



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Д. Берић

**Испитивање везивања халоперидола за хумани
серумски албумин спектроскопским и методама
молекулског моделовања и интеракције са
одабраним флавоноидима и јонима метала**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jelena D. Berić

**Investigation of haloperidol binding to human serum
albumin by spectroscopic and molecular modeling
methods and interaction with selected flavonoids and
metal ions**

Doctoral disertation

Kragujevac, 2026

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор	
Име и презиме: Јелена Берић	
Датум и место рођења: 22.07.1987., Краљево, Република Србија	
Садашње запослење: Апотекарска установа <i>Filly Farm</i> Велика Плана	
Докторска дисертација	
Наслов: Испитивање везивања халоперидола за хумани серумски албумин спектроскопским и методама молекулског моделовања и интеракције са одабраним флавоноидима и јонима метала	
Број страница: 71	
Број Слика: 33	
Број библиографских података: 150	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): Медицинске науке	
Коментори:	
Проф. др Мирослав Соврић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу;	
Др Емина Мркалић, виши научни сарадник Института за информационе технологије, Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу.	
Број и датум одлуке Већа Универзитета о прихватању теме докторске дисертације:	
Одлука број IV-03-423/19 од 14.06.2023.	

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Jelena Berić
Datum i mesto rođenja: 22.07.1987., Kraljevo, Republika Srbija
Sadašnje zaposlenje: Apotekarska ustanova <i>Filly Farm</i> Velika Plana
Doktorska disertacija
Naslov: Ispitivanje vezivanja haloperidola za humani serumski albumin spektroskopskim i metodama molekulskog modelovanja i interakcije sa odabranim flavonoidima i jonima metala
Broj stranica: 71
Broj Slika: 33
Broj bibliografskih podataka: 150
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Komentori:
Prof dr. Miroslav Sovrlić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu; Dr Emina Mrkalić, viši naučni saradnik Instituta za informacione tehnologije, Kragujevac, Univerziteta u Kragujevcu.
Broj i datum odluke Veća Univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:
Odluka broj IV-03-423/19 od 14.06.2023.

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Jelena Berić
Date and place of birth: 22 July 1987, Kraljevo, Republic of Serbia
Current employment: Filly Farm Pharmacy, Velika Plana, Serbia
Doctoral Dissertation
Title: Investigation of haloperidol binding to human serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods and interaction with selected flavonoids and metal ions
No. of pages: 71
No. of images: 33
No. of bibliographic data: 150
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical Sciences
Co-Mentors:
Prof. Miroslav Sovrlić, Associate Professor at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Dr Emina Mrkalić, Senior Research Associate, Institute for Information Technologies, Kragujevac, University of Kragujevac.
Topic Application Date:
14 December 2022
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Decision No. IV-03-423/19, dated 14 June 2023

Захвалница

Посебну захвалност дугујем својим менторима, проф. др Мирославу Соврлићу и вишем научном сараднику др Емини Мркалић, на несебичној помоћи током израде и писања дисертације. Захваљујем се на разумевању, подршци и корисним саветима.

На крају, бескрајна захвалност мојој породици на великој подршци током свих ових година.

Јелена Д. Берић

САЖЕТАК

Хумани серумски албумин (HSA) има кључну улогу у транспорту и дистрибуцији лекова, при чему њихово везивање може бити модификовано различитим ендогеним и екзогеним лигандима. Халоперидол (HPD), типични антипсихотик широке терапијске примене, се у високом степену везује за HSA, при чему промене у степену везивања могу бити од значаја, с обзиром да је фармаколошки активна само слободна фракција лека.

Циљ овог истраживања био је испитивање механизма везивања и карактеризација интеракције HPD са HSA, као и процена утицаја одабраних флавоноида и јона метала на ову интеракцију, применом спектроскопских и *in silico* метода. Резултати флуоресцентне спектроскопије су показали да се HPD стабилно и специфично везује за HSA, превасходно на Судловом месту I, уз доминантан механизам статичког гашења флуоресценције. Термодинамички параметри указују на спонтану природу интеракције и стабилност формираног комплекса, при чему у стабилизацији учествују различите интермолекулске силе.

Присуство јона метала утиче на HSA-HPD интеракцију, при чему је показано да јони земноалкалних метала (Ca^{2+} , Mg^{2+}) смањују афинитет везивања, док јони прелазних метала (Cu^{2+} , Fe^{3+}) не утичу афинитет везивања уз испољавање благог стабилизујућег ефекта комплекса. Флавоноиди (кверцетин, катехин и диосмин) се везују за исто везивно место на HSA као и HPD. Утврђено је да делују као компетитивни лиганди, што доводи до смањења афинитета везивања HPD за HSA, при чему је кверцетин испољио најизраженији утицај на константу везивања.

Молекулски докинг и молекулска динамика потврдили су експерименталне резултате и омогућили детаљнији увид у механизме интеракције и стабилност комплекса. Регресионом анализом молекулских дескриптора развијен је и валидиран предиктивни модел који указује да липофилност (AlogP) и pK_a представљају кључне факторе везивања HPD за HSA.

На основу добијених резултата може се закључити да је интеракција HSA-HPD процес подложен утицају различитих фактора, што се потенцијално може одразити на фармакокинетичке параметре и терапијски одговор. Интеграција спектроскопских и *in silico* метода примењених у овом истраживању погодна је за проучавање интеракција лек-протеин и може се применити и на друге фармаколошки активне супстанце.

Кључне речи: халоперидол; хумани серумски албумин; интеракција лек-протеин; флавоноиди; јони метала; флуоресцентна спектроскопија; молекулски докинг; молекулска динамика; молекулски дескриптори.

ABSTRACT

Human serum albumin (HSA), the most abundant plasma protein, plays a crucial role in the transport and distribution of drugs, while its binding capacity can be modulated by various endogenous and exogenous ligands. Haloperidol (HPD), a typical antipsychotic with broad therapeutic use, exhibits a high degree of binding to HSA, and variations in binding may be of importance, given that only the free fraction of the drug is pharmacologically active.

The aim of this study was to investigate the binding mechanisms and characterize the interaction between HPD and HSA, as well as to evaluate the influence of selected flavonoids and metal ions on this interaction using spectroscopic and *in silico* methods. Fluorescence spectroscopy revealed that HPD binds stably and specifically to HSA, predominantly at Sudlow site I, with a dominant static quenching mechanism. Thermodynamic parameters indicated that the interaction is spontaneous and that the formed complex is stable, with various intermolecular forces contributing to its stabilization.

The presence of metal ions was found to influence the HSA-HPD interaction, with alkaline earth metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}) decreasing binding affinity, while transition metal ions (Cu^{2+} , Fe^{3+}) showed no effect on binding affinity, but exhibited a mild stabilizing effect on the complex. Flavonoids (quercetin, catechin, and diosmin) were shown to bind to the same binding site on HSA as HPD. They act as competitive ligands, leading to a decrease in the binding affinity of HPD, with quercetin exhibiting the most pronounced effect on the binding constant.

Molecular docking and molecular dynamics simulations confirmed the experimental findings and provided further insight into the interaction mechanisms and stability of the complexes. Regression analysis of molecular descriptors enabled the development and validation of a predictive model indicating that lipophilicity (AlogP) and pKa represent key determinants of HPD binding to HSA.

The results of this study indicate that the HSA-HPD interaction is a process influenced by multiple factors, which may affect pharmacokinetic behavior and therapeutic response. The integration of spectroscopic and *in silico* methods applied in this study represents a suitable approach for investigating drug-protein interactions and may be extended to other pharmacologically active compounds.

Keywords: haloperidol; human serum albumin; drug-protein interactions; flavonoids; metal ions; fluorescence spectroscopy; molecular docking; molecular dynamics; molecular descriptors.

Садржај

1.	УВОД	1
1.1.	Везивање лекова за протеине плазме и утицај на фармакокинетику и терапијски одговор	1
1.1.1.	Модели грађења протеин-лиганд комплекса	2
1.1.2.	Реверзибилно и иререверзибилно везивање лекова за протеине	3
1.1.3.	Кинетика реверзибилног везивања лека за протеин	5
1.1.4.	Интеракција лекова са протеинима и ћелијским компонентама крвне плазме	5
1.2.	Хумани серумски албумин (HSA)	7
1.2.1.	Синтеза хуманог серумског албумина	7
1.2.2.	Структура хуманог серумског албумина	8
1.2.3.	Везивна места хуманог серумског албумина	9
1.2.3.1.	Судлово место I	10
1.2.3.2.	Судлово место II	10
1.2.3.3.	Везивна места за јоне метала	11
1.2.3.4.	Везивна места за масне киселине	11
1.2.4.	Физиолошке улоге хуманог серумског албумина	12
1.3.	Истовремено везивање (<i>cobinding</i>) два лиганда за HSA	13
1.4.	Експерименталне и теоријске методе у испитивању интеракција лиганда и протеина	15
1.4.1.	Флуоресцентна спектроскопија у испитивању лиганд-HSA интеракција	16
1.5.	Халоперидол	17
1.5.1.	Фармакокинетика халоперидола	18
1.5.2.	Дозирање халоперидола и клинички одговор пацијената	19
1.5.3.	Праћење концентрације халоперидола у серуму	19
1.6.	Флавоноиди и њихова интеракција са HSA	19
2.	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	22
2.1.	Циљеви истраживања	22
2.2.	Хипотезе истраживања	22
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	24
3.1.	Врста студије	24
3.2.	Хемикалије и реагенси	24
3.3.	Емисиона и апсорпциона спектроскопија	24

3.4. Интеракције HPD и HSA.....	25
3.5. Одређивање термодинамичких параметара између HPD и HSA.....	25
3.6. Одређивање места везивања HPD на HSA.....	25
3.7. Утицај јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} на HSA-HPD интеракцију.....	25
3.8. Утицај одабраних флавоноида на HSA-HPD интеракцију.....	26
3.9. Испитивање HSA-HPD интеракција применом молекулског докинга.....	26
3.10. Утицај дескриптора физичко-хемијских особина HPD (logP, Mw, Vol и pKa) на степен његовог везивања за протеине плазме.....	26
4. РЕЗУЛТАТИ.....	28
4.1. Интеракције халоперидола и хуманог серумског албумина.....	28
4.1.1. Емисиони спектри HSA у присуству HPD.....	28
4.1.2. Механизам интеракције између HPD и HSA.....	29
4.1.3. Одређивање константи и места везивања између HPD и HSA.....	31
4.1.4. Одређивање термодинамичких параметара између HPD и HSA.....	32
4.1.5. Одређивање афинитета и начина везивања HPD за HSA.....	33
4.1.6. Апсорпциона спектрофотометрија.....	34
4.2. Идентификација везујућег/везујућих места HPD на HSA.....	36
4.3. Интеракције халоперидола и хуманог серумског албумина испитане молекулским докингом.....	37
4.4. Испитивање утицаја јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} на HSA-HPD интеракцију.....	40
4.4.1. Емисиони спектри система HSA-HPD у присуству јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}	40
4.4.2. Механизам интеракције система HSA-HPD у присуству јона метала Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}	41
4.4.3. Одређивање константи и места везивања система HSA-HPD у присуству Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} јона	41
4.5. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију.....	42
4.5.1. Емисиони спектри и механизам интеракције између HPD и HSA у присуству одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO)	42
4.5.2. Одређивање константи и места везивања између HPD и HSA у присуству флавоноида	44
4.6. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију компјутерским методама	46
4.6.1. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију молекулским докингом.....	46

4.6.2. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију молекулском динамиком.....	48
4.6.2.1. Анализа средње квадратне девијације (RMSD).....	48
4.6.2.2. Анализа флукуације средње квадратне вредности (RMSF).....	49
4.6.2.3. Анализа радијуса гирације (Rg).....	50
4.6.2.4. Анализа броја водоничних веза (nHB).....	50
4.6.2.5. Конкурентно везивање и улога хидрофобних интеракција.....	51
4.7. Испитивање утицаја дескриптора физичко-хемијских особина HPD на степен његовог везивања за HSA	52
5. ДИСКУСИЈА.....	57
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	62
7. ЛИТЕРАТУРА	63
8. ПРИЛОЗИ	72

1. УВОД

1.1. Везивање лекова за протеине плазме и утицај на фармакокинетику и терапијски одговор

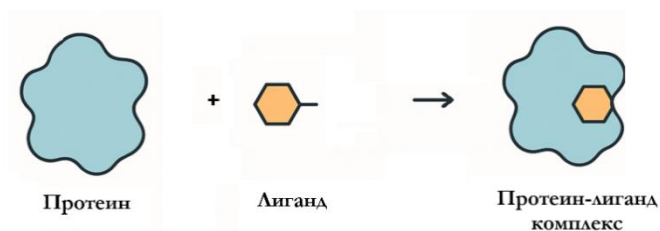
Интеракција и везивање лекова са протеинима у крви представља кључни аспект у разумевању фармакокинетики лекова, јер директно утиче на дистрибуцију, ефикасност и потенцијална нежељена дејства лекова. Транспорт лекова у организму је активан процес који укључује специфична и неспецифична везивања лекова за протеине, при чему највећи значај имају серумски албумин и α_1 -кисели гликопротеин (1,2). Поред значаја у транспорту, ови протеини имају круцијалну улогу у регулисању доступности слободне фракције лека, која се може дистрибуирати у целом организму, ступити у интеракцију са циљним молекулима и испољити фармаколошки ефекат. Везивање лекова за протеине је најчешће реверзибилно, што подразумева да лек може напустити везујуће место и постати слободна фракција. Процес реверзибилног везивања лекова за протеине зависи од различитих фактора који укључују присуство и концентрацију других молекула у циркулацији, као што су масне киселине, други лекови, ендогени и екзогени лиганди, који могу заузети исто место везивања. Такође, на удео слободне фракције лека у организму, чиме се мења фармаколошки одговор, могу утицати различити физиолошки услови као што су старост, болести бубрега и јетре (3).

Различити физиолошки фактори и болести могу довести до промена у концентрацији протеина за које се везују лекови, што може утицати на однос слободне и везане фракције лека у организму а последично на њихов терапеутски ефекат и потенцијална нежељена дејства. На пример, код пацијената са бубрежним обољењима попут хроничне бубрежне инсуфицијенције, нефротског синдрома и уремије постоји смањено везивање лекова за албумин. Код нефротског синдрома, концентрација албумина је снижена и износи 7-25 g/L, док нормалне концентрације код одраслих износе $42,0 \pm 3,5$ g/L (4). Акумулација ендогених инхибитора или карбамилисање албумина може утицати на везивање лекова. Сматра се да ендогени инхибитори, као што су уремични токсини или масне киселине, углавном доприносе смањеном везивању лекова за албумин (5). У људском серуму идентификовано је неколико анионских уремичних токсина који редукују капацитет везивања лекова за албумин: индоксил-сулфат, хипурина киселина, индол-ацетат и 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионска киселина (6). Смањено везивање лекова код болести јетре може бити последица смањене концентрације албумина, накопљања ендогених инхибитора (нпр. билирубин) или промене у структури самог албумина (7).

Познавање начина и механизма везивања лекова за протеине доприноси разумевању различитих терапијских аспеката. На пример, код лекова са уским терапијским индексом, као што су антиконвулзанти потребно је пажљиво праћење нивоа лека у крви (8). Такође, постојање лек-лек интеракција или лек-болест интеракција може довести до повећањег или смањењег терапеутског ефекта. У таквим стањима, редовно праћење терапије и прилагођавање дозе су неопходни за избегавање нежељених ефеката и постизање оптималног терапијског одговора.

1.1.1. Модели грађења протеин-лиганд комплекса

Интеракције протеина и лиганда су веома важни биолошки процеси којима се регулишу различите функције у организму. Лиганди могу бити мали органски молекули, лекови, супстрати или ко-фактори који се везују за специфичну локацију на протеину формирајући комплекс протеина и лиганда (Слика 1)



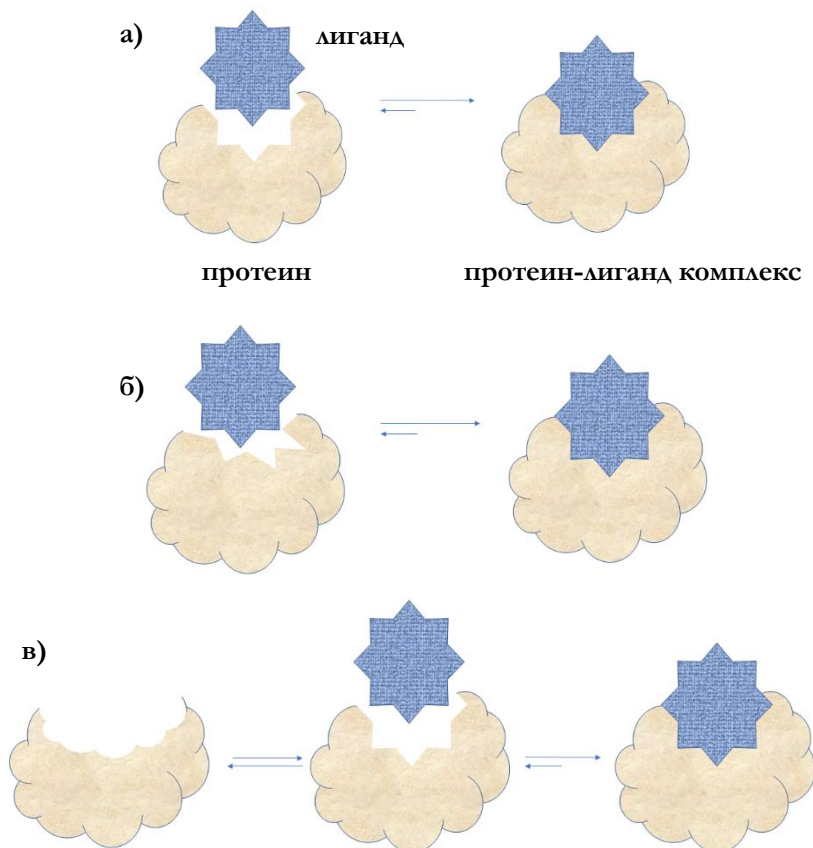
Слика 1. Формирање протеин-лиганд комплекса

Да би дошло до процеса везивања мора постојати комплементарност у облику и хемијским особинама лиганда и везујућег протеинског места (9). Почетна интеракција омогућава позиционирање лиганда у адекватан положај који омогућава формирање различитих веза и интеракција, којима се стабилизује протеин-лиганд комплекс.

Три главна модела којима се објашњавају механизми интеракције између протеина и лиганда су модел кључ-брава, модел индукованог прилагођавања и модел конформационе селекције (Слика 2). Ови модели представљају различите теоријске приступе који се могу примењивати зависно од особина конкретног протеина и лиганда и нужно не искључују један у односу на други (10).

Модел *кључ-брава* је први пут предложен 1894. године од стране немачког хемичара Емила Фишера за опис специфичности ензима према супстрату (11). Основни принцип овог модела јесте „кртост молекула“, односно да и протеин и лиганд имају унапред структурисане и идеално комплементарне површине за везивање (Слика 2а). Лиганд мора бити одговарајућег облика и величине (*кључ*) да би се сместио у везивни домен протеина (*брава*). Овим моделом се објашњава висока специфичност бројних ензимских реакција. Међутим, овај модел има ограничења јер не може да објасни експерименталне налазе да протеин може да веже лиганд и у случају када њихови почетни облици нису добро усклађени, односно да многи протеини могу везивати лиганде иако њихови почетни облици нису у потпуности комплементарни, што указује да молекули поседују одређени степен флексибилности. Амерички биохемичар Даниел Кошланд је предложио 1958. године модел индукованог прилагођавања како би објаснио флексибилност у интеракцији. По овом моделу, место везивања протеина је флексибилно и приликом контакта са лигандом долази до конформационих промена, чиме се структура активног места прилагођава лиганду (Слика 2б). На овај начин, протеин „мења облик“ и омогућава стабилно и специфично везивање (12). Бројни експериментални подаци показују да након везивања лиганда може доћи до промена у структури протена, па је овај модел посебно погодан за објашњавање таквих феномена (13). Иако је реалнији од модела кључ-брава, главно ограничење овог модела је претпоставка да протеин у одсуству лиганда постоји у једном доминантном, стабилном конформационом облику. Савремена истраживања показују да су протеини динамичке молекулске структуре које се налазе у динамичком спектру конформационих стања/подстања која коегзистирају у равнотежи, са различитим расподелама

популација. Модел конформационе селекције полази од тога да нативно стање протеина не постоји као једна крута конформација, већ као огроман ансамбл конформационих стања (*free energy landscape*) (14). Лиганд се може селективно везати за најпогодније конформационо стање/подстање чиме се равнотежа помера ка том стабилизованом стању (Слика 2в). Другим речима, протеин и у одсуству лиганда може, са одређеном вероватноћом, усвојити облик идентичан оном који има у комплексу са лигандом. Овај модел пружа најсвеобухватније објашњење, јер у обзир узима урођену динамику протеинских структура.



Слика 2. Шематски прикази три модела везивања протеина и лиганда: (а) Кључ-брава; (б) Индуковано прилагођавање (уклапање) и (в) Конформациона селекција.

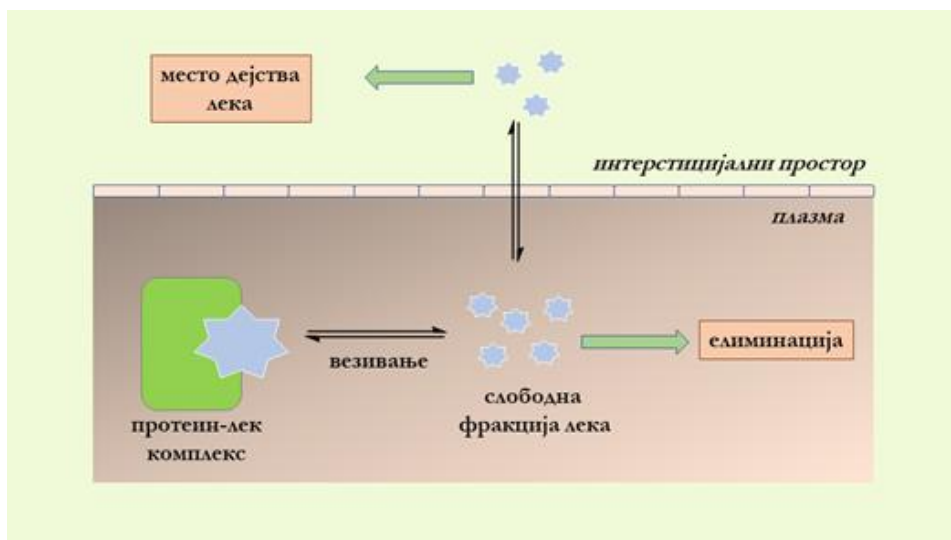
Предложена три модела везивања представљају еволуцију у разумевању интеракција протеина и лиганда. У пракси се сва три механизма могу преклапати, а избор модела зависи од конкретног система који се проучава. Савремена биофизичка истраживања показују да је конформациона селекција најдоминантнији механизам интеракције, прилагођавање може играти значајну улогу у стабилизацији коначног комплекса.

1.1.2. Реверзибилно и иреверзибилно везивање лекова за протеине

Многи лекови ступају у интеракцију са протеинима плазме, ткива или са другим макромолекулама, попут меланина и DNK, формирајући комплекс лек-макромокул. Формирање комплекса лек-протеин често се назива везивање лек-протеин. Лек-протеин везивање може бити реверзибилан или иреверзибилан процес (15).

До пререверзибилног везивања протеина и лека најчешће долази услед хемијске активације лека, који се затим снажно везује за протеин или макромолекул ковалентном хемијском везом. Иреверзибилно (неповратно) везивање лека (нпр. интеракција неких цитотоксичних лекова са DNK) се може сматрати еквивалентом елиминацији, јер је онемогућено ослобађање лека и улазак у циркулацију (16). Одређена ковалентна везивања могу бити споро реверзибилна, као што је растварање дисулфидних мостова које формира каптоприл са ангиотензин-конвертујућим ензимом (ACE) и са протеинима плазме (17). Код ковалентног везивања не долази до брзе дисоцијације као одговор на смањење концентрације слободног лека, и такво везивање представља споро уравнотежујући резервоар лека. Иреверзибилно везивање лека објашњава одређене врсте токсичности лекова које се могу јавити током дужег временског периода, као у случају хемијске канцерогенезе, или у релативно кратком временском периоду, као у случају лекова који формирају реактивне хемијске интермедијере. На пример, хепатотоксичност високих доза ацетаминофена је последица формирања реактивних метаболитних интермедијара који интерагују са протеинима јетре (18).

Највећи број лекова са протеинима гради комплексе реверзибилним процесом. Реверзибилно везивање лека за протеине подразумева да се лек везује за протеин слабијим хемијским везама, као што су водоничне везе или ван дер Валсове силе (19). Аминокиселине које чине ланац протеина имају хидроксил, карбоксил или друга места доступна за реверзибилне интеракције лекова. Реверзибилно везивање лека за протеине је феномен који може утицати на дистрибуцију, биорасположивост и фармаколошку активност лека. Лек везан за протеин представља комплекс велике молекулске масе ограничене моћи транспорта који, због својих димензија и стабилности није у могућности да пролази кроз ћелијске или капиларне мембране. (Слика 3).



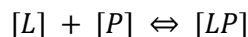
Слика 3. Везивање лекова за протеине плазме и расподела слободне фракције

У везаном облику, дистрибуција лека је ограничена на васкуларни компартман чиме се онемогућава приступ рецепторима лоцираним у ткивима и испољавање дејства. Са друге стране, невезана (слободна) фракција лека може слободно дифундовати у екстрацелуларни простор, ступати у интеракцију са рецепторима и подлежати процесима метаболизма и елиминације, па је стога једино таква фракција лека фармаколошки активна (20,21). Равнотежа између слободне и везане фракције одређује терапијске ефекте лека, али и безбедносни профил, па је феномен

везивања лека за протеине од круцијалног значаја у клиничкој примени и оптимизацији дозирања лекова.

1.1.3. Кинетика реверзибилног везивања лека за протеин

Кинетика реверзибилног везивања лека за протеин са једним везујућим местом може се описати моделом равнотеже везивања, при чему се у стању равнотеже брзина асоцијације лека (L) и протеина (P) изједначава са брзином дисоцијације комплекса лек-протеин (PL).



На основу закона о дејству маса из дате равнотеже се могу изразити константе асоцијације (K_a) и дисоцијације (K_d) (22). Константа асоцијације означава меру афинитета лека према протеину. Може се дефинисати као однос концентрације формираног комплекса лек-протеин и производа концентрација:

$$K_a = [LP]/[L][P]$$

Високе вредности K_a указују на снажан афинитет везивања лека за протеин, односно да се највећа количина лека у циркулацији налази у облику комплекса лек-протеин и са мањим уделом слободне фракције лека (23). Са друге стране, константа дисоцијације описује нестабилност комплекса, меру афинитета комплекса да се распадне на слободан лек и протеин:

$$K_d = [L][P]/[LP]$$

Високе K_d вредности указују на слаб афинитет везивања лека и протеина, док ниже вредности указују на формирање стабилног лек-протеин комплекса и минималну дисоцијацију.

Лекови са високим K_a углавном постоје у облику комплекса и имају мањи удео фармаколошки активне слободне фракције. Однос између константи:

$$K_d = 1/K_a$$

повезује стабилност комплекса и јачину асоцијације чиме и одређује садржај слободне фракција лека која ступа у интеракцију са рецепторима, испољава фармаколошке ефекте и подлеже процесима метаболизма и елиминације. Лекови са високим K_a и ниским K_d вредностима (висок афинитет) се дуже задржавају у циркулацији и могу бити подложни интеракцијама са лековима који се везују за исте протеине. Са друге стране, код лекова са ниским K_a и високим K_d вредностима (низак афинитет) заступљенија је слободна фракција у циркулацији, бржи клиренс и краће трајање фармаколошког дејства (23). Овај модел представља основу динамике везивања лека за плазма протеине и разумевања основног фактора који утиче на дистрибуцију, биорасположивост и фармаколошке ефекте лека.

1.1.4. Интеракција лекова са протеинима и ћелијским компонентама крвне плазме

Крв је двофазни систем који чине крвна плазма и ћелијски елементи. Течна компонента крви је плазма у којој су распоређени и суспендовани еритроцити, леукоцити и тромбоцити. Плазма чини ~55% укупне запремине крви и представља раствор неорганских (електролити) и органских (протеини, липиди, угљени хидрати) једињења са око 90-92% воде. Протеини плазме (приближно 7-8%) су у сталној динамичкој равнотежи са протеинима који се налазе у интерстицијалној течности, при чему је њихова концентрација у интерстицијуму знатно нижа (24). Постоји више од 100 различитих врста протеина плазме од којих су најзначајнији албумин,

глобулини (α , β и γ -глобулини), фибриноген и остали. Испољавају различите физиолошке улоге, укључујући одржавање онкотског притиска, транспорт лекова ендогених молекула, регулација имунолошких процеса и коагулације.

Албумин је протеин молекулске масе 65000-69000 Да који се синтетише у јетри и представља главну компоненту плазма протеина одговорних за реверзибилно везивање лекова (25). У организму се албумин распоређује у плазми и у ванћелијским течностима коже, мишића и различитих других ткива. Концентрација албумина у интерстицијалној течности износи око 60% у односу на плазму. Полуживот елиминације албумина је 17-18 дана. У нормалним физиолошким условима, концентрација албумина се одржава на релативно константном нивоу од 3,5-5,5% (маса/запремина) или 4-5 mg/dL. Албумин је одговоран за одржавање осмотског притиска крви и за транспорт ендогених и егзогених супстанци (26). Као транспортни протеин за ендogene супстанце, албумин формира комплексе са слободним масним киселинама, билирубином, различитим хормонима (као што су кортизон, алдостерон и тироксин), триптофаном и другим једињењима (27). Слабо кисели лекови, као што су салицилати, фенилбутазон и пеницилини, у великој мери се везују за албумин. Међутим, јачина везивања лека разликује се од лека до лека.

α_1 -кисели гликопротеин (орозомукоид, AGP) је глобулин молекулске масе око 44000 Да (25). Један је од главних протеина акутне инфламаторне фазе у организму и има кључну улогу у одговору организма на различите врсте стреса, укључујући инфекције, трауме и инфламаторне процесе. Концентрација AGP-а код здравих особа у плазми је ниска (0,4-1%), док код упалних и инфективних болести долази до пораста његове концентрације. Транспортна улога α_1 -киселог гликопротеина се огледа у могућности везивања базних (липофилних) лекова као што су: β -блокатори (пропранолол), антидепресиви (имипрамин, дезипрамин, амитриптилин), антиаритмици/локални анестетици (лидокаин, пропафенон), опиоиди (морфин, метадон, фентанил) и други (25, 28, 29). AGP је високо гликозилован протеин, са више олигосахаридних ланаца. Различити патолошки процеси (инфекције, упале, малигне болести) могу довести до промене у структури олигосахаридних ланаца, што може модификовати афинитет везивања лекова. Ова појава је од посебног значаја код лекова са уском терапијском ширином (лидокаин, пропафенон, циклоспорин) и високим афинитетом за везивање са AGP, где промене у гликолизацији могу довести до значајних варијација у погледу испољавања терапијских ефеката или токсичности, што је један од разлога препоручивања *Therapeutic Drug Monitoring*-а (TDM) код критично оболелих пацијената (30).

