5 mM Glc	0,030		5 mM Glc	0,270
	20 mM Glc	0,522		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,023		20 mM Glc	0,570
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,007		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,014
	5 mM Glc	0,106		5 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0,000		5 mM Glc	0,940
	10 mM Glc	0,522		10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,023		10 mM Glc	0,570
	0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	1,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000
6.	10 mM Glc	0,000	6.	10 mM Glc	0,000	6.	10 mM Glc	0,033	6.	10 mM Glc	0,001
	20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,084		20 mM Glc	0,999		20 mM Glc	0,000
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	1,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000
	10 mM Glc	0,021		10 mM Glc	1,000		10 mM Glc	0,038		10 mM Glc	0,451
	20 mM Glc	0,792		20 mM Glc	0,065		20 mM Glc	1,000		20 mM Glc	0,508
	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,033		10 mM Glc 0 mM Glc	0,001
	5 mM Glc	0,021		5 mM Glc	1,000		5 mM Glc	0,038		5 mM Glc	0,451
	20 mM Glc	0,233		20 mM Glc	0,064		20 mM Glc	0,044		20 mM Glc	0,994
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,084		20 mM Glc 0 mM Glc	0,999		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000
	5 mM Glc	0,792		5 mM Glc	0,065		5 mM Glc	1,000		5 mM Glc	0,508
	10 mM Glc	0,233		10 mM Glc	0,064		10 mM Glc	0,044		10 mM Glc	0,994
	0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,002		0 mM Glc 5 mM Glc	0,994
7.	10 mM Glc	0,003	7.	10 mM Glc	0,000	7.	10 mM Glc	0,000	7.	10 mM Glc	0,078
	20 mM Glc	0,082		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,051
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,002		5 mM Glc 0 mM Glc	0,994

Prilog 2; Tabela 2. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a			Multiple Comparisons ^a		
Tukey HSD			Tukey HSD			Tukey HSD			Tukey HSD		
A) HSA:SK 1:0			B) HSA:SK 1:1			C) HSA:SK 1:2			D) HSA:SK 1:4		
Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.	Dan	Koncentracija glukoze	Sig.
10.	10 mM Glc	0,107	10.	10 mM Glc	0,815	10.	10 mM Glc	0,704	10.	10 mM Glc	0,093
	20 mM Glc	0,007		20 mM Glc	0,958		20 mM Glc	0,798		20 mM Glc	0,060
	10 mM Glc 0 mM Glc	0,003		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,078
	5 mM Glc	0,107		5 mM Glc	0,815		5 mM Glc	0,704		5 mM Glc	0,093
	20 mM Glc	0,441		20 mM Glc	0,989		20 mM Glc	1,000		20 mM Glc	0,979
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,082		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,051
	5 mM Glc	0,007		5 mM Glc	0,958		5 mM Glc	0,798		5 mM Glc	0,060
	10 mM Glc	0,441		10 mM Glc	0,989		10 mM Glc	1,000		10 mM Glc	0,979
	0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,001		0 mM Glc 5 mM Glc	0,003
	10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,012		10 mM Glc	0,249
	20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,020		20 mM Glc	0,612
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,001		5 mM Glc 0 mM Glc	0,003
	10 mM Glc	0,925		10 mM Glc	0,592		10 mM Glc	0,914		10 mM Glc	0,177
	20 mM Glc	0,698		20 mM Glc	0,998		20 mM Glc	0,783		20 mM Glc	0,048
	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,000		10 mM Glc 0 mM Glc	0,012		10 mM Glc 0 mM Glc	0,249
	5 mM Glc	0,925		5 mM Glc	0,592		5 mM Glc	0,914		5 mM Glc	0,177
	20 mM Glc	0,952		20 mM Glc	0,488		20 mM Glc	0,994		20 mM Glc	0,900
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,020		20 mM Glc 0 mM Glc	0,612
	5 mM Glc	0,698		5 mM Glc	0,998		5 mM Glc	0,783		5 mM Glc	0,048
	10 mM Glc	0,952		10 mM Glc	0,488		10 mM Glc	0,994		10 mM Glc	0,900
	0 mM Glc 5 mM Glc	0,001		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,000		0 mM Glc 5 mM Glc	0,949
	10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,000		10 mM Glc	0,859
	20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,001		20 mM Glc	0,000		20 mM Glc	0,991
	5 mM Glc 0 mM Glc	0,001		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,000		5 mM Glc 0 mM Glc	0,949
	10 mM Glc	0,004		10 mM Glc	0,993		10 mM Glc	0,006		10 mM Glc	0,994
	20 mM Glc	0,006		20 mM Glc	0,055		20 mM Glc	0,230		20 mM Glc	0,994
14.	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000	14.	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000	14.	10 mM Glc 0 mM Glc	0,000	14.	10 mM Glc 0 mM Glc	0,859
	5 mM Glc	0,004		5 mM Glc	0,993		5 mM Glc	0,006		5 mM Glc	0,994
	20 mM Glc	0,993		20 mM Glc	0,079		20 mM Glc	0,107		20 mM Glc	0,956
	20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,001		20 mM Glc 0 mM Glc	0,000		20 mM Glc 0 mM Glc	0,991
	5 mM Glc	0,006		5 mM Glc	0,055		5 mM Glc	0,230		5 mM Glc	0,994
	10 mM Glc	0,993		10 mM Glc	0,079		10 mM Glc	0,107		10 mM Glc	0,956
	10 mM Glc	0,993		10 mM Glc	0,079		10 mM Glc	0,107		10 mM Glc	0,956

