

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Lena I. Platanić Arizanović

**Molekulske osnove delovanja atipičnih
antipsihotika klozapina, sertindola i ziprazidona
na jetru pacova i eritrocite čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Lena I. Platanić Arizanović

**Molecular basis of action of atypical antipsychotics
clozapine, sertindole, and ziprasidone on rat liver
and human erythrocytes**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

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

dr Čedo Miljević, docent i naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet i Institut za mentalno zdravlje u Beogradu

Komisija:

dr Aleksandra Nikolić-Kokić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Marija Stojadinović, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Ilija Cvijetić, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Mami Milici, tati Ivici, sestri Ani, mužu Milošu i našoj deci.

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija je urađena na Institutu za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu i Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Mentoru, dr Milanu Nikoliću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dugujem veliku zahvalnost najpre za podstrek prilikom polaganja prvih ispita na doktorskim studijama, bez kojih ništa dalje ne bi bilo moguće, a potom i za svu ostalu pomoć i uloženi trud, kao i neposredni rad tokom izrade ove disertacije. Veliko hvala na poverenju, saradnji, toleranciji i prenetom znanju, kao i smernicama u radu tokom prethodnih godina. Mom drugom mentoru, dr Čedu Miljeviću, docentu i naučnom saradniku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Instituta za mentalno zdravlje, neizmerno hvala na pomoći u izradi same teze, svim savetima i sugestijama. Vaše znanje i iskustvo nemerljivo su doprineli ovom radu. Posebno hvala na pribavljanju lekova, čak i kada je bilo potrebno otići po njih stotinama kilometara oдавde.

Dr Aleksandri Nikolić-Kokić, naučnom savetniku Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, dugujem posebnu, ogromnu zahvalnost na pomoći u eksperimentalnom radu, znanju i iskustvu vrednom divljenja, koje galantno deli, kao i na svim profesionalnim, ali i životnim savetima. Najlepše hvala na svim preporukama, smernicama, idejama koje su dovele do uspeha. Saradnja sa Vama bila je zadovoljstvo.

Veliko hvala svim članovima komisije. Docentu dr Mariji Stojadinović zahvaljujem na svim sugestijama i savetima. Docentu dr Iliji Cvijetiću veliko hvala na nesebičnoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada i podjednako nesebičnom deljenju znanja i iskustava, posebno iz oblasti dokinga.

Dragom i jedinstvenom profesoru Mihajlu Spasiću dugujem ogromnu zahvalnost na svojoj pomoći, preporukama, rečima zlata vrednim i nekim lekcijama koje ću se truditi da upamtim za ceo život. Čast mi je što ste mi ukazali poverenje. Podjednako veliku zahvalnost dugujem i veoma dragoj dr Snežani Spasić, koja je svojom energijom, snagom i voljom značajno doprinela tome da ova teza ugleda svetlost dana. Hvala na svim rečima podrške, poverenju koje ste mi ukazali i pružili, ali i razumevanju onda kada je to bilo najpotrebnije.

Beskrajno hvala i mojim biohemičarkama Ivani, Čupki i Sandri, bez kojih ovaj put studija ne bi bio isti.

Ako bih morala da napišem definiciju безусловne podrške, ljubavi, razumevanja, strpljenja i snage, našla bih je u rečima i delima moje mame Milice, tate Ivice i sestre Ane. Bez vas, ne bi bilo ni mene niti ovog uspeha. Volim vas.

Posebno i najveće hvala ide mojoj porodici, Milošu i Borisu i snazi iz stomaka, koji su me obasuli ljubavlju i podrškom. Vi punite moja jedra. Boris je neretko učestvovao i u samom kucanju ove teze, ali su tragovi uspešno izbrisani. Doktorirali smo toleranciju, strpljenje i timski rad. Volim vas.

Lena I. Platanić Arizanović

Molekulske osnove delovanja atipičnih antipsihotika klozapina, sertindola i ziprazidona na jetru pacova i eritrocite čoveka

SAŽETAK

Pleiotropni efekti lekova obuhvataju delovanja na mesta i strukture u telu za koje oni nisu posebno razvijeni i obično su neočekivani. Atipični antipsihotici podležu intenzivnom metabolizmu u jetri, uz stvaranje toksičnih slobodno-radikalnih intermedijera kao jedan od predloženih mehanizama oštećenja jetre kod pacijenata hronično tretiranih ovim psihofarmacima. Cilj prvog dela disertacije bio je da istraži da li atipični antipsihotici klozapin, sertindol ili ziprazidon utiču na enzimski sistem antioksidativne zaštite u jetri. Ekspresija i aktivnost superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPx), glutation-reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST) su izmereni u jetri pacova pri dozama koje odgovaraju ljudskoj terapiji antipsihoticima. Klozapin je povećao aktivnost SOD tipova 1 i 2, GR i GST, uz smanjenje CAT aktivnosti, dok je tretman sertindolom povećao aktivnost obe SOD. U ziprazidonom-tretiranoj grupi pacova jedino je nađeno smanjenje CAT aktivnosti. Sva tri antipsihotika su proizvela blage do umerene histopatološke promene, okarakterisane kao regenerativne promene jetre. Nisu primećeni očigledni znaci infiltracije imunskih ćelija, mikrovezikularnih ili makrovezikularnih masnih promena, ili hepatociti u mitozu. U zaključku, tretman atipičnim antipsihoticima u trajanju od 28 dana promenio je aktivnost zaštitnih antioksidativnih enzima i izazvao histopatološke promene u jetri, pre svega kod pacova tretiranih klozapinom. Rezultati potvrđuju da poremećaji u redoks-homeostazi mogu da doprinose disfunkciji jetre nakon dugotrajnog lečenja atipičnim antipsihoticima.

Prepuni hemoglobinom, esencijalnim proteinom za transport kiseonika kroz telo, eritrociti čoveka su takođe pogodan model sistem za testiranje pleiotropnih efekata lipofilnih lekova. U drugom delu disertacije najpre je ispitano vezivanje klozapina, ziprazidona i sertindola za humani hemoglobin pod simuliranim fiziološkim uslovima. Analiza gašenja (kvenčinga) fluorescencije proteina na različitim temperaturama i podaci iz van't Hoff-ovog dijagrama i molekuskog dokinga pokazali su statični tip kvenčinga, da tetramerni hemoglobin ima jedno vezivno mesto za sve lekove u centralnoj šupljini u blizini $\alpha\beta$ interfejsa, te da hidrofobne sile pre svega učestvuju u stabilizaciji nagrađenih protein–ligand kompleksa. Konstante asocijacije bile su umerene jačine ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$), najveće za klozapin ($2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 25°C). Vezivanje klozapina pokazalo je "prijateljske" učinke: povećan sadržaj α -heliksa, viša tačka topljenja i zaštita proteina od oksidacije posredovane slobodnim radikalima. S druge strane, vezani ziprazidon i sertindol imali su blago pro-oksidativni učinak, povećavajući sadržaj ferihemoglobina, oblika koji ne vezuje kiseonik: mogući "neprijatelji". Niti jedan antipsihotik nije pokazao značajniji efekat na fluidnost plazmine membrane eritrocita, u EPR studiji sa spinskim probama. Sva tri leka su efikasno štitila integritet eritrocita u oksidativnom okruženju koje favorizuje njihovu hemolizu, a pre svega klozapin. Budući da interakcije proteina sa lekovima utiču na njihova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva, dobijeni rezultati ukazuju na mogući značaj hemoglobina u ovim procesima *in vivo*.

Ključne reči: atipični antipsihotici, klozapin, sertindol, ziprazidon, jetra, antioksidativni enzimi, eritrociti, hemoglobin, interakcije, redoks homeostaza.

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina

Molecular basis of action of atypical antipsychotics clozapine, sertindole, and ziprasidone on rat liver and human erythrocytes

ABSTRACT

Pleiotropic effects of drugs include actions on places and structures in the body for which they have not been specifically developed and are usually unexpected. Atypical antipsychotics are subject to intensive metabolism in the liver, with the formation of toxic free-radical intermediates as one of the proposed mechanisms of liver damage in patients chronically treated with these psychopharmaceuticals. The aim of the first part of the dissertation was to investigate whether the atypical antipsychotics clozapine, sertindole, or ziprasidone affect the enzyme system of antioxidant protection in the liver. Expression and activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione-S-transferase (GST) were measured in rat liver at doses corresponding to human antipsychotic therapy. Clozapine increased the activity of SOD types 1 and 2, GR and GST while decreasing CAT activity, while sertindole treatment increased the activity of both SODs. Only a decrease in CAT activity was found in the ziprasidone-treated group of rats. All three antipsychotics produced mild to moderate histopathological changes characterized as regenerative liver alterations. No obvious signs of immune cell infiltration, microvesicular or macrovesicular fatty changes, or hepatocytes in mitosis were observed. In conclusion, treatment with atypical antipsychotics for 28 days changed the activity of the protective antioxidant enzyme and caused histopathological changes in the liver, primarily in rats treated with clozapine. The results suggest that disturbances in redox homeostasis may contribute to liver dysfunction after long-term treatment with atypical antipsychotics.

Loaded with hemoglobin, an essential protein for transporting oxygen throughout the body, human erythrocytes are also a convenient model system for testing the pleiotropic effects of lipophilic drugs. In the second part of the dissertation, the binding of clozapine, ziprasidone, and sertindole to human hemoglobin was first examined under simulated physiological conditions. Analysis of protein fluorescence quenching at different temperatures and data obtained from the van't Hoff diagram and molecular docking showed the static type of quenching that tetrameric hemoglobin has one binding site for all drugs in the central cavity near the $\alpha\beta$ interface, and that hydrophobic forces dominantly mediate the protein-ligand complex stabilization. Association constants were of lower-moderate strength ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$), the highest for clozapine ($2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at 25°C). Clozapine binding showed "friendly" effects: increased α -helix content, higher melting point, and protein protection from free radical-mediated oxidation. On the other hand, bound ziprasidone and sertindole had a slightly pro-oxidative effect, increasing the content of ferrihemoglobin: possible "enemies". None of the antipsychotics showed a significant effect on the fluidity of the erythrocyte plasma membrane in an EPR study with spin probes. All three drugs effectively protected the integrity of erythrocytes in an oxidative environment that favors their hemolysis, especially clozapine. Since protein interactions with drugs affect their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, the obtained results indicate the importance of hemoglobin in these processes *in vivo*.

Keywords: atypical antipsychotics, clozapine, sertindole, ziprasidone, liver, antioxidant enzymes, erythrocytes, hemoglobin, interactions, redox homeostasis.

Scientific field: Biochemistry

Scientific subfield: Protein biochemistry

Sadržaj disertacije

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	3
2.1. Atipični antipsihotici: lekovi izbora u tretmanu shizofrenije	3
2.1.1. Klozapin	4
2.1.2. Sertindol	5
2.1.3. Ziprazidon	6
2.2. Jetra: centralni metabolički organ	7
2.2.1. Osnovi metabolizma ksenobiotika u jetri	8
2.2.2. Štetni metabolički efekti atipičnih antipsihotika	9
2.2.3. Enzimski sistem antioksidativne zaštite	10
2.3. Eritrociti čoveka: "kesice" hemoglobina	14
2.3.1. Membrana eritrocita: model za ispitivanje bioloških membrana	14
2.3.2. Hemoglobin čoveka: opšta struktura i ligand-vezujuća svojstva	15
2.3.3. Oksidativni procesi u eritrocitima čoveka	16
2.4. Metode za ispitivanje interakcija lekova i proteina	17
2.4.1. Spektrofotometrija proteina	17
2.4.2. Spektrofluorimetrija proteina	18
2.4.3. Cirkularni dihroizam proteina	19
2.4.4. Molekulska modelovanje: proteinski doking	20
3. Eksperimentalni deo	22
3.1. Polazni materijal	22
3.2. Eksperimenti sa jetrom pacova i antipsihoticima	23
3.2.1. <i>In vivo</i> procedure	23
3.2.2. Pripremanje tkiva i homogenata jetre	23
3.2.3. Svetlosna mikroskopija tkiva jetre	24
3.2.4. Određivanje proteina u homogenatima jetre	24
3.2.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre	24
3.2.5.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza	24
3.2.5.2. Određivanje aktivnosti katalaze	25
3.2.5.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze	26
3.2.5.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze	26
3.2.5.5. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze	27
3.2.6. Denaturišuća elektroforeza proteina iz homogenata	27
3.2.7. Imunoblot i detekcija antioksidativnih enzima iz homogenata	28
3.3. Eksperimenti sa humanim hemoglobinom i antipsihoticima	28
3.3.1. Fluorescentna merenja hemoglobina i antipsihotika	28
3.3.1.1. Teorijska razmatranja i izračunavanje	29
3.3.2. Merenja cirkularnog dihroizma hemoglobina i antipsihotika	30
3.3.3. Merenja apsorbancije hemoglobina i antipsihotika u vidljivoj oblasti	30
3.3.4. Molekulski doking antipsihotika za hemoglobin	31
3.4. Eksperimenti sa eritrocitima čoveka	31
3.4.1. Merenja fluidnosti membrane eritrocita u prisustvu antipsihotika	32

3.4.2. Merenja stepena hemolize eritrocita u prisustvu antipsihotika i oksidansa	32
3.5. Statističke analize dobijenih podataka	33
4. Rezultati i diskusija	34
4.1. Efekti atipičnih antipsihotika klozapina, sertindola i ziprazidone na jetru pacova: uloga oksidativnog stresa u lekovima-izazvanoj disfunkciji jetre?	34
4.1.1. Tretman eksperimentalnih životinja antipsihoticima	34
4.1.2. Promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri pacova tretiranih antipsihoticima	34
4.1.3. Histopatološke promene u jetri pacova tretiranih antipsihoticima	37
4.2. Humani hemoglobin i atipični antipsihotici klozapin, ziprazidon i sertindol: prijatelji ili ne?	39
4.2.1. Gašenje fluorescencije humanog hemoglobina antipsihoticima	39
4.2.2. Karakterizacija vezivanja antipsihotika i humanog hemoglobina	43
4.2.3. Sinhrona fluorescencija rastvora hemoglobina i antipsihotika	44
4.2.4. Termodinamičko ispitivanje vezivanja antipsihotika za hemoglobin	45
4.2.5. Rezultati doking studije hemoglobina i antipsihotika	46
4.2.6. Analiza cirkularnog dihroizma hemoglobina sa antipsihoticima	47
4.2.7. Efekat antipsihotika na termalnu stabilnost hemoglobina	49
4.2.8. Efekat antipsihotika na spontanu oksidaciju hemoglobina	49
4.2.9. Efekat antipsihotika na oksidansima-potpomognutu oksidaciju hemoglobina ...	50
4.3. Humani eritrociti i atipični antipsihotici klozapin, ziprazidon i sertindol: prijatelji ili ne?	51
4.3.1. Efekat antipsihotika na membranu eritrocita	51
4.3.2. Efekat antipsihotika na oksidansima-potpomognutu hemolizu eritrocita	53
5. Zaključci	54
6. Literatura	56
7. Prilozi	64

1. Uvod

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. World Health Organization) lek je svaka "prirodna ili sintetička supstanca ili proizvod koji se primenjuje u cilju modifikacije ili istraživanja fizioloških sistema ili patoloških stanja" (<https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive>). Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima Republike Srbije prepoznaje lek kao "proizvod koji sadrži supstancu ili kombinaciju supstanci proizvedenih i namenjenih za lečenje ili sprečavanje bolesti kod ljudi ili životinja, postavljanje dijagnoze, poboljšanja ili promena u fiziološkim funkcijama, kao i za postizanje drugih medicinski opravdanih ciljeva" (<https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/335364/lekovi.php>). Prema tome, lekovi su agensi koji se koriste za prevenciju, ublažavanje, dijagnozu ili lečenje patofizioloških stanja (bolesti).

Ne postoji lek koji nema neželjeno delovanje na organizam čoveka u *preporučenoj* dozi, već samo lekovi koji ih ređe ili češće ispoljavaju. Tegobe izazvane lekom nekada su toliko izražene da pacijenti pomisle da su dobili pogrešnu terapiju. Zato štetni efekti delovanja lekova nisu samo problem za pacijente i njihove lekare, već i za zdravstveni sistem u celini, pošto su lekovi najčešći uzrok (60–80%) akutnih trovanja kod ljudi. Osim citostatika (antitumorskih lekova), najbrojnija i toksikološki najznačajnija trovanja su ona psihofarmacima (oko 20% svih lekova izdatih na recept), jedinjenjima koja utiču na psihu čoveka i promene u njegovom raspoloženju, percepciji stvarnosti, svesti i ponašanju. Štetno delovanje nekog leka deo je njegovih "plejotropnih" efekata, koji podrazumevaju delovanje na organizam čoveka *različito* od onog za koji je lek specifično napravljen i odobren za upotrebu. Biohemijski mehanizmi plejotropnog delovanja leka mogu, ali i ne moraju da budu slični osnovnom mehanizmu njegovog (željenog) dejstva. Štaviše, plejotropni efekti mogu da budu i korisni za organizam, te su zato od značaja za ukupnu kliničku sliku primene svakog leka (**Arizanović et al., 2018**).

Antipsihotici (neuroleptici) su lekovi izbora u tretmanu shizofrenije, jedne od najčešćih i najtežih psihijatrijskih bolesti. U farmakološko-biohemijskom smislu, oni su antagonisti dopaminskih receptora, iako mnogi neuroleptici deluju i na druge tipove receptora, čime se objašnjava ne samo njihova izuzetna klinička efikasnost, već i mnogobrojni sporedni (plejotropni) efekti (**Rang et al., 2005**). Antipsihotici se dele u dve velike grupe: (i) tipični, ili lekovi prve generacije, međusobno sličnog delovanja, primene, ali i neželjenih dejstava, i (ii) na novije, atipične ili antipsihotike druge generacije. Neželjeni efekti kod atipičnih antipsihotika su manje izraženi; ipak, većina pokazuje značajne štetne metaboličke efekte, pre svega na metabolizam lipida i glukoze (**Newcomer, 2005**).

Opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje plejotropnih efekata tri u kliničkoj praksi mnogo korišćena oralna *atipična* antipsihotika (klozapina, sertindola i ziprazidona) na jetru (pacova) i eritrocite (čoveka). Zašto jetra? Kao centralni metabolički organ, jetra je zadužena i za selektivno uzimanje lekova iz cirkulacije, njihovo koncentrovanje i metaboličke transformacije, ali i izlučivanje većine lekova i toksina koji se unose u telo. Dok neki parentalni (hemijski oblik leka unetog u telo) lekovi mogu da direktno izazovu hepatotoksičnost, pre svega su njihovi metaboliti ti koji dovode do povreda jetre izazvane lekovima (DILI, engl. Drug-induced Liver Injury). Većina slučajeva DILI-ja je benigna i poboljšava se nakon prestanka uzimanja leka. Stoga je važno na vreme prepoznati i ukloniti njihove uzročnike, kako bi se spečilo napredovanje lezija u hronične bolesti jetre ili njenu akutnu insuficijenciju (**David & Hamilton, 2010**). Zašto eritrociti i njihov hemoglobin? Zbog svog broja (ubedljivo najzastupljenije ćelije krvi), lokacije u organizmu (krv je univerzalni transportni medijum za prenos lekova), jednostavne građe ("kesice hemoglobina"), lakoće izolovanja i razvijene analitike, eritrociti su takođe zahvalan model sistem za izučavanje plejotropnog uticaja lekova na ćelije životinja i njihove komponente (makromolekule i supramolekulske strukture).

Ovako široko postavljen opšti cilj istraživanja ove doktorske disertacije konkretizovan je kroz tri zasebna, ali dopunjujuća zadatka. U prvom (**odeljak 4.1.**), istraženo je da li klozapin, sertindol i/ili ziprazidon utiču na ekspresiju i aktivnost enzima koji su deo zaštitnog anti-oksidativnog odbrambenog sistema, kao i da li posledično narušena redoks-homeostaza uporedo dovodi do oštećenja/povreda jetre (histopatološka ispitivanja), što bi moglo doprineti i razvoju metaboličkih

poremećaja. Za ove analize je iskorišćen standardni *in vivo* životinjski model, mužjaci Wistar albino pacova hronično (svakodnevno, tokom 4 nedelje) tretirani navedenim atipičnim antipsihoticima (suspenzije tableta lekova i pijaće vode), u dozama ekvivalentnim organizmu čoveka. U drugom (**odeljak 4.2.**) je po prvi put *in vitro* okarakterisano vezivanje klozapina, sertindola i ziprazidona za molekul humanog hemoglobina (pod simuliranim fiziološkim uslovima), te utvrđen učinak kompleksacije lekova na strukturu i aktivnost ovog esencijalnog metaloproteina kičmenjaka, koristeći standardne spektroskopske i *in-silico* metode. Polazni proteinski materijal bio je komercijalni preparat hemoglobina ili purifikovani hemoglobin iz krvi zdravog dobrovoljca. Konačno (**odeljak 4.3.**), izanaliziran je uticaj klozapina, sertindola i ziprazidona na fluidnost plazmine membrane eritocita, kao i integritet ćelija/membrane u uslovima oksidativnog stresa *ex vivo*, inkubiranjem eritrocita sa lekovima u prisustvu ugrađenih membranskih spinskih proba (EPR studija fluidnosti), ili uz dodatak oksidujućeg agensa koji hemolizuje ćelije.

Dobijeni rezultati imaju ne samo fundamentalno biohemijski (doprinos istraživanjima interakcija različitih protein–lek sistema), već i moguće primenjeni značaj, za razumevanje složenih mehanizama štetnih i/ili korisnih plejotropnih efekata atipičnih antipsihotika na tkiva i ćelije, što bi moglo da utiče na razmatranja njihove buduće (manje ili veće) primene u kliničkoj praksi.

2. Teorijski deo

Polazeći od predmeta, opšteg cilja i definisanih zadataka (**poglavlje 1**), u ovom delu teksta ukratko su prikazane biohemijske i farmakološke osnove delovanja tri atipična antipsihotika (klozapin, sertindol i ziprazidon) čiji su izabrani plejotropni efekti (parametri) na jetru pacova i eritrocite čoveka eksperimentalno ispitani (**poglavlje 3**). Zbog toga je dat i kratak prikaz (pre svega) funkcionalnih karakteristika hepatocita i eritrocita, sa posebnim osvrtom na njihove komponente (npr. enzimi antioksidativne zaštite, plazmina membrana eritrocita, molekul hemoglobina) koji su bili (ključni) model sistemi za ispitivanje efekata odabranih lekova na njihovu strukturu i/ili aktivnost. Konačno, prikazane su analitičke osnove i mogućnosti metoda koje se (rutinski) koriste u proteinskoj biohemiji za praćenje vezivanja malih molekula (lekova) za proteine od interesa.

2.1. Atipični antipsihotici: lekovi izbora u tretmanu shizofrenije

Antipsihotici su lekovi koji se koriste u tretmanu psihoza, ozbiljnih mentalnih poremećaja koje karakterišu haotične i često bizarne misli, neadekvatno ponašanje i neodgovarajuće emotivne reakcije (**slika 1**). Akutne epizode psihoza označavaju se kao konfuzije (delirijumi) i traju od nekoliko sati do nekoliko dana. Ove psihotične epizode su početna manifestacija shizofrenije kao hroničnog poremećaja, koja se javlja kod oko 1% populacije. Faktori rizika za razvoj shizofrenije (grč. "rascep duše") su genetska predispozicija (fundamentalne biohemijske abnormalnosti, pre svega u funkciji mezolimbičkih i mezokortikalnih neuronskih puteva) u sadejstvu sa sredinskim faktorima. Etiologija shizofrenije nije u potpunosti razjašnjena, ali se sa njom povezuju poremećaji na nivou neurotransmitera dopamina, serotonina i glutamata u mozgu. Simptomi oboljenja uglavnom se javljaju u adolescenciji ili ranom odraslom dobu (**Rang et al., 2005**).



Slika 1. Tipični (rani) psihotični (shizofreni) simptomi
(adaptirano sa: <https://lighthouseinstitute.com/blog/>).

Bihevioralne manifestacije shizofrenije okarakterisane su kao pozitivni i negativni simptomi bolesti. Pozitivni simptomi se javljaju kao posledica pojačane stimulacije centralnog nervnog sistema (CNS) i obuhvataju deluzije (pogrešna ili sumanuta verovanja i ideje), halucinacije (obmane čula sluha i vida), paranoju, uzrujanost, poremećaje u govoru, nesanicu i drugo. Nedostatak zadovoljstva (anhedonija), nedostatak motivacije, slaba briga o higijeni i izgledu, nedostatak socijalnih interakcija, socijalno povlačenje i opšta emocionalna indiferentnost ubrajaju se u negativne simptome. Klinički fenotip shizofrenije veoma varira: paranoidni tip, disorganizovani tip i katatoni tip su najčešće manifestacije ove bolesti (**Stroup & Gray, 2018**).

U farmakološkom smislu, svi antipsihotici deluju kao antagonisti dopaminskih receptora. Ipak, većina lekova iz ove grupe psihofarmaka deluje i na druge receptorske sisteme, pre svega za serotonin, što dokazano doprinosi njihovoj kliničkoj efikasnosti. Antipsihotički lekovi svoje terapijske efekte pretežno duguju blokadi dopaminskih D₂-receptora, za šta je neophodno blokirati oko 80% njihove ukupne populacije. Antipsihotici izazivaju dve glavne vrste neželjenih dejstava, koje se manifestuju promenama u motornoj funkciji: akutna distonija i tardivna diskinezija, koje se jednim imenom nazivaju ekstrapiramidalna neželjena dejstva. Ona su (in)direktna posledica upravo

blokade D₂-receptora. Akutne distonije predstavljaju nevoljne pokrete karakterisane produženom mišićnom kontrakcijom, što dovodi do uvrtnja, ponavljajućih pokreta, ili abnormalnog položaja i držanja tela, tako da podseća na sindrom sličan parkinsonizmu. Tardivnu diskineziju karakterišu učestali nevoljni pokreti, uglavnom mišića lica i jezika (neuobičajene facijalne ekspresije, protruzija jezika, pokreti usana koji slični žvakanju ili brzo treptanje), ali i trupa i udova, što može ozbiljno da onesposobi (socijalni život) pacijenta (**Rang et al., 2005**).

Najosnovnija podela antipsihotika je na tipične (konvencionalne, lekove prve generacije) i atipične (lekovi druge generacije) antipsihotike. Konvencionalni antipsihotici su dalje podeljeni u nekoliko različitih klasa na osnovu svoje hemijske strukture: fenotiazini (hlorpromazin, flufenazin, periciazin, tioridazin, trifluoperazin); butirofenoni (droperidol, haloperidol); tioksantini (tiotiksen); difenilbutilpiperidini (pimozid). Za sve ove psihofarmake karakteristično je da se kompetitivno vezuju i blokiraju D₂ tip dopaminskih receptora. Noviji antipsihotici druge generacije pokazuju snažan afinitet ne samo prema dopaminskim, već i serotoninским, histaminskim i muskarinskim receptorima. Zato oni efikasnije uklanjaju psihotične simptome, sa manjom pojavom ekstrapiramidalnih neželjenih efekata u poređenju sa tipičnim antipsihoticima. Kraće trajanje okupiranosti ciljnih receptora, kao i uticaj na serotonergičku signalizaciju, osnovni su razlozi za znatno bolju tolerabilnost atipičnih u odnosu na konvencionalne antipsihotike (**Simpson, 2005**).