Липопротеини су макромолекуларни комплекси са унутрашњим хидрофобним (липидним) делом који је окружен амфипатским омотачем изграђеним од хидрофобних и хидрофилних компоненти (аполипопротеини). На основу величине, састава липида и аполипопротеина, плазма липопротеини се могу поделити на хиломикроне, липопротеине врло мале, интермедијарне и мале густине (VLDL, IDL, LDL) и липопротеине велике густине (HDL) (31). Њихова основна улога се огледа у транспорту липида и осталих хидрофобних молекула у циркулацији. Поред способности везивања масних киселина и липида, хидрофобна матрица липопротеина има способност везивања лекова нерастворних у води, што може утицати на дистрибуцију лека, количину слободне фракције а самим тим и на терапеутске ефекте. На пример, циклоспорин А (имуносупресив) се у великој мери везује за LDL и HDL липопротеине, што утиче на његову дистрибуцију у организму (31). Амфотерицин Б може градити комплексе са липопротеинима, чиме се смањује слободна (токсична) количина лека (33). Цитостатици, као што је паклитаксел испољавају афинитете према липопротеинима, што може утицати на њихову биодоступност (34). Познавање интеракција лекова са

липопротеинима је клинички значајно, јер у стањима, попут хиперлипидемије и дијабетеса, може доћи до измене састава и количине липопротеина, што директно може утицати на дистрибуцију и потенцијалну токсичност лекова.

Еритроцити или црвена крвна зрнца, поред транспорта O_2 и CO_2 могу везивати различите ендogene и екзогене лиганде. Велика мембранска површина ($\sim 163 \mu m^2$) и биконкавни облик еритроцита обезбеђују велики простор за интеракцију са лигандима (35). Слободни липофилни лиганди, процесом пасивне дифузије, једноставно пролазе липидну мембрану и пенетрирају у цитоплазму еритроцита. Са друге стране, присуство различитих трансмембранских транспортера, као што су аквапорини, *GLUT1* (глюкозни транспортер) и *ENT1* (*equilibrative nucleoside transporter 1*) омогућава пролазак хидрофилних молекула у еритроците (36). Унутар еритроцита лиганди могу ступати у интеракцију са хемоглобином, најзначајнијим везивним протеином еритроцита, као и са ензимима, попут карбонске анхидразе и имунофилина. На пример, имуносупресив циклоспорин се специфично везује за еритроцитну пептидил пролил *cis-trans* изомеразу (циклофилин А, FKBP12). Из тог разлога, приликом спровођења TDM-а овог имуносупресива, концентрација се мора мерити у пуној крви а не у серуму или плазми (37). Лекови попут барбитурата, салицилане киселине, дигоксина и његових деривата се везују за хемоглобин при чему могу довести до алостеричних промена и измене афинитета за везивање кисеоника (38).

1.2. Хумани серумски албумин (HSA)

Хумани серумски албумин (HSA) је мономерни мултидоменски макромолекул и најзаступљенији протеин крвне плазме. Од великог је значаја у одржавању колоидно-осмотског притиска плазме и за регулацију дистрибуције телесних течности. Такође, HSA има висок афинитет за везивање ендогених и екзогених лиганада, главни је носач масних киселина у организму, утиче на фармакокинетiku бројних лекова, један је од најважнијих антиоксиданаса крвне плазме и има ензимска својства (40, 41). HSA је битан биомаркер за многе болести као што су карциноми, реуматoidни артритис, исхемија, гојазност у постменопаузи и у болестима које захтевају сталну контролу гликемије (3). Може се користити и за лечење неких болести попут хиповолемије, шока, опекотина, крварења, хемодијализе, акутне инсуфицијенције јетре, акутног респираторног дистрес синдрома и хипоалбуминемије (42, 43). У крвној плазми, HSA се налази у концентрацији од 35-50 mg/ml, његово време полуделиминације је од 15-20 дана. Присутан је и у екстраваскуларном и интраваскуларном простору. Велики број лекова након примене подлеже брзој разградњи, чиме се може смањити или изостати њихов ефекат. Међутим, HSA као главни транспортер, захваљујући способности да веже молекуле лекова, може да повећа њихов полуживот и да спречи да дође до њихове деградације. На тај начин регулише биодоступност лекова и биоактивних молекула, и користи се као модел за проучавање интеракција са биоактивним молекулима (44).

1.2.1. Синтеза хуманог серумског албумина

HSA се синтетише у хепатоцитима, пре свега као препроалбумин који садржи 609 аминокиселина. Првих 18 аминокиселина са аминок краја препроалбумина чине сигналну секвенцу, коју препознаје и везује SRP протеин (*signal recognition particle*), при чему долази до формирања тзв. хидрофобног цепа. Тако везани SRP протеин и сигнална секвенца везују се за рецептор који се налази на ендоплазматском ретикулуму. На тај начин се полипептидни ланац,

рибозоми и молекул *i*RNK везују за ендоплазматски ретикулум (45). Када се синтетише од 50-75 аминокиселинских остатака у полипептидном ланцу, SRP протеин се уклања, а рибозоми се везују за површину мембране ендоплазматског ретикулума преко рецептора за рибозоме при чему долази до транслокације полипептидног ланца кроз мембрану ендоплазматског ретикулума. На унутрашњој страни мембране ендоплазматског ретикулума налази се сигнална пептидаза која препознаје сигналну секвенцу са полипептидног ланца и одсеца је, при чему настаје молекул проалбумина (3). На аминок крају молекула проалбумина налази се 6 аминокиселина (3 базне и 3 хидрофобне аминокиселине). За полипептидни ланац молекула проалбумина везују се шаперони, који омогућавају његово увијање и формирање нативне конформације, уз истовремено стварање дисулфидних мостова које формирају аминокиселине са аминок краја овог ланца. Након тога, молекул проалбумина се уз помоћ везикула транспортује у Голџијев апарат, где се наставља процес синтезе. У Голџијевом апарату долази такође до уклањања аминокиселинских остатака са полипептидног ланца при чему као крајњи производ настаје зрели хумани серумски албумин. Зрели HSA састоји се од 585 аминокиселинских остатака и представља негликолизирани протеин молекулске масе 66400 Da. Током дана, код одрасле здраве особе, синтетише се око 15 грама HSA, а одређена количина се складишти у хепатоцитима. На процес синтезе HSA утиче присуство одређених аминокиселина у организму, посебно присуство триптофана, тако да се његова синтеза може повећати након obroка (46).

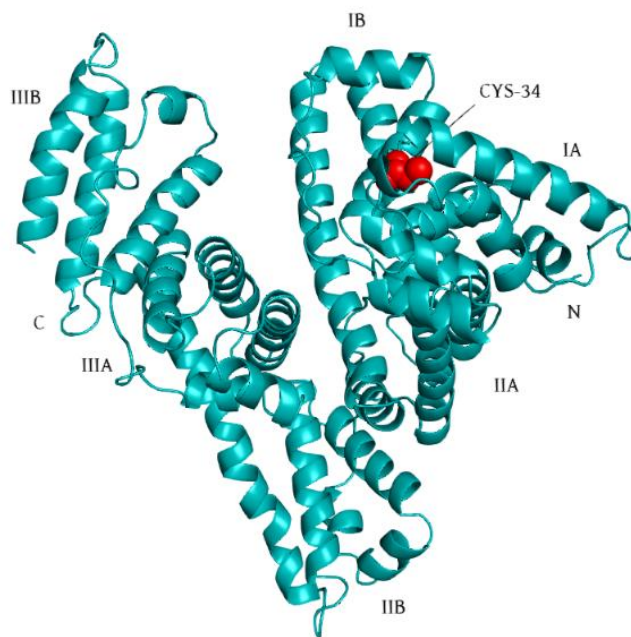
1.2.2. Структура хуманог серумског албумина

Примарна структура HSA садржи 585 аминокиселина, и то углавном аминокиселине са наелектрисаним бочним низом, као што су глутаминска и аспарагинска киселина, аргинин и лизин (47). Због овакве структуре при неутралној рН вредности долази до јонизације бочних остатака аминокиселина, што молекул албумина чини лако растворљивим у води. HSA у својој примарној структури садржи 35 цистеина (Cys), од којих чак 34 учествује у формирању дисулфидних веза док један цистеин остаје неспарен (Cys34). Неспарени Cys34 цистеински остатак садржи слободну тиолну групу која делује као главни антиоксиданс у крвној плазми (48). Оксидација Cys34 остатка означава албумин као осетљив биомаркер за оксидативни стрес, а његово редокс стање (меркапталбумин, немеркапталбумин или немеркапталбумин 2) одражава нивое реактивних врста кисеоника у телу.

Секундарну структуру HSA карактерише висок садржај α -хеликса (65-70%), који доприноси његовој еластичности и стабилности. За разлику од многих других протеина, албумин не гради стабилне β -плочасте структуре, па је присуство β -листова (*sheet*) практично занемарљиво (<1%). β -окретаји и насумични (*coil*) сегменти (~30-35%) повезују α -хеликсе и омогућавају формирање три велика домена HSA градећи компактну, асиметричну и срцолику структуру димензија $\sim 80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$ (49). Три главна сегмента HSA се означавају као домен I (N-терминални део, 1-195 АК), домен II (196-383 АК) и домен III (C-терминални део, 384-585 АК). Сваки домен има по два субдомена (IA, IB, IIA, IIB, IIIA и IIIB), доминантно изграђених од α -хеликса (Слика 4). Субдомени су флексибилни модули и садрже хидрофобне цеповете који представљају везивна места за различите ендogene и екзогене лиганде. Испољавају особину прилагођавања конформације у зависности од везаног лиганда. Терцијарна структура HSA стабилизована је ковалентним дисулфидним везама, водоничним везама, хидрофобним и електростатичним интеракцијама као и Ван дер Валсовим силама (50). Дисулфидне везе (дисулфидни мостови, -S-S-), којих има 17, граде се између α -хеликса у свим доменима и кључне су за стабилност и отпорност HSA на денатурацију. У одржавању глобуларног, срцоликог

облика од кључног значаја су водоничне везе које се граде и између домена и субдомена повезујући аминокиселине унутар α -хеликса. Између наелектрисаних бочних група аминокиселина (нпр. Lys-Asp, Arg-Glu) долази до електростатичких (јонских) интеракција, које површински стабилизују протеин и од значаја су за интеракцију са окружењем (51). Између блиских атома у структури HSA долази до Ван дер Валсових интеракција. Иако појединачно слабе, ове интеракције збирно значајно стабилизују структуру HSA.

У структури HSA налази се велики број киселих и базних аминокиселина, тако да при промени pH вредности долази до промене његове основне структуре. При pH вредностима од 4,5-8 он заузима тзв. неутралну или Н конформацију, а при вредностима pH испод 4,5 структура се постепено разматава при чему заузима тзв. F конформацију (*Fast*) за коју је карактеристично да има мању растворљивост и већи вискозитет од основне структуре уз нарушавање структура α -хеликса. Оваква структура одржава се у опсегу pH вредности од 3,5-4,5. Снижавањем pH вредности испод 3,5 долази до даљег разматавања при чему она заузима тзв. E конформацију (*Extended*). У веома киселој средини, на pH вредности око 2.5 и нижој долази до потпуног разматавања молекула HSA (52). Са друге стране у базној средини, при pH вредностима од 7-9 долази до повећања флексибилности структуре и настаје В конформација (*Basic*). Повећањем pH вредности преко 9 настаје А конформација (*Aged*), која је доста стабилна и постојана и овај процес је претериван, односно ова конформација остаје стабилна и при промени pH вредности. У базној средини долази до процеса изомеризације, при чему слободна -SH група дисосује и настаје њен дисосовани облик -S који катализује реакцију измене дисулфидних мостова (53).



Слика 4. Кристална структура HSA са положајем Cys34 цистеинског остатка.

1.2.3. Везивна места хуманог серумског албумина

Захваљујући својој високо флексибилној структури и присуству три домена, HSA има способност да везује различите ендogene и екзогене лиганде. Иако сва три домена имају сличне структуре, њихова способност везивања различитих лиганда се разликује. Коришћењем кристалографских метода, показано је да у молекулу HSA постоје три главна везивна места са

великим афинитетом за везивање великог броја лиганда. Од њих два везивна места се налазе у субдоменима IIА и IIIА и позната су под називом Судлово место I и Судлово место II (54). Такође, постоји везивно место које је специфично за везивање хема и оно се налази у субдомену IV. Поред ових места, постоје још четири места за која се могу узети јони метала, као и девет места за везивање неестерификованих масних киселина (55).

1.2.3.1. Судлово место I

Судлово место I (варфарин-азапропазон везујуће место) је велико место које се налази на површини албумина. Састоји се од 6 хеликса који се налазе у оквиру субдомена IIА, кога чине аминокиселински остаци од 195-383, и субдомена IV сачињеног од остатака 148-154. У састав овог везивног места углавном улазе неполарне аминокиселине, али HSA такође садржи и два поларна кластера (унутрашњи и спољашњи). Унутрашњи кластер чине поларни аминокиселински остаци Tyr150, His242 и Arg257 и налази се на дну везивног места, а спољашњи кластер у чији састав улазе Lys195, Lys199, Arg218 и Arg222 налази се на улазу везивног места (56).

За Судлово место I у највећој мери везују се поларни и анјонски молекули. Такође, за ово место велики афинитет показују анјонска хетероциклична једињења, а од лекова нестероидни антиинфламаторни (NSAID) и антикоагулантни лекови (57, 58). Неки лекови, попут варфарина локализују се у централном делу овог везивног места и то тако што поларна група у молекулу варфарина интерагује са неполарним аминокиселинама као што су Leu238 и Ala291. Ово везивно место је велике запремине, тако да молекули када се вежу за њега могу да заузму различит простор, али су сви распоређени тако да граде водоничну везу са Tyr 150, који је најзначајнији у процесу интеракције са лековима који се везују за HSA. Међутим, у случају да дође до везивања неке масне киселине за албумин, Tyr 150 интерагује са том киселином, тако да се његова улога у интеракцијама са лековима смањује. У том случају, уместо тирозина, за интеракције са лековима су од значаја Lys199 и Arg222 са једне стране везивног места и His242 са друге стране (59).

1.2.3.2. Судлово место II

Судлово место II или индол-бензодиазепинско место налази се у субдомену IIIА. За ово место углавном се везују негативно наелектрисане алифатичне и ароматичне карбоксилне киселине. За њега се, такође, великим афинитетом везују масне киселине других ланаца, L-триптофан и октаноат, а од лекова диазепам и неки од нестероидних антиинфламаторних лекова (NSAID) (3, 60). По својим карактеристикама доста је слично Судловом месту I. Ово место садржи 6 хеликса. У његовом централном делу налази се хидрофобна шупљина коју изграђују поларни аминокиселински остаци (Arg410, Tyr411, Lys414 и Ser489). Иако су ова места структурно слична, доста се разликују по поларности, величини и облику. Судлово место II је мање запремине, и у овом месту се Tyr411 налази у унутрашњем делу везивног места, што може да омета везивање неких лиганата. Ово место има мању флексибилност у односу на место I, зато што везивање углавном зависи од стереоселективних утицаја. Приликом везивања лекова за место II углавном не долази до истискивања лиганда из молекула HSA. Иако има способност да веже велики број различитих једињења, постоји доста ограничења. Нпр. уколико се изврши супституција метил групе на α водонику у L-триптофану долази до блокаде везивања. Такође, L-триптофан има око сто пута већи афинитет за ово место у односу на његов D-изомер (61).

1.2.3.3. Везивна места за јоне метала

У структури HSA идентификовано је више места за везивање јона метала. На овим местима везују се неки од есенцијалних метала као што су калцијум, цинк, кобалт и гвожђе, али се могу везати и неки токсични метали попут никла, кадмијума и живе. Такође, за ова места могу да се вежу и нефизиолошки, токсични метали који се користе у медицини као што су платина, злато и ванадијум. Везивна места за метале обухватају бочне ланце остатка Cys34 и His105 у субдомену IA, остатке His67 и His247 (познати као место A, типично за везивање Zn^{2+} јона), као и His128 и His146 у субдомену IB. У субдомену IIA налазе се Lys199, His242 и His288, док су у субдомену IIB присутни Met298, Met329 и His338. Субдомен IIIA садржи Lys436 и His440, а субдомен IIIB укључује Met548 и His535. Нековалентно везивање јона метала за HSA углавном се одвија у претежно хидрофобним џеповима формираним од аминокиселинских остатака субдомена IB. Pt(II)-базирани лекови показују већу склоност ка везивању за бочне ланце хистидина и метионина, Ru(II)/(III) једињења преференцијално интерагују са His (или са His и Lys) остацима, док Au(III)/Au(I)-деривати углавном циљају Cys34, при чему једињења Au(III) могу додатно да се вежу и за His146 (62, 63).

1.2.3.4. Везивна места за масне киселине

Масне киселине имају слабу растворљивост у води, па се из тог разлога везују за молекул HSA који омогућава њихов транспорт у организму и одржавање њихових концентрација у крви. За HSA се могу везивати засићене, мононезасићене и полинезасићене масне киселине дугих ланаца. Кристалографским методама показано је да се структура HSA за који је везана нека масна киселина разликује од структуре нативног HSA (64). На молекулу албумина постоји више асиметричних места за везивање масних киселина (FA1-FA9), која могу бити примарна (FA1-FA7) и секундарна (FA8-FA9). Места која показују највећи афинитет за масне киселине су FA2, FA4 и FA5. Масне киселине, када се вежу за албумин заузимају линеарну конформацију и долази до грађења сонних мостова између масних киселина и бочног остатка неке аминокиселине. За FA1 место све масне киселине се везују тако што њихове карбоксилне групе граде водоничне везе са аргинином (Arg117). FA2 место налази се у шупљини између субдомена IA, IB и IIA и граде водоничне везе са тирозином и аргинином (Tyr150, Arg257). FA3 и FA4 везивна места налазе се у субдомену IIIA. У FA3 месту карбоксилна група масне киселине гради водоничну везу са два молекула аргинина (Arg348, Arg485), а у FA4 месту водонична веза се гради између карбоксилне групе и молекула аргинина, серина и тирозина (Arg410, Ser489, Tyr411). Масне киселине које су везане за ова два места интерагују међусобно, и то тако што поларна глава масне киселине која је везана за FA3 место интерагује са неполарним репом масне киселине у FA4 месту. FA5 место се налази у субдомену IIIB и у оквиру њега масне киселине интерагују са молекулом тирозина и лизина (Tyr401, Lys525). FA6 везивно место налази се између субдомена IIA и IIB и оно представља секундарно место за везивање ибупрофена. Везивно место FA7 налази се у шупљини IIA субдомена, а масне киселине су стабилизоване поларним везама са аргинином (Arg257). FA8 и FA9 везивна места налазе се у шупљини коју формирају субдомени IA, IB и IIA са једне и IIB, IIIA и IIIB са друге стране, тзв. расцеп. У оквиру FA8 места масне киселине интерагују са лизином, аргинином, аспарагином и серином (Lys195, Lys199, Arg218, Asp451, Ser454), док се FA9 место формира након конформационих измена у молекулу HSA које настају при везивању масних киселина (65, 66).

1.2.4. Физиолошке улоге хуманог серумског албумина

HSA, као најважнији протеин крвне плазме има бројне, веома битне улоге у организму. Једна од његових најважнијих улога је одржавање колоидно осмотског притиска плазме. Колоидно осмотски притисак плазме има приближну вредност од 28 mmHg, од чега се сматра да 19 mmHg води порекло од албумина, а осталих 9 mmHg потиче од катјона (пре свега од натријума, који одржава електричну равнотежу). Због његовог негативног наелектрисања омогућено је везивање са катјонима, пре свега са натријумом, што доводи до задржавања воде у организму. Просечно, 1 g албумина може да веже 18 ml воде па се може користити у терапији различитих стања у којима је дошло до губитка крви или у третману едема. Такође, због присуства великог броја аминокиселина у свом молекулу, албумин може да се користи и у неким стањима попут хипопротеинемије, чиме омогућава надокнаду аминокиселина које недостају у организму (67).

Захваљујући великом броју аминокиселина које се налазе у молекулу албумина значајан је у одржавању киселинско базне равнотеже у организму, односно понаша се као крвни пуфер. На рН вредности крви највећи утицај имају парцијални притисак угљен диоксида (CO_2), концентрација јона јаких (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Cl^-) и слабих електролита (фосфати, хидрогенкарбонати) као и друга слабо кисела или слабо базна једињења. Албумин због свог негативног наелектрисања утиче на концентрације катјона и анјона па самим тим и на рН вредност крви (68).

Једна од најбитнијих улога хуманог серумског албумина у организму је транспортна улога. Албумин има способност везивања ендогених и екзогених молекула мале молекулске масе и врши њихов транспорт на различита места у организму. Транспортује велики број једињења, укључујући хормоне (тироксин, стероидни хормони), неестерификоване масне киселине, флавоноиде, витамине, билирубин, хем, азот моноксид, различите метаболите, токсине и лекове. Такође, у мањој мери може да преноси и полипептиде и протеине мањих молекулских маса (69). Пошто је већина ових молекула хидрофобна, при везивању за албумин долази до повећања њихове растворљивости у плазми. Та особина је од великог значаја у транспорту лекова, јер се повећањем њихове растворљивости продужава време задржавања у организму па самим тим им је дужа терапијска ефикасност. Управо из тог разлога, битно је познавање интеракција између албумина и лекова, како би се добиле информације о фармакокинетици и фармакодинамици тих лекова. Албумин може везивати и различите токсине, смањујућу њихову токсичност у организму (70).

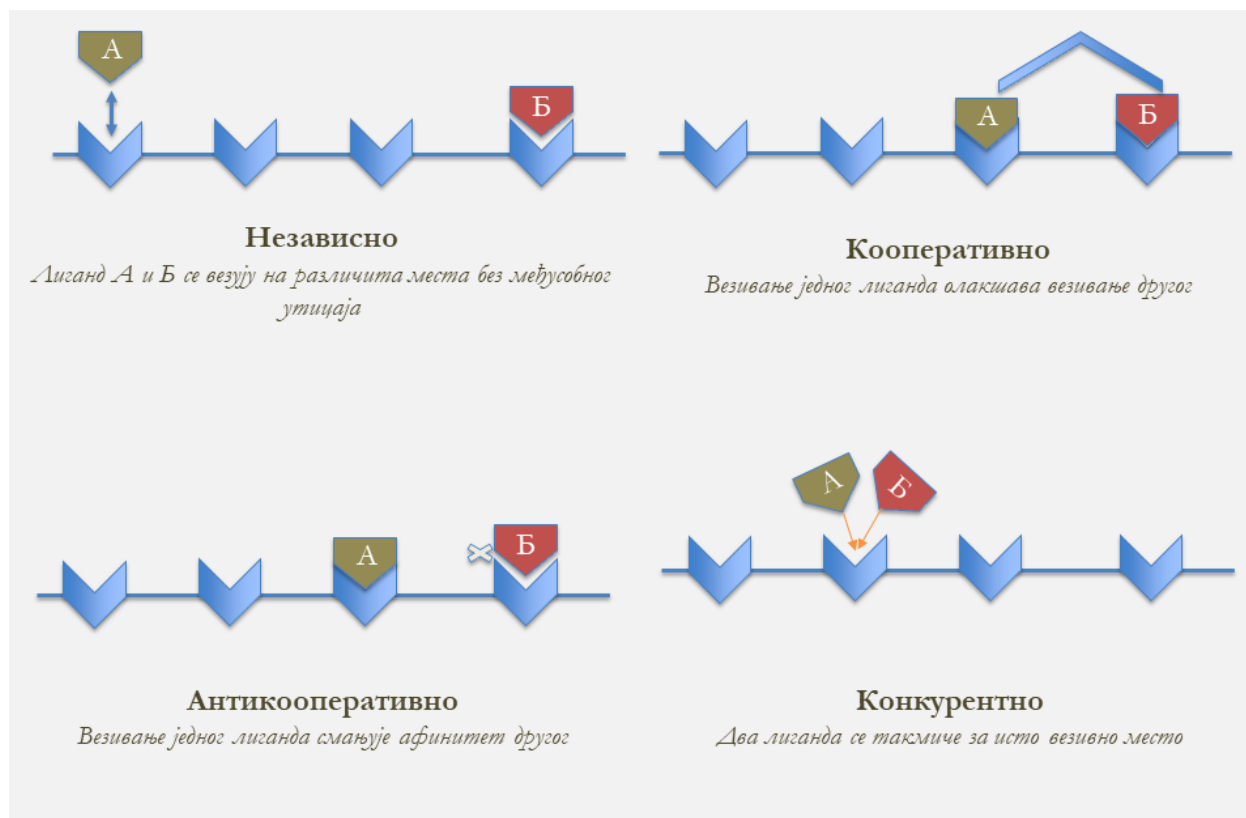
Молекул HSA може да везује и јоне различитих метала, што је посредно повезано са његовом антиоксидативном функцијом. При реакцији јона бакра (Cu^+) и гвожђа (Fe^{2+}) са водоник-пероксидом (H_2O_2), у Фентоновој реакцији, долази до стварања веома штетног реактивног слободног радикала (хидроксил радикал, $\text{OH}^\bullet$). Међутим, када албумин веже ове катјоне, у великој мери се смањује њихова способност да учествују у Фентоновој реакцији. Уколико ипак дође до ове реакције и стварања мале количине хидроксилног радикала, албумин реагује са тим створеним радикалом и умањује његове штетне ефекте на друге молекуле (3). Такође, албумин представља главни извор сулфхидрилних (тиолних -SH) група. У случају сепсе може се применити HSA који значајно повећава нивое плазма албумина који остаје доста повећан чак и након 4 сата од његове примене, док нивои тиола остају значајно повећани и након 18 сати од примене албумина. Ови резултати показују да се повећане концентрације тиола након примене албумина дуго одржавају у крви у односу на ниво самог албумина, што указује на то да постоји размена тиола посредована албумином у плазми тих пацијената. С

обзиром да албумин чини велики проценат тиола крвне плазме код здравих одраслих особа, има велики значај у регулацији редокс равнотеже крвне плазме (26).

Албумин поседује антитромботску и антикоагулантну активност које потичу од способности везивања азот-моноксида (NO), при чему се формирају S-нитрозотиоли, што узрокује успоравање брзе инактивације NO, и ствара могућност да његов антиагрегациони ефекат на тромбоците траје дуже (71). Феномен капиларне пропустљивости се односи на способност ендотелних ћелија да регулишу пролаз супстанци кроз своје зидове, као и кроз међућелијске просторе. Албумини могу директно допринети очувању васкуларног интегритета везивањем за интерстицијални матрикс и субендотел, при чему мењају пропустљивост ових структура за растворе и макромолекуле. Поред тога, њихови индиректни ефекти могу бити последица везивања арахидонске киселине, која сама по себи има способност да утиче на повећање капиларне пропустљивости (72).

1.3. Истовремено везивање (*cobinding*) два лиганда за HSA

HSA има способност везивања великог броја егзогених и ендогених лиганата. Афинитет везивања лекова за HSA, узимајући у обзир његову високу концентрацију у плазми, је значајан фактор који је потребно размотрити при дизајну и развоју фармаколошки активних супстанци. Поред тога, истовремено везивање више лиганата за HSA може изменити интерактивне параметре и капацитет везивања лека за HSA и потенцијално модулисати терапеутску ефикасност лека. Истовремено везивање два лиганда за протеин може се класификовати у четири основна типа: независно, кооперативно, антикооперативно и конкурентно везивање (73). Независно везивање два лиганда подразумева истовремену интеракцију са структурно различитим и међусобно удаљеним везивним местима на протеину, при чему афинитет везивања једног не мења афинитет везивања другог лиганда (Слика 5)



Слика 5. Истовремено заједничко везивање (*Cobinding*) два лиганда за протеин

Код кооперативног везивања долази до позитивне алостеричке интеракције при везивању првог лиганда и индуковања конформационе промене протеина којом се повећава афинитет везивања другог лиганда (74). Са друге стране, антикооперативним везивањем, лиганд који се први веже за протеин изазива конформациону промену протеина која смањује афинитет везивања другог лиганда (негативна алостерија). Конкурентно везивање је „искључиви“ облик интеракције, код ког један лиганд може да истисне или замени други, односно, интеракција у којој се оба лека везују за исто место, те везивање другог доводи до дислокације првог. Директна дислокација лека другим са истог места означава се као директна конкуренција, док се под индиректном конкуренцијом подразумевају сви остали облици интеракције између лекова који се везују на различитим местима, али ипак узрокују међусобну дислокацију. Индиректна конкуренција обухвата антикооперативно везивање, делимично преклапање места и друге мешовите механизме. Ради испитивања природе ових ефеката, неопходно је анализирати вишеструке интеракције између макромолекула и упоредивих концентрација лиганда на молекулском нивоу. Први корак јесте утврђивање да ли је „инхибиторни ефекат“, односно способност конкурентног молекула да истисне лиганд са полимера последица чисто конкурентног механизма или резултат посредних и сложенијих процеса (75).

Због ограниченог броја високоафинитетних везујућих места HSA, детаљне молекулске информације су од великог значаја за процену кооперативних ефеката током везивања других лекова или ендогених лиганада. Као што је претходно наведено, два основна везујућа места HSA су Судлово место I (субдомен IIА, варфаринско место) и Судлово место II (субдомен IIIА, бензодиазепинско место) и већина лекова управо заузима ова два места. Масне киселине (МК) имају висок афинитет за субдомен IIIА, чиме блокирају везивање лекова у том региону. Са друге

стране, масне киселине се релативно слабо везују за ПА субдомен и често бивају замењене лековима (41). Интеракције при везивању два или више лека за HSA најчешће се јављају управо у субдомену ПА, јер место I представља велику хидрофобну шупљину у коју се може сместити више молекула. Ово место има претходно формиран везивни џеп у језгру субдомена ПА, које је изграђено од шест α -хеликса и петље-хеликс сегмента (остатци 148-154 АК) субдомена IB. Унутрашњост џепа је претежно хидрофобна (остаци Trp214, Leu219, Phe223, Leu238, His242, Leu260, Ile264, Ser287, Ile290 и Ala291) али садржи и два кластера поларних аминокиселина-унутрашњи (Tyr150, His242 и Arg257) и спољашњи на улазу у џеп (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222) (76). Простор џепа је организован као велика шупљина са централном зоном и три издвојене коморе. Везивањем масних киселина долази до померања Tyr150, што изазива ротацију домена I и II, повећавајући запремину џепа и промене поларитета унутрашњости.