Tabela 3. ANOVA

Koncentracija glukoze

A) 5mM glukoza		B) 10mM glukoza		C) 20mM glukoza	
ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.	ANOVA ^a	Sig.
0. dan	0,541	0. dan	0,851	0. dan	0,137
1. dan	0,018	1. dan	0,000	1. dan	0,006
2. dan	0,001	2. dan	0,005	2. dan	0,059
3. dan	0,001	3. dan	0,001	3. dan	0,783
4. dan	0,000	4. dan	0,000	4. dan	0,000
6. dan	0,003	6. dan	0,000	6. dan	0,002
7. dan	0,000	7. dan	0,000	7. dan	0,000
10. dan	0,000	10. dan	0,000	10. dan	0,000
14. dan	0,098	14. dan	0,001	14. dan	0,000

Tabela 4. Post-hoc višestruka poređenja

Molarni odnos HSA:SK

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a			
Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell			
A) 5mM glukoza		Sig.		B) 10mM glukoza		Sig.		C) 20mM glukoza		Sig.	
Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK		
0.	1:0	1:1	0,906	0.	1:0	1:1	0,882	0.	1:0	1:1	0,745
		1:2	0,599			1:2	0,932			1:2	0,806
		1:4	0,960			1:4	0,998			1:4	0,822
	1:1	1:0	0,906		1:1	1:0	0,882		1:1	1:0	0,745
		1:2	0,587			1:2	1,000			1:2	0,119
		1:4	0,997			1:4	0,908			1:4	0,068
	1:2	1:0	0,599		1:2	1:0	0,932		1:2	1:0	0,806
		1:1	0,587			1:1	1,000			1:1	0,119
		1:4	0,641			1:4	0,959			1:4	0,999
	1:4	1:0	0,960		1:4	1:0	0,998		1:4	1:0	0,822
		1:1	0,997			1:1	0,908			1:1	0,068
		1:2	0,641			1:2	0,959			1:2	0,999
1.	1:0	1:1	0,839	1.	1:0	1:1	0,049	1.	1:0	1:1	0,225
		1:2	0,125			1:2	0,025			1:2	0,301
		1:4	0,619			1:4	0,787			1:4	0,044
	1:1	1:0	0,839		1:1	1:0	0,049		1:1	1:0	0,225
		1:2	0,589			1:2	0,713			1:2	1,000
		1:4	0,544			1:4	0,022			1:4	0,033
	1:2	1:0	0,125		1:2	1:0	0,025		1:2	1:0	0,301
		1:1	0,589			1:1	0,713			1:1	1,000
		1:4	0,059			1:4	0,014			1:4	0,054
	1:4	1:0	0,619		1:4	1:0	0,787		1:4	1:0	0,044