Danas je u upotrebi oko 20 različitih antipsihotika (**tabela 1**) i, uz neke izuzetke, razlike u kliničkom profilu između pojedinih preparata nisu velike. U savremenoj kliničkoj praksi, povećana primena atipičnih antipsihotika, uprkos (visokoj) ceni na tržištu, potpuno je opravdana, budući da oni u mnogo manjoj meri izazivaju navedene neželjene motorne efekte. Iako su sporedni štetni efekti atipičnih antipsihotika generalno blaži i bolje se tolerišu, neki od njih, poput klozapina, mogu dovesti do stanja opasnih po život, dok drugi povećavaju rizik od gojaznosti, hiperglikemije, dijabetesa i malignog neuroleptičkog sindroma (**Rang et al., 2005**).

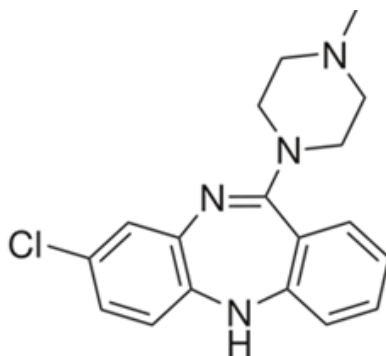
Tabela 1. Lista antipsihotika u upotrebi u Sjedinjenim Američkim Državama (prema Wang et al., 2005).

Tipični antipsihotici	Atipični antipsihotici
Hlorpromazin (Torazin)	Aripiprazol (Abilifaj)
Flufenazin (Proliksin)	Asenapin (Safris)
Haloperidol (Haldol)	Klozapin (Klozaril)
Loksapin (Loksitan)	Iloperidon (Fenapt)
Perfenazin (Trilafon)	Lurazidon (Latuda)
Tioridazin (Melaril)	Olanzapin (Ziprega)
Tiotiksen (Navan)	Paliperidon (Invega)
Trifluoperazin (Stelazin)	Risperidon (Risperdal)
	Ziprazidon (Geodon)

U daljem tekstu biće ukratko predstavljena hemijska, biohemijska i farmakološka svojstva tri atipična antipsihotika čiji su efekti na jetru i eritrocite bili predmet istraživanja ove disertacije: klozapin, sertindol i ziprazidon.

2.1.1. Klozapin

Efikasnost je ono što izdvaja klozapin (Clo) (**slika 2**) od svih ostalih antipsihotika, zbog čega se smatra "zlatnim standardom" u tretmanu oblika shizofrenije na koje ostali psihofarmaci slabo deluju (**Haddad & Correll, 2018**). Uveden je u kliničku praksu 70-tih godina XX veka. Ovaj medikament pre svega deluje kao antagonist serotonergičnih i dopaminergičnih receptora. Dobro je rastvoran u organskim rastvaračima (100 mg/mL u metilen hloridu, 96 mg/mL u etanolu), praktično nerastvoran u vodi. Uobičajene dnevne terapijske doze su 300–600 mg, najviša prepisivana 900 mg, od čega 60–70% ulazi u sistemsku cirkulaciju. Maksimalna koncentracija u plazmi detektuje se nakon 2,5 sata od oralne primene (**Vaddadi et al., 2003**).



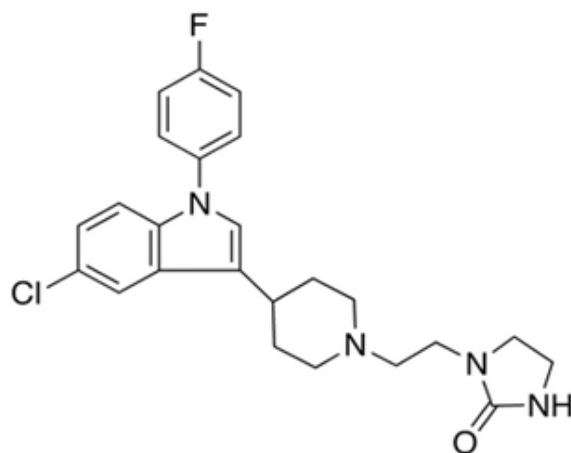
Slika 2. Hemijska struktura klozapina (Mr 326,823):
8-hloro-11-(4-metil-1-piperazin-1-il)-5H-dibenzo-[b,e] [1,4]diazepin.

Kao atipični antipsihotik, klozapin je prototip antagonista širokog spektra delovanja. Njegov profil vezivanja za (ciljne) receptore prilično se razlikuje u odnosu na druge antipsihotike, unutar i izvan dopaminergičnog sistema. Naime, on ima relativno nizak afinitet ka D₂ receptorima u stratumu, sa oko 10 puta većim afinitetom prema D₄ receptorima *in vitro*; potvrđeno je da se vezuje i za D₁, D₃ i D₅ tipove dopaminskih receptora. Veća zastupljenost D₄ receptora u frontalnom korteksu i amigdali, te relativno mala zastupljenost u bazalnoj gangliji, smatra se objašnjenjem visoke efikasnosti klozapina u ublažavanju simptoma shizofrenije bez izazivanja ekstrapiramidalnih štetnih efekata. Klozapin pokazuje visok afinitet ne samo prema 5-HT (serotoninskim) receptorima (tipovi 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₆ i 5-HT₇), već i α_1 i α_2 adrenergičnim, ali i muskarinskim (M) receptorima. Klozapin (specifično) deluje i na glutaminske receptore, kao i na receptorske sisteme vezane za γ -amino-buternu kiselinu (GABA) kao prvim glasnikom (**Guitton et al., 1997**).

Klozapin podleže intenzivnom metabolizmu u jetri, uz proces demetilacije do N-desmetil-klozapina i oksidacije do klozapin-oksida (**Pirmohamed et al., 1995**). S obzirom da se vezuje za različite tipove receptora, klozapin može da izazove širok spektar neželjenih efekata: sinusna tahikardija, ortostatska hipotenzija, hipersalvacija i intenzivna sedacija, noćno mokrenje; sve ovo ograničava upotrebu leka u kliničkoj praksi. Hronični tretman klozapinom povezuje se i sa opasnim neželjenim ishodima: agranulocitoza, kardiomiopatija, miokarditis, akutna mijeloidna leukemija i sa metaboličkim efektima, pre svega kao posledica povećanja telesne mase pacijenta. Najozbiljnije (moguće fatalno) neželjeno dejstvo klozapina jeste agranulocitoza (kod oko 2% pacijenata), koju karakteriše nagli pad broja leukocita, što pacijente čini podložnim različitim infekcijama. Međutim, klozapin je u praksi pokazao i anti-suicidalne i anti-agresivne karakteristike, tako da uprkos navedenim neželjenim efektima i komplikacijama tokom upotrebe, on ostaje lek izbora kod pacijenata rezistentnih na terapiju klasičnim antipsihoticima (**Naheed & Green, 2001**). Sporedne (manje zastupljene) posledice primene klozapinske terapije uključuju i akutni nekrotični hepatitis, holestatski hepatitis, sa nekrozom hepatocita i infiltracijom eozinofila (**Slim et al., 2016**). Iako u većini smernica za pacijente pod klozapinom nisu date preporuke za redovno testiranje i praćenje funkcionalnosti jetre, i do 60% pacijenata imaju povećane nivoe enzima aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), γ -glutamyl-transferaze (GGT), alkalne-fosfataze (ALP) i laktat-dehidrogenaze (LDH) (**Gaertner et al., 2001**).

2.1.2. Sertindol

Iako još uvek nije odobren od strane američke Agencije za hranu i lekove (Food and Drug Association, FDA), sertindol (Ser; **slika 3**) je (inicijalno) dobio odobrenje za upotrebu u tretmanu shizofrenije od strane Ujedinjenog Kraljevstva 1996. godine. Sertindol je atipični antipsihotik koji selektivno inhibira D₂ receptore u mezolimbickom sistemu (naspram nigrostratumu), uz uporednu inhibiciju 5-HT₂ i α_1 -adreno receptora. Lek je solidno rastvoran u vodi (<2 mg/mL) i dobro u DMSO-u (>10 mg/mL). Preporučene dnevne terapijske doze su od 8 do 16 mg, sa najvišom preporučenom dnevnom dozom od 24 mg; oko 75% doze se usvaja, a maksimalnu koncentraciju lek u plazmi dostiže 10 h nakon oralne administracije (**Murdoch & Keating, 2006**).



Slika 3. Hemijska struktura sertindola (Mr 440,94):

1-[2-[4-[5-hloro-1-(4-fluorofenil)-indol-3-il]-1-piperidil]etil]imidazo-lidin-2-on.

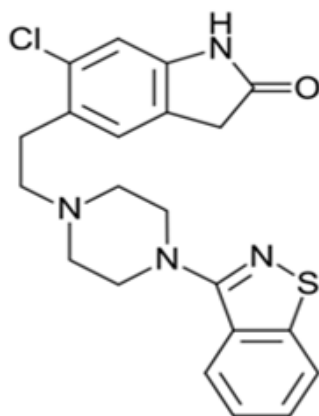
Nakon resorpcije, sertindol preko hepatične cirkulacije dolazi do jetre, gde se metaboliše (ctohrom P450 2D6 i 3A4 izoenzimi) do dva glavna (fiziološki neaktivna) metabolita: dehidrosertindola i norsertindola, koji se gotovo potpuno eliminišu fecesom. Poluživot sertindola u cirkulaciji iznosi 53–102 sata. Glavobolje, insomnija, poremećena ejakulacija kod muškaraca najčešće su zastupljeni sporedni efekti upotrebe sertindola. Iako mnogi antipsihotici povećavaju nivo prolaktina u serumu, kao posledicu dopaminske blokade, to nije slučaj sa sertindolom. Ovaj lek se ne vezuje za muskarinske i histaminske (H₁) receptore, što je potvrđeno odsustvom antiholinergičnih i sedativnih efekata (**Murdoch & Keating, 2006**).

Sertindol je i dalje lek drugog izbora u tretmanu psihoza, zbog mogućih kardiovaskularnih rizika, tako da se (uglavnom) koristi kod pacijenata kod kojih drugi antipsihotici ne daju zadovoljavajuće rezultate (**Juruena et al., 2011**). Po rezultatima jedne studije (**Slim et al., 2016**), nije bilo prijavljenih slučajeva (akutnih) oštećenja jetre kod osoba koje su uzimale sertindol. U drugoj, još obimnijoj studiji (4905 ispitanika), kod jedne osobe je izmeren povećan nivo ALT i AST enzima u serumu, a kod druge je prijavljeno hepatocelularno oštećenje (**Lundbeck, 2014**).

2.1.3. Ziprazidon

Ziprazidon (Zip) je relativno noviji atipični antipsihotik iz grupe benzotiazolil-piperazina (**slika 4**), u upotrebi u SAD od 2001. godine (**Nicolson & Nemeroff, 2007**). Ovaj lek je antagonist (pre svega) dopaminskih i serotoninških receptora u mozgu. Rastvora se u organskim rastvaračima (umereno u etanolu, 10 mg/mL u DMSO-u), vrlo slabo u vodi. Dnevne terapijske doze ziprazidona su 80–160 mg, maksimalno 200 mg leka. Unosi se oralno (biodostupnost 60%) ili intramuskularno, kada se usvaja potpuno (**Green, 2001**). Pošto je odskora (u poređenju sa drugim lekovima iz ove grupe psihofarmaka) u upotrebi, podaci o sporednim efektima korišćenja ovog leka u dužem vremenskom periodu i dalje su ograničeni. Klinički izveštaji ukazuju da je ovaj antipsihotik efikasan u terapiji shizofrenije i shizoafektivnih poremećaja, sa povoljnim uticajem na negativne simptome i simptome depresije (**Nicolson & Nemeroff, 2007**).

Ziprazidon izaziva manje neželjenih dejstava od drugih psihofarmaka, pri čemu je njegova efikasnost slična onoj kod konvencionalnih antipsihotika. Najčešća sporedna dejstva su pospanost (kod oko 14% pacijenata) i mučnina (kod oko 10% pacijenata). Dodatna serotonergična aktivnost leka povećava efikasnost kod negativnih i afektivnih simptoma shizofrenije, a deluje i na kognitivne simptome bolesti (**Green, 2001**). U praksi su retko zabeleženi povišeni nivoi AST i ALT u serumu pacijenata na hroničnoj terapiji ovim lekom (kod 0,3–6% pacijenata) (**Slim et al., 2016**). Ipak, dugoročna upotreba ziprazidona povezuje se i sa opasnim DRESS reakcijama preosetljivosti (engl. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms) (**LiverTox, 2015**).



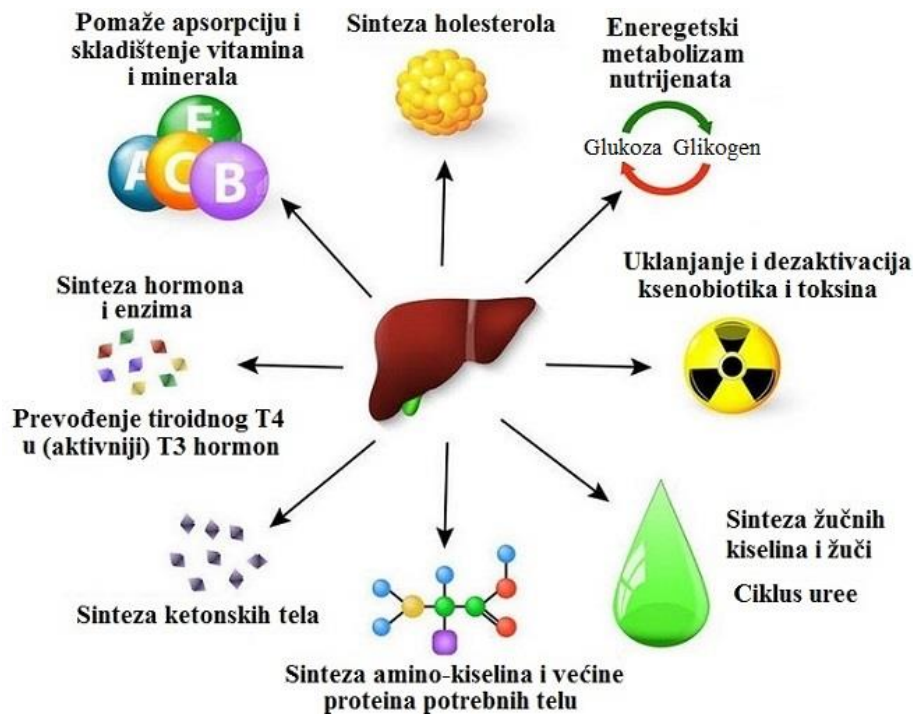
Slika 4. Hemijska struktura ziprazidona (Mr 412,936): 5-(2-(4-(1,2-benzisotiazol-3-il) piperazinil)etil)-6-hloro-1,3-dihidro-2(1H)-indol-2-on.

Ziprazidon je najaktivniji na nivou serotoninских 5-HT_{2A} receptora; vezuje se (*in vitro*) za 5-HT_{2A} i D₂ sličnim, a većim afinitetom u odnosu na većinu drugih klinički dostupnih antipsihotika. Učestalost ekstrapiramidalnih neželjenih efekata, koji se javljaju usled blokade dopaminergičnih receptora, je niska, čemu pre svega doprinosi antagonizam prema 5-HT_{2A} receptorima. Podaci ukazuju i na antidepresivna i anksiolitička svojstva ziprazidona, usled njegove kombinovane (farmakološke) aktivnosti prema serotonergičkom, dopaminergičkom i adrenergičkom signalnom sistemu. Ovo je izgleda u vezi i sa visokim afinitetom ziprazidona prema 5-HT_{1A} receptorskom podtipu (K_a od 3,4 nM), što ovaj lek razlikuje od olanzapina i klozapina (Sprouse *et al.*, 1999). U poređenju sa klozapinom, risperidonom, olanzapinom i kvetiapiinom, ziprazidon je manje potentan α_1 -antagonist. Manji afinitet prema H₁ i M₁ receptorima u mozgu, u poređenju sa klozapinom, olanzapinom i kvetiapiinom, sugeriše da ziprazidom ima manje izražena neželjena sedativna dejstva u odnosu na klozapin i olanzapin (LiverTox, 2012).

2.2. Jetra: centralni metabolički organ

Jetra je najveći čvrst organ u telu odraslog čoveka, sa masom (1,2–1,6 kg) oko 2% ukupne telesne mase odraslog čoveka. To je mekan, smeđocrveni organ klinastog oblika, lociran u gornjem delu abdominalne duplje ispod dijafragme i većim delom je zaštićena rebrima. Iako je anatomski relativno jednostavna, jetra je funkcionalno veoma složeni organ. Sastoji se od dva nejednaka režnja (lobusa) i ima tri strane: gornju (ispupčenu), donju (koja leži na debelom crevu i želucu) i zadnju (koja povezuje jetru sa dijafragmom). Pre ulaska hranljivih materija u sistemsku cirkulaciju i njihovog transporta do ciljnih tkiva i organa, celokupna krv iz gastrointestinalnog trakta prolazi kroz jetru (Reed, 2009).

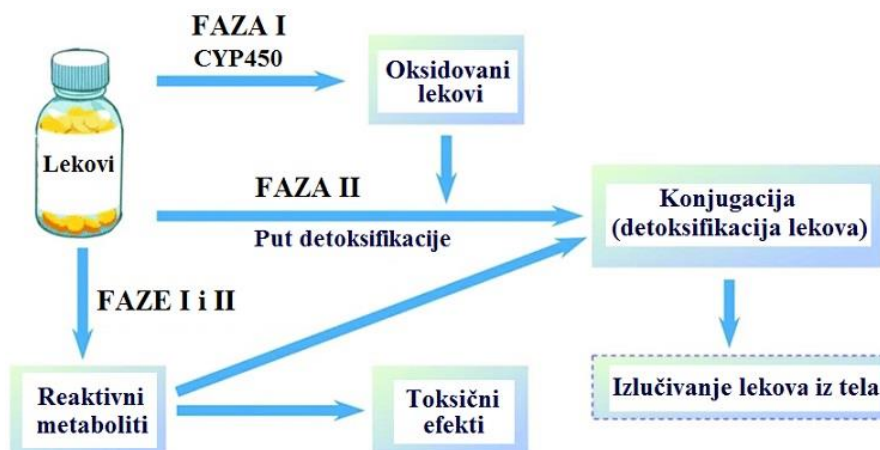
Jetra ima centralnu ulogu u metabolizmu, varenju hrane, detoksikaciji i eliminaciji supstanci iz organizma (slika 5). Slikovito se opisuje kao "laboratorija" čovekovog organizma, zbog svojih brojnih nezamenljivih uloga. Neke od ključnih su: a) svi anabolički i katabolički putevi odvijaju se u hepatocitima (ćelijama jetre); b) sinteza većine proteina (osim imunoglobulina i nekih faktora koagulacije); c) održanje homeostaze glukoze (reguliše nivo glukoze u plazmi, reagujući na nervne i hormonske stimulanse, regulator procesa glikogeneze, glikogenolize, glukoneogeneze i glikolize); d) metabolizam lipida (sinteza holesterola, triacilglicerola i lipoproteina); e) skladištenje različitih jedinjenja (depo vitamina A, D, E, K i B12, lipida i glikogena u slučaju neadekvatne ishrane ili preterane konzumacije alkohola); f) sinteza žučnih kiselina (neophodne za varenje i apsorpciju lipida i u njima rastvornih vitamina, kao i uklanjanje viškova holesterola); g) biotransformacija endogenih supstanci, toksina, ali i lekova, uz njihovo prevođenje u manje toksičan oblik (na primer, prevođenje porfirina hema u bilirubin i bilirubin-glukuronid, amonijaka u ureu, purina u mokraćnu kiselinu); h) katabolizam (razgradnja) hormona. Tokom svih ovih procesa, nastala jedinjenja i metabolite jetra koristi za svoje potrebe, ili eksportuje u krv (Krivokuća *et al.*, 2005).



Slika 5. Shematski prikaz najvažnijih uloga jetre (hepatocita) u telu čoveka (adaptirano sa: <https://www.nutritionwithjudy.com/>).

2.2.1. Osnovi metabolizma ksenobiotika

Za organizam su od posebnog značaja procesi u jetri koji dovode do detoksifikacije i izlučivanja potencijalno štetnih ksenobiotika i endogenih molekula, ali i njihovih metabolita. U osnovi svih ovih procesa nalazi se veći broj enzimom katalizovanih reakcija, koje se uobičajeno dele na dve faze (**slika 6**). U prvoj se povećava polarnost navedenih supstanci, kao rezultat hemijskih reakcija oksidacije (najčešće), redukcije i hidrolize (manje zastupljeni procesi). Ključnu ulogu u prvoj fazi metabolizma lekova ima familija citohroma P450 (mono-oksigenaze) u mikrozomalnoj frakciji hepatocita. Različite reakcije konjugacije, u kojima se jedinjenjima od interesa (najčešće metaboliti prve faze biotransformacije) dodaju glutation, glicin, glukuronska kiselina, sulfatna grupa i druga jedinjenja, predstavljaju reakcije druge faze. S obzirom da su njihovi proizvodi polarna hidrofilna jedinjenja, one za cilj imaju da maksimalno olakšaju eliminaciju neželjenih supstanci preko bubrega, urinom (**Zhao et al., 2021**).



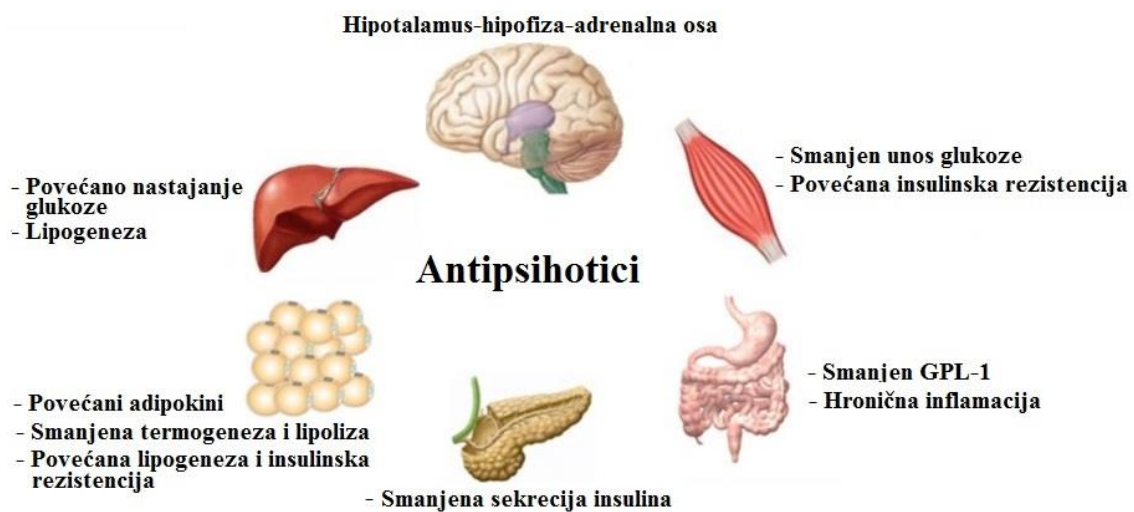
Slika 6. Shematski prikaz opštih puteva metabolizma lekova u jetri (adaptirano iz: **Zhao et al., 2021**).

Citohromi obuhvataju ogroman broj različitih enzima (podeljenih u 18 familija kod čoveka) koji sadrže čvrsto vezani hem kao prostetičnu grupu i obeležavaju se skraćenicom CYP450. Kao ključne komponente prve faze metabolizma ksenobiotika (lekova), oni najčešće katalitički deluju kao

oksidaze mešane funkcije, pošto, za razliku od oksidaza koje uvode oba atoma molekuskog kiseonika u supstrat, one uvode samo jedan atom kiseonika u strukturu nastalog metabolita, obrazujući (reaktivnu) hidroksilnu grupu. Molekul NADPH, kao izvor redukujućih ekvivalenata iz pentozofosfatnog puta, je neophodan koenzim za aktivnost CYP450 enzima. NADPH-citohrom P450 reduktaza, koja prenosi elektrone sa NADPH do CYP450 sistema i nalazi se u membrani glatkog endoplazmatskog retikuluma hepatocita takođe uvodi atom kiseonika u supstrat. Enzimi druge faze metabolizma ksenobiotika su različite transferaze, kao glukuronozil-, sulfo- ili glutathion-S-transferaze. Ovaj tip enzima obično zahteva aktivnu formu grupe ili molekula koji će biti predmet transfera. Glukuronska kiselina je tipičan primer: ona se prvo prevodi u aktivni oblik (UDP-glukuronat), koji se potom konjuguje sa hidroksilnom (ROH – alkoholi; PhOH – fenoli) ili karboksilnom (RCO₂H – kiseline) u ciljnom molekulu (**Gibson & Skett, 2001**).

2.2.2. Štetni metabolički efekti atipičnih antipsihotika

Podaci iz kliničke prakse ukazuju na uzročno-posledičnu vezu između tretmana tipičnim i atipičnim antipsihoticima i patobiohemijskih stanja kao što su: dijabetes, ketoacidoza, hiperglikemija i disregulacija lipidnog statusa kod hronično tretiranih pacijenata. Osim značajnog povećanja telesne mase (debljanja), poznato je da antipsihotici ometaju metabolizam glukoze (neosetljivost tela na insulin), povećavaju nivo holesterola i trigliacilglicerida u serumu, te uzrokuju arterijsku hipertenziju, što dovodi do metaboličkog sindroma kod pacijenata. Debljanje izazvano većinom danas prepisivanih antipsihotika (**slika 7**) smatra se glavnim problemom u farmakološkom tretmanu psihoza. Dokazano je da povećanje telesne mase i prateća gojaznost povećava kardio-vaskularni i cerebrovaskularni morbiditet i mortalitet, smanjuje kvalitet života, što dovodi do prestanka uzimanja lekova od strane pacijenta (**Dayabandara et al., 2017**).



Slika 7. Shematski prikaz središnjih i perifernih mehanizama debljanja izazvanog antipsihoticima i njihovih metaboličkih nuspojava. GLP-1: peptid sličan glukagonu-1. Adaptirano i prilagođeno iz: Verhaegen & Van Gaal, 2019.

Tretman klozapinom i olanzapinom pokazalo se da je povezan sa najvećim rizikom za značajno povećanje telesne mase, dok, u proseku risperidon, kuetiapin i amisulprid manje povećavaju telesnu masu i, stoga, predstavljaju manji rizik za razvoj gojaznosti kod pacijenata. Izgleda da hroničan tretman ziprazidonom i aripiprazolom povlači sa sobom najmanji rizik od gojaznosti (**Newcomer, 2005**).

Rezultati opsežnih kliničkih studija ukazuju da atipični antipsihotici pokazuju međusobno različite efekte na metabolizam glukoze i lipida, koji se najvećim delom odvija u hepatocitima. Hroničan tretman klozapinom i olanzapinom izgleda da povećava rizik od dijabetesa tipa 2 i dislipidemija; nekonzistentni nalazi sugerišu manje izraženi efekat risperidona i kuetiapina na ova patofiziološka stanja. Hronično uzimanje amisulprida smatra se vodi manjem riziku od (navedenih) metaboličkih poremećaja u poređenju sa olanzapinom, dok, po svemu sudeći, dugotrajan tretman

ziprazidonom i aripiprazolom povećava rizik od dijabetesa i dislipidemije (Newcomer, 2005). Prema raspoloživim podacima, uzimanje sertindola ili risperidona ne dovodi se u vezu sa povećanim (uporednim) rizikom od metaboličkog sindroma (tzv. sindrom X), kompleksnog metaboličkog oboljenja, stanja koje obuhvata visceralnu gojaznost, visoki krvni pritisak, povišen nivo glukoze i triacilglicerola u krvi (zbog insulinske rezistencije). Metabolički efekti ova dva atipična antipsihotika u osnovi su veoma slični (De Hert *et al.*, 2011).