Резултати спроведених истраживања у последњих неколико година, у којима је испитивано истовремено везивање два лиганда за HSA, указују на присуство различитих типова интеракција. Тако је показано да се варфарин и дериват кумарина-кумарин 153, могу истовремено везивати за Судлово место I, при чему везивање једног не утиче значајно на афинитет везивања другог лиганда, што указује на независно везивање у оквиру истог везивног места. (77). Такође, салицилна киселина и тенипозид се могу истовремено везивати за HSA у различитим субдоменима без међусобних промена у афинитету везивања (78). Истовремено везивање варфарина и ибупрофена у присуству олеинске киселине указује на различите типове интеракције. Тако је показано да у присуству олеата долази до повећаног афинитета везивања варфарина (кооперативно, синергистичко везивање). Са друге стране, присуство олеата смањује афинитет везивања ибупрофена, што указује на конкурентно везивање два лиганда (79). Као маркери везујућих места најчешће се користе варфарин (Судлово место I) и ибупрофен (Судлово место II). Истовременим везивањем на различитим местима омогућава се независно коегзистирање лиганда без значајних промена у везивном афинитету. Међутим, алостеричне конформационе промене могу створити услове делимичног преклапања и конкурентског везивања, при чему један лиганд може снизити афинитет везивања другог лиганда (80)

Из свега наведеног се може закључити да HSA није пасиван транспортер, већ динамични протеин са способношћу истовременог везивања више лиганда. На афинитет везивања лиганда за HSA, поред типа и положаја везивних места, афинитета и концентрације лиганда, значајно могу утицати конкурентски и кооперативни ефекти са другим молекулима као и конформациона флексибилност протеина.

1.4. Експерименталне и теоријске методе у испитивању интеракција лиганда и протеина

Комбиновање експерименталних и рачунарских (*in silico*) модела у проучавању интеракција протеина и лиганда пружа свеобухватно разумевање механизма настанка протеин-лиганд комплекса. Експериментални приступи, као што су спектроскопске, калориметријске и хроматографске технике, омогућавају идентификовање структурних и конформационих промена протеина након везивања лиганда као и одређивање афинитета везивања и карактеризацију типова интеракција. Са друге стране, рачунарски модели, као што су молекулски докинг, симулације молекулске динамике и квантно хемијско прорачунавање, омогућавају визуелизацију начина везивања, процену енергија везивања и предвиђање осталих

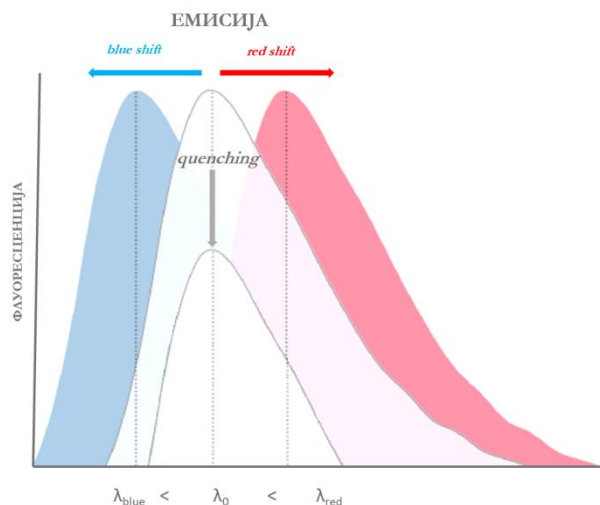
параметара укључених у интеракцију. Комбиновање ових комплементарних приступа пружа ефикасну стратегију у разјашњавању процеса молекулског препознавања.

Спектроскопске методе, као експериментални приступ, имају кључну улогу у идентификацији и карактеризацији интеракција лиганд-протеин омогућавајући детаљан увид у структурне, динамичке и функционалне аспекте комплекса. Заснивају се на одређивању промена у емисији, апсорпцији или расејању фотона (светлости), које настају као резултат интеракције лиганда и протеина. Настале промене се могу идентификовати на основу изгледа добијених спектра, које одражавају структурне, електронске и динамичке промене у протеину, лиганду или њиховом комплексу. Најзначајније спектроскопске методе које се користе у истраживању протеин-лиганд интеракција су флуоресцентна спектроскопија (FS), циркуларни дихроизам (CD), ултраљубичасто-видљива спектроскопија (UV/Vis), Форстеров резонантни пренос енергије (FRET), инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR) и динамичко расејање светлости (DLS) (81).

1.4.1. Флуоресцентна спектроскопија у испитивању лиганд-HSA интеракција

Флуоресцентна спектроскопија има широку примену у проучавању протеин-лиганд интеракција због своје осетљивости и могућности добијања детаљних података о процесима молекулског везивања. Представља врсту електромагнетне спектроскопије којом се анализира флуоресценција узорка. Метода се заснива на упоређивању интензитета флуоресцентне емисије испитиване супстанце са емисијом стандардне супстанце. Излагањем молекула енергији из UV/Vis дела електромагнетног спектра, долази до екситације електрона који, при повратку у основно стање, емитују енергију секундарног зрачења веће таласне дужине у односу на побудно зрачење. Енергија која се при том ослобађа карактеристична је за сваку појединачну супстанцу. Ова појава се назива фотолуминисценција. Ако се зрачење јавља само током деловања извора побуде, реч је о флуоресценцији, док се у случају да траје и након његовог престанка говори о фосфоресценцији. Уређаји за мерење флуоресценције називају се флуориметри. Мерење флуоресценције се врши тако што се испитивана супстанца претходно растворена у одговарајућем растварачу или у смеши погодних растварача, стави у кивету апарата и излаже деловању монохроматског светлосног зрака одређене таласне дужине. Узорак, након апсорпције, емитује флуоресцентну светлост различитих таласних дужина и интензитета при чему настаје емисиони спектар. Подаци добијени овом методом најчешће се приказују у виду емисионих спектра (82,83). Такав приказ представља графички однос јачине зрачења и таласне дужине (nm) или таласног броја (cm^{-1}).

Интринзична (унутрашња) флуоресценција HSA првенствено потиче од остатка триптофана (Trp214), који је лоциран у поддомену IА. Поред триптофана, флуоресценцији HSA доприносе и остаци тирозина (Tyr), али се њихова емисија често гаси оближњим аминокиселинским групама или триптофаном, док остаци фенилаланина (Phe) веома мало доприносе флуоресценцији (84). Однос релативне флуоресцентне осетљивости триптофана, тирозина и фенилаланина износи 11:2:0,08. При екситацији на 280 nm, флуоресценцију емитују и остаци Trp214 и Tyr, са доминирањем Trp214, док при екситацији на 295 nm флуоресценцији доприносе само остаци Trp214 (85). Као резултат емисије настаје флуоресцентни спектар HSA са карактеристичним пиком чији се максимум емисије појављује на 340-350 nm. Положај и интензитет овог пика су веома осетљиви на промене у микроокружењу Trp214 па се често користи за проучавање интеракција HSA са лигандима. При везивању лиганда за HSA долази до блокирања остатака Trp214, што доводи до смањења интензитета флуоресценције, односно гашења флуоресценције (*quenching*, Слика 6).

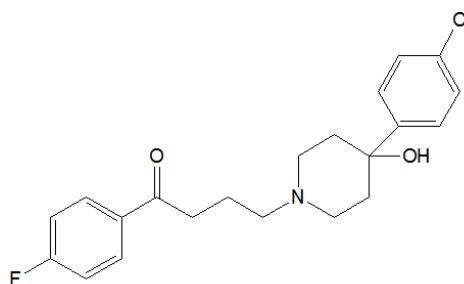


Слика 6. Спектралне промене флуоресценције хуманог серумског албумина при везивању лиганда (гашење, црвено и плаво померање емисионог максимума)

При везивању лиганда, поред гашења флуоресценције, може доћи и до промене положаја емисионог пика ка већим (*red shift*) и мањим (*blue shift*) таласним дужинама. Ове промене описују поларитет окружења Trp214. *Blue shift* у флуоресцентном спектру HSA указује на хидрофобније окружење Trp214, што се често дешава при блиском везивању лиганда који штити остатке Trp214 од растварача. *Red shift* указује на хидрофилније, растварачу изложено окружење, што сугерише на конформационе промене или расклапање структуре HSA. Гашење флуоресценције без промене максимума емисије сугерише да лиганд ступа у интеракцију са HSA без значајне промене поларитета непосредног микроокружења триптофана (86).

1.5. Халоперидол

Халоперидол (HPD) (4-[4-(4-хлорофенил)-4-хидроксипиперидин-1-ил]-1-(4-флуорофенил)-бутан-1-он) спада у типичне антипсихотике из групе бутирофенона (Слика 7).



Слика 7. Структура халоперидола

Користи се у третману шизофреније, акутних психозних стања и делиријума. Деканоатни естар халоперидола се користи као инјекција која се даје на сваке 4 недеље пацијентима са шизофренијом којима је у историји болести забележено нередовно узимање терапије. Услед јаког антагонистичког дејства на допаминске рецепторе, халоперидол спада у високо потентне неуролептике. Има снажно дејство у сузбијању халуцинација, највероватније услед блокаде допаминских рецептора у мезокортексу и лимбичком систему. Такође, блокира допаминергичко дејство у нигростријатним путевима, при чему настају нуспојаве као што су

екстрапирамидални симптоми (дистоније, акатизије, псеудопаркинсонизам). Поред тога има и антихистаминичка и антихолинергичка дејства и самим тим проузрукује кардиоваскуларне и антихолинергичке нуспојаве попут хипотензије, сувих уста, констипације, седације и др. (87-90). Халоперидол се најчешће користи за лечење психотичних поремећаја, па је мониторинг концентрације халоперидола у плазми од клиничког значаја. У истраживачкој и клиничкој пракси коришћене су различите методе испитивања односа између одговора и концентрације лека у плазми. Хемијске методе као што је течна хроматографија под високим притиском (*High Performance Liquid Chromatography-HPLC*) и гасно-течна хроматографија (GLC) имају добру прецизност и осетљивост. Велике дозе халоперидола могу се безбедно примењивати интравенски и интамускуларно при чему долази до брзе неуролептизације. Биорасположивост након оралног уноса варира од 60 до 65%. Међутим постоји велика индивидуална варијабилност концентрације халоперидола у плазми, у већини фармакокинетичких параметара. Ова варијабилност се делимично може објаснити реверзибилном оксидацијом/редукцијом метаболичких путева халоперидола: метаболише се путем редукције до редукованог халоперидола који је биолошки неактиван. Различит степен ентерохепатичног метаболизма и генетских разлика у метаболизму такође се може узети у обзир када је у питању варијабилност концентрације халоперидола. Клинички је доказано да распон концентрација од 4 $\mu\text{g/L}$ до 25 $\mu\text{g/L}$ халоперидола у плазми даје терапијски одговор. Улога редукованог халоперидола у одређивању клиничког одговора није клинички доказана. Мерење црвених крвних зрнаца и концентрације халоперидола у цереброспиналној течности такође су узете као детерминанте за одређивање терапијског одговора, али не пружају значајну предност у односу на праћење концентрације у плазми. Апсорпција халоперидола је спорија од његове елиминације. Време полуетиминације халоперидола је око 3 недеље, а време за стабилно стање пацијента, односно за терапијски одговор је око 3 месеца (87).

1.5.1. Фармакокинетика халоперидола

Халоперидол се примењује интравенски, интамускуларно или орално пацијентима са шизофренијом. Као третман за акутну шизофренију, интамускуларна примена је пожељна за тренутну контролу симптома код пацијената са агресивним понашањем. Интамускуларне дозе од 2 до 5 mg се генерално примењују на сваких 30 минута све док се психотични симптоми не смире (89). Код већине пацијената халоперидол се даје орално у дози од 6 до 15 mg као терапија одржавања (90). Након интравенске примене концентрација у крви опада док се време полуетиминације креће у опсегу од 14,1 до 26,2 часа. Волумен дистрибуције износи 9,5-21,7 l/kg, а клиренс између 0,39 и 0,708 l/h/kg (87). Након интамускуларне примене, време до максималне концентрације у плазми је 20 минута код здравих особа, а 33,8 минута код пацијената са шизофренијом (91). Халоперидол се интензивно метаболише у јетри док се само око 1% излучује непромењен у урину. Биотрансформише се у различите метаболите: *p*-флуоробензилпропионску киселину, 4-(4-хлорофенил)-4-хидроксипиперидин, редуковани халоперидол, пиридинијум метаболите и халоперидол глукуронид (92). Неповратни метаболички пут халоперидола је биотрансформација настала цепањем C-H везе, оксидација на пиридинијумске врсте и коњугација глукуронида. Насупрот томе, редукција халоперидола на бензилкарбонил групи у алкохол је реверзибилан процес, као што показује интерконверзија између халоперидола и редукованог халоперидола код људи. За биотрансформацију халоперидола је одговоран CYP3A4 у јетри. Слободна фракција халоперидола у хуманој плазми износи 7,5 до 11,6%. Везивање халоперидола за протеине у плазми је подједнако код здравих одраслих особа, младих и старих особа са шизофренијом, па чак и код пацијената са цирозом

јетре (93). Халоперидол се слободно дистрибуира у различитим ткивима код људи, иако се халоперидол у високом степену везује за протеине плазме.

1.5.2. Дозирање халоперидола и клинички одговор пацијената

Потребна доза халоперидола да би се постигао задовољавајући терапијски одговор варира широко међу појединцима и зависи од стања које се лечи и симптома. За орално примењен халоперидол, дневна препоручена доза код пацијената са умереним симптомима је од 1 до 6 mg, а за пацијенте са тешким симптомима од 6 до 15 mg. Халоперидол деканоат је такође доступан за интравенску примену, да би се постигло продужено дејство. Због ризика од озбиљних нежељених дејстава, нарочито тардивне дискинезије, сматра се да се повећањем дозе временом постиже кумулативни ефекат, тако да се оптималном дозом сматра најмања доза која доводи до контроле симптома (94).

1.5.3. Праћење концентрације халоперидола у серуму

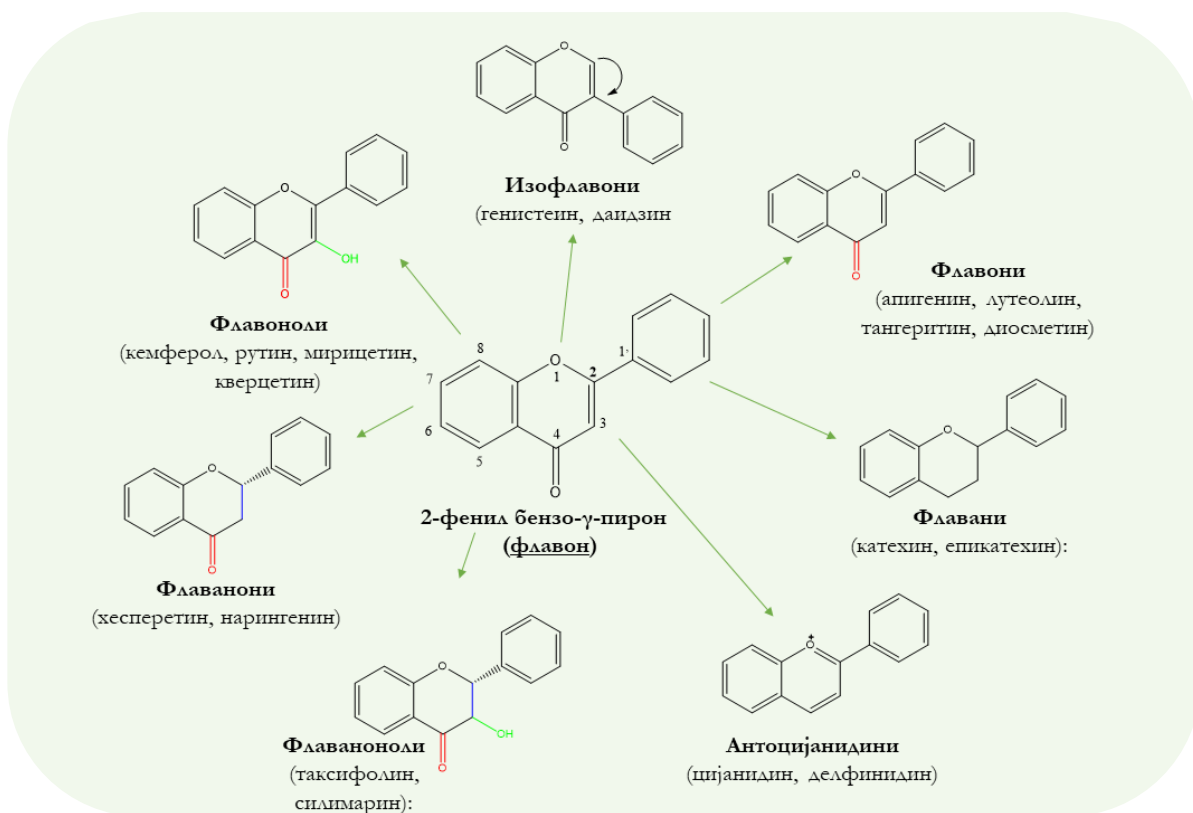
Потенцијална озбиљност од нежељених ефеката је један од разлога за праћење концентрације халоперидола у крви. Однос између дозе и клиничког ефекта је нејасан. Анализе крви за ове лекове нису разјасниле овај однос. Овај пропуст се делимично приписује ефектима активних метаболита. Стога је пажња усмерена на халоперидол, који има само један потенцијално важан метаболит, редуковани халоперидол. Неке студије су одредиле оптималан опсег за ниво халоперидола у плазми. Флексибилне студије су дале различит терапијски опсег халоперидола: 5-15 ng/ml, 15-40 ng/ml, 20-50 ng/ml, 3-10 ng/ml, 8-17,7 ng/ml, 5-21 ng/ml. Ове дозе су показале везу између концентрације у крви и терапијског одговора, повезаним са побољшањем симптома или са мањим побољшањем (95).

1.6. Флавоноиди и њихова интеракција са HSA

У новије време уочава се значајан пораст научног интересовања за проучавање интеракције HSA са молекулима природног порекла. Већина истраживања базирана је на биофизичким, нарочито спектроскопским студијама. Спроведене студије указују да различити молекули природног порекла, укључујући флавоноиде, алкалоиде, стилбене, кумарине и остале, испољавају афинитет везивања и интеракције са HSA.

Полифеноли представљају велику групу секундарних биљних метаболита, која се, у зависности од хемијске структуре, може поделити на најмање 10 група. У биљкама имају различите функције, укључујући учествовање у одбрамбеним механизмима од патогена и заштити од UV зрачења. Са друге стране, полифенолна једињења испољавају бројне биолошке активности, укључујући антиоксидативну, антиинфламаторну, антимикробну, антитуморску и кардиопротективну, па су постала предмет великог научног интересовања (96).

Флавоноиди су група полифенолних биоактивних једињења чију основну хемијску структуру чини скелет 2-фенил-бензо-γ-пирона (флаворон), изграђен од два ароматична прстена (А и В) повезана трећим, хетероцикличним С прстеном. У зависности од степена оксидације и засићења С-прстена, као и од положаја фенил групе и присуства хидроксилних или других супституената, флавоноиди се деле на више подгрупа. Најзначајније класе су: флаворони (нпр. апигенин, лутеолин), флавоноли (кверцетин, кемпферол, рутин), флаванони (хесперетин, нарингетин), флаванололи (таксифолин, силимарин), флавори или катехини (катехин, епикатехин), изофлаворони (генистеин, даидзеин) и антоцијанидини (цијанидин, делфинидин) (Слика 8) (97).



Слика 8. Основна структура и главне подгрупе флавоноида

Структурне варијације флавоноида одређују њихова биолошка својства, као што су антиоксидативно, антиинфламаторно, антимикробно и кардиопротективно деловање, што их чини важним фитохемијским и нутритивним компонентама (98). Могу се налазити у слободном и гликозидно везаном облику, углавном су обојени и одговорни за пигментацију и укус биљке. Флавоноиди и њихови деривати поседују широк спектар биолошких и фармаколошких активности чиме доприносе превенцији различитих хроничних обољења, укључујући кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести, као и одређене типове канцера (99). Флавоноиди су широко распрострањени и могу се наћи у великом броју биљака, па се свакодневно уносе у организам путем исхране (100). Главни извори укључују воће (посебно јагодичасто воће, цитруси, јабуке), поврће (црвени лук, броколи), зелени и црни чај, црно вино и остали биљни напаци. Дневни унос флавоноида зависи од типа исхране, животних навика и географског порекла, при чему се највише вредности бележе код популација са медитеранском или традиционалном источном исхраном богатом биљним намирницама (101).

Флавоноиди и њихови метаболички производи у циркулацији ступају у интеракцију са транспортним протеинима. Интеракција са HSA има значајну улогу у њиховом транспорту, биорасположивости и фармакокинетици. Флавоноиди показују умерен до висок афинитет везивања за HSA. Везивање се остварује различитим механизмима који укључују грађење водоничних и ван дер Валсових веза и хидрофобних интеракција. На пример, интеракција диосметина (флавоон) са HSA је статички процес у који су укључене хидрофобне интеракције и водоничне везе (102). Најчешће места везивања флавоноида за HSA, идентификована спектроскопским студијама, су Судлово место I и II, при чему афинитет везивања зависи од

типа и структуре флавоноида (103). Спектроскопским студијама је показано да кверцетин и мирицитин имају израженији афинитет везивања у поређењу са осталим подгрупама флавоноида. Гликозилација и степен хидроксилације значајно могу утицати на везивање. Услед везивања флавоноида могу последично наступити структурне промене HSA, које зависе од типа флавоноида и његових функционалних група (104). При интеракцији флавоноида и HSA може доћи до конкурентског везивања са осталим ендогеним или екзогеним лигандима. Пример конкурентног везивања флавоноида за албумин је интеракција бајкалина у присуству јона метала Cu^{2+} и Fe^{3+} , у којој присуство јона метала смањује вредности константе везивања бајкалина (105). Антоцијанидини, флавоноидни деривати, показују висок афинитет везивања за HSA. Делфинидин, пигмент присутан у плодовима боровнице, показује виши афинитет везивања у односу на кверцетин и кемферол, што се приписује позитивном наелектрисању његове структуре и интеракцији са негативно наелектрисаним доменима HSA (106).

Узимајући у обзир да је HSA један од најзначајнијих транспортних протеина великог броја лекова у плазми, као и висок афинитет везивања флавоноида за плазма протеине, интеракција флавоноида са HSA може имати значајан утицај на везивање лекова и тиме модификовати њихову фармакокинетику. Флавоноиди су широко распрострањена једињења која су присутна у храни, суплементима и фитопрепаратима, зато проучавање везивања лекова у присуству флавоноида има велики значај у истраживању храна-лек интеракција и процени ефикасности и безбедности фармакотерапије.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Генерални циљ овог истраживања је одређивање афинитета везивања и карактеристика интеракције халоперидола (HPD) и хуманог серумског албумина (HSA) у симулираним физиолошким условима као и утицај јона метала (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) и одабраних флавоноида (катехин, кверцетин, диосмин) на HSA-HPD комплекс. На основу резултата флуоресцентне и апсорпционе спектроскопије, као и метода молекулског моделирања, биће одређене константе везивања, број везујућих места, термодинамички параметри и природа везујућих сила у систему HSA-HPD. Поред тога, биће израчунати физичко-хемијски дескриптори халоперидола и процењен њихов утицај на степен везивања халоперидола за протеине плазме.

На основу генералних циљева, постављени су следећи специфични циљеви:

1. Одредити константе и места везивања, као и природу везујућих сила између халоперидола и HSA, на основу резултата добијених спектроскопским методама и молекулским моделирањем, уз израчунавање термодинамичких параметара.
2. Одредити афинитет и начин везивања халоперидола за HSA у симулираним физиолошким условима и израчунати растојање између донора и акцептора енергије применом FRET анализе.
3. Идентификовати везујуће место халоперидола у HSA применом компетитивних маркера везујућих места (варфарин и ибупрофен), користећи флуоресцентну и апсорпциону спектроскопију у комбинацији са молекулским моделирањем.
4. Испитати утицај јона метала (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) на везивање халоперидола за HSA применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.
5. Испитати утицај одабраних флавоноида (катехин, кверцетин, диосмин) на везивање халоперидола за HSA применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.
6. Испитати повезаност између физичко-хемијских дескриптора антипсихотика и степена њиховог везивања за протеине плазме, као и применљивост развијеног регресионог модела на халоперидол.

2.2. Хипотезе истраживања

Основна хипотеза овог истраживања полази од претпоставке да халоперидол (HPD) има способност специфичног и стабилног везивања за хумани серумски албумин (HSA), при чему настаје комплекс чије карактеристике и стабилност зависе од врсте интеракција, физичко-хемијских својстава молекула и присуства других лиганата у биолошком систему. Полазећи од ове претпоставке, постављене су следеће хипотезе истраживања:

1. У симулираним *in vitro* физиолошким условима формира се комплекс хумани серумски албумин-халоперидол (HSA-HPD);
2. При формирању комплекса HSA-HPD главну улогу имају хидрофобне, електростатичке интеракције, Ван дер Валсове (*Van der Waals*) силе, као и водоничне и ковалентне везе;
3. Механизам гашења флуоресценције HSA у присуству HPD је статички процес гашења;
4. Судлово (*Sudlow*) место I је дефинисано као предоминантно везујуће место халоперидола за хумани серумски албумин;
5. У присуству јона метала долази до промене степена везивања халоперидола за хумани серумски албумин;
6. У присуству флавоноида долази до промене степена везивања халоперидола за хумани серумски албумин;
7. Параметри липофилности и киселости халоперидола су повезани са степеном његовог везивања за протеине плазме, што се може квантификовати применом регресионог модела развијеног на скупу антипсихотика.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

У оквиру дисертације реализована је експериментална студија кроз примену емисионе и апсорпционе спектроскопије са циљем испитивања степена везивања халоперидола за комерцијално набављени хумани серумски албумин. Анализе су рађене *in vitro* при симулираним физиолошким условима. Такође, испитан је и утицај флавоноида и јона метала на HSA-HPD везивање, што може дати увид у потенцијалне интеракције између ових супстанци у организму. Осим тога, у истраживање су примењене теоретске методе молекулског моделирања, што омогућава темељно проучавање и разумевање механизма интеракција, израчунавање параметара интеракције и потврђивање експерименталних резултата. Овом студијом су одређени и молекулски дескриптори халоперидола применом различитих софтверских пакета. Они су се користили за генерисање квантитативних података којима се описују различите карактеристике халоперидола (структура, физичко-хемијске особине и друге) које могу утицати на степен његовог везивања за HSA.

3.2. Хемикалије и реагенси

За извођење експеримената коришћене су комерцијално набављене супстанце аналитичке чистоће. Компанија Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) је произвођач већине хемикалија (серумски албумин хуманог порекла, HSA (A1887), лек из групе антипсихотика-халоперидол, HPD (H1512), флавоноиди: катехин хидрат, CAT (22110), диосмин, DIO (D3525), кверцетин, QUE (Q4915), маркери за предвиђање везујућих места на HSA: варфарин, WF (A2250) и ибупрофен, IP (14883), као и фосфатни пуфер, PBS (P4417)). Соли одговарајућих метала ($MgCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$) и етанол су коришћени без даљег пречишћавања. Раствор PBS (0,01 M, pH = 7,4) садржи 0,0027 M KCl и 0,137 M NaCl и има улогу да одржава константну јонску јачину раствора, па је зато коришћен за припрему свих полазних раствора или за одговарајућа разблажења раствора. Основни раствор HSA концентрације 20 μM је направљен растварањем у пуферу и чуван на температури 0-4°C без излагања светлости. Основни раствори халоперидола концентрације 2,8 mM, варфарина и ибупрофена концентрације 0,2 mM су припремљени растварањем у малој количини етанола (5%) и разблажени раствором PBS. Основни раствори јона метала, M^{n+} ($M^{n+} = Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, и Al^{3+}$) припремљени су растварањем у бидестилованој води, а затим разблажени раствором пуфера.

3.3. Емисиона и апсорпциона спектроскопија

У првој фази ове експерименталне студије су анализиране промене у флуоресцентним спектрима HSA у присуству HPD на различитим температурама. На овај начин се могу утврдити постојање и параметри интеракције лиганд-протеин. Сви експерименти су вршени на физиолошкој pH вредности. Beckman Ф 72 pH метар (Beckman Coulter, USA) је коришћен за мерење pH вредности раствора, док је Sartorius ME215S microbalance (Sartorius, Germany) вага ($\pm 0,1$ mg) коришћена за одмеравање масе супстанци. На спектрофлуориметру RF-1501 PC (Shimadzu, Japan), који има могућност контроле радне температуре и опремљен је кварцном киветом ширине 1,0 cm и ксенонском лампом јачине 150 W снимани су емисиони спектри.

Екситација је вршена на таласној дужини од 295 nm, у спектралном опсегу који обухвата област од 300 до 450 nm. Након тога су, применом маркера везујућих места, флуориметријски одређена везивна места за HPD на HSA. Структурне промене и формирање HSA-HPD комплекса анализиране су и применом UV-Vis апсорпционе спектрофотометрије. Ова метода се често користи за испитивање лиганд-протеин интеракција. Lambda 25 UV/Vis спектрофотометар (PerkinElmer, USA) опремљен са дуплим светлосним снопом и кварцном киветом ширине 1,0 cm је коришћен за снимање свих апсорпционих спектра. Спектри су снимани у опсегу од 220 до 320 nm. Завршна фаза експерименталног дела студије подразумева флуориметријско одређивање утицаја одабраних флавоноида (катехин, кверцетин, диосмин) и јона метала (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) на интеракције HSA-HPD система.

3.4. Интеракције HPD и HSA

Примена флуоресцентне спектроскопије за испитивање интеракције лека и HSA се заснива на мерењу флуоресценције емитоване од HSA након екситације енергијом одређене таласне дужине. Код интеракције HSA са леком, долази до промене у флуоресценцији HSA, што се може користити за квантитативну анализу интеракције. Флуоресцентни спектри су снимљени на различитим температурама (298, 303 и 310 K). Припремљене су серије раствора за све три температуре, при чему је концентрација HSA била константна док је концентрација халоперидола варирана ($0-7 \times 10^{-5}$ M). Све серије су инкубиране у мраку 60 минута на дефинисаним температурама, након чега је праћено гашење флуоресценције.