Prilog 2; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a				Multiple Comparisons ^a			
Games-Howell				Games-Howell				Games-Howell			
A) 5mM glukoza			Sig.	B) 10mM glukoza			Sig.	C) 20mM glukoza			Sig.
Molarni odnos				Molarni odnos				Molarni odnos			
Dan	HSA:SK			Dan	HSA:SK			Dan	HSA:SK		
2.	1:0	1:1	0,544	2.	1:0	1:1	0,022	2.	1:0	1:1	0,033
		1:2	0,059			1:2	0,014			1:2	0,054
		1:1	0,578			1:1	0,009			1:1	0,220
		1:2	0,008			1:2	0,174			1:2	0,868
		1:4	0,020			1:4	0,232			1:4	0,491
		1:1	0,578			1:1	0,009			1:1	0,220
	1:2	1:2	0,114	1:2	0,191	1:2	0,007				
		1:4	0,261	1:4	0,274	1:4	0,986				
		1:0	0,008	1:2	0,174	1:2	0,868				
		1:1	0,114	1:1	0,191	1:1	0,007				
		1:4	0,923	1:4	1,000	1:4	0,263				
		1:4	0,020	1:4	0,232	1:4	0,491				
3.	1:0	1:1	0,261	3.	1:0	1:1	0,274	3.	1:0	1:1	0,986
		1:2	0,923			1:2	1,000			1:2	0,263
		1:1	0,738			1:1	0,005			1:1	0,862
		1:2	0,010			1:2	0,019			1:2	0,895
		1:4	0,168			1:4	0,539			1:4	0,808
		1:1	0,738			1:1	0,005			1:1	0,862
	1:2	1:2	0,006	1:2	0,995	1:2	1,000				
		1:4	0,314	1:4	0,066	1:4	0,998				
		1:0	0,010	1:2	0,019	1:2	0,895				
		1:1	0,006	1:1	0,995	1:1	1,000				
		1:4	0,248	1:4	0,142	1:4	0,996				
		1:4	0,168	1:4	0,539	1:4	0,808				
4.	1:0	1:1	0,314	4.	1:0	1:1	0,066	4.	1:0	1:1	0,998
		1:2	0,248			1:2	0,142			1:2	0,996
		1:1	0,007			1:1	0,002			1:1	0,026
		1:2	0,000			1:2	0,000			1:2	0,000
		1:4	0,002			1:4	0,032			1:4	0,093
		1:1	0,007			1:1	0,002			1:1	0,026
	1:2	1:2	0,020	1:2	0,301	1:2	0,315				
		1:4	0,355	1:4	0,560	1:4	0,911				
		1:0	0,000	1:2	0,000	1:2	0,000				
		1:1	0,020	1:1	0,301	1:1	0,315				
		1:4	0,323	1:4	0,107	1:4	0,776				
		1:4	0,002	1:4	0,032	1:4	0,093				
6.	1:0	1:1	0,355	6.	1:0	1:1	0,560	6.	1:0	1:1	0,911
		1:2	0,323			1:2	0,107			1:2	0,776
		1:1	0,939			1:1	0,000			1:1	0,306
		1:2	0,028			1:2	0,484			1:2	0,996