Uopšteno govoreći, uočena različita sklonost atipičnih antipsihotika ka povećanju telesne mase direktno se povezuje sa povećanim (relativnim) rizikom od rezistencije na insulin (metabolički sindrom), dislipidemije i hiperglikemije. Zato se u terapijskom pristupu mora voditi računa o svim moguće štetnim metaboličkim efektima ove klase lekova, uz evt. uključivanje lekova koji pokazuju suprotno delovanje, tj. smanjuju telesnu masu, kao što su topiramata, lekovi koji su antagonisti histamina, kao i dopaminergični i serotoninergični agensi. Naime, ovi medikamenti su pokazali obećavajuće rezultate u regulaciji psihotropnim supstancama izazvanog povećanja telesne mase u većini pacijenata (Tschoner, 2007).

Oštećenja jetre izazvana lekovima obuhvataju sve ozlede nastale direktnim delovanjem medikamenata, bez obzira da li su oni deo propisanog tretmana ili su samostalno uzimani, bez lekarske preporuke ili recepta (Lisi, 2016). Sve klase antipsihotika izazivaju oštećenje jetre, međutim, bez obzira što veliki broj ljudi u svetu uzima ove lekove, učestalost ireverzibilnog oštećenja ovog organa je relativno nizak (Xu & Zhuang, 2019). Najčešći neželjeni događaji su akutne ozlede sa akutnim hepatocelularnim hepatitisom, koji može biti praćen i prestankom rada jetre (Balestrieri *et al.*, 2000). Svi atipični antipsihotici podležu intenzivnim metaboličkim transformacijama u hepatocitima, čiji rezultat može biti i stvaranje reaktivnih vrsta i reaktivnih metaboličkih intermedijera u procesima inaktivacije leka, odgovornih za uočena oštećenja hepatocita kod pacijenata na hroničnoj terapiji ovom klasom psihofarmaka (Sheehan *et al.*, 2010). Patogeneza lekovima-izazvanih oštećenja jetre zasigurno je veoma složena i često je rezultat kombinacije različitih mehanizama koji nisu u potpunosti izučeni, uključujući tu i oksidativni stres.

2.2.3. Enzimski sistem antioksidativne zaštite

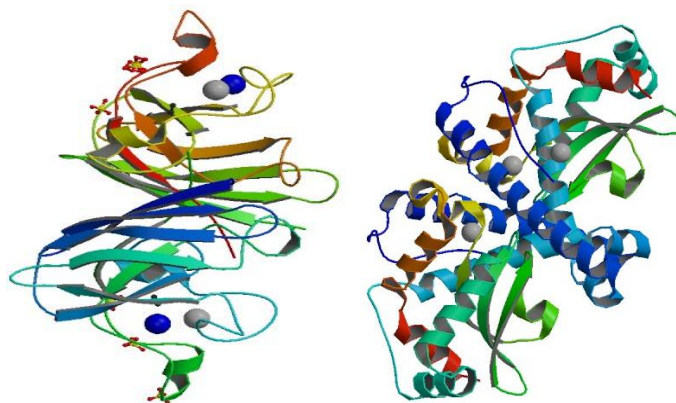
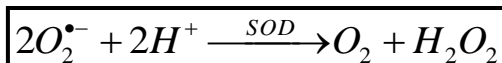
Rezultati mnogobrojnih studija potvrđuju hipotezu da oksidativni stres igra važnu ulogu ne samo u patofiziologiji shizofrenije (videti dalje), već i mnogih drugih patofizioloških stanja, na primer kardiovaskularnih bolesti (Senoner & Dichtl, 2019), kancera (Morry *et al.*, 2017), metaboličkih oboljenja (Frukawa *et al.*, 2004) i starenja (Liguori *et al.*, 2018). Kod pacijenata na hroničnoj terapiji antipsihoticima i kod onih sa prvom shizofrenom epizodom, primećena je narušena homeostaza u složenom sistemu antioksidativne zaštite, kao i povećan stepen lipidne peroksidacije (Gama *et al.*, 2006). Utvrđeno je da atipični antipsihotici pokazuju ne samo (povoljne) anti-oksidativne, već i (veoma štetne) pro-oksidativne efekte na različitim (uglavnom *in vitro*) model sistemima, tako da su (dugoročni) benefiti njihovog plejotropnog delovanja i dalje predmet debata (Bošković *et al.*, 2011). Zato su istraživanja koja proučavaju biohemijske efekte antipsihotika (kao u ovoj disertaciji) fokusirana i na njihov uticaj na ključne komponente i mehanizme antioksidativne zaštite čoveka. To se pre svega odnosi na aktivnost antioksidativnih enzima, prve linije odbrane od štetnog delovanja (ne)radikalnih reaktivnih vrsta kiseonika i azota.

Ukratko, slobodni radikali su reaktivne hemijske vrste koje sadrže nesparen(e) elektron(e) u svojoj poslednjoj atomskoj ili molekulskoj orbitali; stoga su snažni elektrofilni i jaki oksidansi. Hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), joni prelaznih metala (kao Fe^{2+} i Cu^{2+}) i azot-oksid ($\cdot\text{NO}$) neki su od primera slobodnih radikala. Oni, kao i reaktivne neradikalne vrste poreklom iz slobodnih radikala (kao H_2O_2), prisutni su u ćelijama i tkivima u niskim koncentracijama, sa esencijalnom ulogom u procesima redoks-regulacije i u odbrani organizma od različitih patogena. Povećano nastajanje reaktivnih vrsta, koja prevazilazi odbrambene antioksidativne kapacitete ćelija, dovodi do oksidativnog stresa, čije (direktno) posledice mogu biti ireverzibilna oštećenja ključnih makromolekula: oksidacija proteina, peroksidacija lipida, prekidi lanaca i modifikacije nukleinskih

(azotnih) baza u strukturi DNK. Oksidativni stres se definiše i kao "poremećaj redoks signalizacije i kontrole" (Betteridge, 2000).

Ćelije sisara, pre svega hepatociti i eritrociti, razvile su efikasne zaštitne mehanizme detoksikacije i odbrane od štetnog delovanja reaktivnih hemijskih vrsta. Oni sprečavaju, ograničavaju i (donekle) popravljaju oštećenja nastala delovanjem reaktivnih vrsta. Ova zaštita podrazumeva: (i) (ne)enzimske komponente primarne antioksidativne zaštite, one koje direktno reaguju i neutrališu reaktivne vrste; (ii) elemente pomoćne antioksidativne zaštite, uključene u sintezu i/ili reciklažu kofaktora neophodnih za aktivnost antioksidativnih enzima; (iii) proteine koji čvrsto vezuju (i inaktiviraju) katalitički aktivne redoks jone, što umanjuje nastanak (novih) hidroksilnih radikala. U ne-enzimske komponente ubrajamo liposolubilna jedinjenja kao vitamin E, (pro)vitamin A i koenzim Q, ali i ona hidrosolubilne prirode, kao vitamin C, (redukovani) glutation, mokraćna kiselina i (protein) serum albumin. Organizam čoveka ne sintetise sva navedena jedinjenja i ona se moraju unositi u dovoljnoj količini putem ishrane. Najvažnije enzimske komponente sistema antioksidativne zaštite su familija superoksid-dismutaza, katalaza, familija glutation-peroksidaza i glutation-reduktaza (Matés *et al.*, 1999).

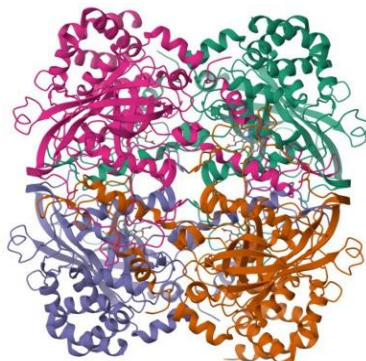
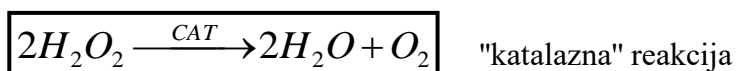
Superoksid-dismutaza (SOD; EC.1.15.1.1) katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik-peroksid (slika 8), kroz cikličnu reakciju oksido-redukcije uz pomoć metalnog jona (kofaktora) u aktivnom centru enzima. Na osnovu prisutnog metala i ćelijskoj lokalizaciji enzima, nalazimo pet članova familije superoksid-dismutaza u prirodi. Fe-SOD sadrži gvožđe (Fe^{3+}) u aktivnom centru i karakteristična je za prokariote i eukariotske alge. Mn-SOD (sa Mn^{3+}) je široko rasprostranjena u živim sistemima, kod eukariota pre svega u mitohondrijama, kao heterotetramer mase 88 kDa. CuZn-SOD u aktivnom centru sadrži po jedan jon bakra (Cu^{2+}) i cinka (Zn^{2+}); eukariotski oblik (dve identične subjedinice od 32 kDa) je prisutan u citosolu ćelija, ređe u međumembranskom prostoru mitohondrija, lizozomima, peroksisomima i jedru. EC-SOD je ekstracelularni tetramerni glikoprotein (135 kDa), takođe sa jonima bakra i cinka u aktivnom mestu enzima lociranog u cerebrospinalnoj tečnosti, plazmi i limf, u malim količinama u tkivima. Pojedine bakterije sadrže podklasu SOD u formi tetramernog ili heksamernog kompleksa, sa katalitičkim jonom nikla (Ni^{2+}) (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).



Slika 8. Shematski prikaz 3D strukture: (levo) CuZn-SOD (PDB 2C9V) i (desno) Mn-SOD (PDB 2ADQ).

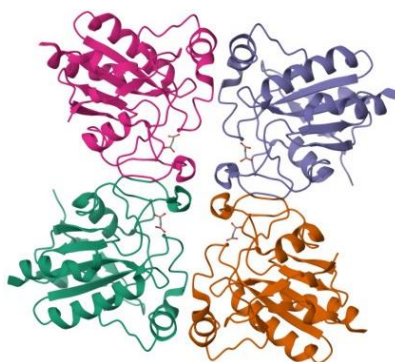
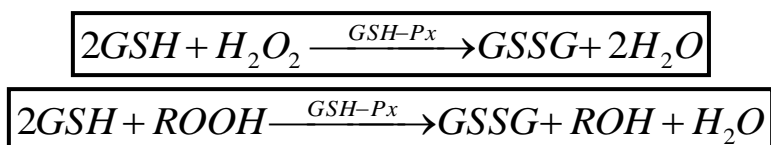
Katalaza (CAT; EC.1.11.1.6) ubrzava razgradnju toksičnog vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika: "katalazna reakcija" (slika 9). Takođe, ovaj enzim koristi (niske koncentracije) H_2O_2 da oksiduje toksične molekule, na primer fenole, formaldehid, ili alkohole: "peroksidazna reakcija". Prisutna je kod svih aerobnih mikroorganizama, u svim ćelijama životinja i biljaka. Veće količine nađene se u citosolu eritrocita i mitohondrijama srčanog tkiva jetre i bubrega, pre svega u peroksisomima. Strukturno, u organizmu čoveka, katalaza je tetramerni enzim koji se sastoji od četiri identične, tetraedarski raspoređene podjedinice (oko 60 kDa): svaka u svom aktivnom

središtu sadrži hem grupu, sa gvožđem u stabilnijem (u poređenju sa molekulom hemoglobina), feri obliku (Fe^{3+}) i molekul NADPH (Goyal & Basak, 2010).



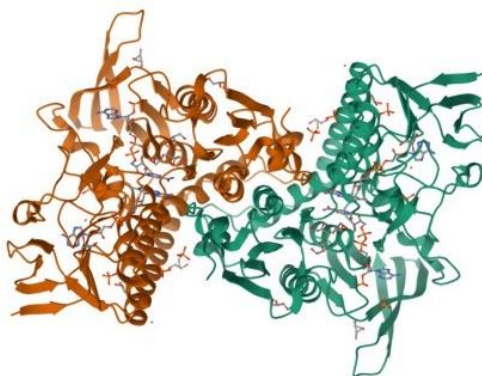
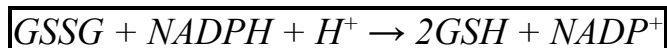
Slika 9. Shematski prikaz 3D strukture humane katalaze (PDB 1QQW).

Glutation-peroksidaza (GPx; EC.1.11.1.9) takođe je važna komponenta primarnog anti-oksidativnog sistema sisara, enzim koji u aktivnom centru sadrži selen (seleno-protein). Ova familija citosolnih enzima katalizuje redukciju vodonik-peroksida do vode (slika 10), u reakciji zavisnoj od glutationa, kao i redukciju organskih peroksida do hidroperoksida. Četiri člana su otkrivena i dobro izučena. Prvi je "klasična" glutation-peroksidaza (GPx1 ili cGPx), unutar ćelija, homoteramer sa jednim atomom Se po subjedinici (76-105 kDa). Glutation-peroksidaza u epitelnim ćelijama gastrointestinalnog trakta (GPx2 ili GI-GP) drugi je tip ovog enzima, prva linija odbrane organizma od vodonik-peroksida unetog hranom. Tetramerni glikoprotein u plazmi (GPx3 ili pGPx) treći je enzim familije sisarskih peroksidaza, molekulske mase 23 kDa, koji poput GPx1 sadrži jedan atom Se u svakoj subjedinici. Poslednji tip je fosfolipid vodonik-peroksid glutation-peroksidaza (GPx4 ili PH-GPx), monomerni protein od 19 kDa, koji osim H_2O_2 redukuje i masne kiseline i perokside esterifikovanog holesterola (Gladyshev, 2011).



Slika 10. Shematski prikaz 3D strukture humane glutation-peroksidaze 1 (PDB 2F8A).

Glutation-reduktaza (GR; EC 1.8.1.7) ubrzava hemijsku reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) uz pomoć NADPH (slika 11). Kao takav, ovaj enzim je odgovoran za snabdevanje ćelija redukovanim tripeptidom glutationom (GSH), najzastupljenijim redukujućim tiolom. Zato glutation-reduktaza ima važnu ulogu u regulaciji, modulaciji i održanju ćelijske redoks homeostaze. Enzim je dimerne strukture (oko 100 kDa kod čoveka), sa po jednim molekulom flavin adenin dinukleotida (FAD) u aktivnom centru svake podjedinice. Nalazi se u citosolu, mitohondrijima, peroksisomima i hloroplastima ćelija. Jedan gen koji kodira za GR evoluciono je konzerviran kod bakterija, kvasaca i životinja, dva kod biljaka (Couto *at al.*, 2016).



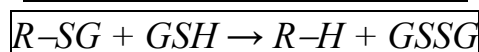
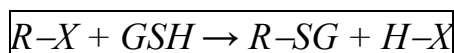
Slika 11. Shematski prikaz 3D strukture humane glutation-reduktaze (PDB 3DJJ).

Glutation-S-transferaza (EC 2.5.1.18) je multi-funkcionalna familija enzima sa tri osnovne uloge u organizmu čoveka: (a) učestvuje u reakcijama konjugacije glutationa (GSH) sa različitim hidrofobnim elektrofilima, tokom druge faze biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata, uključujući ksenobiotike (npr. lekove), što omogućava njihovu detoksifikaciju; (b) reverzibilno vezuje mnoge organske anjone, steroidna jedinjenja i njihove metabolite, razne lekove i drugo, što olakšava njihov transport i raspodelu u telu, tako da predstavlja funkcionalni analog izvanćelijskog albumina; (c) kovalentno se vezuje sa mnoge karcenogene i druge reaktivne metabolite, tj. potencijalno štetne supstance, što predstavlja efikasan, ali i (energetski) skup način njihove eliminacije iz tela. Ovaj enzim je široko rasprostranjen u živim sistemima: u značajnoj koncentraciji se nalazi kod sisara, insekata, vodenih beskičmenjaka, biljaka i nekih bakterija, pre svega u citoplazmi (do 10% svih proteina u hepatocitima), ali i endoplazmatičnom retikulumu i mitohondrijama ćelija. Strukturno, citosolne GST (poznate i kao rastvorljive GST, da bi se razlikovale od za membranu-zakačenih oblika enzima, kao i metalo-GST) deluju kao dimeri (**slika 12**). Svaki monomer je sačinjen od konzerviranog tiorodoksin domena sa mestom za vezivanje glutationa, praćen više varijabilnim α -helikoidnim domenom (C-domen) sa mestom vezivanja supstrata koji podleže reakciji konjugacije (**Atkinson & Babbitt, 2009**).



Slika 12. Shematski prikaz 3D strukture humane glutation-S-transferaze A1-1 u kompleksu sa glutationom (PDB 1PKW).

Dva su tipa proizvoda GST-katalizovane reakcije: konjugacijom redukovano glutationa sa supstratom (RX) nastaje redukovani supstrat (R-SG), koji kao nestabilni međuproizvod reaguje sa novim molekulom glutationa, dajući konačan proizvod (RH) i oksidovani glutation:



Većina izoenzima sisara pokazuje visok afinitet za supstrat 1-hloro-2,4-dinitrobenzen, tako da spektrofotometrijski eseji koriste ovaj supstrat za određivanje ukupne aktivnosti glutation-S-transferaze u tkivima (**Habig *et al.*, 1974**).

2.3. Eritrociti čoveka: "kesice" hemoglobina

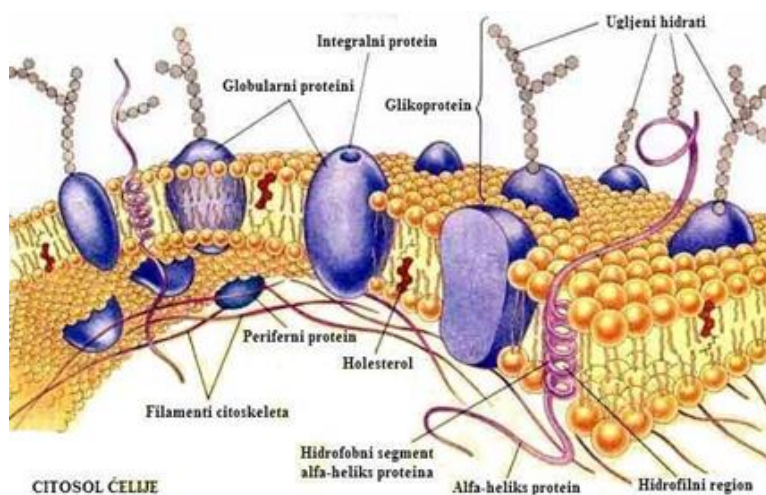
Krv, specijalizovano tečno vezivno tkivo, sastoji se od seruma (plazme) i krvnih elemenata (eritrociti, leukociti i trombociti). Od ukupne zapremine krvi (4,4–6 L kod odraslog čoveka, oko 8% ukupne mase tela), krvni elementi zauzimaju 37–54%, pri čemu dominiraju eritrociti (99,9% svih ćelija krvi). Mililitar krvi sadrži $4,2\text{--}5,5 \times 10^9$ (žene) i $4,5\text{--}6,3 \times 10^9$ (muškarci). Procenjuje se da u telu čoveka cirkuliše od oko 25 bilijardi eritrocita. Zreli eritrociti (crvena krvna zrnca, engl. Red blood cells, RBC) su ćelije bikonkavnog oblika, prečnika 7,8 μm i visine 2,6 μm na najdebljem delu i 0,8 μm u sredini, bez ćelijskih organela (npr. jedra, ribozoma, mitohondrija). Ovakav jedinstveni oblik obezbeđuje veliku površinu u odnosu na zapreminu eritrocita, što ih čini idealnim za razmenu gasova, te omogućuje međusobno "slepljivanje", olakšavajući njihovo kretanje i prolazak i kroz najmanje kapilare (Cimen, 2008).

Proces eritropoeza (sinteza eritrocita) kod odraslih ljudi odvija se u kostnoj srži iz mijeloidnih matičnih ćelija, pod uticajem hormona eritropoetina, koji pre svega (oko 90%) nastaje u bubrezima. Tokom prosečnog životnog veka od oko 120 dana, svaki eritrocit pređe oko 160 km između srca i različitih (ciljnih) tkiva. Humani hemoglobin (HHb), glavna proteinska komponenta (citoplazme) eritrocita, na tom putu prenosi O_2 , CO_2 i H^+ jone kroz krv. Oko 1% eritrocita se zameni novim svakoga dana; mononuklearni fagociti u slezini, jetri i kostnoj srži uklanjaju ostarele eritrocite iz cirkulacije. Smatra se da su signal za aktivaciju ovih makrofaga apoptotske promene u lipidnoj organizaciji plazmine membrane eritrocita (Ashton, 2007).

2.3.1. Membrana eritrocita: model za ispitivanja bioloških membrana

Plazmina membrana eritrocita je dinamična struktura, čije se osnovne strukturne jedinice (lipidi iz lipidnog dvosloja i uronjeni integralni i periferni gliko- i lipoproteini) nalaze u stalnom kretanju. Lizom u hipotonim rastvorima, izolovanu i prečišćenu nefragmentisanu membranu eritrocita čini približno 49% proteina, 43% lipida i 8% ugljenih hidrata (Voet & Voet, 2004).

Lipidni dvosloj je izgrađen iz smeše fosfolipida, sfingolipida, holesterola, glikolipida i fosfatidne kiseline (slika 13). Sastav i fizička svojstva bioloških membrana umnogome određuju aktivnost različitih tipova membranskih proteina. Holesterol je glavna lipidna komponenta plazmine membrane humanih eritrocita (oko 25% ukupnih lipida) i ravnomerno je zastupljen u oba sloja fosfolipidnog dvosloja. Najzastupljeniji fosfolipidi, kao u drugim biomembranama, nejednako su raspoređeni u dvosloju: fosfatidil-holini i sfingomijelini (oko 20% lipida) dominiraju u spoljašnjem, fosfatidil-etanolamin (slično zastupljen) u unutrašnjem delu, a fosfatidil-serin (oko 10%) isključivo se nalazi u unutrašnjem sloju membrane. Molarni odnos holesterola i fosfolipida određuje fluidnost lipidnog dvosloja, sredini u kojoj deluju raznovrsni enzimi, transportni proteini, antigeni krvnih grupa, adhezivni proteini uključeni u interakcije eritrocita sa drugim krvnim i endotelijalnim ćelijama, kao i receptori i drugi signalni molekuli (Mohandas *et al.*, 2008).

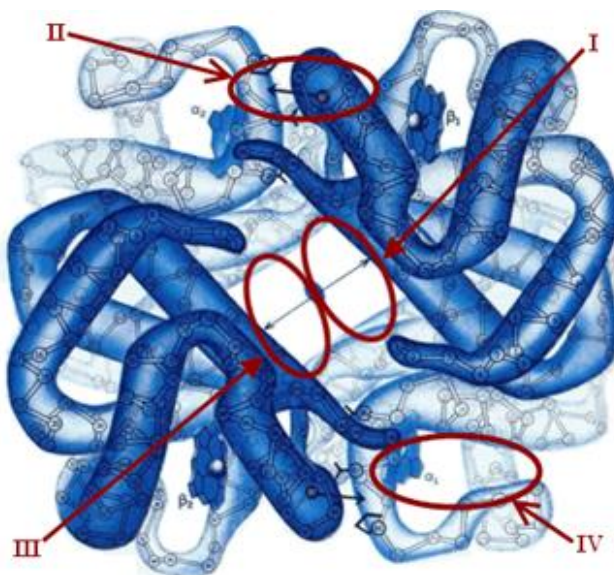


Slika 13. Shematski prikaz fluidno-mozaičnog modela membrane humanih eritrocita (adaptirano iz: Voet & Voet, 2004).

Jedinstvena svojstva strukture plazmine membrane eritrocita su i da je izuzetno elastična (oko 100 puta više od membrane lateksa slične debljine), da brzo odgovara na primenjeni pritisak tečnosti i da je, u smislu otpora, jača od čelika. Ove neobične karakteristike posledica su postojanja elastične proteinske "rešetke", sastavljene od mreže (cito)skeletnih proteina, na koju naleže lipidni dvosloj, ostvarajući mnogobrojne protein-protein i protein-lipid interakcije. Kod drugih ćelija u telu sisara, citoskelet se javlja samo u tankim i retkim trakama, slabo povezanih sa plazminom membranom. Opisana organizacija membrane humanih eritrocita podržava njihovu strukturnu prilagodljivost tokom njihovog puta kroz cirkulaciju, pošto podleže (reverzibilnim) deformacijama uz potpuno održavanje strukturnog integriteta ćelija (**Mohandas et al., 2008**).

2.3.2. Hemoglobin čoveka: opšta struktura i ligand-vezujuća svojstva

Oko 90% svih proteina u citosolu eritrocita čoveka čine molekuli hemoglobina. Hemoglobin je globularni tetramerni protein izgrađen od dva identična α -lanca (141 ostataka amino-kiselina; 7 α -heliksa) i dva identična β -lanca (146 amino-kiselina; 8 α -heliksa) – $\alpha_2\beta_2$ tetramer (**slika 14**). Svaki α -lanac je u kontaktu sa β -lancem, tako da je, u osnovi, molekul hemoglobina funkcionalni $\alpha\beta$ dimer. Svaka subjedinica u molekulu nativnog proteina sadrži jedan hem (sa redoks aktivnim atomom gvožđa) kao prostetičnu grupu, u udubljenju pri spoljašnjoj površini svake podjedinice. Kao obilno zastupljeni protein krvi (12 do 14 g/dL kod muškaraca, 14 do 18 g/L u žena) koga je jednostavno izolovati, hemoglobin je najpre bio model sistem za izučavanje viših nivoa strukture globularnih proteina. S obzirom na biološku ulogu transportnog proteina (osnovna je snabdevanje tela kiseonikom), hemoglobin je nesumljivo koristan i kao model sistem za ispitivanje vezivanja malih regulatornih molekula (različitih liganada) za proteine (**Chakraborti, 2003**).



Slika 14. Shematski prikaz opšte strukture (deoksi) hemoglobina čoveka: $\alpha_2\beta_2$ tetramer (Voet & Voet, 2004). Crvenim su obeležena mesta vezivanja navedenih organskih jedinjenja (na osnovu: Perutz et al., 1986): I – benzafibrat; II - etakrinska kiselina; III - sukcinil-L-triptofan-L-triptofan i IV - *p*-bromobenziloksi sirćetna kiselina.

Mnogi mali reaktivni molekuli (proizvodi normalnog, ali i patološkog metabolizma), kao ksenobiotici i njihovi metaboliti duže prisutni u cirkulaciji, koji prolaze kroz plazminu membranu eritrocita, reaguju sa bočnim ostacima amino-kiselina u molekulu humanog hemoglobina. Normalni hemoglobin (HbA; preko 97% ukupnog HHb), pored genetskih komponenti, sadrži i frakcije nastale ne-enzimskim modifikacijama, uglavnom sa glukozom i njenim metabolitima (HbA₁ frakcija) (**Mayer & Freedman, 1983**). Prva detaljna strukturna ispitivanja vezivanja supstanci različite hemijske prirode za hemoglobin čoveka, primenom rentgenske strukturne analize, od strane nobelovca Maksa Peruca (**Perutz et al., 1986**), uključila su antihiperlipoproteinski lek benzafibrat, diuretik etakrinsku kiselinu, peptid sukcinil-L-triptofan-L-triptofan i *p*-bromobenziloksi sirćetnu kiselinu. Rezultati su pokazali da se ispitani molekuli vezuju u udubljenja u proteinskom delu

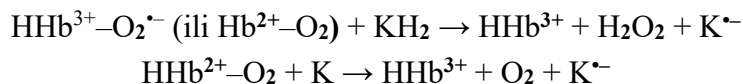
molekula hemoglobina, pri čemu je u stereohemiji interakcija važan van der Waals-ov prostor, maksimalne elektrostatičke interakcije, hidrofobni efekat i (najpre) vodonične veze. Autori su zaključili da neki od navedenih molekula smanjuju, drugi povećavaju afinitet vezivanja kiseonika za hemoglobin. Interesantno, opisana mesta vezivanja ispitivanih supstanci za hemoglobin su različita (**slika 14**); ona nisu podudarna mestu za vezivanje kiseonika (hem), niti mestu vezivanja 2,3-difosfoglicerata (DPG), prirodnog alosternog modulatora aktivnosti hemoglobina. Pregled rezultata novijih studija vezivanja lekova za humani hemoglobin prikazan je u **poglavlju 4**.