3.5. Одређивање термодинамичких параметара између HPD и HSA

Термодинамички параметри између HSA и HPD одређени су на основу емисионих спектра сниманих на три различите температуре (298, 303, 310 K). Сви раствори су припремљени полазећи од константне концентрације HSA (2 μ M) која је третирана варирајућом концентрацијом HPD (0 до 7×10^{-5} M). Серије раствора су инкубиране на радним температурама у мраку 60 минута.

3.6. Одређивање места везивања HPD на HSA

Везивна места HPD на HSA су одређена на основу компетитивних експеримената са маркерима везујућих места (варфарин (WF), специфични маркер места I и ибупрофен (IP), специфични маркер места II). Полазећи од основних раствора HSA, халоперидола и маркера направљене су серије раствора у којима је концентрација HSA и маркера фиксирана (2 μ M), док је концентрација халоперидола варирана (0 до 7×10^{-5} M). Сва мерења су вршена на температури од 298 K, а серије раствора су инкубиране у мраку 60 минута на дефинисаној температури. Праћено је гашење флуоресценције HSA узроковано повећањем концентрације халоперидола. Флуоресцентни спектри су снимани у опсегу 300-450 nm. Сва експериментална мерења су понављана три пута док су резултати изражени као средње вредности три мерења.

3.7. Утицај јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} на HSA-HPD интеракцију

Флуоресцентна спектроскопија је примењена и за испитивање интеракције лека и HSA у присуству јона метала Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} . Експеримент је осмишљен тако да је направљена серија раствора са константном концентрацијом HSA и јона метала (2,0 μ M), док је концентрација HPD варирана (0 до 7×10^{-5} M). Серије су припремљене тако што је раствору HSA додата одговарајућа запремина јона метала и након инкубације у мраку 60 минута, раствори

су третирани одговарајућим концентрацијама HPD и поступак инкубације поновљен. Мерења су вршена на 298 K.

3.8. Утицај одабраних флавоноида на HSA-HPD интеракцију

Испитивање интеракција између HSA и HPD у присуству одређених флавоноида, вршено је снимањем емисионих спектра на 303 K у области од 310-450 nm. У свим растворима су фиксиране концентрације HSA и флавоноида (2 μ M) и третиране варирајућим концентрацијама HPD ($0-7,05 \times 10^{-5}$ M). Одмерено је по 200 μ L HSA и флавоноида и након инкубације 60 минута у мраку, раствору су додате одређене запремине HPD полазне концентрације 3×10^{-4} M и PBS пуфер до постизања одређене концентрације.

3.9. Испитивање HSA-HPD интеракција применом молекулског докинга

Да би се испитао начин на који долази до интеракција између HSA и HPD, као и утицај различитих јона метала или молекула флавоноида на везивање HPD за HSA, извршена је симулација молекулског докинга. Интеракције између HSA и HPD испитане су коришћењем софтвера Autodock 4.2, опремљеног графичким корисничким интерфејсом (GUI) AutoDockTools (ADT 1.5.6rc3). За приказ резултата докинга коришћена је бесплатна верзија софтвера Discovery Studio Visualizer 3.5.0 (Accelrys Software Inc.). За анализу енергетских параметара интеракције између протеина и лиганда примењен је програм PEARLS (Program of Energetic Analysis of Receptor Ligand System). Програм Accessibility Calculation for Protein (ver. 1.2). је примењен за процену доступне површине HSA.

За испитивање утицаја флавоноида на интеракције HSA-HPD, активно место HSA је одређено програмом AutoGridFR (AGFR) (107). Геометрије испитиваних јединица су оптимизоване, а енергетски минимуми су пронађени Гаусовим софтверским пакетом коришћењем теорије функционалне густине (DFT) и коришћењем B3LYP функционала са 6-311++G(d,p) (108-110). Добијена је кристална структура HSA из базе Brookhaven Protein Data bank (PDB ID:1HK1)(111). Протин је припремљен за доковање у Discovery Studio 4.0 (112). Поларни водоници, Колманова (Kollman) наелектрисања и други параметри су додати коришћењем графичког интерфејса из AutoDockTools (ADT) (113). Софтвер AutoDock 4.2 је коришћен за симулације молекулског доковања. Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) је имплементиран за флексибилно спајање протеин-лиганд и комплекс-лиганд система. Параметри за LGA метод су одређени на следећи начин: максималан број енергетских евалуација је био 250.000, максималан број генерација је био 27.000, а стопе мутације и укрштања биле су 0,02 и 0,8, појединачно. Алгоритми на којима се заснива софтвер AutoDock 4.2 могу предвидети позиције лиганда унутар протеинске мете и проценити их бодовањем функција дефинисаних постављањем оквира мреже. HSA је смештен у решеткасту кутију димензија $\text{\AA}^3$ усмерених у -x, -y, и -z правцима тако да се покрије место везивања за протин и да се лиганд може слободно кретати. Размак између тачака мреже од 0,375 $\text{\AA}$ коришћен је за ауто мреже. Добијени резултати су анализирани и илустровани у Discovery Studio 4.0.

3.10. Утицај дескриптора физичко-хемијских особина HPD (logP, Mw, Vol и pKa) на степен његовог везивања за протеине плазме

Израчунавање молекуларних дескриптора антипсихотика на основу њихових молекуларних структура извршено је коришћењем неколико софтверских пакета. Дескриптори молекулска маса (Mw) и запремина (Vol) су израчунати применом софтвера за приказивање (Molinspiration, www.molinspiration.com). Дескриптори липофилности, седам различитих

логаритамских вредности, logP (AlogPs, AClogP, milogP, AlogP, MlogP, XLOGP2, XLOGP3) и њихови подаци о растворљивости у води (logS), израчунати су применом софтверског пакета виртуелне лабораторије за рачунарску хемију (Virtual Computational Chemistry Laboratory, www.vcslab.org). Израчунавање другог параметра липофилности, ClogP вредности, извршена је применом софтверског пакета Chem-Draw ultra 12.0. Банка лекова (DrugBank, www.drugbank.ca) је коришћена за израчунавање дескриптора киселости (pKa вредности). Подаци везивања за протеинне плазме (PPB), као и вредности експерименталних параметара липофилности (log P_{exp}) испитиваних лекова, добијени су коришћењем података из банке лекова (*DrugBank*, www.drugbank.ca). За статистичку анализу података коришћен је програм Microsoft Excel 2003.

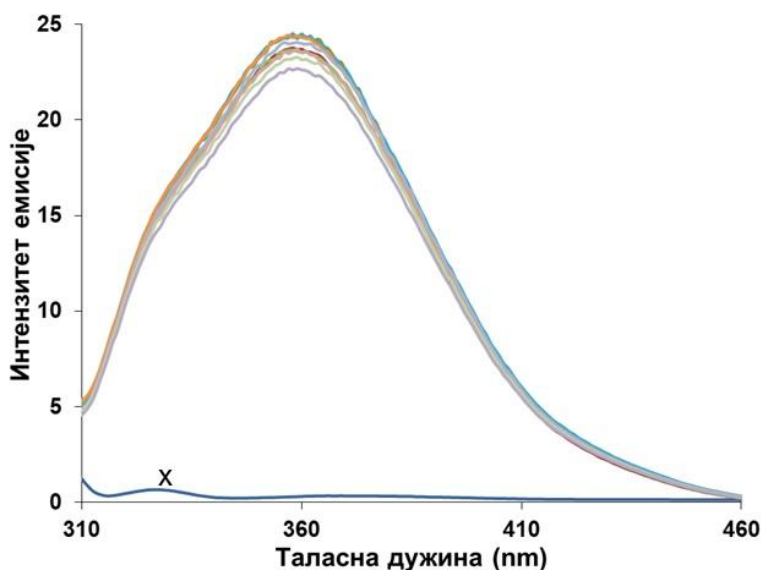
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Интеракције халоперидола и хуманог серумског албумина

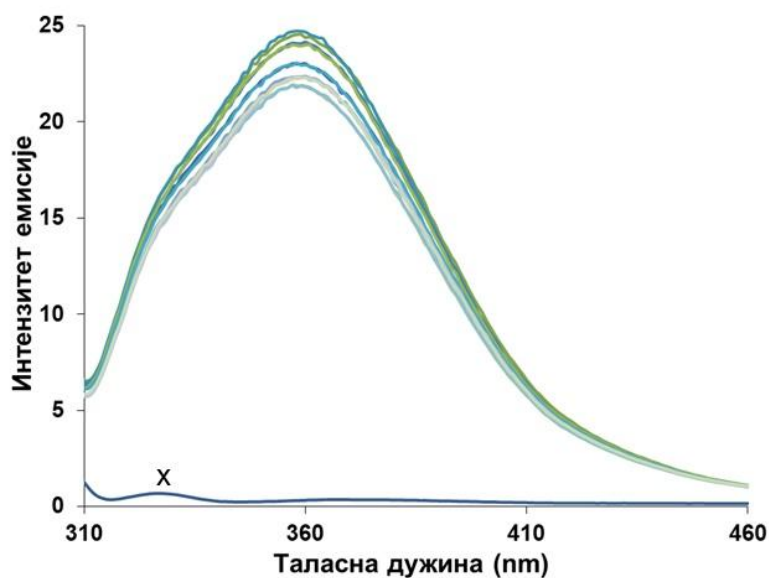
У циљу разјашњавања природе и карактеристика интеракције HSA-HPD и њеног значаја за везивање лека за протеинне плазме, коришћене су спектроскопске методе. Анализирани су емисиони и апсорпциони спектри, механизам гашења флуоресценције, као и параметри везивања, укључујући константе афинитета, број и природу места везивања и термодинамичке параметре интеракције.

4.1.1. Емисиони спектри HSA у присуству HPD

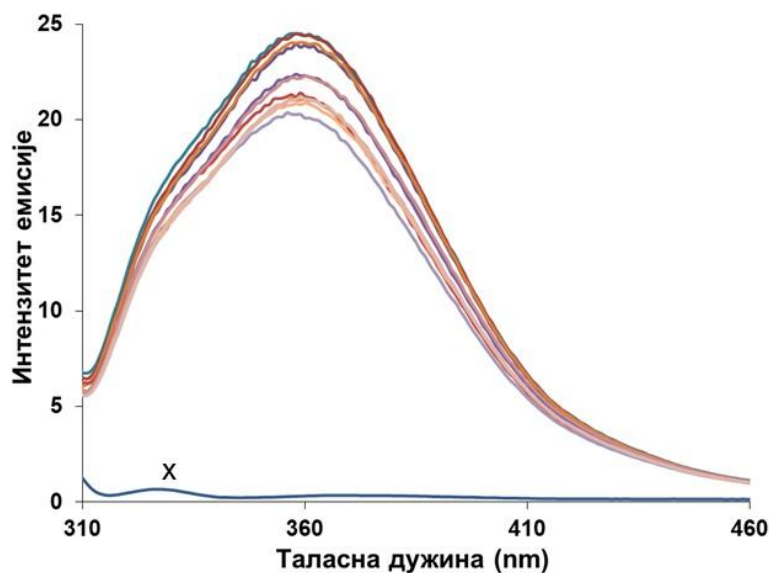
Емисиони спектри HSA у присуству растућих концентрација HPD, при физиолошкој рН вредности ($pH = 7,4$) и на три различите температуре, су снимљени и представљени на Сликама 9, 10 и 11. Када се молекул HSA побуди на 295 nm, долази до унутрашње емисије протеина што је резултат присуства остатака аминокиселина, триптофана (Trp) и тирозина (Tyr) (114), а пре свега остатка триптофана у поддомену ПА. Управо на основу ове особине испитивали смо везивање малих молекула (лека, флавоноида и јона метала) за HSA(115). На свим Сликама су приказани спектри емисије 2 μM HSA, у односу на спектре растућег опсега концентрација HPD од 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 μM . Као што се види на Сликама, присуство растућих концентрација HPD узрокује смањење интензитета максимума емисије протеина који се уочава на $\lambda_{em} = 350$ nm, али истовремено не долази и до померања емисионог максимума. На основу добијених резултата можемо да претпоставимо да присуство HPD узрокује конформационе промене у микроокружењу триптофана и да HPD интерагује са HSA.



Слика 9. Емисиони спектри HSA у присуству различитих концентрација HPD ($T = 298$ K, $pH = 7,4$). $[HSA] = 2,0$ μM . Крива x емисиони спектар HPD, $[HPD] = 70$ μM .



Слика 10. Емисиони спектри HSA у присуству различитих концентрација HPD ($T = 303\text{ K}$, $\text{pH} = 7,4$). $[\text{HSA}] = 2,0\text{ }\mu\text{M}$. Крива x емисиони спектар HPD, $[\text{HPD}] = 70\text{ }\mu\text{M}$.



Слика 11. Емисиони спектри HSA у присуству различитих концентрација HPD ($T = 310\text{ K}$, $\text{pH} = 7,4$). $[\text{HSA}] = 2,0\text{ }\mu\text{M}$. Крива x емисиони спектар HPD, $[\text{HPD}] = 70\text{ }\mu\text{M}$.

4.1.2. Механизам интеракције између HPD и HSA

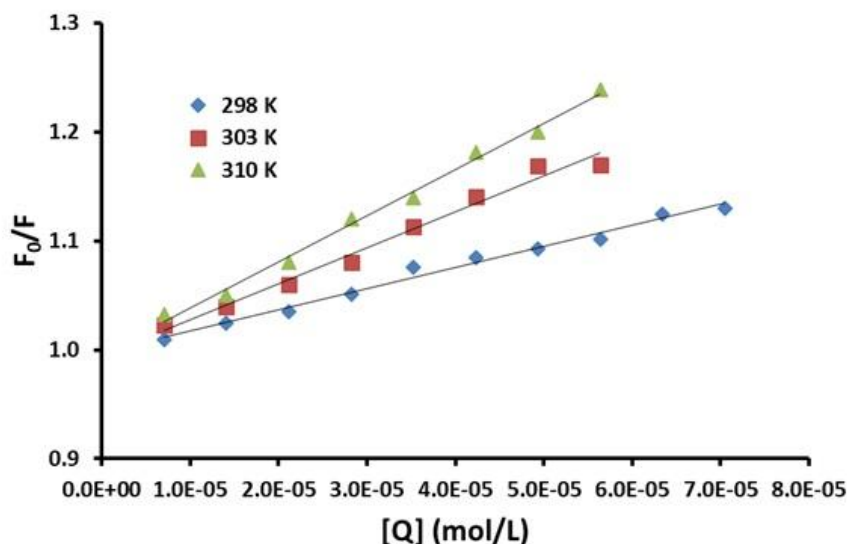
Механизам гашења емисије протеина се може реализовати на три начина: као статички, динамички или мешовити. Код статичког механизма гашења долази до формирања комплекса између флуорофоре протеина и квенчера, при чему награђен комплекс нема флуоресцентна

својства, динамички механизам гашења се дешава као последица судара између флуорофоре и квенчера при преласку у побуђено стање, а мешовити механизам представља комбинацију два поменута механизма. У циљу дефинисања механизма гашења емисије HSA снимани су емисиони спектри испитиваних система на три различите температуре. На основу добијених вредности максимума емисије HSA у присуству HPD, као и линеарне зависности F_0/F у односу на $[Q]$ (Слика 12), може се претпоставити да је механизам гашења остварен кроз динамички или статички процес. Стерн-Волмерове константе гашења одређене су применом Стерн-Волмерове једначине (116):

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

где су F_0 и F интензитети емисије протеина у одсуству и присуству квенчера емисије (HPD), константа бимолекуларног гашења означава се као K_q , τ_0 се односи на животни век флуорофоре у одсуству HPD, тј. квенчера ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), $[Q]$ је концентрација слободног HPD, док се Стерн-Волмерова константа гашења се означава као K_{sv} (Табела 1). Приликом свих израчунавања за концентрацију лека је узета укупна концентracија HPD, зато што у нашим експериментима није позната концентracија слободног HPD.

Са повећањем температуре долази до повећања K_{sv} са $2,05 \times 10^3$ на $3,61 \times 10^3$ што указује на динамички механизам гашења емисије. Истовремено, вредности K_q на свим испитиваним температурама превазилазе ред величине за гашење остварено динамичким механизмом ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) што указује на активно учешће статичког механизма гашења.



Слика 12. Стерн-Волмер-ов дијаграм гашења емисије HSA у присуству растућих концентрација HPD на различитим температурама

Табела 1. Параметри интеракције HSA-HPD система на различитим температурама

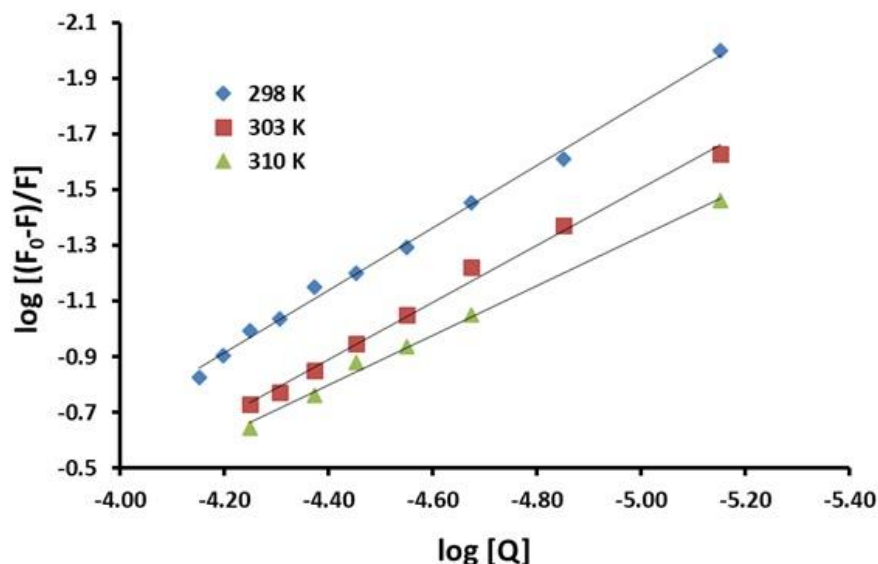
T/K	$K_{sv}/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$K_q/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}$	R^{2*}	$K_a/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	n	R^2
298	$2,05 \times 10^3$	$2,05 \times 10^{11}$	0,9928	$7,94 \times 10^3$	1,12	0,9954
303	$3,50 \times 10^3$	$3,50 \times 10^{11}$	0,9885	$4,07 \times 10^2$	1,02	0,9920
310	$3,61 \times 10^3$	$3,61 \times 10^{11}$	0,9953	$1,95 \times 10^2$	0,93	0,9900

4.1.3. Одређивање константи и места везивања између HPD и HSA

Мерење емисије протеина у присуству растућих концентрација лека пружа вредне податке за израчунавање константи везивања (K_a) као и броја места везивања (n) на HSA. Вредности константи везивања указују на концентрацију слободног лека, а самим тим и његову ефикасност. Однос између интензитета гашења емисије и концентрације квенчера може се описати следећом једначином (114):

$$\log F_0 - F/F = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

где се F_0 и F односе на интензитете флуоресценције протеина без и у присуству квенчера, K_a означава константу везивања или привидну константу асоцијације која се односи на интеракцију између лека и протеина, n се односи на број места везивања по молекулу лека, а $[Q]$ представља концентрацију квенчера. Вредности K_a и n се израчунавају из пресека и нагиба праве (Слика 13) која је добијена на основу графика зависности логаритма $[(F_0 - F)/F]$ у односу на логаритам $[Q]$. Добијене вредности су приказане у Табели 1.



Слика 13. Дијаграм логаритамске зависности $\log(F_0 - F)/F$ у односу на $\log [Q]$ на различитим температурама

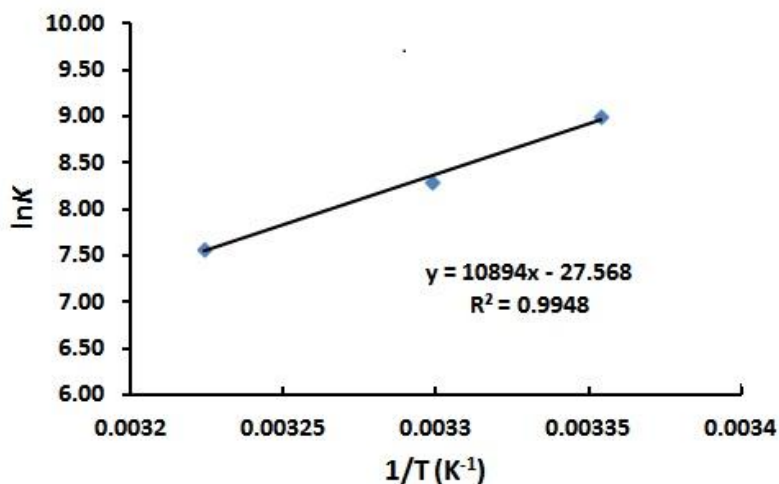
Константе везивања су реда величине 10^2 - 10^3 , што указује на то да комплекс HSA-HPD није нарочито стабилан, односно да HPD има мали афинитет према HSA. Приказане вредности константи везивања на 273, 303 и 310 K ($7,94 \times 10^3$; $4,07 \times 10^2$ и $1,95 \times 10^2$) јасно показују да са порастом температуре стабилност комплекса додатно опада, али истовремено је јасно да долази до повећања ефикасности HPD, што се објашњава повећањем концентрације слободног лека у плазми. Вредности броја места везивања на протеину (n) приказане у Табели 1, указују на то да се HPD веже за једно место на протеину.

4.1.4. Одређивање термодинамичких параметара између HPD и HSA

Интеракције између протеина и малих молекула могу се остварити на више начина у зависности од везујућих сила које међу њима делују. Нековалентне интеракције се најчешће приписују дејству водоничних веза, електростатичких сила, ван дер Валсових сила или хидрофобних интеракција (117). Идентификација остварених нековалентних интеракција се врши на основу термодинамичких параметара (промене Гибсове слободне енергије, ΔG^0 , промене енталпије, ΔH^0 и промене ентропије, ΔS^0). За одређивање термодинамичких параметара је неопходно анализирати понашање испитиваних система на више различитих температура. На основу емисионих спектра HSA у присуству растућих концентрација HPD сниманих на различитим температурама (298, 303 и 310 K), добијене су вредности за ΔH^0 и ΔS^0 применом ван'т Хофове (van't Hoff) једначине:

$$\ln K_a = \Delta H^0 / RT + \Delta S^0 / R \quad (3)$$

као резултат зависности $\ln K_a$ од $1/T$, из пресека и нагиба праве (Слика 14).



Слика 14. Интеракција између HSA и HPD на 298, 303 и 310 K представљена Ван'т Хоф-овим графиком

Промена слободне енергије, ΔG^0 добијена је на основу Гибс-Хелмхолцове (Gibbs-Helmholtz) једначине:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4)$$

где је K_a константа везивања на одговарајућој температури, R је универзална гасна константа и T је термодинамичка температура. Термодинамички параметри су приказани у Табели 2.

Табела 2. Параметри интеракције HSA-HPD система на три температуре

T/K	$\Delta H^\circ/kJ\ mol^{-1}$	$\Delta S^\circ/J\ mol^{-1}K^{-1}$	$\Delta G^\circ/kJ\ mol^{-1}$
298			-15,69
303	-89,56	225,94	-15,81
310			-15,96

Можемо видети да су вредности ΔG° негативне, што указује да се остварена интеракција дешава спонтано. Негативне вредности енталпије (ΔH°) и позитивне вредности ентропије (ΔS°) указују на то да везивање HSA-HPD у великој мери зависи од електростатичких интеракција, које обезбеђују стабилност комплекса (118).

4.1.5. Одређивање афинитета и начина везивања HPD за HSA

Појам преноса енергије флуоресцентне резонанције (FRET) увео је и математички формулисао Теодор Форстер (Theodor Förster), немачки научник по коме се другачије назива и Форстеров енергетски трансфер. FRET је процес код ког се квант енергије преноси са места апсорпције у посматраном систему на место где се та енергија користи. Овај процес се остварује путем резонантне интеракције између хромофора, при чему је неопходан услов да се посматране хромофоре налазе на растојању које је знатно веће од интератомског. На тај начин не долази до кинетичких судара између донора и акцептора, емитовања зрачења и конверзије у топлотну енергију. FRET је важан физички феномен за разумевање неких биолошких система, па има практичну примену за одређивање просечних растојања између остатака аминокиселина у протеину (донора) и везујућег лека (акцептора) (119-121). Форстер (122, 123) је показао да ефикасност преноса енергије флуоресцентне резонанције (EFRET) зависи од инверзног шестог степена растојања између пара донора и акцептора (r) и дата је једначином:

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} \quad (5)$$

где су F и F_0 интензитети флуоресценције донора (у нашем експерименту је то HSA) у присуству и одсуству акцептора (испитиван лек), а R_0 је Форстеров радијус на коме се половина побуђујуће енергије протеина преноси на хромофору халоперидола. Стога се Форстеров радијус (R_0) дефинише као растојање на којем је ефикасност преноса енергије 50%.

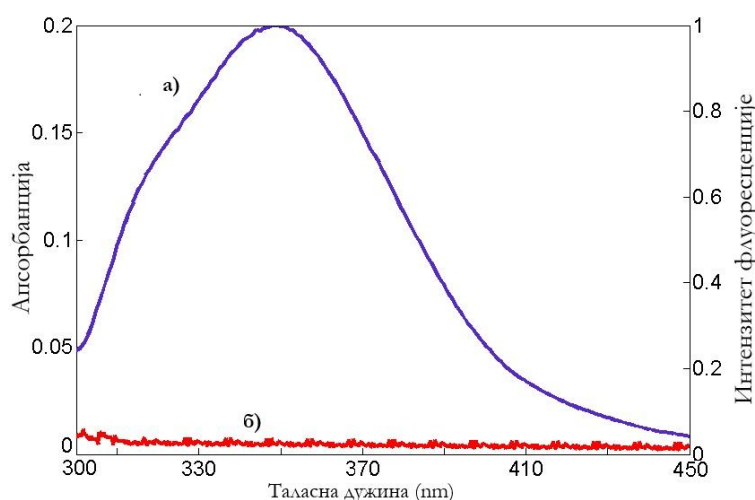
Форстеров радијус (R_0) зависи од квантног преноса флуоресценције протеина у одсуству халоперидола (Φ), индекса преламања раствора (N), диполне угаоне оријентације сваког молекула (K^2) и спектралног интеграла преклапања донора-акцепторског пара (J) и дат је једначином:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (6)$$

Брзина FRET-а зависи од степена спектралног преклапања између пара донора-акцептор, квантног приноса донора, релативне оријентације прелаза донора-акцептор, диполних момената и растојања које раздваја хромофоре донора-акцептор. Интеграл преклапања (J) може се израчунати једначином:

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (7)$$

где је $F(\lambda)$ интензитет флуоресценције флуоресцентног донора на таласној дужини λ , а $\epsilon(\lambda)$ је моларни коефицијент апсорпције акцептора на таласној дужини λ . За интеракцију лек-HSA, $K^2 = 2/3$, $N = 1,336$ и $\Phi = 0,118$ (124). На Слици 15 приказани су апсорпциони спектар HPD и емисиони спектар HSA снимљени на 298 K. Преклапањем апсорпционог спектра лека са емисионим спектром протеина добијени су подаци за израчунавање интеграла преклапања ($1,76 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^{-4}$), Форстеровог радијуса (3,55 nm) и ефикасности преноса енергије флуоресцентне резонанције (0,149). На основу добијених вредности одређено је и растојање између донора и акцептора и износи 5,31 nm. С обзиром да је растојање између донора и акцептора мање од 7 nm, можемо да изведемо закључак да је пренос енергије могућ са HSA на HPD и да се одвија са великом вероватноћом (125).



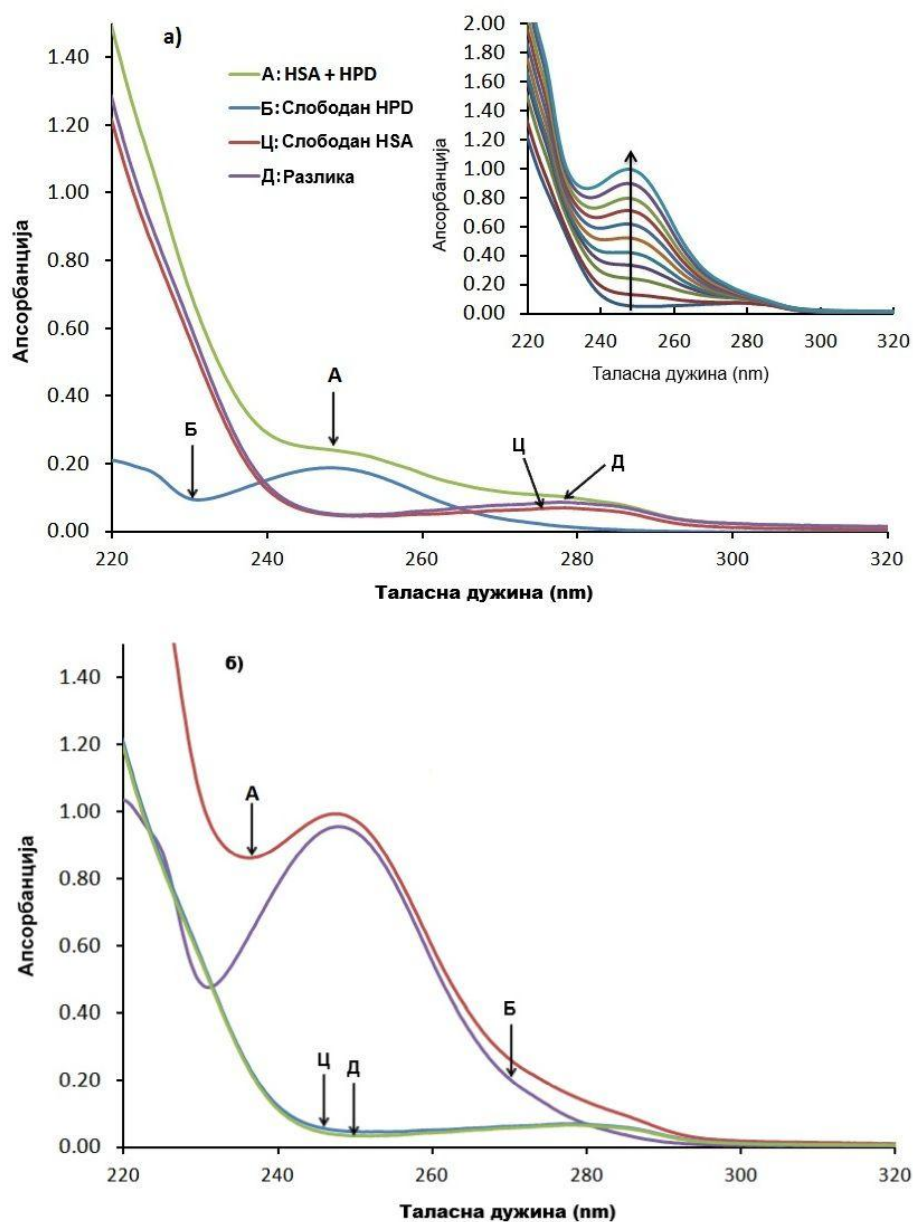
Слика 15. Преклапање емисионог спектра HSA и апсорпционог спектра HPD (а, б). [HSA] = [HPD] = 2,0 μM .