Prilog 2; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a Games-Howell				Multiple Comparisons ^a Games-Howell				Multiple Comparisons ^a Games-Howell			
A) 5mM glukoza			Sig.	B) 10mM glukoza			Sig.	C) 20mM glukoza			Sig.
Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK			Dan	Molarni odnos HSA:SK		
6.	1:1	1:4	0,005	6.	1:1	1:4	0,004	6.	1:1	1:4	0,016
		1:0	0,939			1:0	0,000			1:0	0,306
		1:2	0,334			1:2	0,000			1:2	0,101
		1:4	0,051			1:4	0,999			1:4	0,195
	1:2	1:0	0,028		1:2	1:0	0,484		1:2	1:0	0,996
		1:1	0,334			1:1	0,000			1:1	0,101
		1:4	0,239			1:4	0,008			1:4	0,007
		1:0	0,005			1:0	0,004			1:0	0,016
	1:4	1:1	0,051		1:4	1:1	0,999		1:4	1:1	0,195
		1:2	0,239			1:2	0,008			1:2	0,007
		1:0	0,977			1:0	0,241			1:0	0,001
		1:1	0,977			1:1	0,241			1:1	0,001
7.	1:0	1:1	0,977	7.	1:0	1:1	0,241	7.	1:0	1:1	0,001
		1:2	0,002			1:2	0,689			1:2	0,006
		1:4	0,000			1:4	0,001			1:4	0,000
		1:0	0,977			1:0	0,241			1:0	0,001
	1:1	1:0	0,001		1:1	1:0	0,493		1:1	1:0	0,104
		1:2	0,000			1:2	0,139			1:2	0,002
		1:4	0,002			1:4	0,689			1:4	0,006
		1:0	0,001			1:0	0,493			1:0	0,104
	1:2	1:0	0,005		1:2	1:0	0,000		1:2	1:0	0,036
		1:1	0,000			1:1	0,001			1:1	0,000
		1:4	0,000			1:4	0,139			1:4	0,002
		1:0	0,005			1:0	0,000			1:0	0,036
	1:4	1:0	0,034		1:4	1:0	0,016		1:4	1:0	0,002
		1:1	0,001			1:1	0,002			1:1	0,000
		1:2	0,000			1:2	0,000			1:2	0,000
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,000
10.	1:0	1:1	0,034	10.	1:0	1:1	0,016	10.	1:0	1:1	0,002
		1:2	0,001			1:2	0,002			1:2	0,000
		1:4	0,000			1:4	0,000			1:4	0,000
		1:0	0,034			1:0	0,016			1:0	0,002
	1:1	1:0	0,044		1:1	1:0	0,241		1:1	1:0	0,951
		1:2	0,000			1:2	0,001			1:2	0,951
		1:4	0,001			1:4	0,057			1:4	0,376
		1:0	0,001			1:0	0,000			1:0	0,000
	1:2	1:0	0,000		1:2	1:0	0,001		1:2	1:0	0,236
		1:1	0,000			1:1	0,001			1:1	0,236
		1:4	0,001			1:4	0,057			1:4	0,376
		1:0	0,001			1:0	0,057			1:0	0,376
	1:4	1:0	0,000		1:4	1:0	0,793		1:4	1:0	0,001
		1:1	0,170			1:1	0,967			1:1	0,000
		1:2	0,686			1:2	0,108			1:2	0,001
		1:4	0,000			1:4	0,793			1:4	0,001
14.	1:0	1:1	0,371	14.	1:0	1:1	0,001	14.	1:0	1:1	0,208
		1:2	0,230			1:2	0,000			1:2	0,208
		1:4	0,230			1:4	0,000			1:4	0,657
	1:1	1:0	0,000		1:1	1:0	0,793		1:1	1:0	0,001
		1:2	0,371			1:2	0,001			1:2	0,208
		1:4	0,230			1:4	0,000			1:4	0,657

Prilog 2; Tabela 4. Nastavak tabele

Multiple Comparisons ^a Games-Howell			Multiple Comparisons ^a Games-Howell			Multiple Comparisons ^a Games-Howell		
A) 5mM glukoza		Sig.	B) 10mM glukoza		Sig.	C) 20mM glukoza		Sig.
Dan	Molarni odnos HSA:SK		Dan	Molarni odnos HSA:SK		Dan	Molarni odnos HSA:SK	
1:2	1:0	0,170	1:2	1:0	0,967	1:2	1:0	0,000
	1:1	0,371		1:1	0,001		1:1	0,208
	1:4	0,389		1:4	0,002		1:4	0,999
1:4	1:0	0,686	1:4	1:0	0,108	1:4	1:0	0,001
	1:1	0,230		1:1	0,000		1:1	0,657
	1:2	0,389		1:2	0,002		1:2	0,999