Strukturno modifikovani molekuli hemoglobina mogu imati i izmenjenu aktivnost, u smislu promena u afinitetu vezivanja kiseonika, hemijske stabilnosti, kooperativnosti, Borh-ovom efektu, što može biti od značaja ne samo u dijagnostici pojedinih patofizioloških stanja, već i u praćenju efekata terapije lekovima (**Harding, 1985**). Na primer, u reakciji hemoglobina i oksidovanog glutationa (neutralna ili slabo alkalna sredina) nastaje derivat u kojem je glutation vezan za ostatak Cys93 u β -nizovima. Posledica ove modifikacije stukture je (najveće poznato) povećanje afiniteta (za šest puta) hemoglobina za kiseonik, uz očuvanje (uobičajenih) interakcija adukta sa DPG-om i organskim fosfatom (**Craescu et al., 1986**). Vezivanje hidroksilamina i supstituisanih derivata fenola izaziva oksidacijuoksi-hemoglobina (oblik sa vezanim kiseonikom) do molekula met-hemoglobina, sa oksidovanim jonom gvožđa. Ovaj proces je praćen oksidativnim stresom i povećanom hemolizom eritrocita (**Nohl et al., 1988**), no može da se iskoristi i u terapijske svrhe: 4-dimetilaminofenol je antidot kod trovanja cijanidom: nastali methemoglobin velikim afinitetom vezuje i uklanja CN^- jone iz sistemske cirkulacije (**Eyer et al., 1983**).

2.3.3. Oksidativni procesi u eritrocitima čoveka

Zbog svojih strukturno-funkcionalnih svojstava, visokog sadržaja kiseonika, poli-nezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima plazmine membrane, kao i (redoks aktivnog) Fe^{2+} jona u strukturi hema, eritrociti su kontinuirano izloženi oksidativnim promenama svojih ključnih komponenti. Stoga zrela crvena krvna zrnca imaju moćan sistem antioksidativne zaštite, sačinjen od specifičnih antioksidativnih enzima i jedinjenja male molekulске mase. On bi trebalo da uspori ili spreči lančane reakcije oksidativnog oštećenja makromolekula (hemoglobina), inicirane reaktivnim vrstama nastalim od molekulskog kiseonika (**Cimen, 2008**).

Hem u strukturi molekula hemoglobina sadrži gvožđe u redukovanom (Fe^{2+} , fero) obliku, koji povratno vezuje O_2 , svojstvo presudno za biološku funkciju hemoglobina. Međutim, u dodiru sa kiseonikom, Fe^{2+} jon spontano i sporo oksiduje do Fe^{3+} oblika (feri jon), pri čemu nastaju reaktivni superoksidni anjon radikal i molekul met-hemoglobin (MetHb). Pod fiziološkim uslovima, zastupljenost met-hemoglobina održava se niskim (oko 0,5%), (pre svega) delovanjem NADH-citohrom b5-metHb reduktaze i odgovarajućih kofaktora (askorbat i glutation) (**Umbreit, 2007**). U prisustvu ksenobiotika i/ili njihovih metabolita (K/KH_2), u eritrocitima može doći i do redoks reakcija hemoglobina, koje se mogu prikazati sledećim opštim jednačinama:



iz kojih proizilazi da oksidativne procese u eritrocitima karakteriše nastajanje MetHb, superoksidnih anjon radikala i (nekada) radikalskih oblika ksenobiotika (K^-). U sekundarnim reakcijama (sa drugim makromolekulima) mogu da nastanu i veoma reaktivni (i zato izuzetno štetni) peroksidni radikali (**Weller, 1987**).

Iako ima kratak polu-život, superoksidni anjon, nastao kao proizvod oksidacije molekula hemoglobina, može naneti ozbiljna oštećenja svim vrstama biomakromolekula i dovesti do hemolize. Redukovani glutation i tokoferoli, prisutni u velikim količinama, kao i aktivnost enzima Cu,Zn-superoksid-dismutaze, katalaze i GSH-peroksidaze, sinergistički zaštitno deluju uklanjajući nastale reaktivne vrste. Odnos redukovanog i oksidovanog glutationa u eritrocitima je visok, uz pomoć redukcije (oksidovanog) glutationa pomoću NADPH i glutation-reduktaze. Pentozofosfatni put je takođe značajan za antioksidativni sistem zaštite u eritrocitima, pošto stvara potrebne količine NADPH, neophodne za ovaj proces (**Pandey & Rizvi, 2011**).

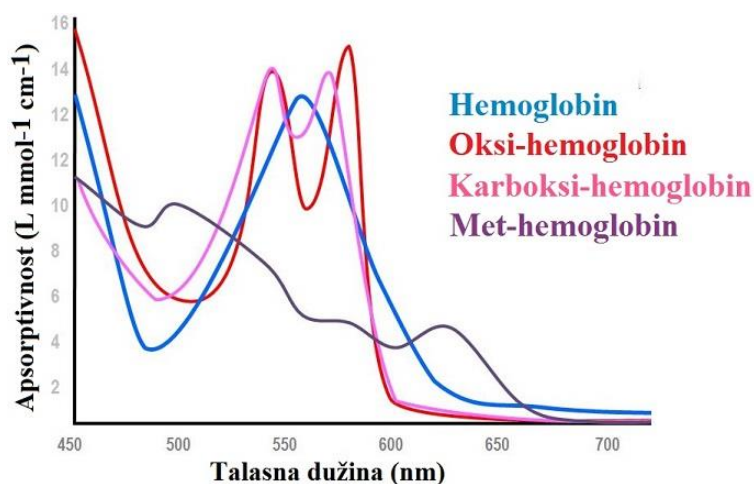
2.4. Metode za ispitivanje interakcija lekova i proteina

Ispitivanje interakcija između proteina i malih bioaktivnih molekula (poput lekova) je od velikog teorijskog i praktičnog značaja. Proteini vezivanjem lekova olakšavaju njihovo prenošenje i raspodelu kroz organizam. Međutim, jake protein–ligand interakcije sprečavaju delovanje leka, ne dozvoljavajući da se on veže za receptorske mete u ciljnim ćelijama. Vezivanje malih molekula za proteine može i da uspori njihovu eliminaciju iz tela. Mnogi lekovi deluju tako što menjaju (smanjuju, ili potpuno inhibiraju) katalitičku aktivnost ključnih metaboličkih enzima. Interakcije sa lekovima mogu da promene i biološke funkcije proteina. Uobičajeni pristup u razumevanju složenih mehanizma delovanja fiziološki aktivnih supstanci zato uključuje i proučavanje interakcija supstance (leka) od interesa sa najzastupljenijim, i/ili najvažnijim, proteinskim komponentama u ćelijama i tkivima, uz ispitivanje posledica vezivanja leka na strukturne i funkcionalne karakteristike biomakromolekula (**Chakraborti, 2003**).

2.4.1. Spektrofotometrija proteina

Spektrofotometrija se zasniva na apsorpciji svetlosti u oblasti elektromagnetnog zračenja od 200 do 780 nm, što dovodi do prelaza valentnih (obično σ ili π) elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Dozvoljeni elektronski prelazi nakon pobuđivanja su iz vezivnih u antivezivne orbitale ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$), pri čemu jedan elektronski prelaz daje jednu apsorpcionu traku (pik) u spektru. Apsorpcioni maksimum trake (λ_{\max}) pre svega zavisi od prirode jedinjenja: različita jedinjenja sadrže u svojoj strukturi različite hromofore, tj. molekul ili deo molekula odgovoran za apsorpciju svetlosti u UV-VIS oblasti (**Schmid, 2001**).

Proteini intenzivno apsorbuju svetlost u UV oblasti. Njihove hromofore su peptidne veze, ostaci aromatičnih amino-kiselina iz bočnih lanaca, kofaktori i prostetične grupe. Peptidne grupe polipeptidne kičme apsorbuju svetlost u dalekoj-UV oblasti (180–230 nm). Aromatični bočni ostaci tirozina (Tyr), triptofana (Trp) i fenilalanina (Phe) takođe apsorbuju u ovom regionu, kao i u oblasti 240–300 nm. Disulfidne veze u proteinu, obrazovane između dva ostatka cisteina, pokazuju apsorpcionu traku sa maksimumom na oko 260 nm. Redukovani nikotinamid-adenin dinukleotid (NADH) i redukovani flavin-adenin dinukleotid (FADH₂) apsorbuju svetlost u bliskoj-UV oblasti, a hem (prostetična grupa u mnogim proteinima) i neki kofaktori (koji u strukturi sadrže bakar) u vidljivom delu spektra. Zbog toga je hemoglobin (hemoprotein) crven (**slika 15**), a plastocijanin (fotosintetski Cu-protein biljaka) plav. U bliskoj UV oblasti, molarni apsorptivitet fenilalanina mnogo je manji od onih tirozina i triptofana. Zbog toga u spektru tipičnog proteina apsorbanacija između 240 i 300 nm dominantno potiče od ostataka Tyr i Trp. Ostaci Phe doprinose finoj strukturi (engl. wiggles) spektra između 250 i 260 nm. Aromatične aminokiseline ne apsorbuju iznad 310 nm, kod (retkih) proteina koji u svom aminokiselinskom sastavu ne sadrže Trp ne apsorbuju svetlost talasnih dužina većih od 300 nm (**Schmid, 2001**).

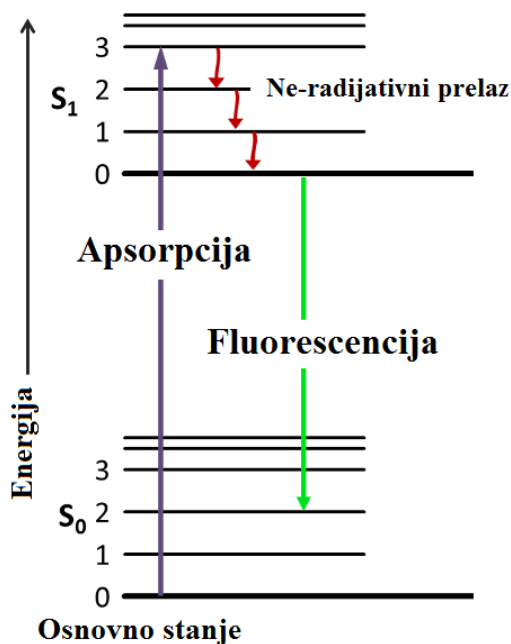


Slika 15. Apsorpcioni spektri različitih derivata humanog hemoglobina
(adaptirano sa <https://derangedphysiology.com/>)

Apsorpcioni spektri aromatičnih aminokiselina su osetljivi na promene u svom okruženju, što za posledicu ima promene u talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma. Plavo pomeranje (engl. blue shift) ka nižim talasnim dužinama opaža se kada raste polarnost rastvarača. U uvijenom (nativnom) proteinu, aromatični ostaci amino-kiselina nalaze se u nepolarnoj unutrašnjosti globule, pokazujući malo crveno (ka većim λ) pomeranje u odnosu na maksimum trake u vodenom rastvoru. Iako su razlike u apsorpciji između native i razvijene forme proteina veoma male (tipično manje od 5%), one su izuzetno korisne za praćenje konformacionih prelaza u proteinu (**Schmid, 2001**).

2.4.2. Spektrofluorimetrija proteina

Molekuli i atomi apsorbuju ultraljubičasto (UV) i vidljivo (VIS) elektromagnetno zračenje, što pobuđuje njihove elektrone. U pobuđenom stanju molekul ostaje veoma kratko i brzo se vraća u osnovno stanje, različitim procesima de-ekscitacije. Ukoliko se takav prelaz odvija između dva singletna (S) stanja emisija svetlosti se naziva fluorescencija (**slika 16**). Talasna dužina emitovane fluorescentne svetlosti obično je veća od talasne dužine apsorbovane (pobuđujuće) svetlosti (Štoksovo pravilo). Izgled fluorescentnih spektara zavisi od hemijske prirode fluorofora i rastvarača. Fluorofore su grupe ili atomi u molekulu odgovorne za proces fluorescencije. Dele se na unutrašnje (ispitivani uzorak fluorescira) i spoljašnje (one koje se dodaju uzorku koji ne fluorescira). Jednostavne i osetljive fluorimetrijske metode od velikog su praktičnog značaja za određivanje i ispitivanje svojstava biološki važnih (makro)molekula. Fluorescentna emisija je znatno osetljivija na okolinu hromofore nego apsorpcija. Zato pri konformacionim prelazima (razvijanje/uvijanje) molekula proteina, kao i prilikom vezivanja liganada, može doći do velikih promena u njegovim fluorescentnim svojstvima, tj. u spektrima proteina (**Valeur, 2001**).



Slika 16. Jablonski dijagram fluorescencije. Nakon što elektron apsorbuje foton visoke energije, najpre se sistem elektronski i vibraciono pobuđuje, a potom vibraciono relaksira i, na kraju, fluorescira na većoj talasnoj dužini (adaptirano sa: <https://theory.labster.com/fluorescence>).

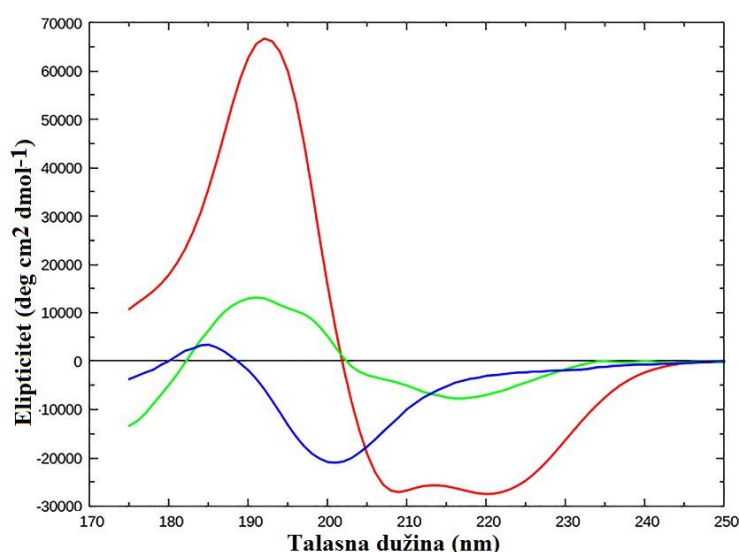
Svi proteini fluoresciraju u UV regionu: fluorofore su ostaci aromatičnih amino-kiselina. Fluorescencija pre svega potiče od ostataka triptofana - talasna dužina ekscitacije i kvantni prinos emisije za ostatke triptofana veći su od vrednosti za tirozin i fenilalanin. Proteini po pravilu sadrže jedan ili nekoliko ostataka Trp, što olakšava interpretaciju eksperimentalnih rezultata. Promene u emisionom spektru Trp posledica su konformacionih prelaza, asocijacije subjednica, vezivanja supstrata, ili denaturacije proteina. Interpretaciju rezultata otežava prisustvo većeg broja fluorofora, zbog čega se snimaju i takozvani sinhroni spektri, kojima se odvaja signal koji potiče od triptofana od signala ostataka tirozina. Proteini se obično ekscituju na talasnoj dužini apsorpcionom maksimuma

na ~280 nm, kada ostaci Phe nisu pobuđeni, tako da fluorescencija potiče samo od ostataka Tyr i Trp. Selektivna ekscitacija Trp postiže se na talasnim dužinama od 295 do 305 nm. U vodenoj sredini emisioni maksimum fenilalanina je na 282 nm, tirozina je na 303 nm, a triptofana na 350 nm. Samo u veoma razblaženim rastvorima postoji linearna zavisnost između intenziteta fluorescencije i koncentracije proteina. U koncentrovanijim rastvorima proteina dolazi do efekta unutrašnjeg filtra, pošto rastvor u "zadnjem" delu uzorka ne dobija isti intenzitet energije pobuđivanja kao onaj u "prednjem" delu koji apsorbuje veći deo ekscitacione energije svetlosti. Ukoliko dolazi do preklapanja u ekscitacionom i emisionom spektru uzorka proteina, on može da apsorbuje deo emisije fluorescencije (**Lakowicz, 2006**).

Zbog svoje osetljivosti i preciznosti, spektrofluorimetrija se mnogo koristi za ispitivanje i karakterisanje (konstante vezivanja i broj vezivnih mesta) protein–ligand interakcija, na osnovu promena u emisionim spektrima proteina tokom/nakon dodatka rastućih koncentracija liganda. 'Kvenčing' (gašenje fluorescencije) opisuje procese koji smanjuju intenzitet fluorescencije proteina. U literaturi se razlikuju dve osnovne vrste kvenčinga, kao rezultat kontakata između fluorofore (npr. proteina) i kvenčera (liganda): dinamičko i statičko gašenje fluorescencije. Dinamičko kvenčovanje je posledica kolizionih susreta/sudara između fluorofore i kvenčera, tj. kvenčer difunduje do fluorofore tokom perioda u kome je ona u ekscitovanom stanju. Kod statičkog gašenja fluorescencije formira se nefluorescentni kompleks fluorofora–kvenčer. Postoji i mogućnost da se intenzitet fluorescencije fluorofore smanjuje istovremeno i po mehanizmu statičkog i po mehanizmu dinamičkog gašenja fluorescencije sa istim kvenčerom (**Valeur, 2001**).

2.4.3. Cirkularni dihiroizam proteina

Hiralnost, važna karakteristika bio(makro)molekula, označava geometrijsku karakteristiku rigidnog objekta koji može da se preklopi sa svojim likom u ogledalu. Takav molekul (objekat) je *asimetričan*. Cirkularni dihiroizam (CD) predstavlja razliku u apsorpciji levo ili desno polarizovane svetlosti i nastaje usled prisustva jedne ili više hiralnih hromofora u molekulu. Spektropolarimetrija jeste spektroskopska tehnika u kojoj se cirkularni dihiroizam molekula predstavlja kao funkcija talasne dužine. Ona se koristi za proučavanje brojnih hiralnih molekula i najveću praktičnu primenu je našla u analizi sekundarnih struktura (**slika 17**) i konformacija biomakromolekula, posebno proteina, čiji je sekundarni nivo strukture osetljiv na promene u temperaturi, pH vrednosti i mikrookruženju, ili se menja kao posledica interakcija sa drugim molekulima. Stoga, CD spektroskopija pruža korisne podatke o strukturnim, kinetičkim i termodinamičkim parametrima koji opisuju vezivanje liganda za protein (**Greenfield, 2006**).



Slika 17. Ilustrativni CD spektri tri sekundarne strukture u proteinu: pretežno α -helikoidni protein (**crvena linija**), protein u kome dominiraju β -nabrane pločice (**zelena linija**) i nasumični (razvijeni) lanac proteina (**plava linija**) (adaptirano iz: **Rogers et al., 2019**).

Snimanje CD spektara služi i da pokaže da li ispitivani molekul (npr. lek) utiče na konformaciju molekula proteina, odnosno, da li dovodi do promena u sekundarnoj (daleka UV-oblast) i terciarnoj (bliska UV/VIS-oblast) strukturi proteina. Da bi neki molekul ispoljio cirkularni dihiroizam, potrebno je da on sadrži hromoforu i optički asimetrično (hiralno) okruženje. Glavne hromofore, slično UV/VIS spektrofotometriji proteina, su peptidne veze (apsorpcija ispod 240 nm), aromatični ostaci amino-kiselina (apsorpcija između 260 i 320 nm) i disulfidne veze (slaba apsorpcija na 260 nm). Kada se snima na talasnim dužinama ispod 250 nm, dobijaju se daleki-UV spektri (engl. far-UV), a pri talasnim dužinama iznad 250 nm bliski-UV/VIS spektri (engl. near-UV). Cirkularni dihiroizam peptidnih veza od značaja je za određivanje sekundarnih struktura proteina, pošto će različite sekundarne strukture imati različiti intenzitet signala, položaj pikova i oblik traka u CD spektrima. Za procenu sekundarnih struktura proteina postoje brojni algoritmi, ali se koriste i matematičke formule (**Kelly et al., 2005**). Praćenjem sadržaja sekundarnih struktura može da se ispita uticaj vezivanja leka od interesa na konformaciju proteina. CD spektroskopija je odlična tehnika i za praćenje konformacionih prelaza (razvijanja i uvijanja) proteina u zavisnosti od temperature, te uticaja vezanog liganda na stabilnost polipeptida/proteina, poređenjem dobijenih temperatura topljenja. Proteini sa visokim udelom α -heliksa (najstabilnija sekundarna struktura) u svojim CD spektrima imaju pikove na oko 222, 209 i 193 nm. Studije termalne denaturacije proteina obično se rade na 222 nm, pošto je tu najmanji odnos signal-šum (**Greenfield, 2006**).

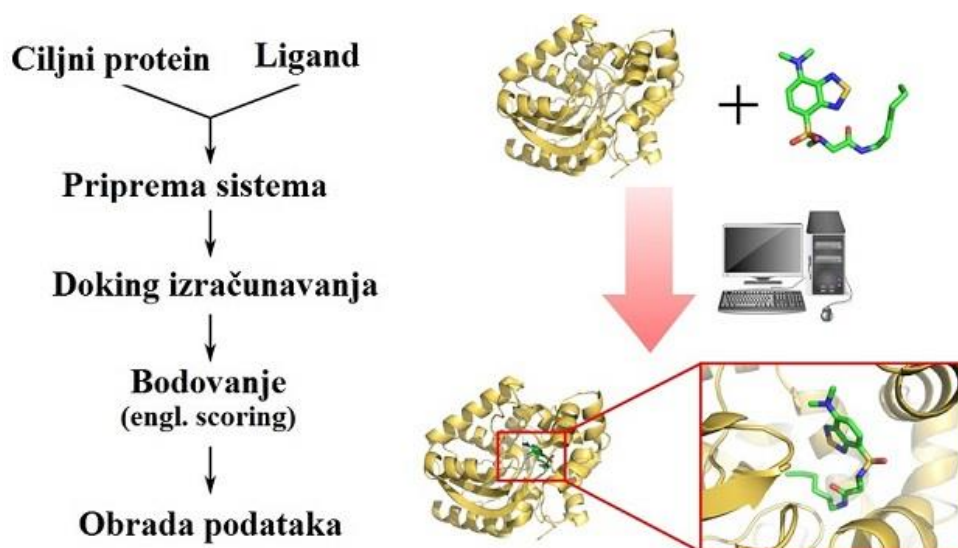
Prema tome, CD signali u spektralnom regionu između 260 i 320 nm (uglavnom) potiču od aromatičnih amino-kiselinskih ostataka: Tyr sa pikom između 275 i 282 nm, Trp na oko 290 nm; Phe ima slab, ali oštar pik između 255 i 270 nm. Oblik i intenzitet signala u bliskom-UV CD spektru proteina zavisi ne samo od broja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka, već i njihove mobilnosti, mikro-okruženja i oblika molekula. Uprkos tome što bliski-UV CD spektri ne pružaju detaljnije informacije o strukturi proteina, kao "otisak prsta" terciarne (3D) strukture proteina mogu da ukažu na promene u njegovoj konformaciji. U tom smislu oni su osetljiviji na promene izazvane vezivanjem liganada od dalekih-UV CD spektara (**Kelly et al., 2005**).

2.3.4. Molekulsko modelovanje: proteinski doking

Molekulski doking je računarska metoda koja se rutinski koristi za otkrivanje novih lekova i (u biohemiji) za predviđanja načina vezivanja i afiniteta malog molekula (liganda) za protein od interesa. Molekulskim dokingom dobijamo informacije o najvažnijim interakcijama između partnerskih molekula, što pomaže u racionalnom dizajnu novih lekova. Cilj ove metode je nalaženje optimalnog prostornog rasporeda (poze) liganda unutar vezivnog mesta na proteinu, uzimajući u obzir fleksibilnost i konformacione promene liganda (tzv. rigidni doking) ili i proteina i liganda (fleksibilni doking) (**Agarwal & Mehrotra, 2016**).

Proces molekuskog dokinga obično uključuje nekoliko koraka (**slika 18**). U prvom, polazne strukture proteina i liganda se pripremaju uklanjanjem molekula vode i dodavanjem nedostajućih atoma ili veza. U slučaju 3D struktura proteina koji su iskristalisani sa nekim ligandom potrebno je ukloniti taj ligand radi oslobađanja interagujućeg (vezivnog) mesta. Konformacija proteina se potom može relaksirati kratkim simulacijama molekulske dinamike, gde se protein smešta u klaster molekula vode, uz dodatak jona Na^+ i Cl^- do neutralizacije šarže proteina i podešavanja jonske sile do fizioloških 0,15 M. Početna konformacija liganda priprema se iz njegove 2D strukture, primenom brzih, semi-empirijskih kvantno-hemijskih proračuna (**Fan et al., 2019**). U sledećoj fazi, primenjuje se algoritam koji pretražuje moguće konformacije i orijentacije liganda unutar vezivnog mesta na proteinu, što se postiže sistematskim uzorkovanjem (engl. sampling) konformacionih stepena slobode proteina i liganda (**Korb et al., 2009**). Najpoznatiji takvi algoritmi su LGA (engl. Lamarckian Genetic Algorithm), koji koristi AutoDock program (korišćen i u ovom radu) (**Trott & Olson, 2010**), zatim GA (engl. Genetic algorithm) koji koristi GOLD program, kao i algoritam sistemske pretrage (engl. systematic search algorithm) koji koristi Glide program za doking. Zatim se primenjuju takozvane scoring (bodujuće) funkcije, sa zadatkom rangiranja predviđenih vezivnih poza prema afinitetu, ili procenjenoj slobodnoj energiji vezivanja (**Torres et al., 2019**). Na kraju se analiziraju najbolje

rangirane doking poze liganda i pronalaze najvažnije vezivne interakcije koje obrazuju protein–ligand komplekse, evt. i predlažu mogući mehanizmi vezivanja.



Slika 18. Shematski prikaz protein–ligand doking procesa

(adaptirano sa: <https://www.profacgen.com/protein-ligand-docking.htm>).

Metode molekuskog dokinga pokazale su se korisnim alatom u otkriću novih lekova. Sa napretkom računarske tehnologije, danas je moguće efikasno pretražiti baze podataka koje sadrže strukture više miliona liganada, u cilju odabira potencijalnih kandidata za dalju eksperimentalnu validaciju. Takođe, nalaženjem ključnih interakcija između proteina i liganda moguća je dalja optimizacija vodećih struktura (engl. lead compounds) radi nalaženja novih kandidata sa poboljšanom efikasnošću i specifičnošću za protein od interesa (Fan *et al.*, 2019).