4.1.6. Апсорпциона спектрофотометрија

Апсорпциона спектроскопија је метода која се веома често користи као додатна метода за дефинисање механизма гашења емисије протеина. У ту сврху се анализирају апсорпциони спектри испитиваних система. Наиме, када се гашење емисије дешава динамичким механизмом (долази до судара између карактеристичне флуорофоре протеина и испитиваног лека) долази до промена само у побуђеном стању, па тако апсорпциони спектри задржавају првобитан изглед. Супротно, промене у изгледу апсорпционих спектра недвосмислено су последица статичког гашења емисије, када долази до формирања комплекса између протеина и испитиваног лека (126).

У оквиру испитивања интеракција система HSA-HPD снимани су апсорпциони спектри у UV области на температури од 298 K. Експеримент је осмишљен тако да се пореде апсорпциони спектри HSA у одсуству и присуству HPD, као и вредности њихових апсорпционих максимума. На слици 16 се могу видети четири апсорпционе криве. Апсорпциони спектар HPD представљен је кривом Б и лако се уочава максимум на 247 nm, док апсорпциони спектар HSA има слаб апсорпциони максимум на око 278 nm (крива Ц), а резултат је апсорпције која потиче од остатака три ароматичне аминокиселине (Trp, Tyr и Phe). Крива А

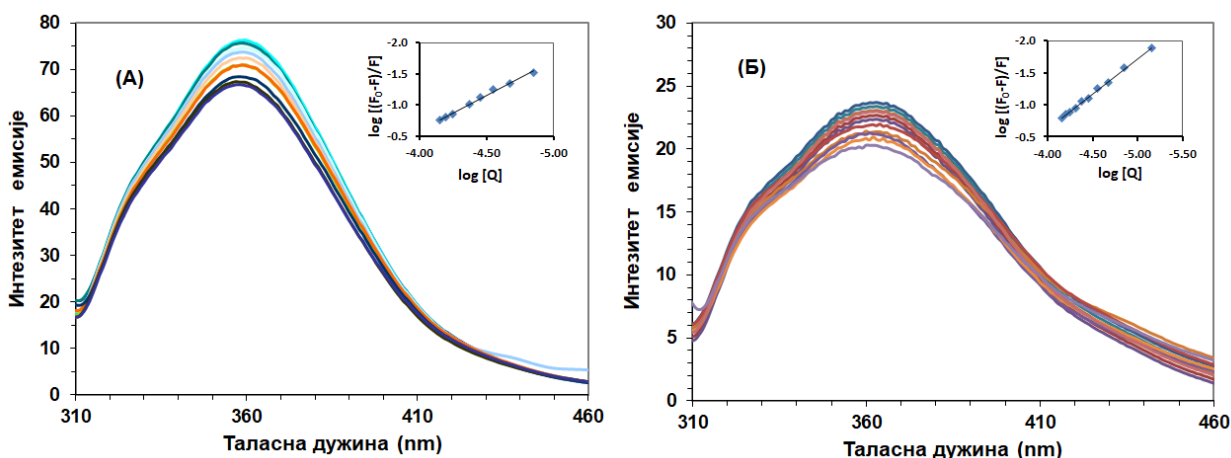
приказује апсорпциони спектар HSA у присуству HPD, а крива Д разлику између апсорпционих спектра HSA-HPD комплекса и самог HPD. Ако посматрамо криве Ц и Д, очигледно је да апсорпциони максимум HSA (крива Ц) на 278 nm остаје готово непромењен и након додавања HPD (крива Д), што указује на то да не постоје значајне промене у апсорпционом спектру, што искључује доминантно статичко гашење.



Слика 16. UV-Вис спектри HSA у присуству HPD: а) апсорпциони спектар HSA-HPD комплекса у односу 1:7 и б) 1:35; А, апсорпциони спектри HSA у присуству HPD; Б, апсорпциони спектар HPD; Ц, апсорпциони спектар HSA; Д, разлика између апсорпционих спектра HSA-HPD комплекса и HPD. На уметнутом делу приказан је апсорпциони спектар HSA у присуству растућих концентрација HPD. [HSA] = 2,0 μ M, [HPD] = 0 - 70 μ M.

4.2. Идентификација везујућег/везујућих места HPD на HSA

Анализом кристалне структуре HSA откривено је да се у овом молекулу налазе три домена (I, II и III), у оквиру којих постоје по два поддомена, А и Б. Као најчешће мете лекова који су у свакодневnoj употреби, на молекулу албумина су идентификовани место I и место II (127,128). Као специфични маркери везивања, тј. лекови који се вежу за место I могу да се користе варфарин, азапропазон, азидотимидин, индометацин и др., а за место II, ибупрофен, халотан, диазепам, пропофол. Да би се идентификовала места везивања малих молекула за HSA, уобичајено је спроводити компетитивне експерименте са специфичним маркерима везивања.



Слика 17. Емисиони спектри HSA-IP (А) и HSA-WF (Б) у присуству различитих концентрација HPD ($T = 298\text{ K}$, $pH = 7,4$). $[HSA] = [IP \text{ или } WF] = 2,0\text{ }\mu\text{M}$, $[HPD] = 0-70\text{ }\mu\text{M}$. На уметнутом делу је дијаграм логаритамске зависности $\log(F_0 - F)/F$ у односу на $\log [Q]$.

У оквиру испитивања интеракција HPD са HSA, извршена су компетитивна експериментална испитивања употребом варфарина (WF), маркера специфичног за место I, као и ибупрофена (IP), маркера специфичног за место II (129). На Слици 17 су приказани емисиони спектри система HSA-IP и HSA-WF у молском односу 1:1 ($2\text{ }\mu\text{M}$), у присуству растућих концентрација HPD ($5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70\text{ }\mu\text{M}$). Спектар који показује највећи интензитет емисије односи се на двокомпонентне системе HSA-IP, односно HSA-WF. Очигледно је да присуство растућих концентрација HPD утиче на смањење интензитета емисије двокомпонентних система, што узрокује смањење вредности константи и то, са $7,94 \times 10^3\text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ на $6,17 \times 10^3\text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ у присуству WF и $7,76 \times 10^3\text{ dm}^3\text{mol}^{-1}$ у присуству IP. Присуство WF смањује константу везивања трокомпонентног система (K_a) за $22,3\%$, док IP константу везивања редукује за $2,27\%$ у поређењу са константом везивања двокомпонентног HSA-HPD система. Ови резултати показују да присуство WF значајније смањује константу везивања, док постоји само мали утицај ибупрофена на посматрану вредност. На основу наведеног, можемо закључити да се HPD делимично везује за место I или у његовом окружењу на HSA.

4.3. Интеракције халоперидола и хуманог серумског албумина испитане молекулским докинг

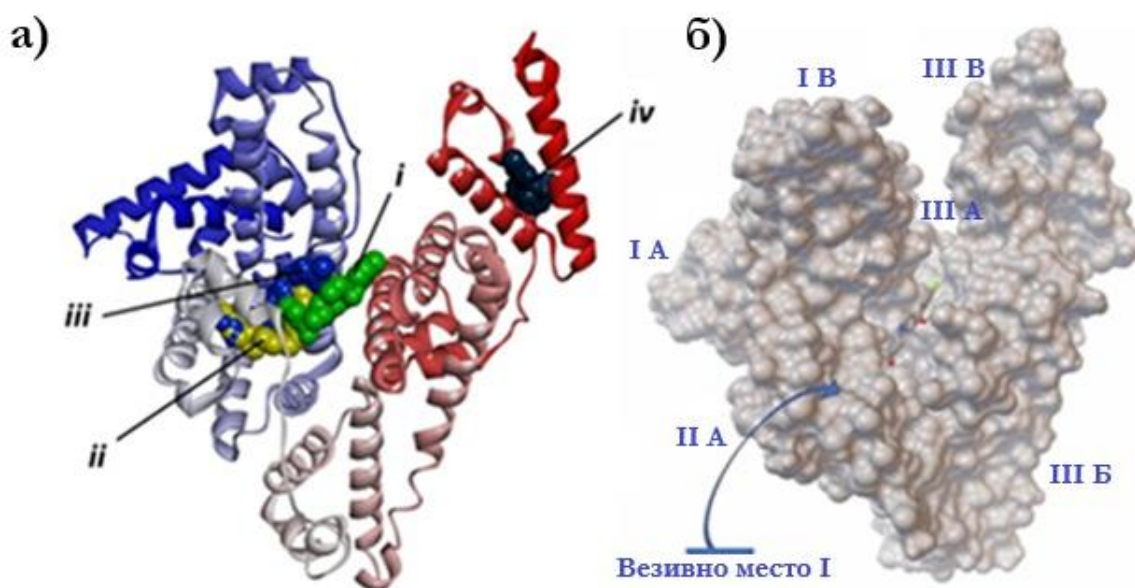
Применом компјутерске методе молекулског доковања, испитиване су интеракције између халоперидола и албумина. У истраживањима овог типа, квалитет предвиђања у великој мери зависи од начина на који докинг програм истражује простор могућих поза и како оцењује њихову енергетску повољност. Зато су у овој студији примењена три различита софтверска решења, од којих AutoDock и AutoDock Vina (130, 131) припадају академским докинг платформама које користе стохастичку глобалну оптимизацију у комбинацији са унапред израчунатим енергетским мрежама рецептора, док Vina додатно интерно генерише и оптимизује мрежу бодовања током самог процеса доковања. Комерцијални програм GOLD (132), с друге стране, примењује генетички алгоритам претраживања, а енергетску евалуацију комплекса врши CHEMPLP емпиријском функцијом, конципираном да са већом прецизношћу предвиди положај лиганда унутар протеинског џепа.

Табела 3. Афинитети везивања HSA-HPD на основу AutoDock, Vina и Gold (CHEMPLP)

<i>T/K</i>	Место I	Место III
AutoDock ^a	-17,49 (i)	
Vina ^a	-34,3 (ii)	
Gold ^b	82,32 (iii)	93,73(iv)

^a Слободна енергија везивања $\Delta G^0/\text{kJ mol}^{-1}$

^b Функција укупног бодовања



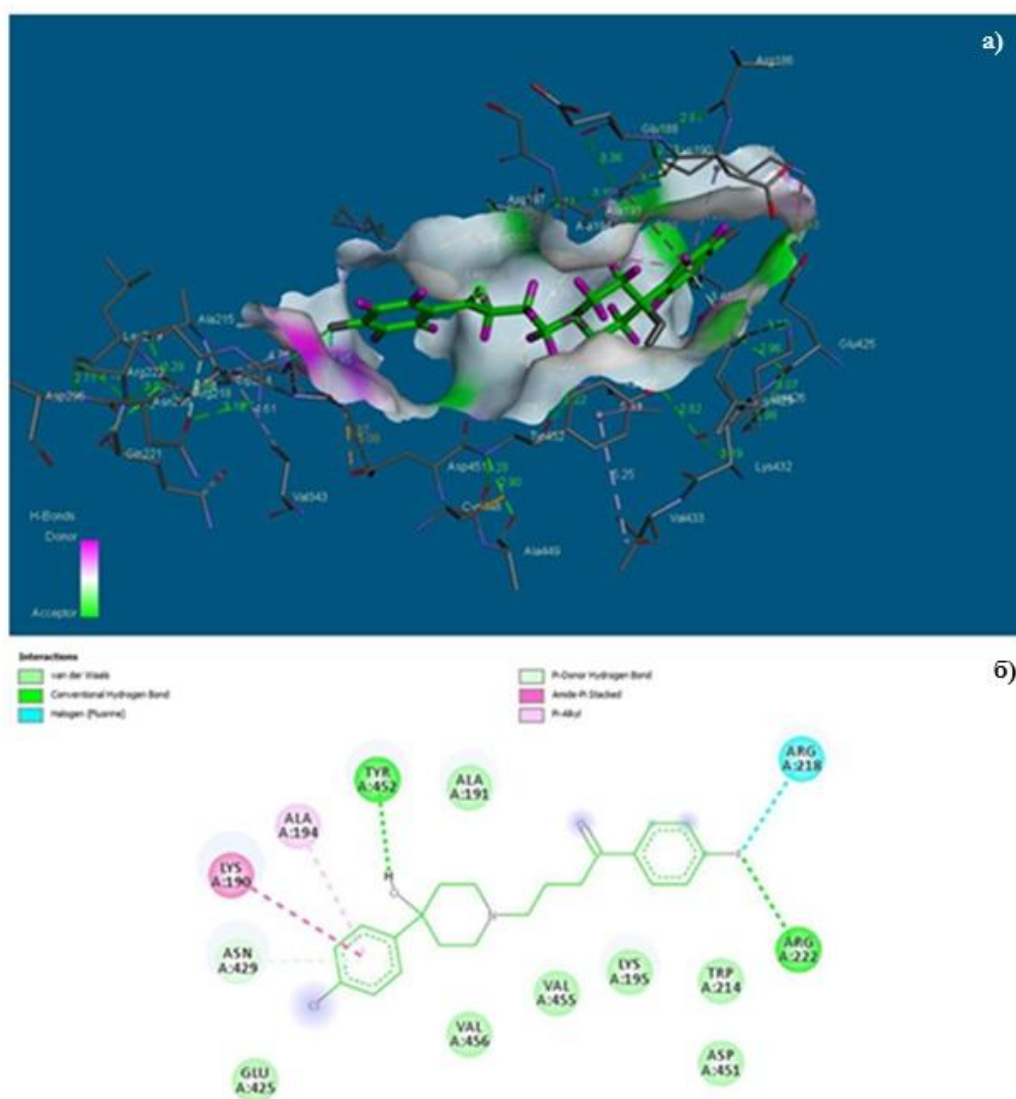
Слика 18. Докинг анализа комплекса халоперидол-хумани серумски албумин: (а) приказ везаних комплекса добијених програмима AutoDock, AutoDock Vina и GOLD; (б) најповољнија поза халоперидола у везивном џепу албумина предвиђена докинг алгоритмима.

Wang и сарадници (133) су у једној од најцитиранијих и најобухватнијих студија у овој области показали да GOLD остварује високу ефикасност у претраживању поза лиганда, док академски програми AutoDock и AutoDock Vina испољавају већу поузданост у домену скоринг функције, што је довело у питање опште уверење да комерцијални докинг софтвер нужно надмашује слободно доступне академске платформе. У том контексту, резултати добијени у овој дисертацији додатно подржавају став да избор докинг методе мора бити условљен типом рецептора и истраживачким циљем, а не искључиво доступношћу софтвера. Предвиђене вредности докинг афинитета, позе и доминантне интеракције комплекса халоперидол-HSA приказане су у Табели 3 и на Слици 18, које заједно пружају структурну и енергетску интерпретацију оствареног везивања.

Употребом докинг програма GOLD идентификована су два потенцијално најповољнија везивна региона, Место III и Место I, који су показали веома сличне вредности скоринг функције, што указује на упоредив афинитет прихватања лиганда у оба џепа. Иако су оба места структурно и енергетски вероватна, резултати докинга су у већој мери фаворизовали микросредину Места I, због чега је управо овај џеп изабран за даљу структурну и термодинамичку интерпретацију комплекса HSA-HPD.

Анализом термодинамичких параметара везивања утврђено је да комплекс халоперидол-албумин није стабилизovan доминантно јаким интермолекулским силама ($\Delta G^0 = -15,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ на 298 K), што је у складу са литературним подацима који описују сличне HSA системе умереног афинитета. За даљу интерпретацију изабрана је поза добијена AutoDock протоколом (Табела 3, Слика 18б), јер кореспондира и са израчунатом енергијом слободног везивања комплекса ($-17,49 \text{ kJ mol}^{-1}$), као и са налазима Wang и сарадника, који су показали да академски програми постижу већу поузданост у домену скоринг евалуације у односу на комерцијалне алгоритме.

Просторна организација и природа остварених нековалентних контаката HSA-HPD приказане су на Слици 19, док је највероватнија, доминантна конформација халоперидола у хидрофобном џепу Места I приказана на Слици 19а, са јасно уочљивом оријентацијом хлоробензенског прстена ка неполарном језгру џепа.



Слика 19. Најдоминантнија конформација халоперидола докованог на албумину (а) основне 2Д HSA-HPD интеракције (б)

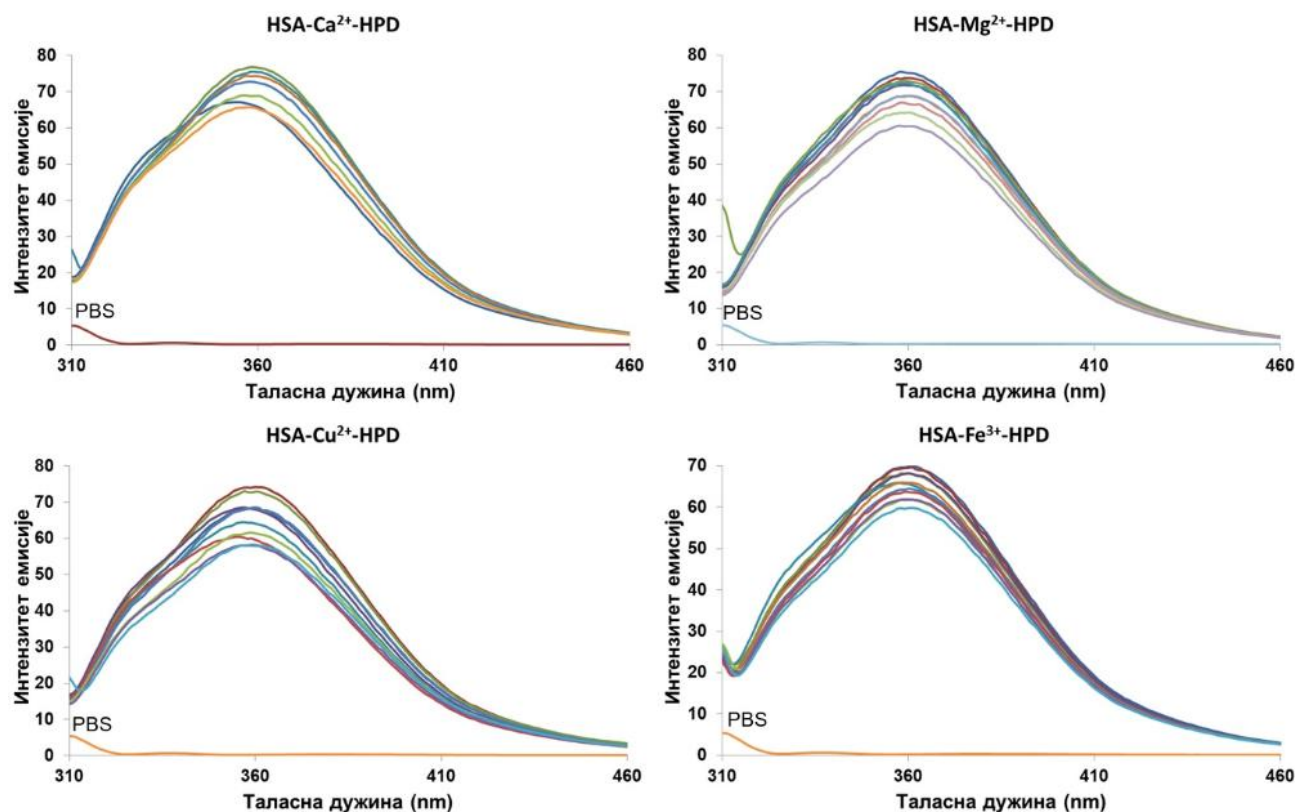
Утврђено је да је кључни допринос електростатичкој стабилизацији комплекса условљен водоничним везама између фенолне ОН групе халоперидола и остатка Tyr452, као и интеракцијом између флуоровог атома НРД и Arg222, која испољава карактер усмерене, умерено јаке водоничне/халогене везе. Остале стабилизујуће интеракције доминантно припадају π -алкил и π -амидним контактима између хлоробензенског прстена и остатака Lys190 и Ala194, што указује на изражен хидрофобни и ароматски допринос везивању, типичан за Судлов I поддомен HSA протеина.

4.4. Испитивање утицаја јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} на HSA-HPD интеракцију

Битна улога HSA је транспорт разноврсних молекула попут лекова, хормона, витамина, масних киселина, јона метала. Трагови јона метала, посебно двовалентних, неопходни су за одржавање хомеостазе и представљају важну компоненту структуре бројних протеина (134). Важно је напоменути да HSA неселективно врши транспорт и физиолошких (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и Cu^{2+}) и токсичних јона метала (попут Cd^{2+} и Ni^{2+}). Неки извори наводе да метални јони могу формирати комплекс са HSA (135, 136). Стога су у овој студији испитани ефекти неких јона метала (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+}) на везивање HPD са HSA. Под датим експерименталним условима, ниједан од катјона није нагradio талог у фосфатном пуферу.

4.4.1. Емисиони спектри система HSA-HPD у присуству јона Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}

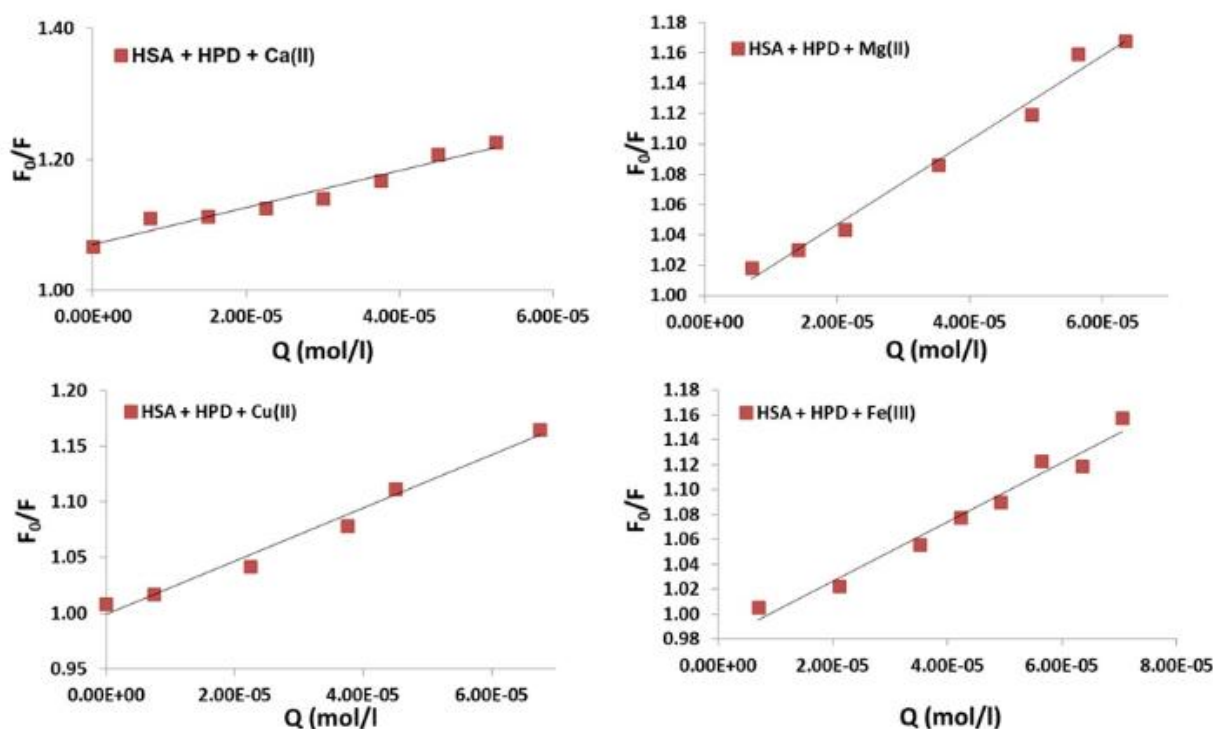
У оквиру ових експеримената двокомпонентни систем HSA- M^{n+} , припремљен у молском односу 1:1, изложен је растућим концентрацијама HPD (0-70 μM) на температури од 298 К. Добијени емисиони спектри двокомпонентног комплекса HSA-HPD, као и трокомпонентних система, дати су на Слици 20. Резултати јасно показују да присуство јона метала доводи до смањења интензитета емисије, што недвосмислено указује на постојање интеракције између испитиваних компоненти.



Слика 20. Емисиони спектри HSA-HPD у присуству Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} јона метала ($T = 298$ К, $\text{pH} = 7,4$). $[\text{HSA}] = [\text{M}^{n+}]$ 2,0 μM , $[\text{HPD}] = 0\text{-}70$ μM .

4.4.2. Механизам интеракције система HSA-HPD у присуству јона метала Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}

На Слици 21 приказана је линеарна зависност F_0/F у односу на $[Q]$ на основу чега се закључује да је гашење емисије остварено кроз један механизам, динамички или статички. Код свих испитиваних система вредности K_q су реда величине 10^{11} што наводи на претпоставку да је гашење остварено кроз учешће статичког механизма.

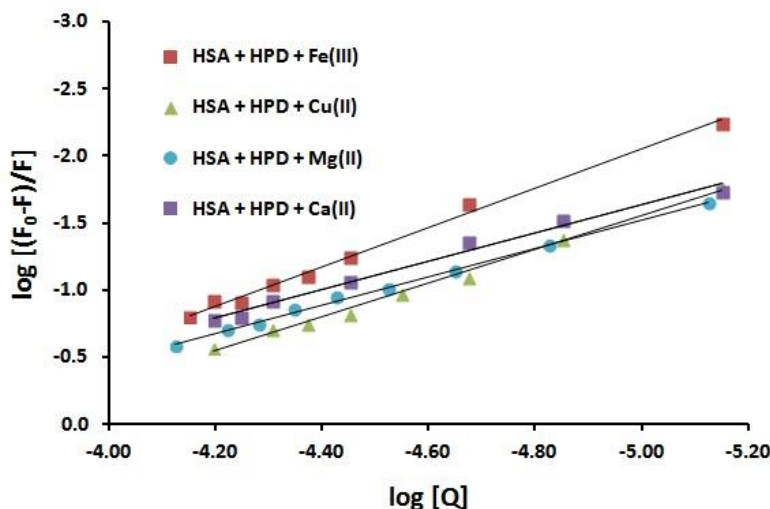


Слика 21. Стерн-Волмер-ов дијаграм гашења емисије HSA-HPD у присуству јона метала (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+})

4.4.3. Одређивање константи и места везивања система HSA-HPD у присуству Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} јона

На Слици 22 приказан је график $\log[(F_0-F)/F]$ у односу на $\log[Q]$ за систем HSA-HPD у присуству испитиваних јона метала. На основу добијених података одређене су константе везивања комплекса HSA-HPD у присуству наведених јона, а резултати су приказани у Табели 4.

Као што се може видети, присуство јона метала доводи до смањења константи везивања ($4,24 \times 10^3$ и $5,67 \times 10^3$ у присуству Mg^{2+} и Ca^{2+}) или њиховог повећања ($5,61 \times 10^4$ и $1,81 \times 10^5$ у присуству Cu^{2+} и Fe^{3+}) између халоперидола и хуманог серумског албумина. Добијене вредности недвосмислено указују на могуће конформационе промене у близини места везивања, што потврђује значај металних јона у модулацији афинитета комплекса.



Слика 22. Дијаграм логаритамске зависности HSA-HPD у присуству различитих јона метала на 298 K

Табела 4. Утицај јона метала на константе система HSA-HPD

System	$K_{sv}/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	$K_q/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}$	R^{2*}	$K_a/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	n	R^2
HSA-HPD	$2,05 \times 10^3$	$2,05 \times 10^{11}$	0,9869	$7,94 \times 10^3$	1,12	0,9954
HSA-HPD- Ca^{2+}	$2,83 \times 10^3$	$2,83 \times 10^{11}$	0,9988	$5,67 \times 10^3$	1,05	0,9910
HSA-HPD- Mg^{2+}	$2,78 \times 10^3$	$2,78 \times 10^{11}$	0,9881	$4,24 \times 10^3$	1,05	0,9854
HSA-HPD- Cu^{2+}	$2,39 \times 10^3$	$2,39 \times 10^{11}$	0,9841	$5,61 \times 10^4$	1,26	0,9949
HSA-HPD- Fe^{3+}	$2,38 \times 10^3$	$2,38 \times 10^{11}$	0,9841	$1,81 \times 10^5$	1,50	0,9936

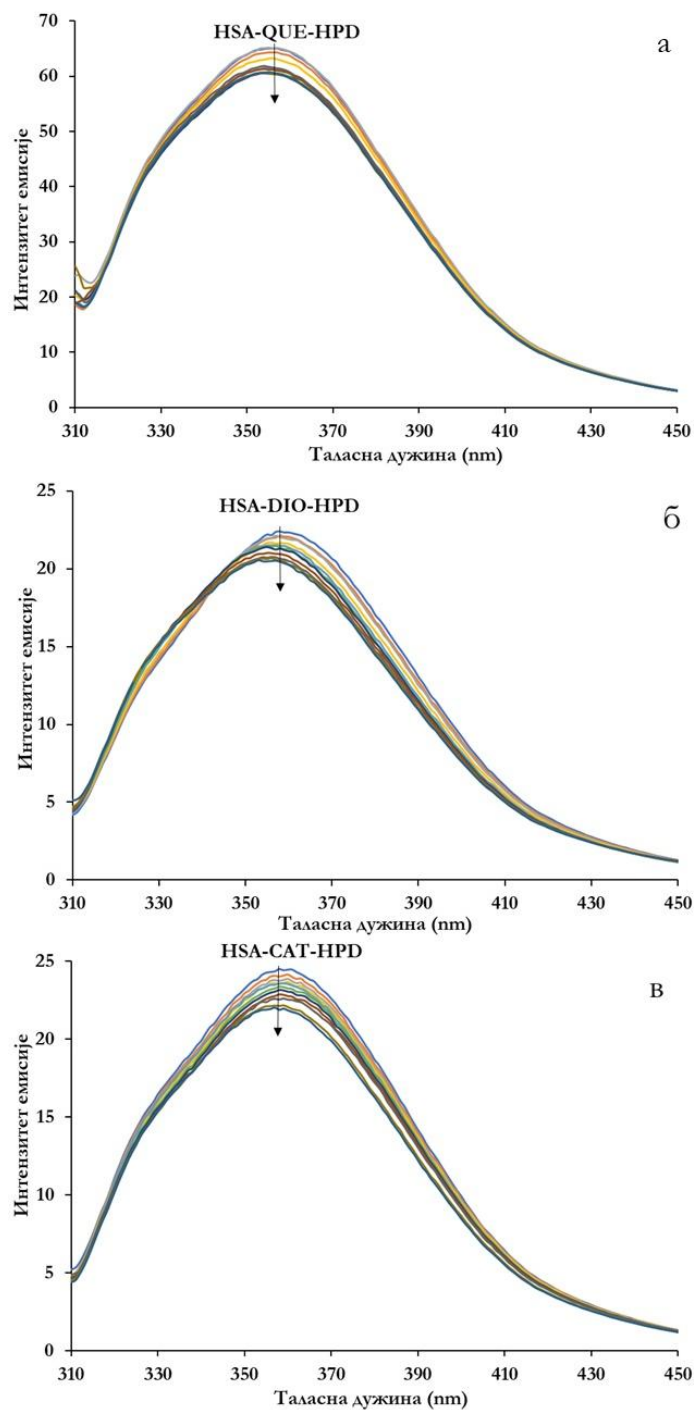
4.5. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију

У оквиру ових испитивања анализиран је утицај одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO), кверцетина и диозмина, на HSA-HPD систем. Претходно одређене константе двокомпонентног система (протеин-лек) упоређене су са константама добијеним за трокомпонентне системе (протеин-лек у присуству флавоноида). Температура на којој су вршени експерименти износи 298 K, при pH=7,4, док су константне концентрације протеина и флавоноида третиране растућим концентрацијама HPD (0-70 μM).