BIOGRAFIJA

Tamara (Nenad, rođ. Uzelac) Zmijanac je rođena 24. oktobra 1990. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Heroj Radmila Šišković“ završila je u Smederevskoj Palanci. Srednju Medicinsku školu „Beograd“ završila je u Beogradu 2009. godine. Osnovne akademske studije, studijski program Profesor hemije, kandidatkinja je upisala 2009 godine na Hemijskom fakultetu u Beogradu, a završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 7,82 i ocenom 10 za završni rad. Po završetku osnovnih, upisuje master studije na studijskom programu Hemija životne sredine na Hemijskom fakultetu u Beogradu i završava ih sledeće, 2015. godine, sa prosečnom ocenom 9,75. Diplomski rada: „Uticaj antipsihotika na reaktivnost albumin-tiolne grupe“ ocenjen je najvišom ocenom. Nakon završenih master studija, u oktobru 2015. godine upisuje doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, smer Biohemija, sa ukupnom prosečnom ocenom 8,14. Na doktorskim studijama je položila svih šest ispita predviđenih planom i programom, svaki sa ocenom 10. Tokom studija učestvovala je u različitim aktivnostima vezanim za promociju nauke. Od marta do maja 2015. godine je radila u osnovnoj školi „Milan Rakić“ u Beogradu. U maju 2015. godine prisustvovala je Školi proteomike – Teorijski i praktični osnovi, održanoj na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2017. do maja 2020. godine radila je kao saradnik u nastavi na teorijskim i eksperimentalnim vežbama na predmetima Biohemija i Biohemija hrane na Poljoprivrednom fakultetu – Univerziteta u Beogradu, a od oktobra 2018. do decembra 2019. godine i kao saradnik u nastavi na teorijskim i eksperimentalnim vežbama na predmetima Toksikološka hemija (460H1) i Toksikološka biohemija (424B1) na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na osnovu odluke Nastavno-naučnog veća (odluka broj 1213/2) Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakultetu, donete na redovnoj sednici održanoj 08.11.2018. godine, Tamara (Uzelac) Zmijanac stekla je zvanje istraživač-pripravnik. Od jula 2020. godine zaposlena je u „Miphem“ laboratoriji na mestu analitičara za instrumentalna ispitivanja, a od januara 2023. godine na mestu rukovodioca odeljenja za instrumentalna ispitivanja. Svakodnevno radi analize iz oblasti kontrole kvaliteta prehrambenih proizvoda i proizvoda namenjenih za ljudsku upotrebu. U okviru svog naučno-istraživačkog rada, kandidatkinja pre svega izučava efekte odabranih atipičnih antipsihotika na antioksidativne sposobnosti humanog serum-albumina. Pored ovoga, zainteresovana je i za ispitivanja uticaja nekih patofizioloških stanja ili suplementacije polifenolima na promenu reaktivnosti i dostupnosti tiolne grupe humanog serum-albumina. Udata je, a 2021. godine ostvarila se i u ulozi majke.

Objavljeni naučni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

M21 – Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima

1. Uzelac, T., Smiljanić, K., Takić, M., Šarac, I., Oggiano, G., Nikolić, M., Jovanović, V. (2024). The thiol group reactivity and the antioxidant property of human serum albumin are controlled by the joint action of fatty acids and glucose binding. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2335. <https://doi.org/10.3390/ijms25042335>
2. Uzelac, T. N., Nikolić-Kokić, A. L., Spasić, S. D., Mačvanin, M. T., Nikolić, M. R., Mandić, L. M., & Jovanović, V. B. (2019). Opposite clozapine and ziprasidone effects on the reactivity of plasma albumin SH-group are the consequence of their different binding properties dependent on protein fatty acids content. *Chemico-Biological Interactions*, 311, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108787>

M64 – *Saopštenja sa skupova od nacionalnog značaja*

1. Tamara N. Uzelac, Vesna B. Jovanović, Ivan D. Pavićević, Jelena M. Aćimović, Ljuba M. Mandić. The influence of antipsychotics on serum albumin thiol group reactivity, 52. Serbian Chemical Society Meeting, May 29-30, 2015, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts p91.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Тамара Змијањац (рођ. Узелац)**

Број индекса **ДБ10/2015**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај везивања антипсихотика клозапина, зипразидона и сертиндола на садржај и реактивност тиолне групе Cys34 хуманог серум-албумина”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 22.09.2025.

Потпис аутора

Zmijanjac Tamara

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутор **Тамара Змијањац (рођ. Узелац)**

Број индекса **ДБ10/2015**

Студијски програм **Биохемија**

Наслов рада: **„Утицај везивања антипсихотика клозапина, зипразидона и сертиндола на садржај и реактивност тиолне групе Cys34 хуманог серум-албумина”**

Ментори **др Милан Николић, ванредни професор Универзитета у Београду – Хемијског факултета и др Весна Јовановић, научни саветник Универзитета у Београду – Хемијског факултета**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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, 22.09.2025.

Змијањас Тамара

Изјава о коришћењу

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

„Утицај везивања антипсихотика клозапина, зипразидона и сертиндола на садржај и реактивност тиолне групе Cys34 хуманог серум-албумина”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 22.09.2025

Потпис аутора

Zvezdana Tashara

Изјава о коришћењу - наставак

1. **Ауторство** - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.