3. Eksperimentalni deo

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u prostorijama Odeljenja za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" (IBISS), Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, pod rukovodstvom dr Aleksandre Nikolić-Kokić (rezultati delovanja antipsihotika na jetru pacova), kao i Katedre za biohemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod rukovodstvom dr Milana Nikolića (rezultati na eritrocitima čoveka i hemoglobinu), sve u saradnji sa dr Čedom Miljevićem, specijalistom psihijatrije u Institutu za mentalno zdravlje pri Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, koji je i obezbedio sve potrebne lekove/aktivne supstance.

3.1. Polazni materijal

Za potrebe eksperimenata sa jetrom pacova korišćeni su sledeći komercijalni lekovi atipičnih antipsihotika: "Clozapine" (sa 25 mg klozapina u tableti), proizvođača Alvogen (Remedica Ltd., Limasol, Kipar); "Zeldox" (80 mg ziprazidon hidrohlorida po tableti) kompanije Pfizer (Beč, Austrija); "Serdolect" (sa 12 mg aktivne supstance sertindola u svakoj tableti) koji proizvodi farmaceutska kompanija H. Lundbeck A/S (Valbi, Danska).

Kompanija Abcam (Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo) proizvela je sledeća primarna antitela korišćena u imunoblot analizama (**odeljak 3.2.7.**): anti-SOD1 (ab13498), anti-SOD2 (ab13533), anti-CAT (ab16731), anti-GPx (ab22604) i anti-GR (ab16801), kao i sekundarno anti-mišije i anti-zečije IgG H&L antitelo konjugovano za peroksidazu iz rena (redom, ab97046 i ab6721). Kit za Western blot detekciju proizvođača Amersham ECL poručen je od GE Healthcare Life Sciences. Imobilon-FL poliviniliden difluorid (PVDF) membranu proizvela je Millipore kompanija (SAD), dok su β -aktinsko antitelo (AC-15) i druge korišćene hemikalije dobijene od Sigma Chemicals (Sv. Luis, Misuri, SAD).

Humani hemoglobin (liofilizovani prah), klozapin, ziprazidon (kao hidrohlorid hidrat, čistoće $\geq 97\%$) i sertindol (čistoće $\geq 97.5\%$) nabavljeni su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Nemačka) i korišćeni bez daljeg prečišćavanja. Ukoliko nije navedeno drugačije, rastvori HHb-a su pripremljeni u fiziološkom (izotonom) rastvoru puferisanom fosfatom (PBS, engl. phosphate-buffered saline) pH 7,4, a koncentracija ovakvog preparata proteina određena je standardnom Drabkinovom metodom (**odeljak 3.3.3.**). Odmerene mase atipičnih antipsihotika su rastvorene u 99,9% dimetil-sulfoksidu (DMSO), u cilju pripremanja 4 mM štok rastvora lekova. U svim eksperimentima, finalna koncentracija DMSO-a u različitim protein–ligand smešama nije prelazila 0,5% (v/v). Sve druge korišćene supstance za rad sa (komercijalnim ili izolovanim) hemoglobinom i eritrocitima su bile analitičke čistoće, uz upotrebu Milli-Q vode (Millipore, Molsheim, Francuska) za sve eksperimente.

Periferna venska krv (ukupno 30 mL pune krvi) je uzeta od zdravog dobrovoljca, u vajli sa heparinom (500 IU po mL krvi) kao antikoagulantom. Etička dozvola za eksperimente uticaja atipičnih antipsihotika na eritrocite čoveka (*ex vivo* i *in vitro*), dobijena je od Etičke komisije za upotrebu humanog biološkog materijala za istraživanja Hemijskog fakulteta u Beogradu (rešenje broj 1-6/21, od 24. juna 2021. god.).

Uzeta krv je odmah izcentrifugirana na 2500 x g tokom 10 minuta na 4°C (Heraeus, Biofuge Prime R centrifuga; Thermo electron corporation, SAD). Plazma i međusloj (engl. buffy coat) su odbačeni, a staloženi eritrociti isprani 3 puta sa izotonom fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), pod navedenim uslovima. Deo spakovanih eritrocita je izliziran u 20 zapremina 10 mM fosfatnog pufera (pH 7,4) na 4°C (frižider) preko noći, u cilju dobijanja rastvora hemoglobina. Ujutro je pun hemolizat iscentrifugiran 60 minuta na 12000 x g i 4°C (navedena centrifuga) da bi se uklonili zaostali delovi plazmine membrane.

Rastvor u supernatantu (neprečišćeni rastvor hemoglobina) je sakupljen i njegovi alikvoti su podvrgnuti gel-filtraciji na Sephadex® G-100 (medium; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) koloni (dimenzije: 45×1,0 cm), pre-ekvilibriranoj i eluiranoj istim 10 mM fosfatnim puferom. Koncentracija dobijenog rastvora oksidovanog hemoglobina (iz sakupljenih frakcija sa $V_e/V_o \sim 2$) određena je iz apsorbancije

Soretove trake hemoglobina (koja potiče od molekula hema) na 415 nm ($\epsilon = 125,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tentori & Salvati, 1981). Čistoća izolovanih preparata HHb ($\geq 95\%$) proverena je pomoću standardne SDS-PAGE (15% gel za razdvajanje), nakon standardnog bojenja gelova sa Coomassie blue bojom (protokol i dobijeni rezultati nisu prikazani).

3.2. Eksperimenti sa jetrom pacova i antipsihoticima

Tretman eksperimentalnih životinja urađen je u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste za eksperimentalne i druge naučne svrhe. Eksperimentalni protokoli u vezi ispitivanja efekata tretmana tkiva/ćelija jetre sa atipičnim antipsihoticima (klozapin, sertindol i ziprazidon) odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu (Odluka broj 3-10/13 i Mišljenje broj 01-937, od 16. juna 2021. god.) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (Rešenje broj 323-07-12531/2021-05, od 07.12.2021. god.).

3.2.1. *In vivo* procedure

Ukupno 32 odrasla mužjaka Wistar albino pacova (starosti tri meseca i početne mase od 300–350 g) nasumično su podeljeni u četiri eksperimentalne grupe, u zavisnosti od leka koji su dobijali. Prema tome, u svakoj grupi (klozapinska, sertindolska, ziprazidonska i kontrolna) bilo je po osam životinja. Pacovi su bili smešteni u kaveze odgovarajuće veličine, pri čemu broj životinja po kavezu nije premašivao tri. Životinje su konzumirale standardnu hranu (laboratorijska hrana za glodare, proizvođač Veterinarski zavod u Subotici, Srbija) i vodu *ab libitum*. Sredinski uslovi pod kojima su pacovi držani tokom tretmana takođe se mogu svrstati u standardne: temperatura 22°C, normalni atmosferski pritisak i dvanaesto-časovni dnevno/noćni ciklus.

Suspenzije ispitivanih lekova (tablete sprasene u avanu sa tučkom) pravljene su sa pijaćom vodom svakog jutra i odmah nakon toga su davane životinjama. Korišćena je želudačna sonda, kako bi se osiguralo da celokupna doza leka bude uspešno aplicirana. Doze antipsihotika davane pacovima izračunate su pomoću formule za prevođenje doza kojima se tretiraju ljudi u one koje odgovaraju životinjama (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Kontrolnoj grupi pacova svakog dana je davana (umesto suspenzije leka) pijaća voda, takođe putem želudačne sonde. Životinje su tretirane na sledeći način: i) klozapinska grupa je primala 45 mg leka po kg telesne mase svakoga dana; ii) sertindolskoj grupi 2,5 mg leka po kg mase dnevno, a ziprazidonskoj grupi davano je 20 mg leka na kg mase dnevno. Opisani tretman pacova lekovima je trajao četiri nedelje, odnosno 28 dana.

3.2.2. Pripremanje tkiva i homogenata jetre

Nakon celonoćnog gladovanja, nakon 28 dana tretmana lekovima (prethodni odeljak), pacovi su žrtvovani brzom dekapitacijom. Jetra je odmah uzeta (u celosti) i perfundovana hladnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl; w/v). Isečak levog srednjeg režnja perfundovane jetre je fiksiran u 4% rastvoru paraformaldehida u fiziološkom rastvoru puferisanom fosfatom (PBS pufer), pH vrednosti 7,4, tokom 24 sata, a potom dehidriran pomoću rastućih koncentracija etanola i ksilena. Ovako pripremljeno tkivo jetre je korišćeno za histopatološka istraživanja, a preostalo tkivo je zaleđeno u tečnom azotu i čuvano na -70°C do upotrebe.

Nakon fiksiranja u Histowax parafinu (Histolaboduct AB, Geteburg, Švedska), uzorci tkiva jetre za histološke analize su isečeni na delove debljine 5 μm na rotacionom mikrotomu (RM2125 RT Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

Uzorci delimično odmrznutog tkiva jetre, zarad pripreme ekstrakata celokupnog tkiva, su homogenizovani na ledu u puferu (pH vrednost 7,4) sastava: 50 mM Tris-HCl, 0,25 M saharoza, 1 mM EDTA. Za homogenizaciju je upotrebljen homogenizator Ultra Ture (Janke Kinkel), sa odnosom odmerenog tkiva i pufera 1:10 (w/v) (Krummer *et al.*, 2002) i sonifikacijom hemolizata na ledu, u tri intervala od po 10 sekundi na 10 MHz (Sonopuls, Bandelin, Berlin, Nemačka). Potom je dobijeni (sirovi) homogenat podvrgnut jednočasovnom centrifugiranju na 4°C i 105,000 x g (Beckman L7-55 ultracentrifuga). Talozi su odbačeni, a supernatanti (ekstrakti citosola hepatocita; u daljem tekstu homogenati) su čuvani na -20°C do izvođenja enzimskih eseja (odeljak 3.2.5).

3.2.3. Svetlosna mikroskopija tkiva jetre

Za potrebe svetlosne mikroskopije, sekcije tkiva jetre su deparafisane u ksilolu, dehidratirane koristeći opadajuće koncentracije alkohola, a potom obojene PAS (engl. Periodic Acid Schiff) reagensom (<https://laboratorytests.org/periodic-acid-schiff-pas-stain/>). Sve digitalne slike sekcija jetre (ne) tretirane lekovima dobijene pod svetlosnim mikroskopom su generisane na DM RB fotomikroskopu (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) sa DFC 320 CCD tipom kamere (Leica) za prikupljanje i analizu slika.

3.2.4. Određivanje proteina u homogenatima jetre

Ukupni sadržaj proteina u tkivnom homogenatu određen je standardnom metodom po Lowryju (**Lowry, 1951**), koristeći goveđi serum albumin (BSA) kao standard. Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri (Cu^{2+}) jona i peptidnih veza u proteinima u alkalnoj sredini, kao i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovskog reagensa (tzv. Folin-Ciocalteu-ov reagens) sa aromatičnim ostacima tirozina i triptofana iz uzorka. Nastaje plavo obojeni kompleks, sa intenzitetom boje proporcionalnim koncentraciji ukupnih proteina u uzorku i maksimum apsorpcije koji se spektrofotometrijski očitava na 500 nm.

Potrebni rastvori: (1) 0,1 M NaOH; (2) 2% Na_2CO_3 i 0,1 M NaOH; (3) 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; (4) 2% K,Na-tartarat; (5) Biuretski reagens (pravi se neposredno pre upotrebe): 1 mL rastvora (3), 1 mL rastvora (4) i 98 mL rastvora (2); (6) komercijalni Folin-Ciocalteu-ov reagens, razblažen u odnosu 1:2 (v/v) sa destilovanom vodom.

Postupak: U epruvete je otpipetirano po 20 μL uzoraka za analizu, 3 mL reagensa 5 i 200 μL rastvora 1. Nakon mešanja, u ovu smešu je nakon 15 minuta dodato 600 μL reagensa 6, sadržaj je dobro izmućkan i ostavljen 35 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija uzoraka je izmerena na 500 nm (Shimadzu UV-160 spektrofotometar, Japan). Kao slepa proba korišćena je ista mešavina rastvora/reagenasa, u koju je umesto uzorka dodato 20 μL destilovane vode. Koncentracija proteina u homegenatima jetre je izračunavana iz BSA-standardne prave (nije prikazana), uzimajući u obzir i razblaženja analiziranih uzoraka.

3.2.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre

Aktivnosti antioksidativnih enzima SOD1 (CuZn-SOD), SOD2 (Mn-SOD), CAT, GPx, GR i GST su određene spektrofotometrijski (CECIL CE 2021 UV/VIS spektrofotometar; BMG Labtech GmbH, Ofenburg, Nemačka) u homogenatima dobijenim na način opisan u **odeljku 3.2.2**. U svakom uzorku analiziranog tkiva, enzimski antioksidativni profil je urađen u triplikatu. Aktivnost svih analiziranih enzima izražena je kao specifična aktivnost, tj. kao internacionalne jedinice aktivnosti (IU) po mg (ukupnih) proteina. U okviru ovog odeljka ukratko su prikazani eksperimentalni principi korišćenih metoda i protokola.

3.2.5.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza

Ukupna SOD aktivnost (zbir SOD1 i SOD2 aktivnosti) u homogenatima (ekstraktima) jetre pacova je određena adrenalinskom metodom (**Misra & Fridovich, 1972**). Kao metoda "negativnog" tipa, ona prati smanjenje brzine auto-oksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, u zavisnosti od količine prisutnog superoksida (supstrat enzima). Naime, superoksid-dismutaze u uzorku neutrališu jone superoksida, inhibirajući reakciju auto-oksidacije adrenalina do adrenohroma. Spektrofotometrijski je praćena brzina auto-oksidacije adrenalina (na 26–30°C), iz nagiba linearnog dela krive porasta apsorbcije na 480 nm, koja potiče od akumulacije adrenohroma. Mera katalitičke aktivnosti SOD se izražava kao procenat inhibicije oksidacije adrenalina: brzina ovog procesa u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a u prisustvu enzima kao ispitivana vrednost uzorka.

Potrebni rastvori: (1) 0,3 mM arenalin u 0,1 M HCl (rastvor se priprema neposredno pred upotrebu); (2) karbonatni pufer: 50 mM Na_2CO_3 i 0,1 mM EDTA, pH 10,2.

Postupak: Reakciona smeša (u kivetu za spektrofotometriju) je pripremljena sa 3 mL pufera i rastvora adrenalina u zapremini (μL) koja menja apsorbciju (tokom linearnog dela krive auto-

oksidacije adrenalina) za 0,020–0,022 u minuti. Potom je u kivetu otpipetirano uzorka toliko da smanjenje apsorbancije (linearnog dela) krive auto-oksidacije adrenalina bude 30–40%. Auto-oksidacija adrenalina praćena je 4 minuta na talasnoj dužini od 480 nm. Uporedo je urađena i kontrolna reakcija, pošto se za izračunavanje aktivnosti SOD koristi % inhibicije auto-oksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka u odnosu na kontrolnu reakciju (auto-oksidacije adrenalina).

Ukupna specifična aktivnost superoksid-dismutaza u uzorcima jetre (IU/mg proteina) izračunata je iz jednačine:

$$\text{Aktivnost SOD (IU/mg)} = \frac{2 (\Delta K - \Delta A) \times R}{V_{uz} \times C_p \times \Delta K} \quad (\text{jednačina 1})$$

u kojoj je: ΔK promena apsorbancije (na 480 nm) kontrolne reakcije (u minuti), ΔA je promena apsorbancije reakcije sa analiziranim homogenatom (u minuti), V_{uz} je zapremina uzorka (u mL) dodata u reakcionu smešu, C_p je koncentracija proteina u uzorku (prema Lowry-ju), a R faktor razblaženja. Jedna jedinica aktivnosti enzima (IU) definisana je kao količina enzima potrebna da smanji auto-oksidaciju molekula adrenalina za 50% na pH 10,2.

Aktivnost SOD2 (Mn-SOD) je određena na gore opisani način, uz prethodnu blokadu (inhibiciju) aktivnosti Cu,Zn-SOD (SOD1) u analiziranim uzorcima. Blokada je urađena preinkubiranjem alikvota homogenata sa 8 mM KCN u zapreminskom odnosu 1:1, 30 minuta pre početka određivanja aktivnosti enzima. Za ova merenja je potrebna veća količina (zapremina) uzoraka, pošto je zastupljenost aktivnosti Mn-SOD svega 5–10% od ukupne superoksid-dizmutazne aktivnosti u ćelijama jetre.

Aktivnost SOD1 (Cu,Zn-SOD) je sračunata iz razlike između aktivnosti ukupne SOD i aktivnosti SOD2 u analiziranim uzorcima hemogenata jetre pacova (ne)retiranih ispitivanim atipičnim antipsihoticima.

3.2.5.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Katalazna aktivnost hemogenata jetre određena je po standardnoj metodi (**Claiborne, 1985**). Princip metode je jednostavan: spektrofotometrijski se prati razlaganje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze, na talasnoj dužini (240 nm) na kojoj peroksid intenzivno apsorbuje svetlost. Količina katalaze koja redukuje jedan μM vodonik-peroksida u minuti definiše jednu IU njene aktivnosti.

Potrebni rastvori: (1) 50 mM kalijum-fosfatni pufer (K_2HPO_4 i KH_2PO_4), pH 7.0; (2) 30% H_2O_2 : ovaj (koncentrovani) rasvor se razblaži u fosfatnom puferu tako da apsorbancija na 240 nm iznosi 0,525–0,550.

Postupak: "Nulovanje" spektrofotometra izvedeno je pomoću pufera bez H_2O_2 . Uzorci za analizu su promućkani, a potom je 20–50 μL uzorka dodato u kvarcnu kivetu sa 2 mL pufera. Kivete su promućkane po dodatku pufera i potom je praćen pad absorbancije ovog rastvora (na svakih 30 sekundi mereno je A_{240}) u trajanju od 3 minuta (ukupno 9 merenja). Količina uzorka se podešava da srednja vrednost promene absorbancije (u minuti) bude u opsegu 0,030–0,060.

Specifična aktivnost CAT (IU po mg proteina) uzoraka dobijena je prema formuli:

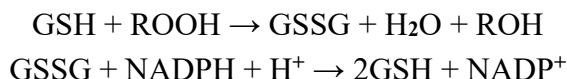
$$\text{Aktivnost CAT} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs} \times R}{43.6 \times C_p \times V_{uz}} \quad (2)$$

u kojoj ΔA_{uz} označava srednju promenu apsorbancije uzorka u minuti, ΔA_{sp} srednju promenu apsorbancije slepe probe (kontrolne) u minuti, V_{rs} zapreminu reakcione smeše (mL), R je faktor razblaženja uzorka, C_p je koncentracija proteina u uzorku (mg/mL), V_{uz} je zapremina uzorka (mL), a 43,6 odgovara vrednosti za molarni ekstikcioni koeficijent H_2O_2 na 240 nm ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Jedna jedinica aktivnosti enzima katalaze odgovara količini enzima koja razloži 1 mmol H_2O_2 na 25°C i pH 7,0.

3.2.5.3. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze

Pre određivanja aktivnosti GPx u dobijenim homegenatima jetre (**odjeljak 3.2.2.**), u po 0,5 mL uzoraka dodato je 0,25 mL 10% sulfosalicilne kiseline, smeše su dobro izmešane i potom izcentrifugovane 10 minuta, na 5000 rpm i 4°C (MiniSpin® centrifuga, Eppendorf). Talog je odbacivan, a u supernatantima je određena aktivnost enzima prema modifikovanoj metodi **Paglia & Valentine (1967)**. Princip metode se zasniva na svojstvu glutathion-peroksidaze da ubrzava oksidaciju redukovanog glutathiona (GSH) u oksidovani oblik (GSSG), uz redukciju molekula hidroperoksida. Oksidovani glutathion se potom redukuje do GSH (NADPH je donor elektrona) u reakciji koju katalizuje glutathion-reduktaza (GR):



Aktivnost GPx se u ovom sistemu prati posredno, preko određivanja potrošnje NADPH, odnosno, oksidacije NADPH uz pomoć GR na talasnoj dužini od 340 nm.

Potrebni rastvori: (1) 0,5 M kalijum-fosfatni pufer, pH 7,0; (2) 1% NADPH; (3) 0,2 mM NaHCO₃; (4) 1 mM GSH; (5) 30 mM t-butilhidroperoksid; (6) glutathion-reduktaza: 105 U/mg proteina; (7) 1 mM EDTA i (8) 1 mM NaN₃.

Postupak: U kvarcnu kivetu se, redom, otpipetira 1,5 mL destilovane vode, 300 µL rastvora 4, 600 µL rastvora 2, 100 µL rastvora 8, 100 µL rastvora 7, 300 µL pufera, 100 µL uzorka, 100 µL rastvora 5 i 5 µL enzima (rastvor GR). Reakcija započinje po dodatku GR. Kiveta (zatvorena parafilmom) je potom izmešana (okretanjem nekoliko puta gore-dole), nakon čega je izmerena apsorpcija smeše na 340 nm. Temperatura merenja bila je 37°C, a merenje je urađeno 5 puta, na svakih 30 sekundi. Za slepu probu koriste se isti rastvori, bez dodatka uzorka, dakle, dodaje se 1,6 mL destilovane vode.

Za određivanje specifične aktivnosti GPx u uzorcima jetre korišćena je relacija:

$$\text{Aktivnost GPx} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times 3000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_p} \quad (3)$$

u kojoj ΔA_{uz} označava promenu apsorpcije na 340 nm uzorka u minuti, ΔA_{sp} je promena apsorpcije slepe probe po minuti, V_{uz} je zapremina uzorka jetre (mL), C_p je ukupna koncentracija proteina po Lowry-ju (**odjeljak 3.2.4.**), a 6,22 odgovara milimolarnom ekstinkcionom koeficijentu za NADPH.

Jedinica aktivnosti (IU) glutathion-peroksidaze definiše se kao količina enzima potrebna da za jedan minut oksiduje 1 µmol NADPH, na sobnoj temperaturi (25°C) i pH 7,0.

3.2.5.4. Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze

Za određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze u homogenatima jetre iskorišćena je uobičajena metoda (**Glatzle et al., 1974**). Ovaj enzim ubrzava oksidaciju molekula NADPH uz redukciju oksidovanog glutathiona ($\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{GSSH} \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$): brzina oksidacije molekula NADPH služi za praćenje i merenje aktivnosti GR-a, prateći promenu (smanjenje) maksimuma apsorpcije NADPH na 340 nm.

Potrebni rastvori: (1) 0,5 M kalijum-fosfatni pufer, pH 7,4; (2) 0,5 M EDTA; (3) 2 mM GSSG; (4) 0,1 mM NADPH.

Postupak: U kvarcnu kivetu otpipetirano je, redom, 600 µL navedenog pufera, 100 µL rastvora 3, 100 µL rastvora 2, 2 mL destilovane vode, 100 µL uzorka, kao i 100 µL rastvora 4; dodatkom NADPH započinje hemijska reakcija. Za slepu probu (kontrola) korišćena je identična smeša, bez dodatka uzorka već identične zapremine vode. Spektrofotometrijski je potom praćena apsorpcija uzoraka na 340 nm prema slepoj probi, na temperaturi od 37°C, pet puta na svakih pola minuta.

Aktivnost glutathion-reduktaze je (na osnovu dobijenih podataka) izračunata prema:

$$\text{Aktivnost GR} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta K) \times 3000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_p} \quad (4)$$

gde ΔA_{uz} označava promenu apsorpcije uzorka u minuti, ΔK promenu apsorpcije slepe probe (kontrolnog uzorka) u minuti, V_{uz} odgovara zapremini uzorka (mL), C_p je koncentracija (ukupnih) proteina u uzorcima jetre, određena metodom po Lowry-ju (**odeljak 3.2.4.**), a 6,22 je vrednost (milimolarnog) ekstinkcionog koeficijenta NADPH.

Količina enzima neophodna da izoksiduje 1 μmol NADPH (na 25°C i pH 7,0) definiše se kao internacionalna jedinica aktivnosti glutation-reduktaze.

3.2.5.5. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze

Za merenje ukupne aktivnosti GST, 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) je korišćen kao supstrat enzima (**Habig et al., 1974**). Princip metode zasniva se na sledećoj reakciji koju katalizuje glutation-S-transferaza:



čiji proizvod, GS-DNB, ima maksimum apsorpcije na 340 nm. Zato se merenje promene apsorpcije na ovoj talasnoj dužini koristi za određivanje aktivnosti enzima.

Potrebni rastvori: (1) 0,5 M kalijum-fostatni pufer, pH 6,5; (2) 25 mM CNDNB u 95% etanolu; (3) 20 mM GSH.

Postupak: U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu redom je otpipetirano 1,5 mL destilovane vode, 0,6 mL pufera, 0,1 mL rastvora 2 i 0,3 mL rastvora 3. Reakcija je započeta dodatkom uzorka (50–100 μL homogenata jetre) i odvijala se na 37°C. Kontrola je umesto uzorka sadržala istu zapreminu destilovane vode. Promena apsorpcije je praćena 180 s.

Specifična aktivnost glutation-S-transferaze je izračunata iz formule:

$$\text{Aktivnost GST} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right) = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta K) \times R}{9,6 \times V_{\text{uz}} \times C_p} \quad (5)$$

u kojoj A_{uz} označava promenu apsorpcije u minuti uzorka (na 340 nm), ΔK promenu apsorpcije kontrolnog uzorka u minuti, V_{uz} zapreminu uzorka (mL), C_p koncentraciju ukupnih proteina u uzorku, određenu Lowry-jevom metodom (**odeljak 3.2.4.**), R je faktor razblaženja uzorka, a 9,6 milimolarni ekstinkcioni koeficijent CNDNB-konjugata.

Jedna jedinica enzimske aktivnosti GST definiše se kao količina enzima neophodna za konjugaciju 1 μmol CNDNB sa glutationom (GSH) u minuti na 25°C.

3.2.6. Denaturišuća elektroforeza proteina iz homogenata

Na osnovu razlika u molekulskim masama, razdvojeni su proteini ukupnih ćelijskih ekstrakata jetre denaturišućom elektroforezom (**Laemmli, 1970**) na 12% poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Na gel za razdvajanje proteina (7,5% akrilamid i 0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl pufer, pH 8,8) nadslojen je gel za koncentrovanje proteina (3% akrilamid i 0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris-HCl pufer, pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodatkom 0,05% amonijum-persulfata i 0,033% TEMED-a (tetrametiletildiamin). Rezervoar pufera za elektroforezu bio je ispunjen 0,192 M glicinom, 0,1% SDS-om i 0,025 M Tris-HCl puferom, pH 8,3.

Uzorci za elektroforetsko razdvajanje proteina uzoraka jetre pacova su pripremljeni dodatkom redukujućeg (dva puta koncentrovanog) Laemmli-jevog pufera za uzorke (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, sa 20% glicerola, 4% SDS-a i 10% β -merkaptotetanolu) u ukupne ćelijske ekstrakte, u jednakom odnosu zapremina. Nakon kuvanja uzoraka (5 minuta na 100°C) i dodatka bromfenolplave boje (marker za praćenje toka elektroforeze), svaki uzorak (20 μL) je nanošen mikrošpicem u bunarčić u gelu. Elektroforeza je urađena (u proseku 90 minuta) na 4°C u aparatu MiniProtean II Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija, USA), pri konstantnom naponu od 120 V.