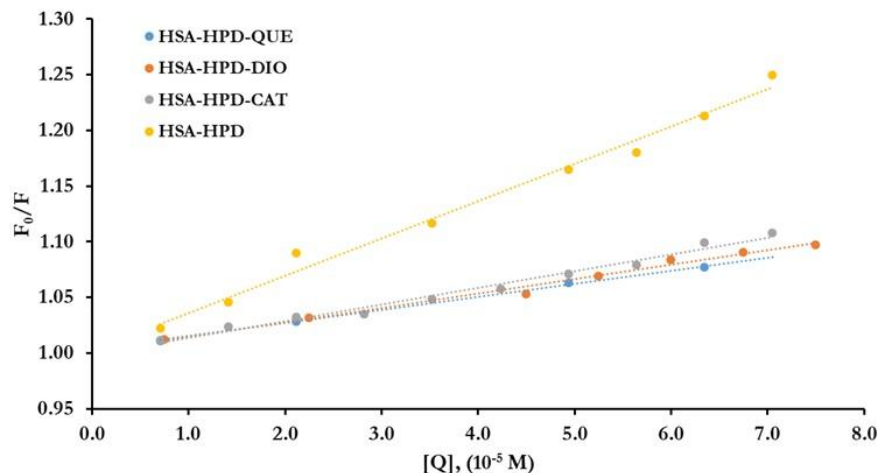
4.5.1. Емисиони спектри и механизам интеракције између HPD и HSA у присуству одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO)

На Сликама 23а, 23б и 23в приказани су емисиони спектри добијени након побуђивања на таласној дужини од 295 nm. Систем албумина и флавоноида у молском односу 1:1, третиран је растућим концентрацијама HPD ($0-7,05 \times 10^{-5}$ M). У свим испитиваним системима уочава се изражен максимум емисије на 355 nm. Са повећањем концентрације HPD, интензитет унутрашње емисије, приписане пре свега триптофану, постепено опада (137). Ова појава је карактеристична

за формирање комплекса, у конкретном случају трокомпонентних система HSA-QUE-HPD, HSA-CAT-HPD и HSA-DIO-HPD. У свим посматраним системима облик пикова и таласна дужина максимума емисије остају непромењени у поређењу са испитиваним двокомпонентним системом, што указује да присуство флавоноида не доводи до значајних спектралних померања, већ пре свега утиче на интензитет емисије и стабилност комплекса.



Слика 23. Емисиони спектар HSA-HPD у присуству QUE (а), DIO (б) и CAT (в) ($T=298$ K, $pH = 7,4$). $[HSA] = 2,0 \mu M$, $[флавоноиди] = 2,0 \mu M$ и $[HPD] = 0 - 7,05 \times 10^{-5} M$.



Слика 24. Стерн-Волмер-ов дијаграм гашења емисије HSA-HPD у присуству QUE, CAT и DIO на 303,15 K.

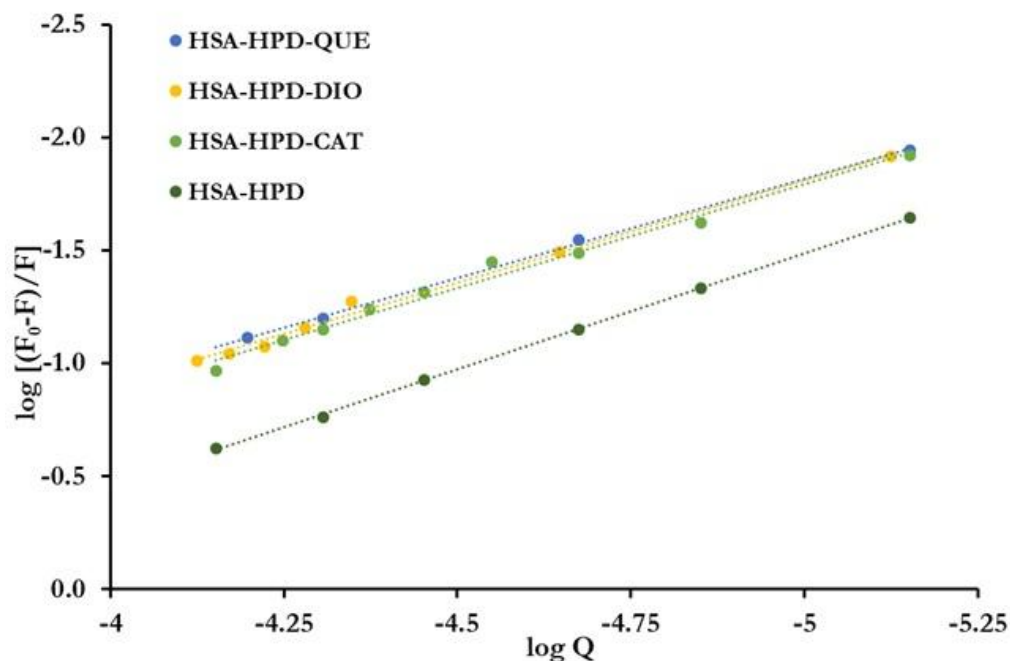
Вредности Стерн-Волмерових константи приказане су у Табели 5, а одређене су на основу дефинисаног поступка и зависности F_0/F у односу на $[Q]$ (Слика 24). Као и у случају ефекта присутних јона метала, а на основу добијених вредности K_q , може се претпоставити да се и у присуству флавоноида гашење емисије одвија статичким механизмом. Ови резултати указују да флавоноиди, попут јона метала, могу утицати на стабилност и природу комплекса, што додатно потврђује значај трокомпонентних система у разумевању интеракција протеин-лек-модулатор.

4.5.2. Одређивање константи и места везивања између HPD и HSA у присуству флавоноида

Слика 25 приказује дијаграм зависности $\log[(F_0-F)/F]$ од концентрације комплекса HSA са QUE, CAT и DIO у одсуству HPD, као и у присуству растућих концентрација HPD. Константе везивања и број везивних места дати су у Табели 5. Присуство свих анализираних флавоноида доводи до смањења константи везивања ($3,75 \times 10^2$, $5,40 \times 10^2$ и $6,24 \times 10^2$), при чему је најизраженији ефекат уочен у случају кверцетина. Овај ефекат утиче на повећање концентрације слободног лека у плазми, што потенцијално може допринети његовој већој фармаколошкој ефективности.

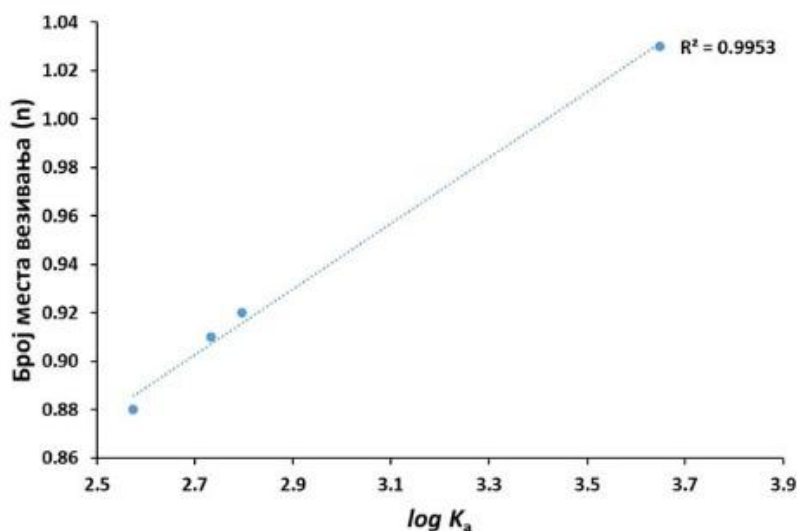
Табела 5. Параметри везивања двокомпонентних (HSA-HPD) и трокомпонентних (HSA-QUE-HPD, HSA-DIO-HPD, HSA-CAT-HPD) система на 303,15 K.

Систем	$K_{sv}/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$K_q/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}$	R^{2*}	$K_a/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	n	R^2
HSA-HPD	$3,35 \times 10^3$	$3,37 \times 10^{11}$	0,9869	$4,45 \times 10^3$	1,03	0,9997
HSA-QUE-HPD	$1,18 \times 10^3$	$1,18 \times 10^{11}$	0,9988	$3,75 \times 10^2$	0,88	0,9992
HSA-DIO-HPD	$1,30 \times 10^3$	$1,30 \times 10^{11}$	0,9881	$5,40 \times 10^2$	0,91	0,9933
HSA-CAT-HPD	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^{11}$	0,9841	$6,24 \times 10^2$	0,92	0,9861



Слика 25. Дијаграм логаритамске зависности HSA-HPD у присуству флавоноида на 303,15 К.

На Сlici 26 је приказана логаритамска зависност константе везивања ($\log K_a$) и броја везивних места (n) између HSA и HPD у присуству или одсуству флавоноида (QUE, CAT и DIO). Може се уочити да су вредности $\log K_a$ пропорционалне броју места везивања (n) са високим коефицијентом корелације ($R^2=0,9953$). На основу ових резултата може се закључити да је примењен математички модел погодан за испитивање интеракција између HPD и HSA (138).



Слика 26. Веза између логаритамске вредности константе везивања ($\log K_a$) и броја везивних места (n) између HSA и HPD у присуству или одсуству QUE, CAT и DIO на 303,15 К.

4.6. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију компјутерским методама

Утицај одабраних флавоноида на интеракцију HSA-HPD испитиван је применом компјутерских метода, молекулског докинга и молекулске динамике. Циљ ових испитивања је био поређење експерименталних и теоријских резултата, као и боље разумевање остварених интеракција.

4.6.1. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију молекулским докингом

Софтвер AGFR1.0 је коришћен за препознавање активног места на основу конфигурисања и израчунавања мапа афинитета за молекул рецептора, а добијене мапе су даље коришћене у процесу доковања (AutoDock 4.2). Резултати докинга потврдили су да је најповољније место везивања у рецептору за испитиване молекуле активно Судлово место I, које се налази у домену II, поддомену IIA. Добијени резултат је у доброј сагласности са оним до којих се дошло експерименталним путем. У Табели 6 приказани су резултати добијени на основу молекулског докинга албумина у двокомпонентном и трокомпонентним системима. За даљу анализу посматране су вредности енергије слободног везивања ($\Delta G_{vezivanja}$), константи инхибиције (K_i) и других термодинамичких параметара који описују везивање молекула HPD за HSA, као и везивање HPD за HSA-QUE, HSA-DIO и HSA-CAT комплексе.

Табела 6. Вредности везивних енергија двокомпонентног HSA-HPD и трокомпонентних HSA-QUE, HSA-DIO, HSA-CAT система у присуству HPD.

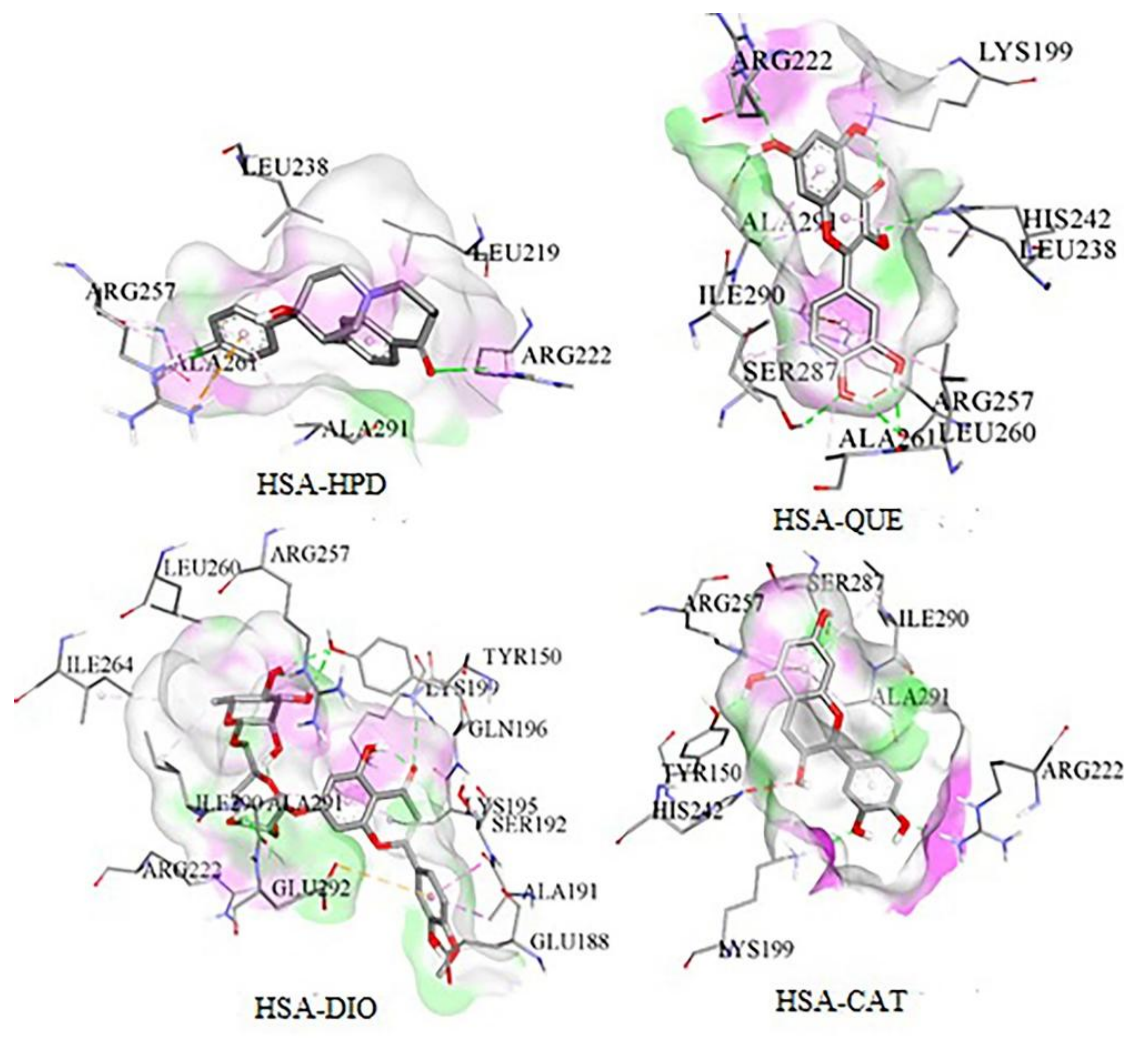
Систем	$\Delta G_{vezivanja}$ kJ/mol	K_i (nM)	ΔG_{inter} kJ/mol	$\Delta G_{vdw+hbond+desolv}$ kJ/mol	ΔG_{elec} kJ/mol	ΔG_{total} kJ/mol	ΔG_{tor} kJ/mol
HSA-HPD	-40,7	75,6	-43,2	-42,8	-0,4	-6,2	8,7
HSA-QUE-HPD	-37,0	325,6	-38,2	-37,9	-0,2	-7,6	8,7
HSA-DIO-HPD	-37,2	298,4	-41,5	-41,4	-0,1	-4,5	8,7
HSA-CAT-HPD	-38,0	221,5	-42,5	-42,0	-0,5	-4,3	8,7

R^2 - корелациони коефицијент

На Слици 27 је приказана интеракција HSA са испитиваним једињењима на активном Судловом месту I. Розе обојена површина означава доноре, док зелена представља акцепторе у формираном водоничним везама. Као што се може видети, инхибиција везивања HPD произилази из чињенице да испитивани флавоноиди заузимају исто активно место на HSA као и HPD. У складу са тим, присуство флавоноида у крви у знатној мери инхибира везивање HPD за HSA. Константе инхибиције указују на то да је везивање HPD за HSA најизраженије инхибирано у присуству QUE, затим DIO и најмање у присуству CAT. Ови резултати добро корелирају са експериментално одређеним вредностима. Пошто су флавоноиди обимни, HPD је барем делимично спречен да се веже за активно Судлово место I. Према резултатима добијеним путем AGFR-а, HPD ће се везати за активно место у домену I када је активно место I већ заузето флавоноидима. Због тога су разлике у енергији везивања између чистог HSA и флавоноидних комплекса са HPD ниже од очекиваних, али вредност K_i и даље указује на добар инхибиторни потенцијал.

Мале разлике у енергијама везивања могу се приписати структурним сличностима међу испитиваним једињењима, будући да велики број интеракција са протеином настаје захваљујући

ароматичној структури флавоноида (Слика 27). Наведено објашњава сличан механизам инхибиције везивања HPD за сва три испитивана флавоноида. Поред тога, на Слици 27 јасно се уочава да сва испитивана једињења интерагују са истим аминокиселинским остацима, нарочито онима који су одговорни и за интеракције са HPD, што додатно потврђује конкурентни карактер њиховог везивања.



Слика 27. Интеракције HSA са испитиваним једињењима на активном Судловом месту I, розе обојена површина указује на донора, а зелена на акцептора у оствареним водоничним везама.

Висок степен слагања између експериментално уоченог смањења афинитета везивања HPD (смањене вредности K_a) и резултата симулације докинга, односно повећаних константи инхибиције (K_i), потврђује поузданост молекуларног приступа докинга у предвиђању утицаја флавоноида. На пример, вредност K_a двокомпонентног система HSA-HPD смањује се више од десет пута у присуству QUE, што је у корелацији са четвороструким повећањем K_i . Ове корелације у великој мери подржавају предложени механизам конкурентног везивања, заснован на подацима о гашењу флуоресценције, и истичу значај интеграције експерименталних и теоријских резултата у процени интеракција протеин-лек-модулатор.

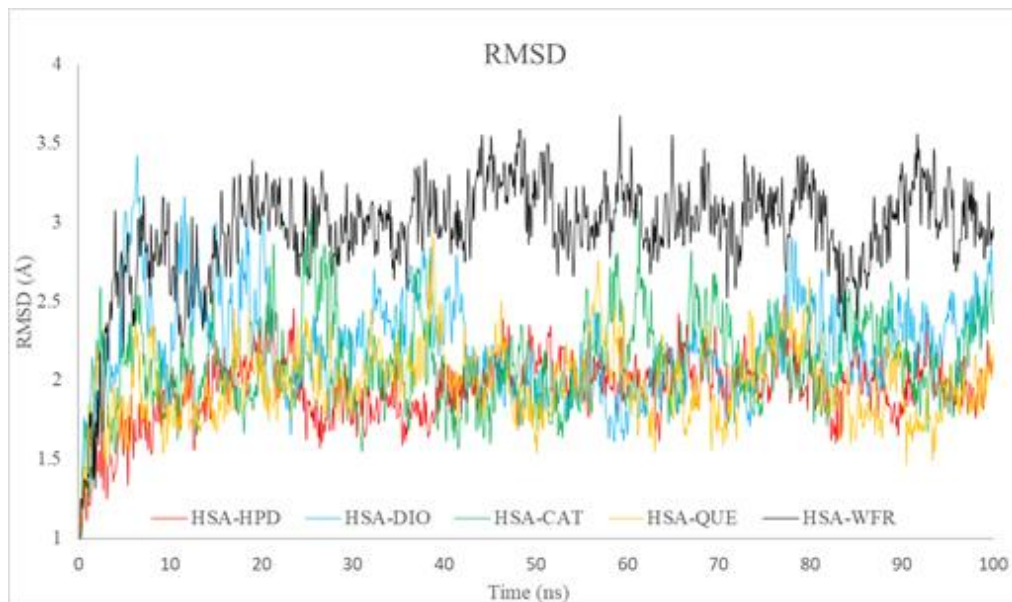
Иако су сви испитивани флавоноиди показали конкурентно везивање на Судловом месту I, релативно мале разлике у вредностима $\Delta G_{\text{везивања}}$ указују да примећена инхибиција није последица потпуног замењивања HPD, већ пре свега стерних сметњи и делимичне попуњености активног места. Ово је посебно релевантно за QUE, који формира мањи број водоничних веза, али истовремено показује највећи инхибиторни потенцијал. Такав налаз имплицира да хидрофобне интеракције доминирају његовим начином везивања. Стабилност ових интеракција биће додатно процењена у специфичном временском оквиру применом молекулско-динамичких симулација, што ће омогућити прецизније разумевање механизма конкурентне инхибиције.

4.6.2. Испитивање утицаја одабраних флавоноида (CAT, QUE, DIO) на HSA-HPD интеракцију молекулском динамиком

На испитиване системе примењен је теоријски приступ молекулско-динамичких симулација како би се испитале интеракције у посматраним комплексима. Овај метод омогућава добијање резултата који пружају јаснији увид у стабилност и природу интеракција између лека и протеина. У ту сврху анализирани су параметри средње квадратне девијације (RMSD), флукуације средње квадратне вредности (RMSF), радијуса гирације (Rg) и броја водоничних веза (nHB).

4.6.2.1. Анализа средње квадратне девијације (RMSD)

За процену укупне структурне стабилности комплекса HSA са испитиваним лигандима (HPD, DIO, CAT, QUE) коришћена је средња квадратна девијација (RMSD). Симулације су изведене у периоду трајања од 100 ns, а резултати су приказани на Слици 28.



Слика 28. RMSD вредности добијене за комплексе HSA са HPD, QUE, CAT, DIO и WF у трајању од 100 ns MD симулацијом.

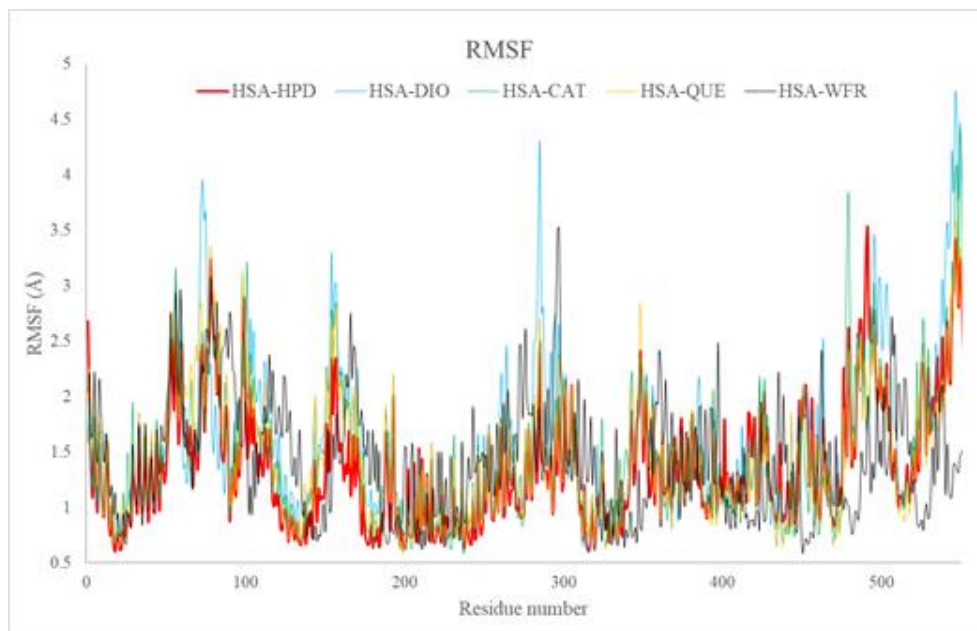
Сви анализирани системи су показали релативно ниске вредности RMSD, у распону од приближно 1,5 до 3,5 Å, што указује на висок степен структурне стабилности (Слика 28). Комплекси HSA са HPD, CAT и QUE имали су ниже просечне вредности RMSD (~2 Å), што

указује на побољшану структурну стабилност у поређењу са DIO, али и WF који је коришћен као стандардни лек за место I. Повећана RMSD вредност примећена за WF указује на значајнији степен конформационих промена, или потенцијалну делимичну дестабилизацију у поређењу са осталим лигандима.

Резултати су у складу са анализама докинга, које су показале значајан афинитет везивања флавоноида и HPD за Судлово место I (поддомен IIА). Штавише, експериментални подаци флуоресценције показали су значајне интеракције компетитивног везивања између HPD и флавоноида, нарочито QUE, што указује на стабилно и конкурентно везивање на идентичном месту у HSA.

4.6.2.2. Анализа флукутације средње квадратне вредности (RMSF)

RMSF вредности обезбеђују вредне увиде у флексибилност појединачних аминокиселина унутар структуре HSA током процеса симулације. Резултати приказани на Слици 29 показују упоредиве флукутације у свим системима, уз повећане вредности у површински изложеним и терминалним сегментима, што је у складу са њиховом природном флексибилношћу.



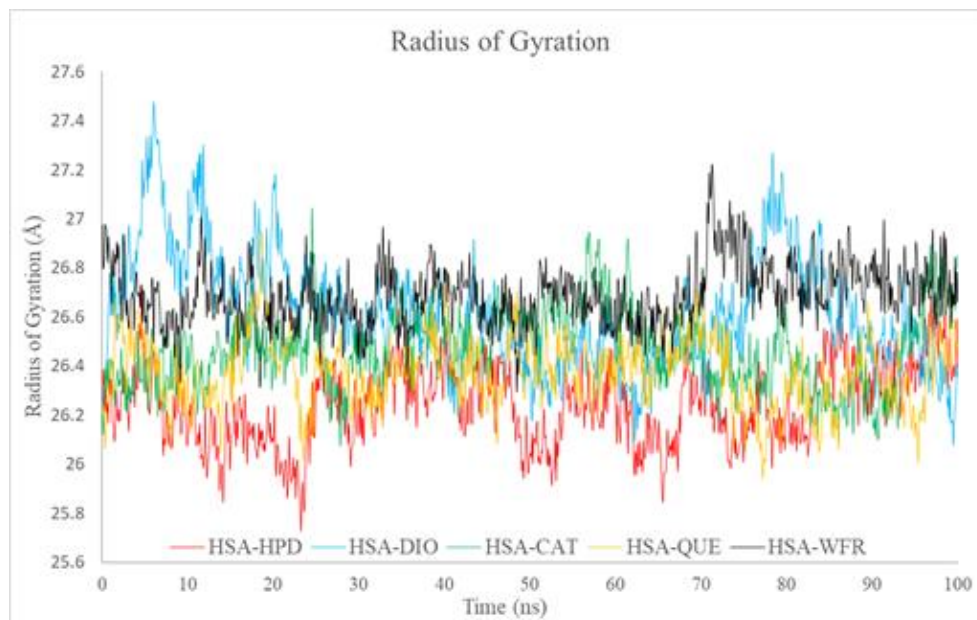
Слика 29. RMSF вредности остатака аминокиселина у комплексима HSA са HPD, QUE, CAT, DIO и WF.

Примећено је константно смањење флукутација у областима око активног места везивања (поддомен IIА) за све анализиране лиганде. Ово представља јасан доказ о стабилним интеракцијама са аминокиселинским остацима, укључујући Tyr150, Lys199, Trp214 и Arg218, што доприноси повећању стабилности комплекса.

Резултати RMSF анализе потврђују резултате молекулског докинга, откривајући значајне интеракције лиганада са критичним аминокиселинским остацима на Судловом месту I. Експериментални подаци додатно потврђују формирање стабилних бинарних комплекса између флавоноида и HSA, што је у потпуној сагласности са резултатима RMSF анализе.

4.6.2.3. Анализа радијуса гирације (Rg)

Радијус гирације (Rg) представља квантитативну меру компактности протеин-лиганд комплекса током молекулско-динамичких симулација. Сви испитивани комплекси показали су стабилне Rg вредности, у распону од приближно 26,2 Å до 27,2 Å, са само мањим флукуацијама које су примећене (Слика 30). Најкомпактнији комплекси су идентификовани код HSA-HPD и HSA-QUE, што је у складу са повећаном стабилношћу примећеном у RMSD анализи. Насупрот томе, маргинално повишене Rg вредности добијене код DIO и WF комплекса са HSA указују на смањење компактности њихових конформација, али и побољшану структурну флексибилност.



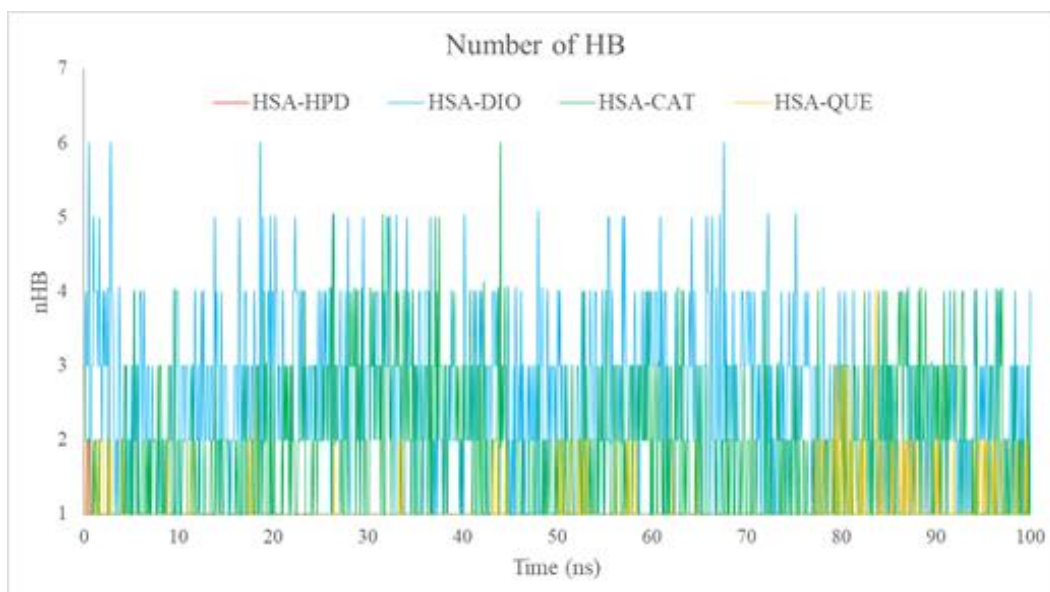
Слика 30. Радијус гирације (Rg) комплекса HSA са HPD, QUE, CAT, DIO и WF током 100 ns MD симулације.