3.2.7. Imunoblot i detekcija antioksidativnih enzima iz homogenata

Nakon završene elektroforeze gelovi su inkubirani 30 minuta (sobna temperatura) u puferu za transfer (0,192 M glicin, 20% metanol i 0,025 M Tris·HCl puferu, pH 8,3). PVDF membrane su pre korišćenja tretirane metanolom u cilju pasivizacije, a zatim pre-inkubirane u puferu za transfer. Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) aparatura je upotrebljena za prenos razdvojenih proteina iz gela na blot-membranu. Prenos proteina je urađen preko noći, pri konstantnoj struji (135 mA) po gelu. Efikasnost ovog procesa testirana je bojenjem membrane sa 1% rastvorom Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini. Nakon odbojavanja destilovanom vodom, slobodna mesta na membrani su blokirana, inkubiranjem membrane (tokom 90 minuta) na sobnoj temperaturi u PBS puferu sa odmašćenim mlekom (sa 1% mlečne masti). Membrane su potom inkubirane odgovarajućim primarnim antitelom (**odeljak 3.1.**) preko noći na 4°C uz mešanje, a zatim isprane 4 puta (po 5 minuta) PBS puferom (1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl i 0,14 M NaCl, pH 7,2) sa 0,1% Tween 20 nejonskog detergenta. Konačno, membrane su inkubirane sa (odgovarajućim) sekundarnim antitelom (**odeljak 3.1.**), konjugovanim sa peroksidazom iz rena (1:20000; mol/mol), u trajanju od 1 sat (sobna temperatura).

Imuno-pozitivne trake (ciljnih) proteina na blot-membranama vizuelizovane su inkubiranjem sa hemiluminiscentnim supstratom za peroksidazu iz rena, a potom skenirane na skeneru iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, SAD). Pre izvođenja enzimske reakcije membrane su isprane PBS puferom sa 0,1% Tween 20, a zatim čistim PBS puferom. Kvantitativna analiza relativnih integrisanih optičkih gustina imuno-pozitivnih traka urađena je uz pomoć ImageJ softvera (<https://sr.vessoft.com/software/windows/download/imagej>). Nakon detekcije svakog od proteina, vezana antitela su uklonjena sa 0,2 M NaOH, membrane ponovo blokirane i dalje inkubirane narednim antitelom. Za poređenje gelova, jedna nasumično odabrana kontrola je korišćena kao interni standard (**Ristić *at al.*, 2015**). Dalje, β-aktin je korišćen za svaki uzorak kao kontrola jednakog nanošenja uzoraka na gel i normalizaciju intenziteta svake analizirane imuno-specifične trake.

3.3. Eksperimenti sa humanim hemoglobinom i antipsihoticima

Za ispitivanje i karakterisanje vezivanja atipičnih antipsihotika klozapina, sertindola i ziprazidona za molekul humanog hemoglobina iskorišćene su standardne spektroskopske metode (spektrofotometrija, fluorimetrija, cirkularni dihiroizam) u kombinaciji sa *in-silico* metodom molekuskog dokinga.

3.3.1. Fluorescentna merenja hemoglobina i antipsihotika

Merenja fluorescencije humanog hemoglobina urađena su na FluoroMax[®]-4 spektrofluorimetru (HORIBA Scientific, Japan), pod termostatiranim uslovima (Peltijeova ćelija), u standardnoj kvarcnoj kiveti (4 mL, 1,0 cm optički put), sa širinom ekscitacionog (EX) i emisionog (EM) proreza podešenog na 3 ili 5 nm. Vrednosti fluorescencije za odgovarajuće slepe probe (različite koncentracije ispitanih lekova u PBS puferu) oduzete su od vrednosti za hemoglobin da se koriguje pozadinska fluorescencija.

Vezivanje antipsihotika za HHb ispitano je metodom titracije sa gašenjem fluorescencije (fluorescentni "kvenčing"), mereći promene u unutrašnjem fluorescentnom signalu hemoglobina, pri konstantnoj koncentraciji komercijalnog proteina (4 μM, 3 mL) i različitim rastućim (finalnim) koncentracijama svakog leka (od 0 do 28 μM). Po pravilu, dodavani su alikvoti od 5 μL štok rastvora odgovarajućeg leka. Fluorescentni spektri rastvora hemoglobina i protein–lek kompleksa u tzv. stabilnom stanju (engl. steady-state fluorescence spectra) snimljeni su na tri različite temperature: 25°C (298,15 K), 30°C (303,15 K) i 37°C (310,15 K). Talasna dužina ekscitacije postavljena je na 280 nm, a emisioni spektri proteina (srednje vrednosti dva pojedinačna snimanja) su zabeleženi u opsegu 290 do 450 nm.

Sinhroni fluorescentni spektri HHb i HHb-antipsihotici kompleksa (pod identičnim, gore navedenim uslovima) snimljeni su u dva različita skenirajuća intervala: Δλ od 15 nm (pobuđivanje

ostataka tirozina u proteinu) i $\Delta\lambda$ od 60 nm (pobuđivanje ostataka triptofana), pri čemu je $\Delta\lambda = \Delta\lambda_{EM} - \Delta\lambda_{EX}$ (Miller, 1979).

Termalna stabilnost 4 μ M (3 mL) komercijalnog humanog hemoglobina ispitana je sa i bez prisustva 40 μ M svakog antipsihotika (finalna koncentracija u kivetu), u temperaturnom rasponu od 30 do 85°C. Povećanje temperature podešeno je na 2°C u minuti, sa vremenom uspostavljanja ravnoteže od 1 minut. Emisioni spektri proteina snimljeni su u opsegu od 315 do 365 nm, uz talasnu dužinu ekscitacije podešenu na 280 nm. Kriva topljenja (grafički) je predstavljena kao promena odnosa (fluorescencija) F_{350}/F_{330} u zavisnosti od temperature, gdje je F intenzitet emisije na odgovarajućoj talasnoj dužini, a potom je fitovana u sigmoidalnu funkciju, gde tačka infleksije (engl. inflection point) predstavlja tačku topljenja proteina (T_m vrednost) (Gligorijević *et al.*, 2021).

Stabilnost humanog hemoglobina prema oksidaciji istražena je ispitivanjem uticaja jakog oksidansa 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorida (AAPH) (finalna koncentracija 5 mM) na unutrašnju fluorescenciju izolovanog i prečišćenog hemoglobina (4 μ M; 3 mL) sa i bez dodatka fiksne koncentracije lekova (finalna koncentracija 40 μ M). Promena fluorescencije je praćena 30 minuta na emisionom piknu HHb od 344 nm, nakon ekscitacije proteina na 280 nm. Zaštitni učinak (PE, engl. protection efficiency) svakog antipsihotika na smanjenje fluorescencije proteina izazvano oksidansom, izražen u proizvoljnim jedinicama (AU, engl. arbitrary units), izračunat je na osnovu jednačine (Minić *et al.*, 2018):

$$PE (AU) [* 10^6] = AUC_{HHb+AAP} - AUC_{HHb} \quad (6)$$

u kojoj $AUC_{HHb+AAP}$ predstavlja površinu ispod krive dobijene za smešu humanog hemoglobina i nekog od lekova, a AUC_{HHb} površinu ispod krive čistog proteina.

3.3.1.1. Teorijska razmatranja i izračunavanja

Intenzitet fluorescencije jedinjenja se smanjuje (gašenje fluorescencije, tj. kvenčing) kao rezultat različitih događaja: procesa u pobuđenom stanju, promena u strukturi, transfera energije, formiranja protein–ligand kompleksa u osnovnom stanju i kolizionog kvenčinga. Za određivanja tipa gašenja fluorescencije, kvenčing eksperimenti (odjeljak 3.3.1) urađeni su na tri različite temperature (25, 30 i 37°C), a dobijeni podaci su analizirani primenom klasične Stern-Volmerove jednačine (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (7)$$

u kojoj su F_0 i F vrednosti emisije fluorescencije proteina (humani hemoglobin) na 344 nm, redom, sa i bez dodatka liganda (leka), k_q je konstanta brzine kvenčinga, τ_0 je prosečni životni vek fluorofore (proteina) u odsustvu liganda, koji je reda veličine 10^{-8} (Lakowicz & Weber, 1973). Dalje, $[Q]$ označava koncentraciju kvenčera (liganda), a K_{sv} je Stern-Volmerova dinamička konstanta gašenja fluorescencije, koja se dobija iz nagiba linearne krive F_0/F u funkciji $[Q]$.

Intenziteti fluorescencije su korigovani za efekat unutrašnjeg filtra (apsorpcija ekscitovane svetlosti i njena reapsorpcija) prema izrazu (Lakowicz, 2006):

$$F_c = F_0 \cdot 10^{-(A_{EX} + A_{EM})/2} \quad (8)$$

gde je F_0 izmerena fluorescencija, F_c iskorigovana fluorescencija, a A_{EX} i A_{EM} su apsorbancije kvenčera (antipsihotika), redom, na talasnoj dužini ekscitacije i talasnoj dužini maksimuma emisije (344 nm).

Kada se ligand nezavisno vezuje za set ekvivalentnih vezivnih mesta na makro-molekulu (proteinu), ravnoteža koja se uspostavi između slobodnih molekula i onih vezanih za makromolekul se izražava pomoću jednačine (Bi *et al.*, 2004):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = -n \cdot \log \frac{1}{[L] - [P] \cdot \frac{F_0 - F}{F_0}} + n \cdot \log K_a \quad (9)$$

gde su F_0 i F intenziteti fluorescencije pre i nakon dodatka liganda (antipsihotik), a $[P]$ i $[L]$, redom, ukupne koncentracije proteina (HHb) i liganda. Iz linearne zavisnosti između $\log (F_0 - F/F)$

(ordinata) i $\log(1/[L]-[P] \times (F_0-F)/F)$ (apcisa), određuje se konstanta vezivanja (asocijacije) K_a između proteina i liganda, kao i broj vezivnih mesta (n) za ligand na proteinu, pod primenjenim eksperimentalnim uslovima (**odjeljak 3.3.1.**).

Vezujuće sile koje se uspostavljaju prilikom interakcija malog organskog molekula sa proteinima po pravilu uključuju: van der Waals-ove interakcije, hidrofobni efekat, elektrostatičke (Kulonove) sile i vodonične veze (**Pace *et al.*, 2014**). Kao parametri koji presudno određuju način vezivanja liganda (lek) za protein (HHb), termodinamički parametri promene entalpije (ΔH), promene entropije (ΔS), kao i promene Gipsove slobodne energije (ΔG), su izračunati iz van't Hoff-ovog izraza:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (10)$$

kao i jednačine:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (11)$$

u kojima je K_a konstanta vezivanja, R univerzalna gasna konstanta (8.314 J/mol·K), a T temperatura u stepenima po Kelvinu. Vrednosti za ΔH i ΔS su određene (redom) iz nagiba i odsečka linearne krive $\ln K_a$ u zavisnosti od $1/T$, pod pretpostavkom da ΔH i ΔS slabo zavise od temperature, što je obično i slučaj. Hemoglobin čoveka ne podleže strukturnoj degradaciji na temperaturama korišćenim u ovim eksperimentima (298,15, 303,15 i 310,15 K).

3.3.2. Merenja cirkularnog dihiroizma hemoglobina i antipsihotika

Merenja signala humanog hemoglobina (sa i bez ispitanih lekova) ovom metodom su urađena na Jasco J-815 modelu spektropolarimetra (Jasco, Tokio, Japan) u dalekom ultra-ljubičastom području (185–250 nm). Eksperimenti su urađeni na 37°C, sa dva skeniranja (aparati daju uprosečene vrednosti) za svaki CD spektar i brzinom skeniranja od 50 nm/min. Korišćena je kvarna ćelija sa optičkim putem od 0,1 mm, u kojoj je koncentracija proteina (komercijalni HHb) bila 10 μ M (100 μ L uzorka), a finalna koncentracija svakog antipsihotika 40 μ M. Dobijeni spektri su korigovani oduzimanjem odgovarajućih vrednosti iz spektara lekova (u istom puferu).

Dobijeni podaci, u jedinicama elipticiteta (mdeg), pretvoreni su u srednju vrednost elipticiteta amino-kiselinskog ostatka (MRE, engl. mean residue ellipticity) pomoću relacije:

$$[\text{MRE}] = \frac{\theta \cdot M_m}{10 \cdot l \cdot C \cdot r} \quad (12)$$

gdje je θ elipticitet u mdeg, M_m molarna masa HHb (64,5 kDa), l dužina kivete, C molarna koncentracija proteina u eksperimentu, a r broj ostataka amino-kiselina u ovom proteinu (574).

Sadržaj α -helikoidnih (sekundarnih) struktura u humanom hemoglobinu (%) izračunat je iz ovih podataka korišćenjem CONTIN algoritma i SP29 baze podataka u CDPro softverskom paketu (<https://sites.google.com/view/sreerama>).

3.3.3. Merenja apsorbcije hemoglobina i antipsihotika u vidljivoj oblasti

Sadržaj hemoglobina u uzorcima komercijalnog preparata ovog proteina (**odjeljak 3.1.**) određen je uobičajenom Drabkinovom metodom (**Tentori & Salvati, 1981**). Ona se zasniva na oksidaciji hemoglobina rastvorom kalijum-fericijanida (5 mg KCN, 20 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 g $NaHCO_3$ u 100 mL vode): protein sa cijanidnim jonima daje stabilan, obojeni kompleks cijano-methemoglobina apsorpcionog maksimuma na 540 nm (A_{540}).

Postupak: u 20 μ L uzorka HHb (ili hemolizata) odpipetirano je 2,0 mL reagensa. Ovaj rastvor se promućka i potom izmeri njegova apsorbcija na 540 nm nakon 20 minuta, naspram slepe probe (2,0 mL cijanidnog reagensa i 20 μ L vode).

Sadržaj HHb (u mg/mL) izračunat je na osnovu relacije:

$$\text{Hb (mg/ml)} = \frac{16114 \cdot A_{540} \cdot R}{11000} \quad (13)$$

u ovoj jednačini, vrednost 16114 odgovara molekulskoj masi hemoglobina u odnosu na gvožđe, R faktoru razblaženja (101 put), a 11000 je milimolarni ekstinkcioni koeficijent hemoglobina na talasnoj dužini merenja.

Apsorpcioni spektri izolovanog i prečišćenog humanog hemoglobina (4 μM) u PBS-u (**odeljak 3.1.**), sa i bez dodatka antipsihotika (u finalnoj koncentraciji 40 μM), dobijene su na spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japan). Uslovi rada i snimanja spektara: 6 sati inkubacije svih uzoraka na 37°C pre merenja i 3 mL uzorka proteina, kvarcna kiveta sa optičkim putem 1 cm, opseg talasnih dužina od 500 do 700 nm.

Sadržaj oksidovanog met-hemoglobina (izražen kao % ukupne koncentracije proteina) u analiziranim uzorcima je određen na osnovu jednačine (**Szebeni & Winterbourn, 1984**):

$$\text{metHb} = 7.0 \cdot A_{577} + 76.8 \cdot A_{630} - 13.8 \cdot A_{560} \quad (14)$$

koja se zasniva na milimolarnim ekstinkcionim koeficijentima tetramernih vrsta hemoglobina (oksi-, met- i hemi-hrom) i apsorpcija na navedenim talasnim dužinama na pH 7,4, pri čemu se ove vrednosti umanjuju za apsorpciju uzoraka na 700 nm.

3.3.4. Molekulski doking antipsihotika za hemoglobin

Početna struktura čovečijeg hemoglobina za modelovanje je preuzeta iz proteinske banke podataka (PDB, engl. Protein Data Bank), šifra/kod 2D60 (**Yokoyama et al., 2006**). Dva kokristalisana molekula liganda su uklonjena iz ove strukture, a protein je jonizovan do pH 7,40 pomoću PROPKA programa (**Olsson et al., 2011**). Molekul analiziranog proteina je zatim okružen sferom TIP3P molekula vode prečnika 10 Å i podvrgnut je minimizaciji konjugovanog gradijenta u trajanju od 10 ps, kako bi se eliminisale sterne neravnine. Proteinska kičma je fiksirana kako bi se očuvala eksperimentalno određena struktura molekula. Za minimizaciju je korišćen NAMD 2.14 sa CHARMM poljem sila (**Phillips et al., 2020**), a Vega ZZ 3.2.0 je poslužio kao grafički interfejs (GUI) (**Pedretti et al., 2021**).

Trodimenzionalne (3D) strukture klopazina, sertindola i ziprazidona preuzete su iz PubChem baze (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) i njihove finalne konformacije su optimizovane na semiempirijskom nivou teorije PM7 (**Stewart et al., 2013**) u programu MOPAC 2016 (**Stewart et al., 1990**). COSMO implicitni model solvatacije vode iskorišćen je dodavanjem ključne reči EPS=78,4, uz povećanje kriterijuma konvergencije za 100 puta pomoću ključne reči PRECISE.

Molekulski doking tri leka (klopazin, sertindol i ziprazidon) i humanog hemoglobina izveden je u programu AutoDock Vina 1.1 (**Trott & Olson, 2010**). Slep doking (engl. blind docking) je urađen nakon postavljanja čitave strukture proteina kao receptorskog mesta. Parametar iscrpljenosti (engl. exhaustiveness) je u ovoj analizi povećan na 200, pri čemu je sačuvano po 20 vezujućih modova za svaki ligand (atipični antipsihotik).

3.4. Eksperimenti sa eritrocitima čoveka i antipsihoticima

Efekat ispitivanih lekova na humane eritrocite ispitan je analizom njihovog uticaja na plazminu membranu (EPR studija) i zaštitnog efekta antipsihotika na integritet eritrocita u prisustvu jakog oksidansa, što je praćeno preko razlika u stepenu hemolize.

Elektronska paramagnetna rezonanca (EPR), nazvana i elektronska spinska rezonanca (ESR), je rezonantna spektroskopska tehnika koja se koristi za proučavanje hemijskih vrsta sa nesparenim elektronima. Ona proučava mikrotalasno zračenje apsorbovano ili emitovano od nesparenih elektrona u magnetnom polju. Zbog svoje visoke osetljivosti (detektuje slobodne radikale i paramagnetne vrste u nanomolarnoj koncentraciji) našla je široku primenu u prirodnim naukama i medicini. Dodavanje spinskih proba, stabilnih (dugoživećih) slobodnih radikala koji se ubacuju u sistem da bi se ispitalo neko njegovo svosjstvo, EPR spektroskopija može da se iskoristi i za ispitivanje ćelijskih membrana (https://www.ffh.bg.ac.rs/uploads/sr/2020/05/Metode-FHA_EPR.pdf) i lipozoma. Za potrebe ove disertacije, EPR studija membrana eritrocita je urađena na Institutu za multidisciplinarna istraživanja (Univerzitet u Beogradu), ljubaznošću dr Ivana Spasojevića, naučnog savetnika.

3.4.1. Merenja fluidnosti membrane eritrocita u prisustvu antipsihotika

Za ove analize, uzorci periferne venske krvi uzeti su od istog zdravog volontera kao za eksperimente izolovanja hemoglobina. Krv je prikupljena u vakutanere sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom kao anti-koagulansom (EDTA; 1.8 g/L). Eritrociti su iz sveže krvi odvojeni na uobičajeni način (**odjeljak 3.1**). U svim uzorcima hematokrit je podešen na 50% pomoću PBS-a.

Spinsko obeležavanje eritrocita (engl. spin label) urađeno je prema **Ajdžanović et al. (2011)**. Etanolni rastvori spinskih proba 5-DS (5-doksil stearat) i 16-DS (16-doksil stearat) (Sigma-Aldrich, SAD) dodati su na zid suda u količini tako da odnos spinskog obeleživača i lipida u membrani eritrocita približno bude 1:100 (mol/mol). Nakon otparavanja etanola, uz blago mešanje, dodata je suspenzija ispranih eritrociti, a zatim i alikvoti (1 μ L u 100 μ L uzorka) štok rastvora svakog leka (40 mM u DMSO), tako da je finalna koncentracija leka u smeši bila 100 μ M. U kontrolni uzorak dodat je alikvot DMSO-a. Uzorci eritrocita u teflonskim tubama (debljina zida 0,025 mm, prečnik 0,6 mm; Zeus Industries, SAD) su ubačeni u kvarcne kapilare i EPR spektri uzoraka su snimljeni na 20°C, 2 minuta nakon dodatka leka. Varian E104-A EPR spektrometar (Palo Alto, SAD) koji radi u X-polju (9,1 GHz) je korišćen za snimanje spektara. Parametri uređaja bili su: amplituda modulacije 2 G; frekvencija modulacije 100 KHz; jačina mikrotalasa 20 mW; opseg skeniranja 100 G; vreme skeniranja 4 minuta; vremenska konstanta 0,25 s. Svaki spektar je zapisan i analiziran EW softverom (Scientific Software, SAD).

Spinska proba 5-DS (sa paramagnetnom grupom na C5 atomu masne kiseline) omogućava procenu fluidnosti fosfolipidnog sloja u blizini površine membrane). Parametar uređenosti membrane (S) eritrocita obeleženih sa 5-DS (recipročno proporcionalan njenoj fluidnosti) izračunat je prema **Ajdžanović et al. (2011)**. Spinska proba 16-DS (paramagnetna grupa na C16 atomu masne kiseline) služi za procenu fluidnosti dubljeg (hidrofobnog) sloja ispitivane membrane. Zato se za nju računa rotaciono korelaciono vreme (parametar τ), a ne parametar uređenosti. Ova vremena su isto obrnuto proporcionalna membranskoj fluidnosti i izračunata su prema **Koter et al. (2004)**. Svi eksperimenti su urađeni u tetraplikatu.

3.4.2. Merenja stepena hemolize eritrocita u prisustvu antipsihotika i oksidansa

Inkubiranje eritrocita u PBS puferu (hematokrit 50%) sa lekovima (klozapin, sertindol i sertindol) urađeno je na sledeći način. U ovu suspenziju eritrocita (6 mL, u vajli od 15 mL) otpipetirano je dovoljno štok rastvora svakog od antipsihotika (4 mM u DMSO-u), kao i rastvora AAPH, tako da finalna koncentracija ovih jedinjenja bude kao u eksperimentima ispitivanja oksidativne stabilnosti hemoglobina (**odjeljak 3.3.1**): 40 μ M svakog od antipsihotika i 5 mM oksidansa. Pod navedenim uslovima inkubiran je uzorak sa 40 μ M standardnog antioksidansa Trolox-a, u vodi rastvornog analoga vitamina E. Kontrolne smeše umesto lekova su sadržale odgovarajuće zapremine pufera umesto rastvora lekova i AAPH.

Dobijene suspenzije inkubirane su u vodenom kupatilu na 37°C tokom ukupno 5 sati, uz povremeno pažljivo mešanje uzoraka. Svakih 60 minuta uzimano je okvirno 1 mL suspenzije ćelija, a ostatak je vraćan u vodeno kupatilo. Alikvoti suspenzija inkubiranih eritrocita (sa i bez dodatka antipsihotika) su potom izcentrifugovane, pod uslovima za taloženje ćelija iz pune krvi (**odjeljak 3.1**). Supernatanti su sačuvani za određivanje stepena hemolize.

Stepen hemolize (% od ukupnog Hb-a) je izračunat na osnovu vrednosti za sadržaj hemoglobina u supernatantu nakon inkubiranja pune krvi sa ili bez (odgovarajućeg) leka i oksidansa i vrednosti za sadržaj hemoglobina u hemolizatu (1:1, v/v) netretiranih eritrocita (100% hemolize). Hemoliza netretiranih eritrocita je urađena dodavanjem jednake zapremine destilovane vode i, nakon 15 minuta, intenzivnim mešanjem ove smeše na "Vortex-u". Koncentracija hemoglobina u uzorcima (supernatanti i pun hemolizat) je određena na standardan način (**odjeljak 3.3.3**).

3.5. Statističke analize dobijenih podataka

Statističke analize podataka dobijenih za efekte atipičnih antipsihotika na tkivo i ćelije jetre sprovedene su prema protokolima opisanim u **Hinkle *et al.*, (1994)**. Svaki esej je urađen u triplikatu za svaki uzorak tkiva. Statistička značajnost je testirana jednosmernom analizom varijanse (ANOVA test), praćenom Tukijevim (engl. Tukey) *post-hoc* testom višestrukog poređenja. Nivo verovatnoće $p < 0,05$ je smatran statistički značajnim. Za sve ove analize je korišćen GraphPad Prism 8 softver (GraphPad Software Inc., San Dijego, Kalifornija, SAD).

Svi eksperimenti sa komercijalnim ili izolovanim hemoglobinom, kao i sa eritrocitima čoveka (osim EPR eseja fluidnosti membrane) su urađeni u triplikatu. Za statičku obradu podataka (srednje vrednosti, standardne devijacije i statističke analize) iskorišćen je softver OriginPro (OriginLab Corporation, SAD; <https://www.originlab.com/>). Rezultati su analizirani jednosmernim (engl. one-way) ANOVA testom varijanse: razlika na nivou $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. Rezultati i diskusija

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uticaja tri atipična antipsihotika (diazepinskog derivata klopazina, piperidinskog derivata sertindola i piperazinskog derivata ziprazidona) na jetru pacova (mesto intenzivnog metabolizma svih lekova) i eritrocite čoveka (najzastupljenije ćelije krvi, medijuma za prenos svih (ne)polarnih lekova kroz organizam), sa naglaskom na molekul humanog hemoglobina (pogodan model sistem za ispitivanje protein-ligand interakcija i posledica vezivanja lekova na strukturu, aktivnost i uloge proteina u telu).

4.1. Efekti atipičnih antipsihotika klopazina, sertindola i ziprazidone na jetru pacova: uloga oksidativnog stresa u lekovima-izazvanoj disfunkciji jetre?

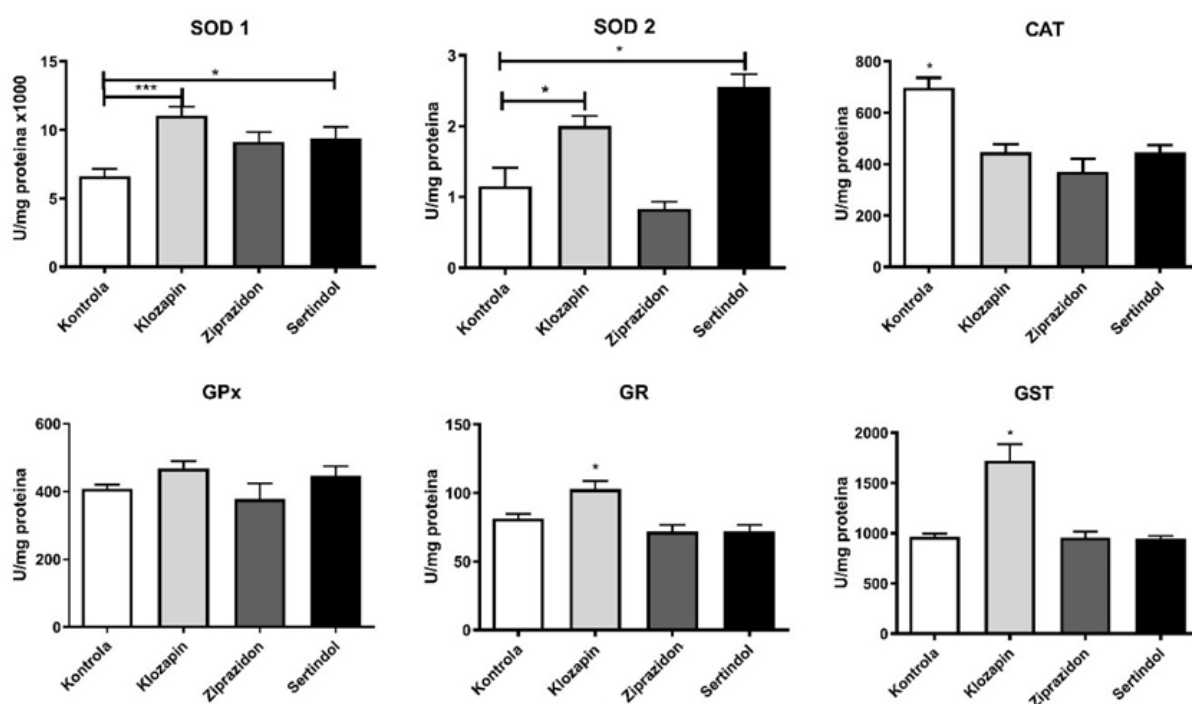
4.1.1. Tretman eksperimentalnih životinja antipsihoticima

Tretman mužjaka Wistar albino pacova atipičnim antipsihoticima urađen je u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu (**odeljak 3.2.1.**). Dnevni unos hrane i vode nije se značajno razlikovao između četiri grupe (kontrolna, klopazinska, sertindolska i ziprazidonska) životinja; podaci nisu prikazani. Ukupna telesna masa životinja nije se značajno promenila niti u jednoj eksperimentalnoj grupi po okončanju tretmana lekovima. Takođe, uprosečena veličina jetre, odnosno njena relativna masa u poređenju sa ukupnom telesnom masom pacova, statistički se nije razlikovala između ispitanih grupa životinja.

4.1.2. Promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri pacova tretiranih antipsihoticima

U homogenatima hepatocita (**odeljak 3.2.2.**) određene su aktivnosti pet antioksidativnih enzima: Cu,Zn-superoksid dismutaze (SOD1) i Mn-superoksid-dismutaze (SOD2) (**odeljak 3.2.5.1.**), katalaze (CAT; **odeljak 3.2.5.2.**), glutation-peroksidaze (GPx; **odeljak 3.2.5.3.**), glutation-reduktaze (GR, **odeljak 3.2.5.4.**), glutation-S-transferaze (**odeljak 3.2.5.5.**), uz nivo ukupnih proteina (**odeljak 3.2.4.**), da bi se utvrdilo da li se (specifična) aktivnost ovih enzima menja nakon hroničnog tretmana pacova trima antipsihoticima druge generacije (klopazin, ziprazidon i sertindol), u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

Dobijeni statistički obrađeni podaci su prikazani na slici 19.

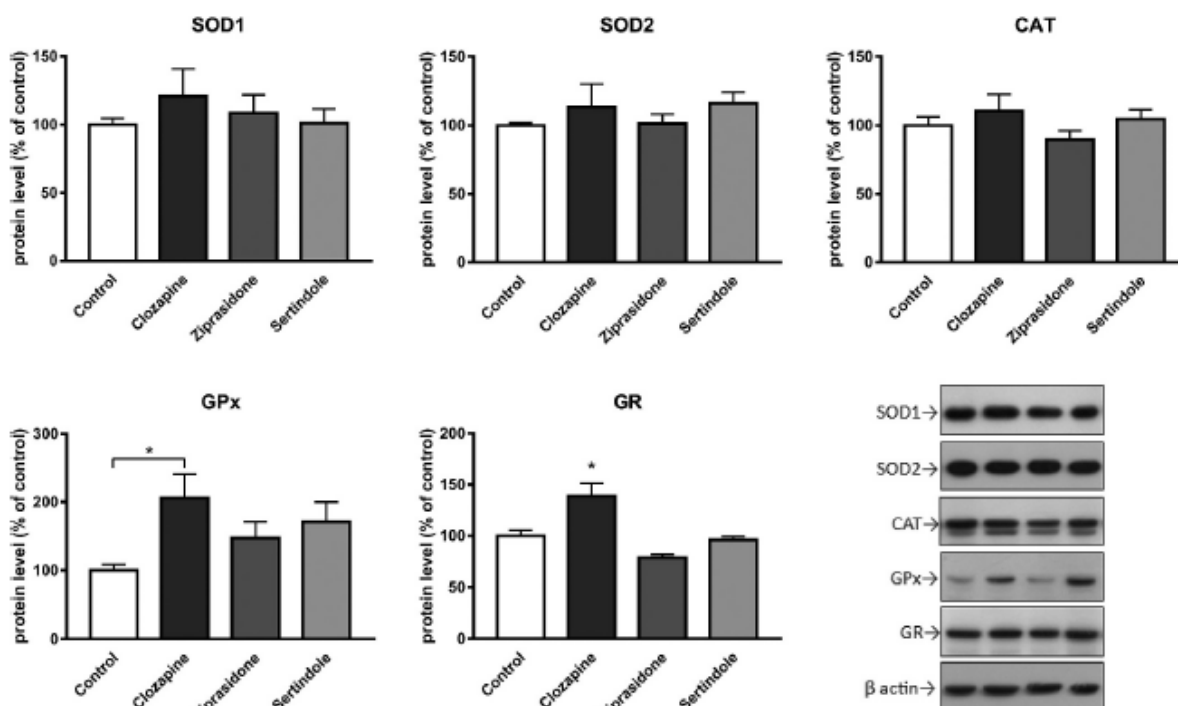


Slika 19. Specifična aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri pacova, nakon 28 dana tretmana životinja klopazinom, ziprazidonom i sertindolom.

Napomene (**slika 19**): Aktivnost SOD1 (Cu,Zn-superoksid-dismutaze), SOD2 (Mn-superoksid-dismutaze), CAT (katalaze), GPx (glutation-peroksidaze), GR (glutation-reduktaze) i GST (glutation-S-transferaze) je izmerena spektrofotometrijskim metodama u izolatima iz celih hepatocita u kontrolnoj grupi, kao i klozapinom-, ziprazidonom- i sertindolom-tretiranim grupama životinja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti \pm standardna greška merenja (n=8). Značajne razlike (nakon jednosmerne analiza varijanse (ANOVA), praćene Tukijevim *post-hoc* testom za višestruka poređenja; značajnost razlika na nivou $p < 0,05$) su obeležene zvezdicama (*).

Dobijeno je više statistički značajnih promena u specifičnoj aktivnosti analiziranih enzima, kao posledica tretmana pacova lekovima. U klozapinskoj grupi, uočen je značajan *porast* aktivnosti SOD1, SOD2, GR i GST, uz *smanjenje* aktivnosti CAT, u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati (**slika 19**) pokazuju i da je tretman pacova sa druga dva atipična antipsihotika uticao na enzime prve linije odbrane od štetnog delovanja reaktivnih vrsta, u nešto manjoj meri. Ziprazidon je statistički značajno *smanjio* samo aktivnosti CAT, uz trend (uprosečene vrednosti) povećanja aktivnosti SOD1, ali i smanjenja aktivnosti SOD1 ($p > 0,05$ za oba poređenja). Što se tiče posledica tretmana pacova sertindolom, uočen je značajan porast specifične aktivnosti SOD1 i SOD2, uz smanjenje specifične aktivnosti CAT, u odnosu na kontrolne vrednosti (grupa pacova tretirana pijacom vodom umesto suspenzije lekova).

Vestern blot (engl. Western blotting), poznat i kao imunoblot ili proteinski blot, uveden u biohemijsku praksu radom **Towbin et al. (1979)**, uobičajena je tehnika za imunološku detekciju i kvantifikaciju proteina *in vitro*. Ova tehnika najpre omogućava razdvajanje proteina iz uzorka za analizu na SDS-PAGE, u funkciji njihove molekulske mase, nakon čega sledi njihov prenos na adsorpcionu membranu. Naknadno dodavanje odgovarajućih antitela obezbeđuje identifikaciju specifičnih proteina na membrani i iz složenih smeša proteina, kakvi su ćelijski ili tkivni lizati. Materijali od nitroceluloze i poliviniliden-difluorida (PVDF) najčešće su korišćene membrane za primenu u proteinskom blotu (**Ahmed & Narain, 2016**). Ovaj pristup (**odeljci 3.2.6. i 3.2.7.**) je iskorišćen i u ovoj disertaciji, za kvantifikaciju enzima antioksidativne zaštite u homogenatima (ne)tretiranih pacova atipičnim antipsihoticima klozapinom, sertindolom i ziprazidonom. Na **slici 20** su prikazani (statistički obrađeni) rezultati imunoblot analiza.



Slika 20. Sadržaj proteina enzima antioksidativne zaštite u jetri pacova nakon tretmana klozapinom, ziprazidonom i sertindolom.

Napomene (**slika 20**): Nivo proteina SOD1 (Cu,Zn-superoksid-dismutaze), SOD2 (Mn-superoksid-dismutaze), CAT (katalaze), GPx (glutation-peroksidaze) i GR (glutation-reduktaze) izmereni su Vestern blot tehnikom (eng. Western blotting) i normalizovani prema β -aktinu. Za spisak korišćenih antitela videti **odjeljak 3.1**. Rezultati su izraženi kao procenat kontrolnih vrednosti. Značajne razlike u dobijenim vrednostima (jednosmerna ANOVA, praćena Tukijevim *post-hoc* testom višestrukih poređenja, prag nivoa statističke značajnosti razlika od 0,05) označene su zvezdicom (*).

Sa **slike 20** se uočava značajan porast u sadržaju GPx i GR proteina u jetri pacova tretiranih klopazinom, u poređenju sa kontrolom. Nivoi drugih analiziranih enzima (SOD1, SOD2 i CAT), iako blago povećani, nisu bili značajno različiti u ovoj grupi životinja. Dalje, nisu nađene značajne razlike u nivou niti jednog od ispitanih enzima (SOD1, SOD2, CAT, GPx i GR) u jetri pacova u sertindolskoj i ziprazidonskoj grupi, u odnosu na netretirane životinje (**slika 20**).

Druga generacija antipsihotika izaziva štetne metaboličke nuzpojave u jetri (**odjeljak 2.2.2.**). Smatra se da je oksidativni stres jedan od (osnovnih) molekulskih mehanizama koji doprinose razvoju i napredovanju metaboličkih poremećaja u jetri izazvanih lekovima. Ovde predstavljeni originalni rezultati pokazuju da *klopazin* ima najznačajniji učinak na promene funkcije anti-oksidativnih enzima, što nije iznenađujuće. Atipični antipsihotici, kao klopazin i olanzapin, podležu metaboličkim transformacijama u jetri, pre svega pod katalitičkim uticajem CYP1A2 izoenzima, važnog dela citohrom P450 (CYP) sistema (**Urichuk et al., 2008**). Drugi CYP enzimi uključeni u metabolizam klopazina su CYP2D6 i CYP3A4 (**Dean, 2016**). Tokom metabolizma klopazina nastaju reaktivne vrste kiseonika (ROS, engl. reactive oxygen species), kao superoksid-anjon radikal (O_2^-) i vodonik-peroksid (H_2O_2) (**Gonzalez, 2005**). Stoga je SOD aktivacija, tj. veliko *povećanje* aktivnosti SOD1 i SOD2 enzima u klopazinskoj grupi (**slika 19**), pokazatelj pojačanog stvaranja O_2^- u hepatocitima pacova. Unutar ćelija, SOD1 i SOD2 brzo pretvaraju O_2^- u H_2O_2 , koji se potom razlaže do vode, katalitičkim delovanjem CAT ili GPx. Povećana aktivnost GPx u jetri, kod pacova kojima je davan klopazin, može zato biti adaptivni odgovor na povećano nastajanje H_2O_2 u hepatocitima. Povećana aktivnost GPx kod pacova tretiranih klopazinom bila je praćena i povećanjem nivoa proteina i rastom aktivnosti GR (**slika 19**). Citosolna GPx detoksifikuje H_2O_2 uz pomoću molekula redukovano glutationa (GSH), koji se potom recikliraju, kao rezultat delovanja GR. Koristeći sličan model sistem (tretman sa 20 mg/kg/dnevno klopazina, u trajanju od 21 dan) **Zlatković et al., (2014)** su našli smanjen sadržaj GSH u jetri pacova, glavne redoks-aktivne komponente za aktivnost i GPx i GST.

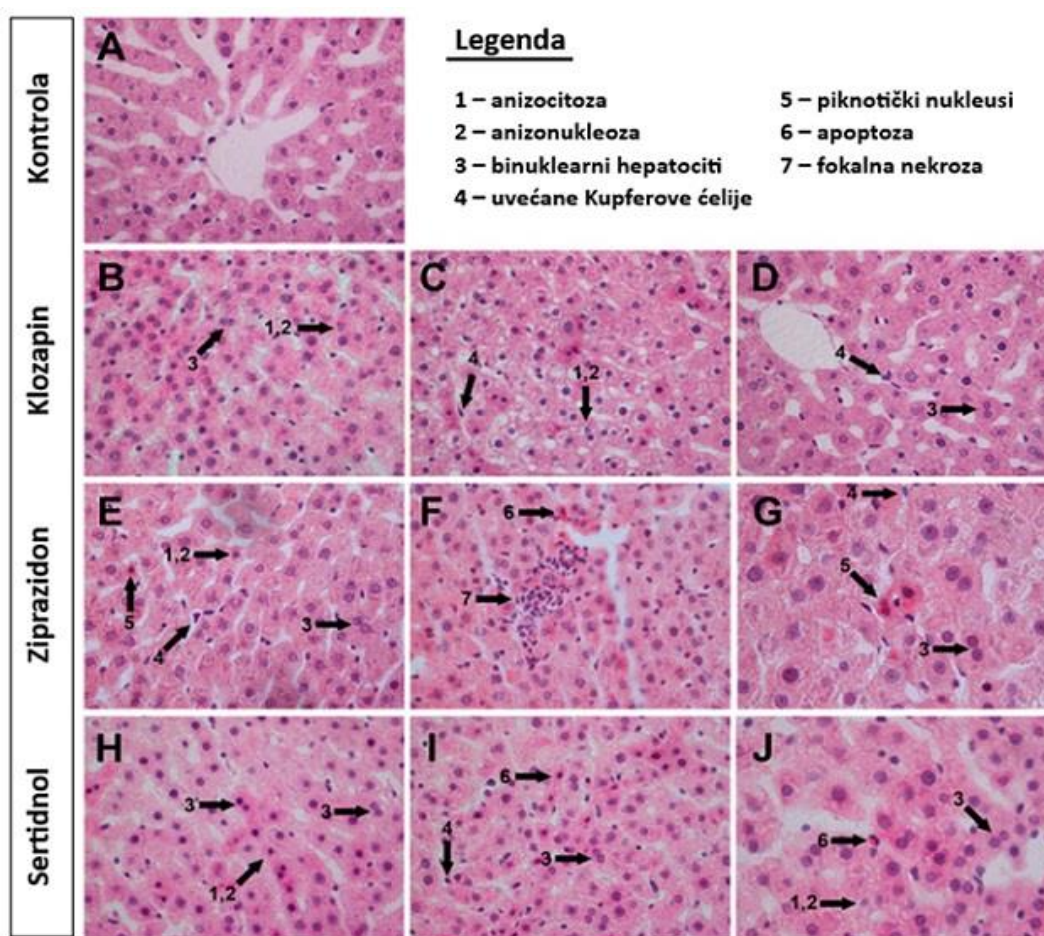
Sva tri atipična ispitana antipsihotika su smanjila aktivnost CAT u jetri pacova (**slika 19**), što dovodi do akumulacije H_2O_2 (supstrat katalaze) u ćelijama jetre. Ovaj poremećaj bio je očigledniji kao odgovor na klopazin i sertindol, gde je pojačano nastajanje H_2O_2 posledica delovanja SOD1 i SOD2. Prema našim rezultatima, klopazin je uticao i na GSH ciklus u jetri, povećavajući ne samo aktivnost GPx, već i koncentraciju GR, kao i aktivnost GST. Povećana GSH-konjugacija nitronijum jonom klopazina, ili različita toksičnost GSH-konjugata od aktivnosti različitih GST izoformi (**Vredenburg et al., 2013**), izgleda da utiče na ROS-om izazvana oštećenja jetre kod klopazinom-tretiranih pacova. **Zlatković et al. (2014)** su našli i značajan porast GST aktivnosti kod klopazinom-tretiranih, pritom i hronično izolovanih pacova, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

Značajno smanjenje, ne samo u aktivnosti, već i koncentraciji CAT nakon tretmana atipičnim antipsihoticima (od kojih je jedan od testiranih bio je ziprazidon), već je zabeleženo u literaturi (**Pillai et al., 2007**). U skladu sa ovim rezultatima, **Miljević et al. (2010)** pronalaze štetne metaboličke efekte (pre svega u lipidnom profilu plazme) i poremećaje u aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima pacijenata hronično (više godina) tretiranih klopazinom, koji su delimično pripisani oksidativnom stresu. Do oksidativnog stresa dolazi i zbog povećanog nastajanja toksičnih metabolita dopamina, što izgleda da inhibira mitohondrijske procese respiracije, uzrokujući redoks-neravnotežu (**Raha et al., 2012**). Oksidativna oštećenja proteina funkcionalno povezanih sa energetskeg metabolizmom (kod limfoblastoidnih ćelija) takođe se dovode u vezu sa štetnim uticajem psihofarmaka kao što je klopazin (**Baig et al., 2010**).

4.1.3. Histopatološke promene u jetri pacova tretiranih antipsihoticima

Jetra je jedan od najvećih organa u telu, sa endokrinim i egzokrinim svojstvima (**odjeljak 2.2**). Sastoji se od oko 60% parenhimskih ćelija, odnosno hepatocita, i 30–35% neparenhimskih ćelija, odnosno Kupferovih ćelija (engl. Kupffer cells), zvezdastih ćelija jetre (engl. hepatic stellate cells) i sinusoidnih endotelnih ćelija jetre (engl. liver sinusoidal endothelial cells) (**Williams & Iatropoulos, 2002**). Postojanje histopatoloških promena u jetri pacova nakon tretmana ispitivanim antipsihoticima je ispitano na način opisan u **odjeljcima 3.2.2. i 3.2.3**. Dobijeni nalazi su prikazani na **slici 21** (odgovarajuće fotomikrografije) i **tabeli 2** (rezime uočenih promena).

Kontrolna grupa pacova je pokazala pravilnu arhitekturu i radijalnu organizaciju ćelija (**slika 21**), dok su u jetri tretiranoj atipičnim antipsihoticima nađene različite promene okarakterisane kao oštećenja jetre izazvana lekovima. Najizraženije histopatološke promene jetre su otkrivene kod životinja tretiranih ziprazidonom (**slika 21**). Ove promene su ocenjene kao umerene (**tabela 2**). U poređenju sa rezultatima delovanja ziprazidona, a sve poredeći sa kontrolnom grupom životinja, tretman klozapinom i sertindolom doveo je do blažih histopatoloških promena u jetri.



Slika 21. Fotomikrografije uzoraka jetra pacova nakon 28 dana tretmana klozapinom, ziprazidonom i sertindolom (hematoksilinsko i eozinsko bojenje). **A:** Kontrolna grupa tretirana pijaćom vodom, u kojoj se vidi normalna organizacija i arhitektura jetre, bez patoloških promena (uvećanje 400×). **B–D:** Jetre pacova tretirane klozapinom, sa vidljivim blagim degenerativnim promenama u hepatocitima sa: anizocitozom (1), anizonukleozom (2), bijedarnim hepatocitima (3), kao i srednje izraženim patološkim promenama u ćelijama sa: anizocitozom (1), anizonukleozom (2), bijedarnim hepatocitima (3), uvećanim Kupferovim ćelijama (4), piknotičkim jedrima (5), apoptozom (6) i fokalnom nekrozom (7) ćelija (**E/F**; 400×; **G**: 630×). **H–J:** Grupa pacova tretirana sertindolom, gde se uočavaju blage degenerativne promene u hepatocitima sa: anizocitozom (1), anizonukleozom (2), bijedarnim hepatocitima (3), uvećanim Kupferovim ćelijama (4), piknotičkim jedrima (5) i apoptozom (6) (**H/I**: 400×; **J**: 630×).

Tabela 2. Kvalitativni rezime histopatoloških promena (slika 21) u jetri pacova nakon 28 dana tretmana sa klozapinom, ziprazidonom ili sertindolom.

Histopatološke promene	Klozapin	Ziprazidon	Sertindol
Regenerativne promene (anizocitoza, anizonukleoza, bijedarni hepatociti)	++	++	++
Uvećane Kupferove ćelije	++	++	+
Apoptotski hepatociti	–	++	++
Fokalna nekroza	–	+	–
Infiltracija ćelija imunskog sistema	–	–	–
Mikrovezikularne masne promene	–	–	–
Maktovezikularne masne promene	–	–	–
Hepatociti u mitozu	–	–	–

Rezultati su tačan rezime iz svih grupa pacova: ++ označava gotovo uvek prisutnu promenu, + obično prisutnu promenu, a – uopšteno odsutnu promenu.

Uočene su sledeće patološke (nepovoljne) promene u tkivu jetre nakon tretmana sa sva tri leka: anizocitoza (poremećaj veličine ćelija), anizonukleoza (jedra ćelija različite veličine) i akumuliranje ćelija sa dva jedra (dvojedarne ćelije). Takođe, u tkivu jetre pacova su detektovane *uvećane* Kupferove ćelije, pre svega u klozapinskoj i ziprazidonskoj grupi životinja. Kupferove ćelije su rezidentni makrofagi jetre, sa ključnom ulogom u održanju funkcija ovog organa. U fiziološkim uslovima, one su prve urođene imunske ćelije i štite jetru od bakterijskih infekcija. U patološkim stanjima, aktiviraju se (različitim komponentama) i mogu da se diferenciraju u M1-slične (klasične) ili M2-slične (alternativne) makrofage. Metabolizam klasičnih ili alternativno aktiviranih Kupferovih ćelija određuje njihovu ulogu u oštećenju jetre (Nguyen-Lefebvre & Horuzsko, 2015). Za razliku od opisanih histoloških promena, nisu uočene infiltracije imunskih ćelija, mikro- ili makro-vezikularne masne promene, niti ćelije u mitozu u jetri pacova hronično tretiranih klozapinom, ziprazidonom i sertindolom (tabela 2).

Dobro je poznato da klozapin povećava rizik od nealkoholne masne jetre (engl. fatty liver disease) u većoj meri nego drugi atipični antipsihotici (Keane *et al.*, 2009). Jedan od mogućih mehanizama oštećenja hepatocita mogao bi biti i vezivanje leka ili njegovog metabolita za (neki) protein i stvaranje protein-lek kompleksa (Yuan & Kaplowitz, 2013). Imunski sistem reaguje na ovaj kompleks aktiviranjem T ćelija koje oslobađaju citokine koji dovode do smrti hepatocita (Kullak-Ublick *et al.*, 2017). Kupferove ćelije, monociti i neutrofili potom pojačavaju inflamatorni (upalni) odgovor (Yuan & Kaplowitz, 2013). Mitohondrije, endoplazmatski retikulum i oksidativni stres takođe mogu da imaju ulogu u ovim patofiziološkim procesima. Međutim, tretman niti jednim od tri korišćena antipsihotika nije izazvao infiltraciju (invaziju) imunskih ćelija u jetru pacova, tj. ulazak u tkivo ili tkivne prostore u kojima se obično one ne nalaze. Zanimljivo, i broj i veličina Kupferovih ćelija, prisutnih u sinusoidima jetre, bila je izraženija kod životinja tretiranih klozapinom i sertindolom. Imajući u vidu blisku povezanost između stvaranja ROS-a i anti-inflamatornog odgovora (Mittal *et al.*, 2014) moguć je i scenario da bi produženi tretman ovim lekovima mogao da pogorša redoks neravnotežu, uzrokujući upalne procese u jetri.

Ziprazidon je pokazao najmanji efekat na enzimske komponente zaštitnog anti-oksidativnog enzimskog sistema (prethodni odeljak), iako se on takođe intenzivno metaboliše u jetri, pre svega u reakciji redukcije koju katalizuje enzim aldehyd-oksida. Približno trećina ziprazidonskog metaboličkog klirensa posredovana je citohrom P-450 (CYP) 3A4 izoenzimom, glavnim CYP proteinom koji doprinosi oksidativnom metabolizmu leka (Beedham *et al.*, 2003). Međutim, histopatološke promene nađene u ovom radu ukazuju na znakove fokalne nekroze, uz povećan broj i veličinu Kupferovih ćelija u sinusoidima jetre nakon tretmana ziprazidonom. Iako su retki slučajevi

preosetljivosti (DRESS sindrom), sa oštećenjem jetre u obliku hepatitisa sa žuticom kod pacijenata koji su uzimali ziprazidon (**Qinyu & Zhenghui, 2018**), raspoloživi podaci pokazuju da su štetne nuspojave ziprazidona reverzibilne kada se prekine tretman ovim lekom. Budući da je ziprazidon relativno novi antipsihotik druge generacije (u upotrebi od februara 2001. u SAD), potrebne su dalje studije da bi se utvrdio njegov patofiziološki potencijal.

4.2. Humani hemoglobin i antipsihotici klopazin, ziprazidon i sertindol: prijatelji ili ne?

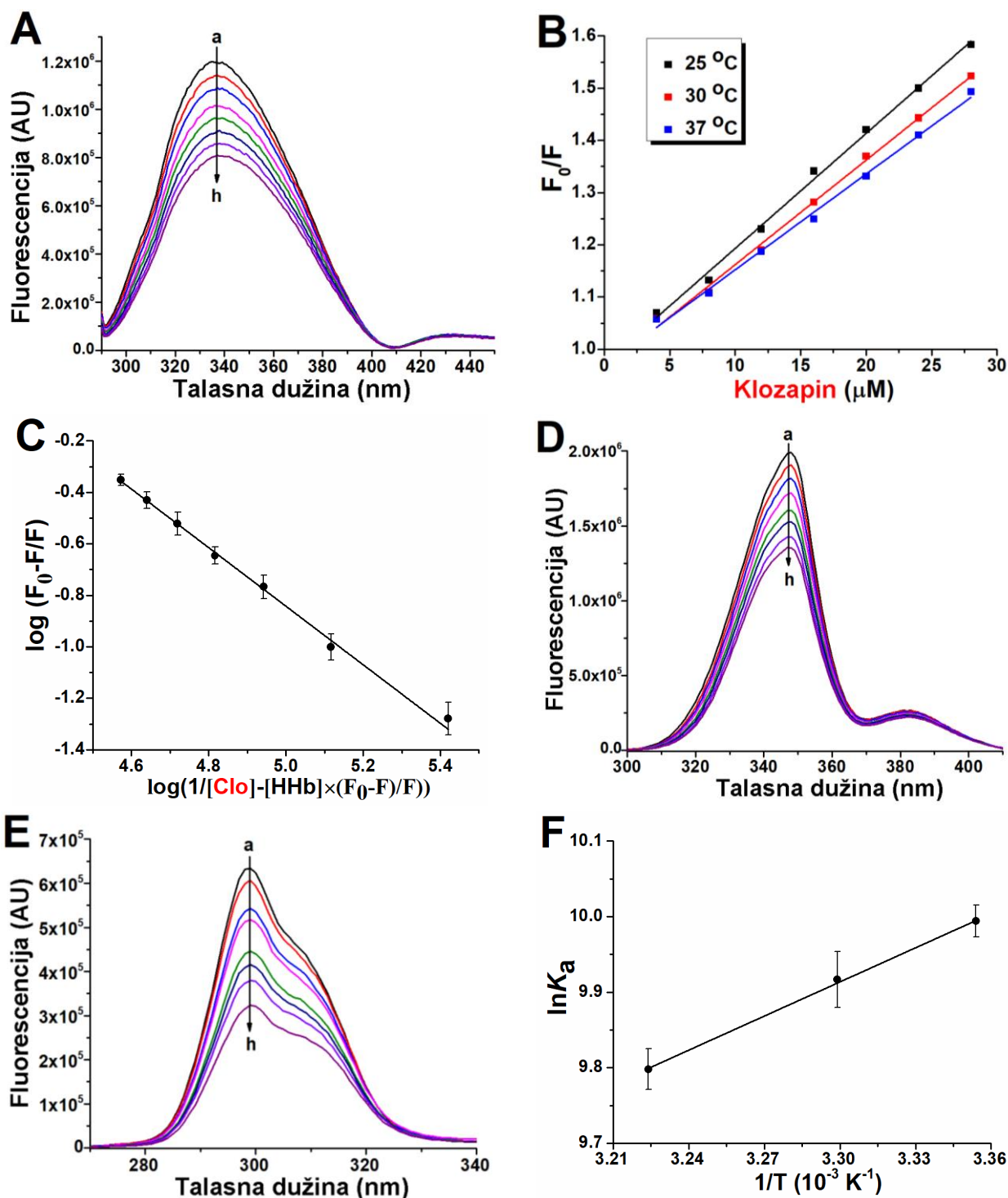
U ovom delu disertacije, prvo je istraženo vezivanje atipičnih antipsihotika klopazina, ziprazidona i sertindola za hemoglobin čoveka pod simuliranim fiziološkim uslovima (pH vrednost i jonska sila rastvora smeša protein–lek), koristeći merenja fluorescencije u tzv. stabilnom (engl. steady-state) stanju u kombinaciji sa *in-silico* doking studijama. Veoma slaba rastvorljivost ispitanih lekova u puferisanim vodenim rastvorima (što je karakteristika praktično svih prihofarmaka) onemogućila je (uspešno) korišćenje tehnike izotermalne titracione kalorimetrije za analizu biomolekulskih interakcija u ispitivanim sistemima. Potom, istražene su posledice vezivanja liganada za ovaj protein krvi, procenjujući njegov uticaj na sekundarnu (α -helikoidnu) strukturu i termalnu stabilnost hemoglobina čoveka, standardnim spektroskopskim metodama. Zanimljivo, drugi autori koriste komercijalne (delimično denaturisane) preparate HHb u većini objavljenih radova za testiranje njegovog potencijala za vezivanja različitih ksenobiotika (**Nedić et al., 2023**). Zbog toga je za ova istraživanja iskorišćen komercijalni liofilizovani humani hemoglobin (**odeljak 3.1.**) da bi dobijeni rezultati bili upoređeni sa podacima iz literature, tj. zabeleženim interakcijama u različitim HHb–lekovi rastvorima. Izuzetak je bilo ispitivanje oksidativne stabilnosti ovog hemoproteina u prisutnosti antipsihotika, za šta su kao polazni materijal iskorišćeni sveže izolovani (dakle potpuno nativni) rastvorioksi-hemoglobina, visoke čistoće (**odeljak 3.1.**).