Ови резултати потврђују робустан структурни интегритет протеина када су присутни лиганди, чиме подржавају налазе докинга који указују на значајан афинитет лиганда, посебно у случају QUE и HPD, за компактну структуру Судловог места I. Експериментални подаци добијени анализом емисионих спектра указују на остварене стабилне интеракције у испитиваним системима, што доводи до смањеног афинитета везивања HPD у присуству флавоноида, посебно QUE, чиме се потврђују резултати молекулске динамике.

4.6.2.4. Анализа броја водоничних веза (nHB)

Број водоничних веза (nHB) представља директан показатељ јачине и трајности интеракција између лиганда и протеина. Резултати приказани на Слици 31 показују да комплекси са DIO и CAT имају највећу учесталост формираних водоничних веза током симулација (две до пет веза), што се може приписати њиховим структурама богатим хидроксилним групама. Насупрот томе, комплекси са HPD и QUE показали су мањи број стабилних водоничних веза (једна до три), али је QUE упркос томе задржао високу стабилност, што је потврђено ниским RMSD и Rg вредностима.

Наведено имплицира да је стабилност везивања QUE првенствено последица хидрофобних интеракција, што је у складу са резултатима докинга. Експериментални подаци флуоресцентне спектроскопије показују смањење константи везивања HPD у присуству QUE, што подржава хипотезу да кверцетин заузима и омета место везивања углавном путем хидрофобних интеракција, уз мањи допринос водоничних веза.



Слика 31. Број водоничних веза (nHB) формианих између HSA и лиганда (HPD, QUE, CAT и DIO) током 100 ns MD симулација.

4.6.2.5. Конкурентно везивање и улога хидрофобних интеракција

Детаљна анализа аминокиселинских остатака укључених у везивање лиганда пружа дубљи увид у механизам конкурентне инхибиције. Резултати докинга и RMSF анализа доследно указују на учешће остатака Ala261, Lys199, Arg222, Ala291, Leu219 и Arg257 у стабилизацији интеракција HPD и флавоноида унутар активног места I.

Ови остаци значајно доприносе афинитету Судловог места I, формирајући хидрофобне контакте и водоничне везе са лигандима. Међу флавоноидима, QUE је показао највећи афинитет везивања. Упркос мањем броју водоничних веза (просечно 1,05) у поређењу са DIO (2,55) и CAT (1,85), QUE је изазвао највећу инхибицију HPD, што је потврђено највишим K_i вредностима и најизраженијим смањењем K_a .

Ови резултати снажно указују да су хидрофобне интеракције доминантна стабилизујућа сила у везивању QUE, док стерне сметње и делимична попуњеност активног места додатно доприносе конкурентској инхибицији HPD. Такви налази наглашавају сложеност интеракција лек-протеин у присуству флавоноида и подвлаче значај анализе на нивоу појединачних аминокиселинских остатака у процени фармакокинетичких ефеката.

4.7. Испитивање утицаја дескриптора физичко-хемијских особина HPD на степен његовог везивања за HSA

Циљ овог истраживања био је да се процени однос између података о везивању за протеине плазме (PPB) код 12 одабраних антипсихотика и њихових рачунарски добијених молекулских дескриптора. Применом вишеструке линеарне регресије (MLR) идентификовани су молекулски дескриптори релевантни за процену PPB антипсихотика, а у завршној фази истраживања најбоље успостављени модел је валидиран на три додатна лека-локсапин, сулпирид и амисулпирид. Испитивани антипсихотици су представљени у Табели 7(139).

Према доступним подацима (140), испитивани антипсихотици, углавном имају високе и релативно сличне вредности везивања за протеине плазме, у распону од 77% за рисперидон до 99% за сертиндол (SRD), зипрасидон (ZPD), флуфеназин (FPZ), зуклопентиксол (ZCP) или 100% за арипипразол (ARP) (Табела 8). Вредности везивања за протеине плазме додатно укључених, тестираних антипсихотика, локсапина, сулпирида и амисулпирида су износиле 97%, <40% и 17%.

За испитиване антипсихотике, добијено је више дескриптора липофилности (AlogPs, AClogP, milogP, AlogP, MlogP, XLOGP2, XLOGP3, ClogP и logP_{exp}) коришћењем софтверских пакета који укључују различите методе израчунавања. Разлике између ових метода резултирале су и разликама између апсолутних вредности logP. Такође, за одабране молекуле, коришћењем неколико софтверских пакета, добијени су молекулска тежина (Mw) и молекулска запремина (Vol) (140-142).

Табела 7. Молекулски дескриптори антипсихотика

Молекул	pKa	Mw	Vol	logP _{exp} *	ClogP	AlogP	XlogP2	XlogP3
ARP	7.46	448	395	4.50	4.63	5.00	4.49	4.64
CLZ	7.50	327	292	3.23	4.10	3.95	3.74	3.08
OLZ	7.24	312	286	2.00	3.40	3.21	2.32	2.86
QTP	7.06	384	352	2.80	3.37	3.18	2.83	2.14
RSP	8.76	410	374	2.50	2.71	3.32	3.07	2.72
SRD	8.59	441	390	НД**	5.07	4.68	4.10	4.07
ZPD	7.09	413	352	3.80	3.58	4.26	3.77	4.02
CPZ	9.20	319	285	5.41	5.80	4.74	4.92	5.19
FLX	8.51	435	379	4.51	4.34	4.82	4.42	4.51
FPZ	8.21	438	381	4.36	4.62	4.44	4.16	4.36
HPD	8.05	376	337	4.30	3.85	3.89	3.98	3.23
ZCP	8.43	401	361	НД	4.13	4.54	4.12	4.31

* Drug Bank: www.drugbank.ca

** НД - није доступно.

У прелиминарној фази истраживања, коришћењем једноставне линеарне регресије, испитане су корелације између вредности везивања антипсихотика за протеине плазме, преузетих из базе DrugBank (140), и израчунатих молекуларних дескриптора (Mw, Vol, logP, pKa) (140-142). Слабе корелације ($R^2 < 0,30$) утврђене су за Mw, Vol, pKa, док су параметри липофилности показали умерену до израженију повезаност са PPB ($0,35 < R^2 < 0,70$). Корелације са највишим R^2 вредностима добијене су за AlogPs ($R^2 = 0,69$), AlogP ($R^2 = 0,55$), milogP ($R^2 = 0,49$),

XlogP3 ($R^2=0,47$) и ClogP ($R^2=0,42$). Вредности XlogP2 и logP_{exp} показали су умерену корелацију ($R^2=0,36$ и $0,35$), док су коефицијенти корелације за AClogP и MlogP били ниски ($R^2<0,20$.)

У наредној фази, применом MLR, вршена је процена комбинованог утицаја два дескриптора на PPB. Дескриптори липофилности су тестирани као прва независна променљива, док су Mw, Vol и pKa изабрани као друга независна променљива. Два параметра липофилности, MlogP и AClogP, нису комбиновани са pKa као другом независном варијабилном због међусобне корелације. Посматрани су као изузеци и нису се могли користити са променљивом пошто је њихова корелација ($R^2\approx 0,50$), док су Mw и Vol показале ниску корелацију ($R^2<0,40$).

Најпре су експериментални параметри липофилности и додатни молекуларни дескриптори, Mw, Vol и pKa као независне променљиве корелисани са PPB вредностима одабраних антипсихотика. Прихватљива вредност вероватноће од $P<0,05$ и коефицијента корелације ($R^2=0,635$) добијена је уз примену logP_{exp} вредности са дескрипторима киселости (pKa) као другом променљивом (Једначина 8).

У наставку истраживања, испитан је комбиновани утицај 6 израчунатих параметара липофилности (AlogPs, milogP, AlogP, XLOGP2, XLOGP3 и ClogP) са додатним молекуларним дескрипторима (Mw, Vol и pKa). Комбинације ових параметара дале су моделе са коефицијентима $R^2>0,55$. Статистички значајни модели ($P < 0,05$) добијени су за четири параметра липофилности у комбинацији са pKa као другом независном променљивом: AlogP ($R^2 = 0,705$), XlogP3 ($R^2 = 0,679$), ClogP ($R^2 = 0,590$) и XlogP2 ($R^2 = 0,567$). Ове корелације могу се сматрати добрим, са прихватљивим P вредностима (141) (Једначине 9-12).

$$\begin{aligned} \text{PPB}_{\text{pred}} (\%) &= 6,158(\pm 1,804) \log P_{\text{exp}} - 6,064(\pm 2,581) \\ &\text{pKa} + 118,263 (\pm 18,097), \end{aligned} \quad (8)$$

$n = 10$; $R^2 = 0,635$; S.D. = 5,041; F = 6,103.

$$\begin{aligned} \text{PPB}_{\text{pred}} (\%) &= 9,904(\pm 2,138) \text{Alog P} - 4,165(1,936) \\ &\text{pKa} + 83,358 (\pm 14,425), \end{aligned} \quad (9)$$

$n=12$; $R^2 = 0,705$; S.D. = 4,212; F = 10,766

$$\begin{aligned} \text{PPB}_{\text{pred}} (\%) &= 7,178(\pm 1,649) \text{X log P3} - 5,108(\pm 2,128) \\ &\text{pKa} + 108,207(\pm 15,002), \end{aligned} \quad (10)$$

$n = 12$; $R^2 = 0,677$; S.D. = 4,398; F = 9,502;

$$\begin{aligned} \text{PPB}_{\text{pred}} (\%) &= 7,330(\pm 2,040) \text{ClogP} - 4,598(\pm 2,275) \\ &\text{pKa} + 100,816(\pm 16,753), \end{aligned} \quad (11)$$

$n = 12$; $R^2 = 0,590$; S.D. = 4,966; F = 6,484.

$$\begin{aligned} \text{PPB}_{\text{pred}} (\%) &= 8,434(\pm 2,460) \text{XlogP2} - 5,267(\pm 2,553) \\ &\text{pKa} + 104,196(\pm 17,285), \end{aligned} \quad (12)$$

$n = 12$; $R^2 = 0,567$; S.D. = 5,102; F = 5,905, при чему

n представља број антипсихотика укључених у регресиони модел.

На овај начин добијене корелације PPB података испитиваних антипсихотика и њихових израчунатих молекуларних дескриптора приказане су у Табели 8.

Табела 8. Вредности степена везивања антипсихотика за протеине плазме (PPB) преузете из базе DrugBank* и вредности предвиђене применом MLR модела ($\log P_{\text{exp}} + pK_a$; $A\log P + pK_a$; $X\log P_3 + pK_a$; $C\log P + pK_a$; $X\log P_2 + pK_a$).

Број	PPB (*)	PPB (1)	PPB (2)	PPB (3)	PPB (4)	PPB (5)
ARP	100	101	105	103	100	103
CLZ	97	93	94	92	96	96
OLZ	93	87	88	92	92	86
QTP	83	93	88	88	93	91
RSP	77	81	83	83	80	84
SRD	100	НД**	97	94	98	94
ZPD	99	99	99	101	94	99
CPZ	95	96	95	98	101	97
FLX	95	94	99	97	93	97
FPZ	99	95	96	98	97	96
HPD	95	96	91	90	92	95
ZCP	99	НД	96	96	92	95

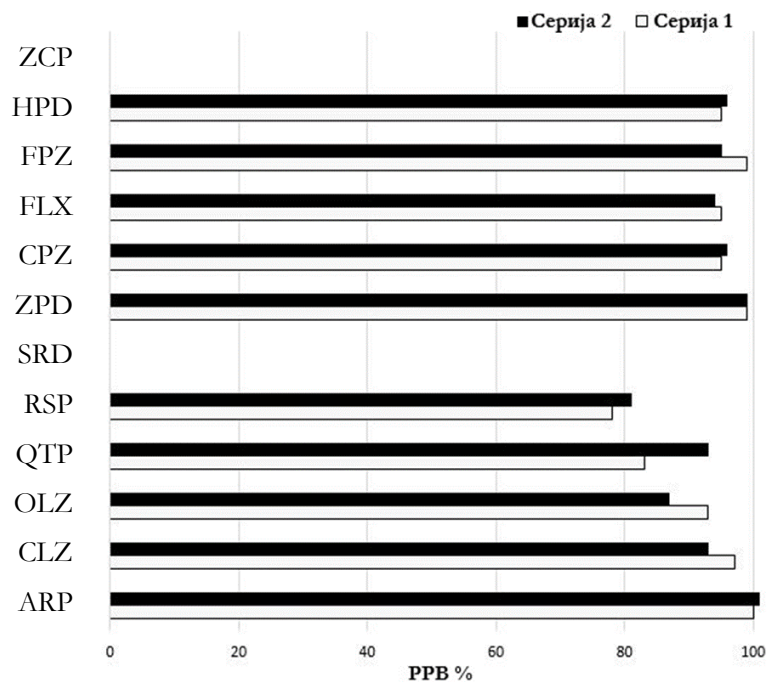
Редни бројеви се односе на антипсихотике наведене у Табели 7.

* Drug Bank кова: www.drugbank.ca

** НД - $\log P_{\text{exp}}$ није доступно.

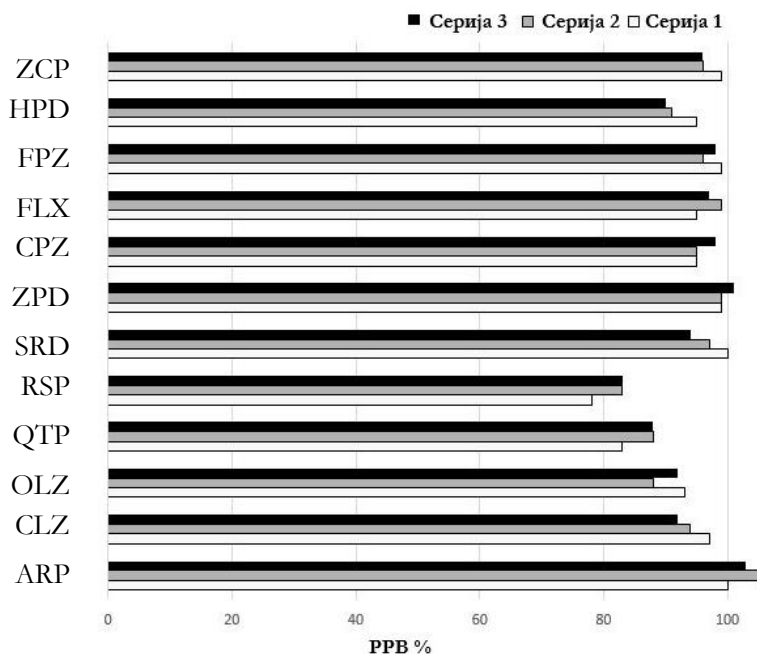
Најбоље утврђене корелације које су добијене једначинама 8, 9 и 10, односно MLR анализом са $\log P_{\text{exp}}$, $A\log P$ и $X\log P_3$ и pK_a као независним варијаблама, приказане су на Сликама 32 и 33.

Однос између степена PPB добијеног помоћу софтверског пакета Drug Bank и оних предвиђених помоћу $\log P_{\text{exp}}$ и pK_a приказани су на Слици 32. Пошто за сертиндол и зуклопентиксол вредности $\log P_{\text{exp}}$ нису биле доступне (140), њихове PPB вредности нису могле бити предвиђене помоћу једначине 8, па зато нису представљене на Слици 32.



Слика 32. Поређење PPV вредности антипсихотика преузетих из базе DrugBank (Серија 1) и вредности предвиђених применом MLR модела ($\log P_{\text{exp}} + pK_a$) (Серија 2).

Однос између PPV добијеног помоћу софтверског пакета (140) и оних предвиђених коришћењем AlogP или XlogP3 и pK_a као независних варијабли приказани су на Слици 33.



Слика 33. Поређење PPV вредности антипсихотика преузетих из базе DrugBank (Серија 1) и вредности предвиђених применом MLR модела ($AlogP + pK_a$) (Серија 2) и ($XlogP3 + pK_a$) (Серија 3).

Најбоља утврђена корелација (једначина 9) добијена коришћењем AlogP и pKa као независних варијабли проверена је коришћењем три додатна антипсихотика: типичног антипсихотика локсапина и два атипична антипсихотика, сулпирида и амисулприда. Ове вредности су биле ван опсега од 77%-100% где припадају вредности за моделирање PPB. Њихове pKa вредности су износиле: за локсапин 7,18, за сулпирид 9,12 и за амисулприд 9,37 (140). Вредности њиховог параметра липофилности AlogP, који је пружио најбољи модел (Једначина 9), биле су 3,96 за локсапин; 0,83 за сулпирид и за амисулприд 1,13 (142). Корелација приказана једначином 9 може да се сматра погодном за предвиђање PPB антипсихотика, јер су предвиђене вредности PPB биле релативно блиске подацима из литературе за локсапин (93%), сулпирид (26%) и амисулприд (27%).

Најбољи регресиони модел (једначина 9), заснован на комбинацији AlogP и pKa, примењен је и проверен на три додатна антипсихотика (локсапин, сулпирид и амисулприд). Њихове PPB вредности у литератури су 97% за локсапин, <40% за сулпирид и 17% за амисулприд и обухватају шири распон у односу на моделовани скуп (77-100%). Предвиђене PPB вредности (93% за локсапин, 26% за сулпирид и 27% за амисулприд) показале су задовољавајуће слагање са литературним подацима, што указује на добру предиктивну способност модела. С обзиром на то да је халоперидол укључен у иницијални скуп антипсихотика и да његове вредности липофилности и киселости спадају у домен најбоље дефинисаног модела (AlogP + pKa), добијени резултати додатно потврђују оправданост примене овог *in silico* приступа за процену степена његовог везивања за протеине плазме.

Утврђена зависност PPB од параметара липофилности и киселости указује да хидрофобност и јонизационо стање молекула имају значајну улогу у везивању халоперидола за протеине плазме. Добијени резултати потврђују претпоставку да хидрофобне интеракције и јонизационо стање молекула имају значајну улогу у процесу везивања лекова за протеине плазме.

5. ДИСКУСИЈА

Резултати ове дисертације пружају свеобухватан увид у механизме везивања халоперидола (HPD) за хумани серумски албумин (HSA), као и утицај јона метала и флавоноида на стабилност и афинитет ових комплекса. Важно је истаћи да су испитивања обухватала експериментални и теоријски приступ и да је добијен висок ниво усаглашености резултата.

Спектроскопске анализе показале су да халоперидол стабилно и реверзибилно интерагује са HSA, при чему је утврђено да се примарно везује за Судлово место I у домену IIА. Добијене вредности константи везивања и израчунати термодинамички параметри указују да је интеракција условљена комбинацијом хидрофобних интеракција и водоничних веза. Сличан механизам везивања пријављен је и за бројне друге лекове који се везују за албумин, где доминантну улогу имају неполарне интеракције унутар хидрофобног џепа Судловог места I (115,118,143,144).

Смањење интензитета флуоресценције HSA у присуству HPD указује на директну интеракцију између молекула лека и протеина. Вредности Стерн-Волмерових константи показују пораст са повећањем температуре, што указује на присуство динамичког механизма гашења флуоресценције. Међутим, вредности константе гашења (K_q) значајно превазилазе максималне вредности карактеристичне за дифузионо контролисане колизоне процесе, што указује на то да се гашење не може приписати искључиво динамичком механизму. Слични резултати описани су и у радовима који се баве испитивањем интеракција различитих фармаколошки активних молекула са албумином, где је показано да високе вредности K_q указују на формирање стабилног комплекса у основном стању (145,146). Стога се може закључити да се гашење флуоресценције у овом систему одвија путем комбинованог механизма, при чему динамичко гашење доприноси температурно зависном повећању K_{sv} , док статичко гашење представља доминантан механизам слабења флуоресценције.

Вредности константе везивања (K_a) налазе се у опсегу 10^2 - 10^3 M^{-1} , што указује на постојање релативно јаких интеракционих сила између HPD и HSA. Овај опсег константи је упоредив са вредностима пријављеним за интеракције многих лекова са албумином, што потврђује значајну улогу овог протеина у транспорту и дистрибуцији фармаколошки активних супстанци у крвотоку (115). Са повећањем температуре уочено је смањење стабилности комплекса, што се може објаснити повећањем дифузионог коефицијента и слабењем интеракционих сила. Ова појава је у складу са литературним подацима који указују да повишена температура може довести до делимичне дестабилизације комплекса лек-албумин и повећања концентрације слободног лека у плазми (146,147). С обзиром на то да је невезана фракција фармаколошки активна, повећање њене концентрације може довести до појачаног фармаколошког ефекта. Експериментални резултати показују да се HPD на свим анализираним температурама везује за једно везивно место на молекулу албумина. Са порастом температуре уочено је благо смањење вредности параметра n , што је у складу са трендом опадања константи везивања и додатно указује на смањење стабилности комплекса при вишим температурама.

Уочен тренд промена константи гашења емисије и константи везивања код халоперидола упоредив је са вредностима добијеним за оланзапин (143). Ово се може објаснити њиховим структурним карактеристикама и доминантним типом интермолекулских интеракција.

Посматрани молекули поседују изражене хидрофобне и ароматичне сегменте који фаворизују интеракције са хидрофобним регионима протеина, што доводи до формирања релативно стабилних комплекса. Ове интеракције су праћене смањењем флексибилности молекула и смањењем ефикасности нерадијативних релаксационих процеса, што се рефлектује кроз корелисане промене посматраних константи. У том смислу, доминантан допринос статичког механизма гашења може додатно објаснити уочену зависност између ових параметара.

Супротно, луразидон, антипсихотик друге генерације као и оланзапин, показује одступање од наведеног тренда. Ово се може приписати сложенијој и израженијој поларној структури луразидона, са већим бројем функционалних група способних за формирање водоничних веза. Ове карактеристике омогућавају интензивније интеракције са растварачем, као и потенцијално другачији начин везивања за протеин, који не мора нужно укључивати значајну промену конформационе флексибилности система. Као последица тога, чак и при повећању константе везивања не долази до очекиване редукције процеса без емисије фотона. Такође, присуство хетероатома и могућност интрамолекулских *charge-transfer* интеракција могу допринети ефикаснијем гашењу емисије путем алтернативних нерадијативних путева.

Анализа апсорпционих спектра показује да карактеристични апсорпциони максимум HSA на 278 nm остаје готово непромењен након додавања HPD. У складу са подацима у литератури, значајни помаци у апсорпционим максимумима протеина најчешће се доводе у везу са формирањем стабилних комплекса у основном стању и израженим конформационим променама, док одсуство спектралних промена указује на суптилније интеракције или коегзистенцију више механизма гашења (145). У том смислу, добијени резултати сугеришу да HPD не индукује значајне промене у микросредини ароматичних остатака HSA, што је у складу са студијама које указују да бројни нискомолекулски лиганди остварују интеракције без драстичне реорганизације протеинске структуре. Ипак, треба нагласити да искључиво ослањање на UV-Vis спектроскопију може довести до недовољно прецизног разграничења статичког и динамичког гашења, па се добијени резултати морају тумачити у корелацији са флуоресцентним мерењима. У том контексту, предложени комбиновани механизам гашења делује методолошки оправдано и конзистентно са савременим приступима у анализи протеин-лиганд интеракција.

Негативне вредности ΔG° у испитиваном температурском опсегу потврђују термодинамичку повољност формирања комплекса, док комбинација ΔH° и ΔS° параметара упућује на доминантан допринос електростатичких интеракција. Овакав резултат је у доброј сагласности са извештајима за бројне лек-HSA системе, где је показано да електростатичке силе играју кључну улогу у иницијалној фази препознавања лиганда, док хидрофобне интеракције доприносе даљој стабилизацији комплекса (117). Међутим, позитиван допринос ентропије може указивати и на десолватационе ефекте и повећање укупне неуређености система, што је често занемарено у једноставним интерпретацијама. Стога се може претпоставити да је механизам везивања HPD мултифакторски, са доприносом и специфичних и неспецифичних интеракција, што је у складу са савременим моделима „индукованог уклапања“ и „конформационе селекције“ у протеин-лиганд системима.

Место везивања HPD на молекулу HSA испитано је применом конкурентних експеримената уз употребу маркера специфичних за Судлово место I и II, варфарина и ибупрофена (148). Смањење константе везивања у присуству варфарина у односу на минималну промену у присуству ибупрофена јасно указује на преференцијално везивање HPD за Судлово место I. Овај податак је у складу са бројним структурним и спектроскопским студијама које показују да Судлово место I поседује изражен афинитет према ароматичним и релативно

крутим молекулима. Ипак, треба узети у обзир да конкурентни експерименти не искључују могућност секундарних или алостеричних места везивања, нарочито при вишим концентрацијама лиганда. Слични феномени су описани у литератури, где је показано да HSA може да веже више молекула лиганда са различитим афинитетима и кинетиком везивања. Стога се добијени резултати могу интерпретирати као доминантно, али не и искључиво везивање за Судлов I регион, што доприноси комплекснијем разумевању интеракционог профила HPD.

Стабилност формираног комплекса додатно је потврђена анализом Форстеровог резонантног преноса енергије (FRET). Израчунато растојање између донорског и акцепторског молекула (< 7 nm) налази се у оквиру типичног опсега за ефикасан пренос енергије, што указује на просторну блискост и повољну оријентацију молекула унутар комплекса. Ови резултати су у складу са бројним студијама које FRET параметре користе као поуздан индикатор формирања стабилних протеин-лиганд комплекса (145). Међутим, треба нагласити да FRET анализа подразумева одређене апроксимације, укључујући претпоставке о насумичној оријентацији дипола и хомогеној средини, што може утицати на прецизност процене растојања. Упркос томе, конзистентност FRET резултата са термодинамичким и спектроскопским подацима додатно оснажује закључак о формирању релативно стабилног, али динамички реверзибилног комплекса HSA-HPD.

Сумирајући добијене резултате, може се закључити да интеракција HPD са HSA представља типичан пример мултимодалног везивања, где се електростатичке и хидрофобне интеракције међусобно допуњују, док је Судлово место I идентификовано као примарни регион везивања. Овакви налази имају значајне импликације за разумевање фармакокинетичког понашања HPD, посебно у контексту његове дистрибуције, транспорта и биодоступности у физиолошким условима. Резултати испитивања утицаја Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} на интеракцију HPD са HSA указују да метални јони могу мењати афинитет везивања и карактеристике HSA-HPD комплекса. У присуству прелазних метала (Cu^{2+} и Fe^{3+}) долази до повећања афинитета везивања (K_a вредности реда 10^4 и 10^5), што може бити последица стабилизације комплекса кроз специфичне координационе интеракције. Присуство земноалкалних метала (Ca^{2+} и Mg^{2+}) довело до благог смањења константи везивања, уз одржавање K_a вредности реда 10^3 . Ово указује на делимичну конкуренцију или конформационе промене у околини везивног места. Ови резултати потврђују да јони метала могу деловати као модулатори фармакокинетике лекова, као и да утицај јона на протеин-лиганд интеракцију није униформан, већ да је јон-специфичан. У свим експериментима n вредности износе ~ 1 , што указује на једно доминантно место везивања, уз статички механизам интеракције. Непромењене вредности броја везивних места, уз промену вредности K_a , указују да присуство металних јон вероватно доводи до модификације микроокружења постојећег везивног џепа. Повећање K_a у присуству Cu^{2+} и Fe^{3+} може бити последица алостерне модификације која је повољна за везивање хидрофобног лиганда или формирања тројног комплекса HSA-метал-HPD.

За разлику од HPD, код антималаријских лекова у присуству јона Cu^{2+} и Fe^{3+} уочено је смањење вредности константи везивања уз задржавање једног места везивања (149), што указује да је утицај јона на интеракцију и лиганд-специфичан. Ове разлике се могу објаснити разликама у структури лиганда. Антималаријски лекови поседују функционалне групе које могу градити координативне комплексе са металима (150), што потенцијално може довести до смањења афинитета према HSA.

Са друге стране, HPD је липофилан молекул са ограниченим бројем координационих донорских група, па је мања вероватноћа директног формирања стабилних комплекса са металима. Из тог разлога, јони прелазних метала, као што су Cu^{2+} и Fe^{3+} , првенствено интерагују

са HSA, изазивајући суптилне конформационе и алостеричне промене, без формирања стабилног тернарног комплекса HSA-Cu²⁺/Fe³⁺-HPD. Ове метал-индуковане структурне модификације могу повећати хидрофобност и просторну комплементарност везивног џепа за HPD, што доводи до стабилизације HSA-HPD комплекса и пораста вредности K_d . Ови резултати указују да би варијације плазма концентрација Cu²⁺ и Fe³⁺ потенцијално могле модификовати слободну фракцију халоперидола, што би се могло одразити на фармакокинетичке параметре HPD.

Јони метала могу модификовати везивање и других антипсихотика за HSA. Тако је показано да присуство Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ и Fe³⁺ доводи до смањења афинитета везивања оланзапина за HSA, што је тумачено као последица конкуренције за исто везивно место или метал-индукованих конформационих промена протеина (143). У систему HSA-HPD у присуству Cu²⁺ и Fe³⁺ забележено је повећање K_d вредности, што додатно потврђује да је утицај металних јона лиганд-специфичан и условљен структурним карактеристикама молекула и механизмом његовог везивања за протеин. Присуство различитих ендогених и екзогених лиганда може модулисати везивање лекова за HSA и потенцијално утицати на терапијски одговор. Флавоноиди су широко распрострањена полифенолна једињења присутна у свакодневной исхрани и пићу (воће, поврће, чајеви, сокови, вино). Такође су широко присутни у бројним лековитим биљкама и често се користе као дијететски суплементи због испољавања различитих биолошких активности, као што су антиоксидативна, антиинфламаторна, кардиопротективна и неуропротективна дејства (96). Флавоноиди се везују за HSA, при чему афинитет везивања зависи од броја и положаја фенолних група, поларности молекула, као и њихове структуре, при чему аглукони углавном испољавају већи афинитет везивања. Доминантно место везивања је место I (домен IIА), док се неки деривати флавоноида могу везивати и у оквиру места II (домен IIIА). Кверцетин, катехин и диосмин су флавоноиди које карактерише присуство више фенолних група и ароматичних прстенова, што им омогућава формирање стабилних интеракција са протеинима као што је HSA (102, 103). Доминантно место везивања халоперидола поклапа се са местом везивања флавоноида, па је у овој дисертацији постављена хипотеза да истовремено присуство флавоноида може утицати на везивање HPD за HSA.

Флавоноиди (QUE, CAT, DIO) показали су изражену способност да утичу на афинитет HSA-HPD комплекса. Емисиони спектри указали су на компетитивно везивање у Судловом месту I, при чему је кверцетин имао најизраженији инхибиторни ефекат. Вредности константе гашења (K_d) указују на статички механизам гашења, што упућује на закључак да је смањење афинитета халоперидола последица директне конкурентне интеракције унутар истог везивног места. У присуству флавоноида број везивних места остаје приближно једнак јединици ($n \sim 1$). Такав налаз указује да не долази до појаве нових места везивања и додатно потврђује конкурентну заузетост постојећег везивног места. Са друге стране, у студији којом је испитиван утицај кверцетина на интеракцију оланзапина са HSA (143) утврђена је доминација алостерног ефекта, што указује да механизам интеракције може зависити од структуре лека.

Докинг симулације показале су високу сагласност са експерименталним резултатима, што потврђује поузданост *in silico* приступа. Докинг и молекулска динамика потврдили су да флавоноиди заузимају исто активно место као HPD, чиме се смањује број доступних везивних места и афинитет лека. Вредности K_d и ΔG везивања указале су да је QUE најјачи конкурент HPD-у, док су CAT и DIO имали умеренији ефекат. Иако разлике у вредностима ΔG_{bind} нису изразито велике, вредности K_d показују јасну тенденцију смањења афинитета халоперидола у присуству флавоноида. Мала разлика у ΔG_{bind} , уз истовремени пад K_d , указује да стеричка

заузетост и просторна конкуренција имају већи значај од саме енергетске разлике у појединачним интеракцијама. Молекулска динамика додатно је потврдила стабилност комплекса и улогу специфичних аминокиселинских остатака (Tyr150, Lys199, Trp214, Arg218) у стабилизацији интеракција. RMSD и RMSF анализе показале су да комплекси остају структурно стабилни, али да се стабилност у случају QUE заснива превасходно на хидрофобним интеракцијама, уз мањи број водоничних веза.

Смањење афинитета HPD за HSA у присуству флавоноида потенцијално може довести до повећања слободне фракције лека у плазми. То може резултирати појачаним фармаколошким ефектом, изменама у дистрибуцији и клиренсу HPD, као и повећаним ризиком од испољавања нежељених ефеката. Иако су резултати добијени у *in vitro* условима и указују на постојање овог феномена, за екстраполацију на *in vivo* услове неопходна су додатна фармакокинетичка испитивања.

Анализа молекулских дескриптора антипсихотика показала је да липофилност (AlogP, XlogP3) и киселост (pKa) имају највећи утицај на степен везивања за протеине плазме. Најбољи регресиони модел добијен је комбинацијом AlogP и pKa, што је потврђено валидирањем на додатним лековима (локсапин, сулпирид, амисулпирид). Ови резултати указују да хидрофобност и јонизационо стање молекула представљају кључне факторе у процесу везивања HPD за HSA.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

1. Халоперидол (HPD) се стабилно и специфично везује за хумани серумски албумин (HSA у оквиру Судлов I везујућег места, уз механизам статичког гашења флуоресценције;
2. HPD везује за једно доминантно везивно место ($n \sim 1$), што указује на специфичност интеракције и могућност компетитивног везивања са другим лигандима;
3. Интеракција HSA-HPD је спонтана и доводи до формирања стабилног комплекса, уз учешће различитих интермолекулских сила;
4. Присуство јона метала утиче на HSA-HPD интеракцију при чему јони земноалкалних метала (Ca^{2+} , Mg^{2+}) смањују афинитет везивања HPD за HSA, док јони прелазних метала (Cu^{2+} , Fe^{3+}) не доводе до промена у афинитету, уз могућ благи стабилизујући ефекат комплекса;
5. Присуство флавоноида утиче на HSA-HPD интеракцију, при чему кверцетин, катехин и диосмин делују као компетитивни лиганди за исто везивно место, што доводи до смањења афинитета везивања, при чему кверцетин испољава најизраженији ефекат;
6. Примена молекулског докинга и молекулске динамике потврђује експерименталне налазе и омогућава детаљније разумевање механизма интеракције и стабилности формираног комплекса;
7. Регресиона анализа молекулских дескриптора омогућава развој и валидацију предиктивног модела који показује да липофилност (AlogP) и pKa представљају кључне факторе везивања HPD за HSA;
8. Интеграција спектроскопских и *in silico* метода представља погодан и применљив приступ за проучавање интеракција лек-протеин, применљив и на друге фармаколошки активне супстанце.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Wang S, Liu S, Zhang Y, He J, Coy DH, Sun L. Human serum albumin (HSA) and its applications as a drug delivery vehicle. *Health Science Journal*. 2020;14(2):1-8.
2. Smith SA, Waters NJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drugs binding to alpha-1-acid glycoprotein. *Pharmaceutical research*. 2018;36(2):30.
3. Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV. Serum albumin in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(19):10318.
4. Ponticelli C, Moroni G. Nephrotic syndrome: pathophysiology and consequences. *Journal of Nephrology*. 2023;36(8):2179-2190.
5. Yadav SPS, Sandoval RM, Zhao J, Huang Y, Wang E, Kumar S et al. Mechanism of how carbamylation reduces albumin binding to FcRn contributing to increased vascular clearance. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021;320(1):F114-F129.
6. Fabresse N, Larabi IA, Abe E, Lamy E, Rigotherier C, Massy ZA et al. Correlation between saliva levels and serum levels of free uremic toxins in healthy volunteers. *Toxins*. 2023;15(2):150.
7. Jagdish RK, Maras JS, Sarin SK. Albumin in advanced liver diseases: the good and bad of a drug!. *Hepatology*. 2021;74(5):2848-2862.
8. Johannessen Landmark C, Johannessen SI, Patsalos PN. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs: current status and future prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2020;16(3):227-238.
9. Di Cera E. Mechanisms of ligand binding. *Biophysics reviews*. 2020;1(1).
10. Gupta MN, Tripathi T, Uversky VN. Binding of a substrate (“lock and key”) and conformational adaption (“induced fit”) are different stages of enzyme action. In the three functional states of proteins. *Academic Press*. 2025;31-43.
11. Danylova TV, Komisarenko SV. Scientific investigations of the nobel prize winner Emil Fischer as a launching pad for the development of biochemistry: a brief overview. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(4):135-142.
12. Raval K, Ganatra T. Basics, types and applications of molecular docking: A review. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*. 2022;7(1):12-16.
13. Klebe G. Protein-ligand interactions as the basis for drug action. In drug design: from structure and mode-of-action to rational design concepts. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2025;39-65.
14. Spassov DS. Binding affinity determination in drug design: insights from lock and key, induced fit, conformational selection, and inhibitor trapping models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(13):7124.
15. Wanat K, Brzezińska E, Sobańska AW. Aspects of drug-protein binding and methods of analyzing the phenomenon. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(25):2974-2985.

16. Alotaibi SH, Momen AA. Anticancer drugs' deoxyribonucleic acid (DNA) interactions. In Biophysical chemistry-advance applications. IntechOpen. 2019.
17. Ghosh A, Pawar AB, Chirmade T, Jathar SM, Bhambure R, Sengupta D et al. Investigation of the captopril-insulin interaction by mass spectrometry and computational approaches reveals that captopril induces structural changes in insulin. ACS omega. 2022;7(27):23115-23126.
18. Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. Drug metabolism reviews. 2004;36(3-4):805-822.
19. Bulusu G, Desiraju GR. Strong and weak hydrogen bonds in protein-ligand recognition. Journal of the Indian Institute of Science. 2020;100(1):31-41.
20. Korzekwa K, Nagar S. Drug distribution part 2. Predicting volume of distribution from plasma protein binding and membrane partitioning. Pharmaceutical research. 2016;34(3):544.
21. Tesseromatis C, Alevizou A. The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. 2008;33(4):225-230.
22. Ma W, Yang L, He L. Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant K_d of drug-receptor interaction. Journal of pharmaceutical analysis. 2018;8(3):147-152.
23. Vauquelin G. Link between a high k_{on} for drug binding and a fast clinical action: to be or not to be?. MedChemComm. 2018;9(9):1426-1438.
24. Mathew J, Sankar P, Varacallo M. Physiology, blood plasma. 2018.
25. Naranjo CA, Sellers EM, Reidenberg MM, Erill S. Drug-protein binding. by Reidenberg MM, Evill S. Praeger Scientific, New York, 1986: 233-251.
26. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. Journal of hepatology. 2014;61(2):396-407.
27. Curry S. Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. Vox Sanguinis. 2002;83.
28. Kremer JM, Wilting JAAP, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. Pharmacological reviews. 1988;40(1):1-47.
29. Behan JL. The binding ability of alpha-1-acid glycoprotein as a mechanism of resistance to methadone (doctoral dissertation, Edinburgh Napier University). 2010.
30. Huang Z, Ung T. Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. Current drug metabolism. 2013;14(2):226-238.
31. Ference BA, Kastelein JJ, Catapano AL. Lipids and lipoproteins in 2020. Jama. 2020;324(6):595-596.
32. Abdel-Mottaleb MM, Boi L, Barra M, Colin J, Berni L, Béduneau A et al. Lipoproteins as drug carriers for cyclosporine A: optimization of the entrapment. Materials. 2023;16(3):1156.
33. Kamiński DM. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. European biophysics journal. 2014;43(10):453-467.

34. Mooberry LK, Nair M, Paranjape S, McConathy WJ, Lacko AG. Receptor mediated uptake of paclitaxel from a synthetic high density lipoprotein nanocarrier. *Journal of drug targeting*. 2010;18(1):53-58.
35. Hamidi M, Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview. *Drug delivery*. 2003;10(1):9-20.
36. De Oliveira S, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2010;44(1):63-74.
37. Al-Tamimi DJ, Alani ME, Ammoo AM, Ibraheem JJ. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine using single sampling strategy. *Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;20(2):55-63.
38. Suwalsky M, Belmar J, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid interaction with the human erythrocyte membrane bilayer induce in vitro changes in the morphology of erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013;539(1):9-19.
39. Wise TJ, Ott ME, Joseph MS, Welsby IJ, Darrow CC, McMahon TJ. Modulation of the allosteric and vasoregulatory arms of erythrocytic oxygen transport. *Frontiers in Physiology*. 2024;15:1394650.
40. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of intensive care*. 2013;3(1):4.
41. Fujiwara SI, Amisaki T. Fatty acid binding to serum albumin: molecular simulation approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013;1830(12):5427-5434.
42. Liu F, Mu J, Xing B. Recent advances on the development of pharmacotherapeutic agents on the basis of human serum albumin. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(14):1866-1888.
43. Abedi F, Zarei B, Elyasi S. Albumin: a comprehensive review and practical guideline for clinical use. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2024;80(8):1151-1169.
44. Tayyab S, Feroz SR. Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2021;123:193-218.
45. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology*. 1988;8(2):385-401.
46. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *International journal of general medicine*. 2016;229-255.
47. Guizado TC. Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of molecular modeling*. 2014;20(10):2450.
48. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 2014;9(1):e85216.
49. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*. 1999;12(6):439-446.
50. Yamasaki K, Anraku M. Stability of albumin and stabilization of albumin preparations. In *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications*. Singapore: Springer Singapore. 2016;25-49.

51. Sinha N, Smith-Gill SJ. Electrostatics in protein binding and function. *Current Protein and Peptide Science*. 2002;3(6):601-614.
52. Dockal M, Carter DC, Rüker F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J Biol Chem*. 2000;275(5):3042-50.
53. Nikkel HJ, Foster JF. A reversible sulphhydryl-catalyzed structural alteration of bovine mercaptalbumin. *Biochemistry*. 1971;10(24):4479-86.
54. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. 1975;11(6):824-32.
55. Bal W, Sokolowska M, Kurowska E et al. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5444-55.
56. Kratochwil NA, Huber W, Müller F et al. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(9):1355-74.
57. Ràfols C, Zarza S, Bosch E. Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID' s) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). *Talanta*. 2014;130:241-250.
58. De Simone G, Pasquadibisceglie A, di Masi A, Buzzelli V, Trezza V, Macari G et al. Binding of direct oral anticoagulants to the FA1 site of human serum albumin. *Journal of Molecular Recognition*. 2021;34(3):e2877.
59. Díaz N, Suárez D, Sordo TL, Merz KM. Molecular dynamics study of the IIA binding site in human serum albumin: influence of the protonation state of Lys195 and Lys199. *Journal of medicinal chemistry*. 2001;44(2):250-260.
60. Di Masi A, Gullotta F, Bolli A, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P. Ibuprofen binding to secondary sites allosterically modulates the spectroscopic and catalytic properties of human serum heme-albumin. *The FEBS Journal*. 2011;278(4):654-662.
61. Abou-Zied OK, Al-Lawatia N. Exploring the drug-binding site Sudlow I of human serum albumin: the role of water and Trp214 in molecular recognition and ligand binding. *ChemPhysChem*. 2011;12(2):270-274.
62. Chapman BE, MacDermott TE, O'Sullivan WJ. Studies on manganese complexes of human serum albumin. *Bioinorganic Chemistry*. 1973;3(1):27-38.
63. Merlino A. Metallodrug binding to serum albumin: Lessons from biophysical and structural studies. *Coordination Chemistry Reviews*. 2023;480:215026.
64. 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. *Nature structural biology*. 1998;5(9):827-835.
65. Wu D, Hierons SJ, Polepalli S, Gucwa M, Fritzen R, Markiewicz M et al. Targeted removal of the FA2 site on human albumin prevents fatty acid-mediated inhibition of Zn²⁺ binding. *Journal of Lipid Research*. 2024;65(6):100560.
66. Ascenzi P, Fasano M. Serum heme-albumin: an allosteric protein. *IUBMB life*. 2009;61(12):1118-1122.

67. Belinskaia DA, Voronina PA, Batalova AA, Goncharov NV. Serum albumin. Encyclopedia. 2020;1(1):65-75.
68. Hankins J. The role of albumin in fluid and electrolyte balance. Journal of Infusion Nursing. 2006;29(5):260-265.
69. Dennis MS, Zhang M, Meng YG, Kadkhodayan M, Kirchhofer D, Combs D, Damico LA. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(38):35035-35043.
70. Dehghan Niestanek V, Unsworth LD. Detailing protein-bound uremic toxin interaction mechanisms with human serum albumin in the pursuit of designing competitive binders. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(8):7452.
71. Paar M, Rossmann C, Nussold C, Wagner T, Schlagenhauf A, Leschnik B et al. Anticoagulant action of low, physiologic, and high albumin levels in whole blood. PLoS one. 2017;12(8):e0182997.
72. Aldecoa C, Llau JV, Nuvials X, Artigas A. Role of albumin in the preservation of endothelial glycocalyx integrity and the microcirculation: a review. Annals of intensive care. 2020;10(1):85.
73. Schumacher MA, Miller MC, Brennan RG. Structural mechanism of the simultaneous binding of two drugs to a multidrug-binding protein. The EMBO journal. 2004;23(15):2923-2930.
74. Stefan MI, Le Novère N. Cooperative binding. PLoS computational biology. 2013;9(6):e1003106.
75. Vagiona AC, Mier P, Andrade-Navarro MA. Unraveling cooperative and competitive interactions within protein triplets in the human interactome. Scientific Reports. 2025;15(1):32548.
76. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. Int J Mol Sci. 2014;15(3):3580-95.
77. Ximenes VF. Concomitant binding of two fluorescent probes at site-I of human serum albumin: The protein acting as a scaffold enabling fluorescence resonance energy transfer. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2022;234:112542.
78. Catalano C, Lucier KW, To D, Senko S, Tran NL, Farwell AC et al. The CryoEM structure of human serum albumin in complex with ligands. Journal of Structural Biology. 2024;216(3):108105.
79. Guzzi R, Bartucci R. Interactive multiple binding of oleic acid, warfarin and ibuprofen with human serum albumin revealed by thermal and fluorescence studies. European Biophysics Journal. 2022;51(1):41-49.
80. Costa-Tuna A, Chaves OA, Almeida ZL, Cunha RS, Pina J, Serpa C. Profiling the interaction between human serum albumin and clinically relevant HIV reverse transcriptase inhibitors. Viruses. 2024;16(4):491.
81. Gholami A, Shirmohammadi S. Advanced in protein-ligand interaction studies: Optical-based spectroscopic insights and simulation perspectives. Journal ISSN. 2024;2766:2276.
82. Brown MP, Royer C. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. Current Opinion in Biotechnology. 1997;8(1):45-49.
83. Albrecht C, Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 2008.
84. Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. Journal of Protein Chemistry. 2000;19(8):637-642.

85. Al-Busaidi BYS. Characterization of the drug-binding site" Sudlow I" of human serum albumin using anthranilic acid probe to reveal the role of Trp-214 in the binding mechanism. Sultan Qaboos University (Oman). 2010.
86. Lu H, Li Z, Zhou Y, Jiang H, Liu Y, Hao C. Horizontal comparison of "red or blue shift" and binding energy of six fluoroquinolones: fluorescence quenching mechanism, theoretical calculation and molecular modeling method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022;278:121383.
87. Froemming JS, Lam YF, Jann MW, Davis CM. Pharmacokinetics of haloperidol. *Clinical pharmacokinetics*. 1989;17(6):396-423.
88. Forsman A, Folsch G, Larsson M, Ohman R. On the metabolism of haloperidol in man. *Current Therapeutic Research*. 1977;45:606-617.
89. Reschke RW. Parenteral haloperidol for rapid control of severe, disruptive symptoms of acute schizophrenia. *Diseases of the Nervous system*. 1974;46.
90. Milton GV, Jann MW. Emergency treatment of psychotic symptoms. *Clinical pharmacokinetics*. 1995;28(6):494-504.
91. Schaffer CB, Shahid A, Javaid JI, Dysken MW, Davis JM. Bioavailability of intramuscular versus oral haloperidol in schizophrenic patients. *Journal of clinical psychopharmacology*. 1982;2(4):274-6.
92. Avent KM, DeVoss JJ, Gillam EM. Cytochrome P450-mediated metabolism of haloperidol and reduced haloperidol to pyridinium metabolites. *Chemical research in toxicology*. 2006;19(7):914-920.
93. Fang J, McKay G, Song J, Remillard A, Li X, Midha K. In vitro characterization of the metabolism of haloperidol using recombinant cytochrome p450 enzymes and human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*. 2001;29(12):1638-1643.
94. Zhang-Wong J, Zipursky RB, Beiser M, Bean G. Optimal haloperidol dosage in first-episode psychosis. *The Canadian Journal of Psychiatry*. 1999;44(2):164-167.
95. Beach SR, Gross AF, Hartney KE, Taylor JB, Rundell JR. Intravenous haloperidol: A systematic review of side effects and recommendations for clinical use. *General Hospital Psychiatry*. 2020;67:42-50.
96. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014;6(12):6020-6047.
97. Sovrlić M, Manojlović N. Osnovi farmakognozije, fitoterapije i priručnik za praktičnu nastavu. Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu; Kragujevac. 2021.
98. Jacob V, Hagai T, Soliman K. Structure-activity relationships of flavonoids. *Current Organic Chemistry*. 2011;15(15):2641-2657.
99. Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*. 2023;28(13):4982.
100. Terahara N. Flavonoids in foods: a review. *Natural product communications*. 2015;10(3):1934578X1501000334.
101. Murphy KJ, Walker KM, Dyer KA, Bryan J. Estimation of daily intake of flavonoids and major food sources in middle-aged australian men and women. *Nutrition Research*. 2019;61:64-81.

102. Zhang G, Wang L, Pan J. Probing the binding of the flavonoid diosmetin to human serum albumin by multispectroscopic techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(10):2721-2729.
103. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;398(3):444-449.
104. Xue P, Zhang G, Zhang J, Ren L. Interaction of flavonoids with serum albumin: A review. *Current Protein and Peptide Science*. 2021;22(3):217-227.
105. Sengupta P, Pal U, Roy P, Samanta T, Chattopadhyay N, Sen K, Bose A. Effect of a metal ion in modulating the binding interaction of a dietary flavonoid with bovine serum albumin and DNA: a spectroscopic and theoretical approach. *ACS Food Science & Technology*. 2022;2(1):114-124.
106. Pal S, Saha C. A review on structure-affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2013;32(7):1132-1147.
107. Ravindranath PA, Forli S, Goodsell DS, Olson AJ, Sanner MF. Autodockfr: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. *PLoSComput. Biol.* 2015;11:e1004586.
108. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*. 1988;38:3098–3100.
109. Becke AD. A new mixing of hartree–fock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys.* 1993;98:1372–1377.
110. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman R et al. Fox, Gaussian 09. 2009. <http://gaussian.com/>
111. Petúpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J et al. Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:6440–6445.
112. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Modeling Environment. 2017. Available online: <https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio> (accessed on 12 July 2025).
113. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS et al. Autodock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009;30:2785–2791.
114. Fey G, Reiss M, Kersten H. Interaction of tetracyclines with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. A fluorometric investigation. *Biochemistry*. 1973;12:1160-1164.
115. Stojanović SD, Janković SM, Matović ZD, Jakovljević IŽ, Jelić RM. *Monatsh Chem.* 2015;146:399.
116. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 2006.
117. Shimada J, Nogita T, Ishibashi Y. Clinical pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin Pharmacokinet.* 1993;25:358-369.
118. Ross PD, Subramanian S. *Biochemistry*. 1981;20:3096.
119. Lubasch A, Erbes R, Mauch H, Lode H. Sparfloxacin in the treatment of drug resistant tuberculosis or intolerance of first line therapy. *Eur Respir J.* 2001;17:641-646.

120. Georgiou ME, Georgiou CA, Koupparis MA. Automated flow injection gradient technique for binding studies of micromolecules to proteins using potentiometric sensors: application to bovine serum albumin with anilinonaphthalenesulfonate probe and drugs. *Anal Chem.* 1999;71:2541-2550.
121. Kandagal PB, Ashoka S, Seetharamappa J, Shaikh SM, Jadegoud Y, Ijare OB. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:393-399.
122. Brand L, Gohlke JR. Fluorescence probes for structure. *Annu Rev Biochem.* 1972;41:843-868.
123. Hu YJ, Liu Y, Zhao RM, Qu SS. Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. *Int J Biol Macromol.* 2005;37:122-126.
124. Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC. Studies of the interaction between palmatine hydrochloride and human serum albumin by fluorescence quenching method. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:1041-1046.
125. Górnas P, Neunert G, Baczyński K, Polewski K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chem.* 2009;114:190-196.
126. Dong C, Ma S, Liu Y. Studies of the interaction between demeclocycline and human serum albumin by multi-spectroscopic and molecular docking methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;103:179-186.
127. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1975;11:824-832.
128. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1976;12:1052-1061.
129. Todorović M, Đurđević P, Antonijević V. Optičke metode instrumentalne analize. 2. izd. Beograd: Hemijski fakultet, 1997.
130. Atkins PW, De Paula J. Atkins' physical chemistry. Oxford: Oxford University Press, 2006.
131. Stokes GG. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc.* 1852;142:463-562.
132. O'Reilly JE. Fluorescence experiments with quinine. *J Chem Educ.* 1975;52:610-612.
133. Beck R, Bertolino S, Abbot SE, Aaronson PI, Smirnov SV. Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Circ Res.* 1998;83:923-931.
134. Barreca D, Laganà G, Bruno G, Magazù S, Bellocco E. Diosmin binding to human serum albumin and its preventive action against degradation due to oxidative injuries. *Biochimie.* 2013;95:2042-2049.
135. Zhivkova Z. Studies on drug—human serum albumin binding: the current state of the matter. *Curr. Pharm. Des.* 2015;21:1817-1830.
136. Mondal M, Lakshmi PT, Krishna R, Sakthivel N. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. *J. Lumin.* 2017;192:990-998.
137. Petrušić A, Mrkalić E, Jelić R, Kočović A, Milosavljević M, Antonijević M et al. Quercetin, catechin, and diosmin as modulators of haloperidol-hsa interactions: a biophysical and computational study. *Int.J. Mol. Sci.* 2025;6834.

138. Sharma A, Schulman SG, Mahanthappa M, Gowda BG, Gowda JI, Rengaswamy R. Spectroscopic, voltammetry and molecular docking study of binding interaction of antipsychotic drug with bovine serum albumin. *J Electrochem Sci Eng*. 2016;6(2):155-64.
139. Berić J, Jelić R, Nešić D, Trbojević-Stanković J, Odović J. Estimation of plasma protein binding of selected antipsychotics using computed molecular properties. *Arch Biol Sci*. 2017;69(3):463-468.
140. Mahanthappa M, Gowda BG, Gowda JI, Rengaswamy R. Spectroscopic, voltammetry and molecular docking study of binding interaction of antipsychotic drug with bovine serum albumin. *J Electrochem Sci Eng*. 2016;6(2):155-64.
141. Asuero AG, Sayago A, Gonzalez AG. The correlation coefficient: an overview. *Crit Rev Anal Chem*. 2006;36:41-59.
142. Kaitin KI. Obstacles and opportunities in new drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:210-2.
143. Mrkalić E, Jelić R, Stojanović S, Sovrlić M. Interaction between olanzapine and human serum albumin and effect of metal ions, caffeine and flavonoids on the binding: a spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;249:119295.
144. Živković N, Mrkalić E, Jelić R, Tomović J, Odović J, Serafinović MĆ et al. The molecular recognition of lurasidone by human serum albumin: a combined experimental and computational approach. *Molecules*. 2025;30:1420.
145. Santos FC, Costa PJ, Garcia MH et al. Binding of RuCp complexes with human apo-transferrin: fluorescence spectroscopy and molecular docking methods. *Biometals*. 2021;34:1029–1042.
146. Sarzehi S, Chamani J. Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47:558–569.
147. Li X, Han L, Song Z, Xu R, Wang L. Comparative study on the interaction between transferrin and flavonols: experimental and computational modeling approaches. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2023;288:122-128.
148. He XM, Carter DC. *Nature*. 1992;358:209.
149. Abubakar K, Francis JA, Tayyab SBM. Elucidating the influence of some metal ions on the binding of antimalarial drugs to human serum albumin: spectroscopic approach. *Rev. Roum. Chim*. 2023;68(10-12):541-545.
150. Villarreal W, Castro W, González S, Madamet M, Amalvict R, Pradines B et al. Copper (I)-chloroquine complexes: interactions with dna and ferriprotoporphyrin, inhibition of β -hematin formation and relation to antimalarial activity. *Pharmaceuticals*. 2022;15(8):921.

8. ПРИЛОЗИ

Биографија

Јелена Д. Берић (девојачко Петровић) рођена је 22.07.1987. године у Краљеву. Основну школу је завршила као носилац Вукове дипломе. Похађала је средњу Медицинску школу у Краљеву, смер фармацевтски техничар, коју је завршила са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је 2006. године. Дипломирала је 15.09.2011. године са просечном оценом 9,00 (девет) и стекла звање магистра фармације. Докторске академске студије на подручју молекулска медицина, подподручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је на Медицинском факултету школске 2011/2012. године. Усмени докторски испит положила је 24.10.2014.

Приправнички стаж је одрадила у Апотеци „29.новембар“- Апотекарске установе Крагујевац. Стручни испит за магистра фармације положила је 29. новембра 2012. године у Београду. Од 2014. године је запошљена у АУ „Фили Фарм“ Велика Плана на позицији одговорног фармацеута. Члан је Фармацеутске коморе Србије, па тако кроз едукације и пројекте спроводи начела примарне здравствене заштите. Свакодневно саветује пацијенте, уочава могуће интеракције и издаје адекватну терапију. У периоду од 2012. до 2014. године била је активни учесник макропројекта: „Анализа фактора који доприносе настанку компликација и/или смртном исходу код политрауматизованих пацијената са акутним панкреатитисом леченим у интензивној нези“.

Мајка је четворо деце.

Библиографија

- Berić J, Stojanović S, Mrkalić E, Matović Z, Milovanović D, Sovrlć M, Jelić R. Interaction of haloperidol with human serum albumin and effect of metal ions on the binding. *Monatsh. Chem.* 2018; 149(12): 2359-2368. M23
- Berić JD, Jelić RM, Nesić DM, Trbojević-Stanković JB, Odović JV. Estimation of plasma protein binding of selected antipsychotics using computed molecular properties. *Arch. Biol. Sci.* 2017; 69(3): 463-468. M23
- Jelić RM, Stojanović SD, Berić JD, Odović J. The effect of tigecycline on the binding of fluoroquinolones to human serum albumin. *Serb. J. Exp. Clin. Res.* 2018; 19(1): 17-25. M51
- Bošković M, Đoković J, Grubor I, Guzvić V, Jakovljević B, Jurišević M, Ljubišić D, Mijailović M, Milićević I, Milovanović M, Nikolić L, Nikolić M, Perić S, Petrović A, Petrović J, Radonjić K, Simonović L, Simović M, Stojanović S, Stojić I, Tomović J, Vranić S, Vučićević K, Zdravković A, Janković S. PhD Student's Awareness of Research Misconduct. *J Empir Res Hum Res Ethics.* 2013;8(2):163-164. M21
- Mijailović M, Stojanović S, Vučićević K, Petrović J, Nikolić M, Zdravković A, Đoković J, Simović M. ABC analiza upotrebe lekova- terminološka razjašnjenja. *Medicinski časopis.* 2013;47(3):161-162. M53
- Petrović DJ. Slučajevi Čurg-Štrausovog sindroma posle primene montelukasa. *Racionalna terapija.* 2012;4(2):23-8. M53
- Jelić RM, Stojanović SD, Berić JD, Janković SM. Spectroscopic studies of binding of tigecycline to human serum albumin and the effects of metal ions and other drugs on binding. 13th IBN SINA International Conference on Pure and Applied Heterocyclic Chemistry- Heterocyclic Chemistry for Sustainable Future, Hurgada, Egypt 2015, Abstracts: p. 237. M34

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

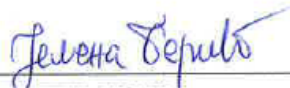
„Испитивање везивања халоперидола за хумани серумски албумин спектроскопским и методама молекулског моделовања и интеракције са одабраним флавоноидима и јонима метала“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 07.04.2026 године,



потпис аутора

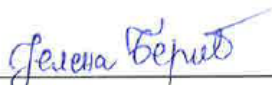
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Испитивање везивања халоперидола за хумани серумски албумин спектроскопским и методама молекулског моделовања и интеракције са одабраним флавоноидима и јонима метала“

истоветне.

У Крагујевцу, 07.04.2026 године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Берић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Испитивање везивања халоперидола за хумани серумски албумин спектроскопским и методама молекулског моделовања и интеракције са одабраним флавоноидима и јонима метала“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

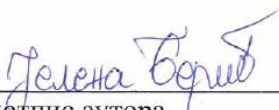
- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 07.04.2026 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>