4.2.1. Gašenje fluorescencije humanog hemoglobina atipičnim antipsihoticima

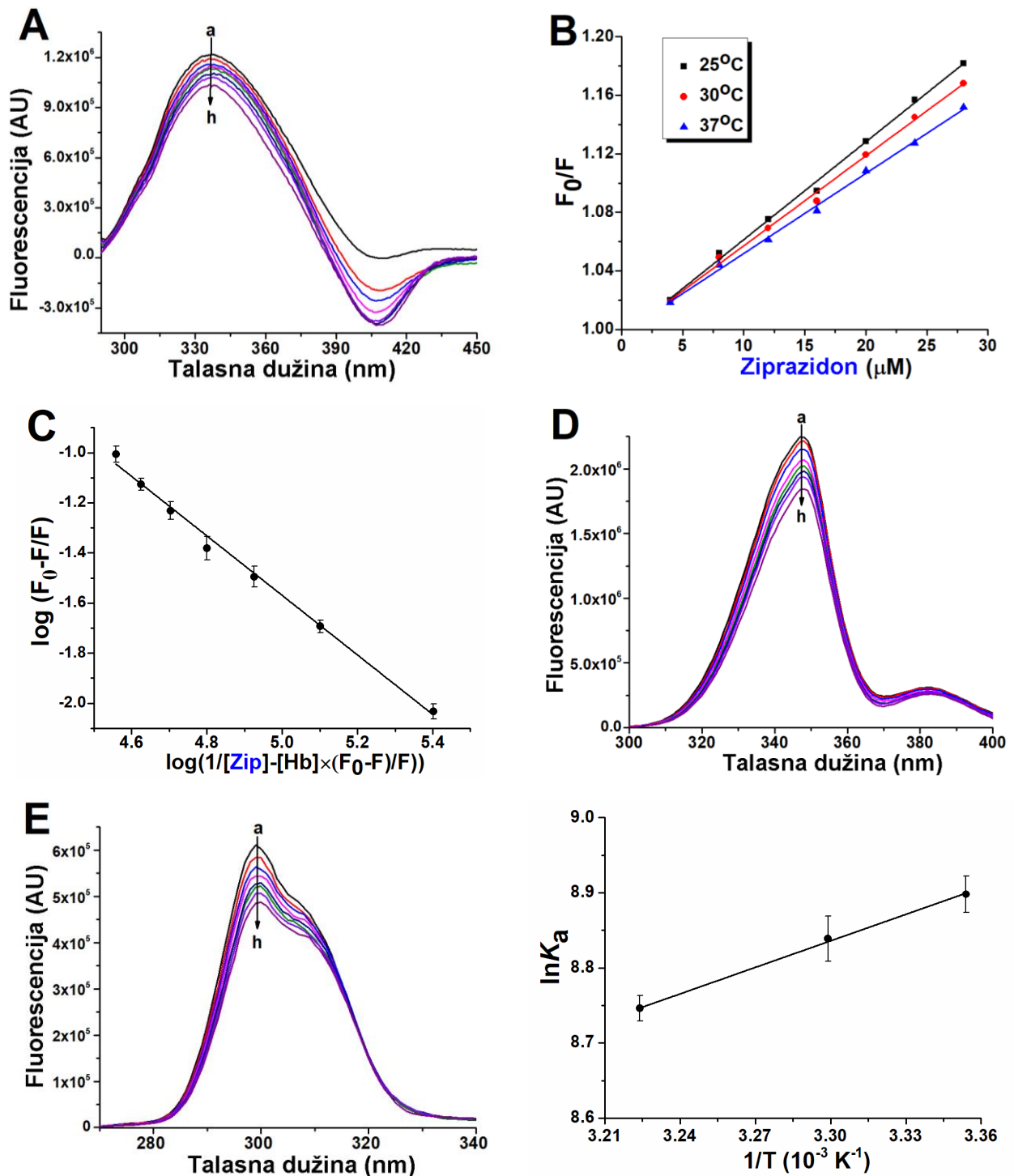
Studije gašenja (kvenčinga) fluorescencije proteina liganima pogodan je način za istraživanja ligand–protein interakcija. Hemoglobinski tetramer je sastavljen od dva $\alpha\beta$ dimera. Svaki dimer sadrži tri triptofanska (Trp) ostatka: α -Trp14 i β -Trp15 se nalaze izvan dodirne površine (interfejsa) subjedinica dimera, dok se β -Trp37 ostatak, lociran na $\alpha_1\beta_1$ interfejsu, smatra primarnim izvorom emisije hemoglobinske fluorescencije (**Hirsch & Nagel, 1981**). Dakle, proučavanje promene unutrašnje fluorescencije HHb u prisustvu antipsihotika može da pruži podatke o lokalnom okruženju oko ovog ostatka amino-kiselina u strukturi proteina u kompleksu sa ligandom. Ukupnoj vrednosti fluorescentnog signala hemoglobina čoveka doprinos daje i pet ostataka tirozina (Tyr) u svakom $\alpha\beta$ dimeru: α -Tyr24, α -Tyr42, α -Tyr140, β -Tyr34 i β -Tyr144 (**Mueser & Rogers, 2000**).

Na **slikama 22A–24A** su prikazani emisioni spektri koji pokazuju dozno-zavisno gašenje (kvenčing) fluorescencije humanog hemoglobina u prisustvu rastućih koncentracija ispitivanih lekova: **slika 22** sa klopazinom, **slika 23** sa ziprazidonom, a **slika 24** sa sertindolom. Izabrano je da radna koncentracija proteina bude 4 μ M (ne više!), kako bi se sprečilo gašenje Trp-fluorescencije od strane susednog hema (**Hirsch & Nagel, 1981**).

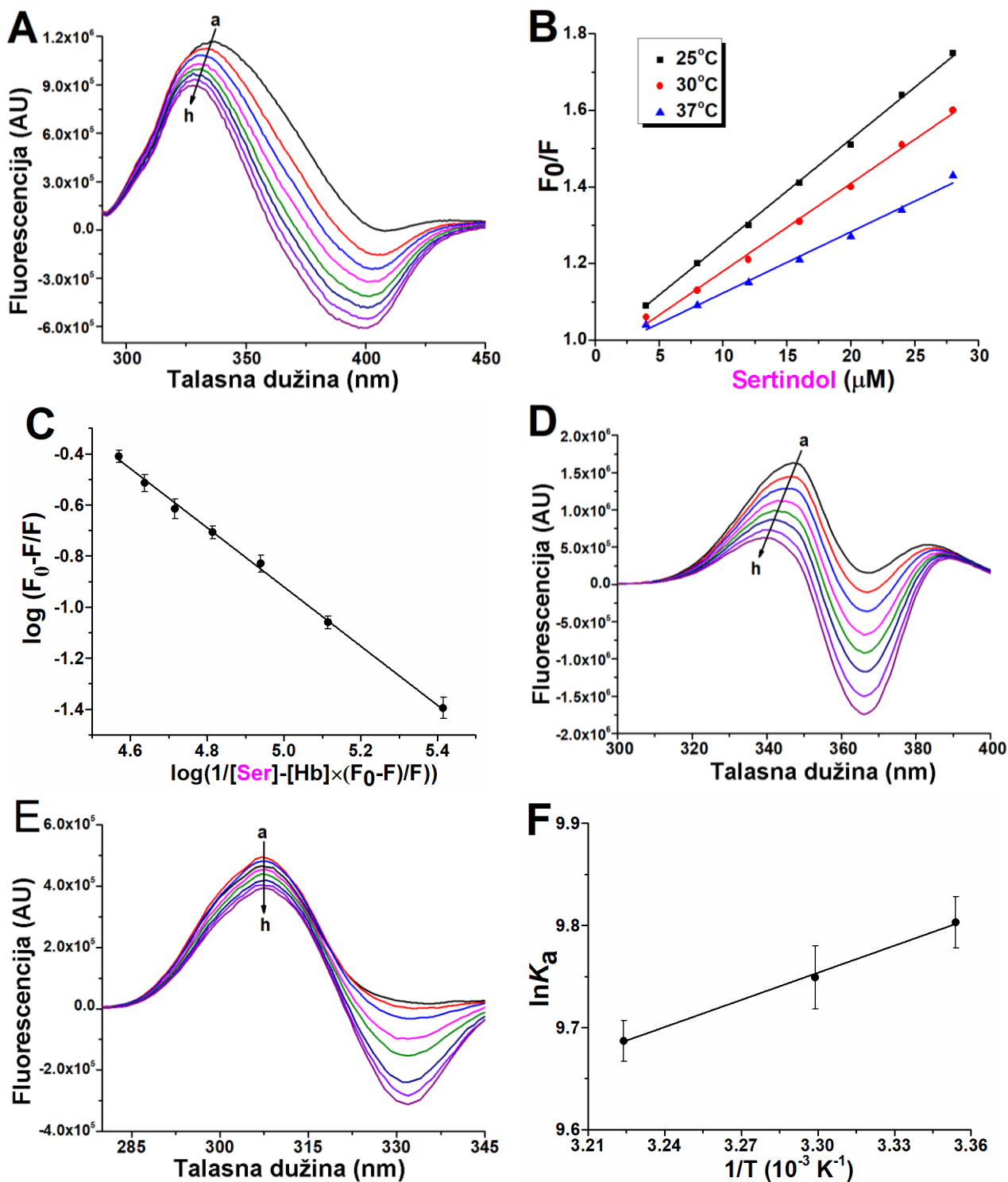
Sa ovih slika se vidi da humani hemoglobin (u korišćenoj koncentraciji) ispoljava jaku fluorescentnu emisiju sa pikom na 344 nm, pri ekscitaciji na 280 nm (**odeljak 3.3.1.**). Na ovom maksimumu emisije, svi ligandi su imali relativno nisku fluorescenciju u poređenju sa proteinom (nije prikazano). Međutim, ziprazidon (videti **sliku 23A**) i sertindol (**slika 24A**) su ispoljili jak fluorescentni signal na većim talasnim dužinama emisije od hemoglobina, sa maksimumom oko 400 nm, što je za posledicu imalo negativne pikove u ovoj oblasti ukupnog emisionog spektra kada su HHb–lekovi smeše pobuđivane na (uobičajenih) 280 nm. Kod smeša klopazina i ziprazidona sa HHb nije uočeno pomeranje maksimuma emisionog pika (sa rastućim koncentracijama liganada), za razliku od sertindola (**slika 24A**) gde je zabeleženo tzv. plavo pomeranje (engl. blue shift) maksimuma pika, na oko 8 nm manjoj talasnoj dužini od čistog proteina.



Slika 22. Veživanje klozapina (Clo) za komercijalni preparat humanog hemoglobina (HHb). Reprezentativni emisijski spektri (ekscitacija na 280 nm) HHb-a (4 μM) u prisustvu različitih koncentracija Clo (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 i 28 μM , redom, za krive **a** do **h**) na 37°C (**A**). Stern-Volmerov dijagram (plot) gašenja fluorescencije proteina na tri temperature (**B**). Dijagram sa podacima za gašenje fluorescencije proteina za određivanje konstante veživanja (asocijacije) i procene broja veživnih mesta na proteinu za ligand na 37°C (**C**). Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri HHb-a (4 μM) sa (**D**) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Trp) i sa (**E**) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Tyr), u prisustvu rastućih koncentracija Clo (0–28 μM za, redom, krive **a** do **h**). van't Hoff-ov dijagram veživanja Clo za 4 μM HHb za izračunavanje termodinamičkih parametara veživanja liganda (**F**). Za sve dijagrame, svaka tačka sa podacima predstavlja srednju vrednost iz tri određivanja, dok su njihove standardne označene vertikalnim linijama (engl. error bars).



Slika 23. Vezivanje ziprazidona (Zip) za komercijalni preparat humanog hemoglobina (HHb). Reprezentativni emisijski spektri (ekscitacija na 280 nm) HHb-a (4 μM) u prisustvu različitih koncentracija Zip (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 i 28 μM , redom, za krive a do h) na 37°C (A). Stern-Volmerov dijagram (plot) gašenja fluorescencije proteina na tri temperature (B). Dijagram sa podacima za gašenje fluorescencije proteina za određivanje konstante vezivanja (asocijacije) i procene broja vezivnih mesta na proteinu za ligand na 37°C (C). Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri HHb-a (4 μM) sa (D) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Trp) i sa (E) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Tyr), u prisustvu rastućih koncentracija Zip (0–28 μM za, redom, krive a do h). van't Hoff-ov dijagram vezivanja Zip za 4 μM HHb za izračunavanje termodinamičkih parametara vezivanja liganda (F). Za sve dijagrame, svaka tačka sa podacima predstavlja srednju vrednost iz tri određivanja, dok su njihove standardne označene vertikalnim stubićima (engl. error bars).



Slika 24. Vezivanje sertindola (Ser) za komercijalni preparat humanog hemoglobina (HHb). Reprezentativni emisijski spektri (ekscitacija na 280 nm) HHb-a (4 μM) u prisustvu različitih koncentracija Ser (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 i 28 μM , redom, za krive **a** do **h**) na 37°C (**A**). Stern-Volmerov dijagram (plot) gašenja fluorescencije proteina na tri temperature (**B**). Dijagram sa podacima za gašenje fluorescencije proteina za određivanje konstante vezivanja (asocijacije) i procene broja vezivnih mesta na proteinu za ligand na 37°C (**C**). Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri HHb-a (4 μM) sa (**D**) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Trp) i sa (**E**) $\Delta\lambda$ od 60 nm (Tyr), u prisustvu rastućih koncentracija Ser (0–28 μM za, redom, krive **a** do **h**). van't Hoff-ov dijagram vezivanja Ser za 4 μM HHb za izračunavanje termodinamičkih parametara vezivanja liganda (**F**). Za sve dijagrame, svaka tačka sa podacima predstavlja srednju vrednost iz tri određivanja, dok su njihove standardne označene vertikalnim stubićima (engl. error bars).

Svi ovi rezultati sugerišu da antipsihotici interaguju sa hemoglobinom čoveka, te da je gašenje fluorescencije proteina posledica obrazovanja (specifičnog) kompleksa protein–lek(ovi). S obzirom da ostatak β -37Trp presudno doprinosi unutrašnjoj (sopstvenoj) fluorescenciji humanog hemoglobina, promene u intenzitetu (negde i talasnoj dužini emisionog pika) proteinske fluorescencije upućuju da bi mesto vezivanja antipsihotika moglo biti u blizini (kritičnog) β -37 Trp ostatka na molekulu proteina (**Dohare et al., 2020**).

Stern-Volmerovi dijagrami za različite HHH–antipsihotik sisteme na tri različite temperature (**odjeljak 3.3.1.**) u osnovi su linearni za koncentracije lekova do 28 μ M (**slike 22–24B**). Ovakav rezultat implicira da dolazi samo do jednog tipa gašenja fluorescencije (statičkog ili dinamičkog) tokom interakcija hemoglobina sa lekovima. Kod statičkog gašenja do formiranja kompleksa protein–ligand dolazi samo u osnovnom stanju. Nasuprot tome, dinamički kvenčing je rezultat formiranja kompleksa između liganda i proteina u pobuđenom stanju fluorofora. Izračunate K_{SV} vrednosti (**odjeljak 3.3.3.1.**) u ispitanim protein–ligand sistemima bile su reda veličine 10^3 M^{-1} (**tabela 1**), što znači da je smanjenje fluorescencije hemoglobina zaista posledica vezivanja liganda (antipsihotika). Dalje, na osnovu podataka iz **tabele 1**, tj. iz varijacija K_{SV} vrednosti u zavisnosti od temperature, proizilazi da je moguće okarakterisati preferencijalni mehanizam gašenja fluorescencije molekula hemoglobina u prisustvu sva tri leka kao *statički*. Naime, vrednosti Stern-Volmerovih konstanti su se, bez izuzetka, smanjivale sa porastom temperature, usled formiranja nefluorescentnog supramolekulskog kompleksa u osnovnom stanju (**Lakowicz, 2006**).

Izračunate vrednosti za K_q (bimolekulsku konstantu kvenčovanja) za vezivanje tri antipsihotika za humani hemoglobin bile su reda veličine $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**tabela 3**), što prevazilazi vrednost od $2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a to je najveća moguća vrednost za K_q u dinamičkom kvenčovanju fluorescencije proteina (**Ware, 1962**). Ovaj rezultat je zato još jedan nedvosmislen dokaz da opisano gašenje fluorescencije humanog hemoglobina nije bilo kontrolisano difuzijom i da nije poticalo od dinamičkog gašenja. Istovetan nalaz je dobijen u svim skorašnjih studijama koje su ispitivale vezivanje različitih lekova za komercijalni humani hemoglobin (**Dohare et al., 2020; Cheng et al., 2021; Tunç et al., 2013a; Tunç et al., 2013b; Maurya et al., 2018**; detaljnije kasnije), u smislu da je u svim radovima vezivanje testiranih lekova okarakterisano kao statičko.

Tabela 3. Parametri gašenja fluorescencije (kvenčinga) za interakcije atipičnih antipsihotika sa hemoglobinom čoveka na tri ispitivane temperature.

Ligand	T (K)	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	R^2	$K_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
Clozapine	298,15	$2,22 \times 10^3$	0,9958	$2,22 \times 10^{11}$
	303,15	$2,01 \times 10^3$	0,9957	$2,01 \times 10^{11}$
	310,15	$1,84 \times 10^3$	0,9952	$1,84 \times 10^{11}$
Ziprasidone	298,15	$0,67 \times 10^3$	0,9956	$0,67 \times 10^{11}$
	303,15	$0,62 \times 10^3$	0,9957	$0,62 \times 10^{11}$
	310,15	$0,55 \times 10^3$	0,9970	$0,55 \times 10^{11}$
Sertindole	298,15	$2,71 \times 10^3$	0,9981	$2,71 \times 10^{11}$
	303,15	$2,29 \times 10^3$	0,9957	$2,29 \times 10^{11}$
	310,15	$1,16 \times 10^3$	0,9911	$1,16 \times 10^{11}$

K_{sv} , Stern-Volmerova (SV) konstanta gašenja; R^2 , linearni koeficijent korelacije za SV dijagrame; K_q , bimolekulsku konstanta gašenja. Standardne devijacije za sve parametre ($n=3$) bile su manje od 5% njihovih srednjih vrednosti.

4.2.2. Karakterizacija vezivanja antipsihotika i humanog hemoglobina

Standardni parametri koji karakterišu interakcije između nekog proteina i njegovih liganada su snaga vezivanja (konstanta asocijacije ili disocijacije liganda za ili sa svog vezivnog ili vezivnih mesta) i broj ligand-vezujućih mesta na makromolekulu proteina. Posmatrajući jednačinu **9** (**odjeljak 3.3.3.1.**) kao izraz koji opisuje jednačinu prave (linije), vrednosti za vezujuću konstantu " K_a " i broj vezivnih mesta " n " za vezivanje klozapina, ziprazidona i sertindola za molekul HHb, unutar

primenjenog opsega koncentracija interagujućih vrsta, dobijene su, redom, iz odsečka i nagiba dvostruko-recipročnih dijagrama koji su prikazani na **slikama 22–24C**.

U **tabeli 4** su prikazani dobijeni podaci koji opisuju vezivanje antipsihotika za molekul hemoglobina čoveka. Trend smanjenja vrednosti za K_a sa povećanjem temperature za sve leka, iako međusobne razlike nisu velike (**tabela 4**), u saglasnosti je sa gore spomenutim statičkim mehanizmom gašenja fluorescencije proteina. Ovi ligandi se reverzibilno vezuju za hemoglobin, sa *osrednjim* afinitetom za proteinskog partnera, s obzirom da su konstante vezivanja od 1 do $15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Jakim vezivanjem se smatraju interakcije sa konstantama reda veličine 10^6 M^{-1} i više (**Dufour & Dangles, 2005; Nedić et al., 2023**). Prema tome, K_a vrednosti dobijene u ovoj disertaciji ukazuju da je vezivanje između klopazina (K_a od $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) ili sertindola (K_a od $1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) i hemoglobina čoveka umerenog intenziteta.

Umereno vezivanje ovih lekova znači da bi oni mogli da se skladište i transportuju putem molekula hemoglobina kroz telo čoveka, s obzirom na visok sadržaj ovog transportnog proteina u crvenim krvnim zrnima od (okvirno) 330 mg/mL (**Undeland et al., 2004**). U poređenju sa drugim lekovima, dobijene konstante vezivanja su uporedive sa onima za anti-mitotski hemioterapeutski agens docetaksel ($3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) (**Cheng et al., 2011**), sintetički anelgetik tramadol ($1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) (**Tunç et al., 2013a**), kao i antimalarik hlorokin ($1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) (**Tunç et al., 2013b**). One su (nešto) niže od onih dobijenih za komercijalni hemoglobin čoveka i nesteroidni anti-inflamatorni lek diklofenak ($5,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) (**Dohare et al., 2020**). Nađene konstante vezivanja ziprazidona za HHb bile su konzistentno (na sve tri temperature) niže, reda veličine od (samo) 10^3 M^{-1} (**tabela 2**). Dobijene vrednosti su slične onima za vezivanje anelgetika i antipiretika acetaminofena (poznatijeg kao paracetamol) za hemoglobin: $6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (na 37°C), vrednosti dobijene kalorimetrijom sa izolovanim proteinom (**Seal et al., 2017**), no ipak većom nego onih zabeleženih za amfilne lekove prometazin ($2,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) i adifenin ($3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ na 37°C) (**Maurya et al., 2018**).

Dobijene vrednosti za (procenjeni) broj vezivnih mesta (n) na proteinu za analizirane antipsihotike su bile bliske jedinici za sva tri sistema i na sve tri temperature (**tabela 4**), kao indikacija postojanja *jednog* vezivnog mesta na hemoglobinu za ove lekove, u okolini jednog ili više ostataka triptofana, identično kao u svim (u ovom odeljku) navedenim studijama interakcija humanog hemoglobina i lekova.

4.2.3. Sinhrona fluorescencija rastvora hemoglobina i atipičnih antipsihotika

Sinhrona fluorescentna spektroskopija proteina daje informacije o molekulskom okruženju u blizini fluorofora (ostaci triptofana i tirozina). Ona podrazumeva istovremeno skeniranje i ekscitacionog (pobuđujućeg) i emisionog monohromatora uz održavanje konstantnog intervala talasne dužine ($\Delta\lambda$) između njih. Pomeranje pika emisionog maksimuma odražava promene u polarnosti oko molekula fluorofora (**Miller, 1979**). Sinhroni fluorescentni spektri rastvora HHb sa dodatkom različite količine antipsihotika su prikazani na **slikama 22–24D** ($\Delta\lambda$ je stabilizovana na 60 nm , dajući karakteristične podatke za Trp ostatke) i na **slikama 22–24E** ($\Delta\lambda$ od 15 nm za Tyr ostatke). Sa slika je uočljivo da fluorescentni intenzitet rastvora HHb ($4 \mu\text{M}$) opada sa dodatkom sve veće i veće količine sva tri leka, dalje potvrđujući pojavu gašenja fluorescencije u procesu vezivanja liganada za protein.

Prema očekivanju, s obzirom na sastav fluorofora u molekulu hemoglobina čoveka, doprinos Trp fluorofora (ukupan intenzitet signala na slikama) na unutrašnju fluorescenciju molekula proteina bio je znatno veći. Međutim, doprinos fluorofora gašenju proteinskog signala (relativno smanjenje intenziteta fluorescencije hemoglobina) u prisustvu antipsihotika bio je različit. Molekuli klopazina više su uticali na fluorescentni signal koji potiče od ostataka Tyr nego ostataka Trp (**slika 22E vs. slika 22D**). Nasuprot tome, nađeno je veće smanjenje intenziteta signala od ostataka Trp u poređenju sa onima koji potiče od ostataka Tyr u HHb sa sertindolom (**slika 24D vs. slika 24E**). Konačno, podaci pokazuju da gašenje fluorescencije u rastvoru molekula HHb uporedivo potiču od ostataka Trp i Tyr u slučaju vezivanja ziprazidona za protein (**slika 23D vs. slika 23E**). Ovi rezultati, tj. nađeni različiti doprinosi proteinskih fluorofora gašenju fluorescentnog signala HHb u prisustvu svakog od

(vezanih) lekova, upućuje da bi njihova mesta vezivanja za protein mogla da budu različita, što je i pokazano studijom molekuskog dokinga (**odjeljak 4.2.5.**).

Sa slika koje daju sinhronne fluorescentne profile hemoglobina sa ispitivanim lekovima, očigledno je da nema značajnijeg pomeranja talasnih dužina emisionih maksimuma ostataka Tyr fluorofora u kompleksu HHb sa klozapinom (**slika 22E**), ziprazidonom (**slika 23E**) i sertindolom (**slika 24E**) za ispitani opseg koncentracija lekova. Ovaj nalaz sugerise da ovi antipsihotici ne utiču na mikro-okruženje ostataka Tyr u molekulu HHb. Slično tome, čini se da okruženje Trp fluorofora ostaje identično nakon vezivanja klozapina (**slika 22D**) i ziprazidona (**slika 23D**) za protein. Za vezivanje sertindola dobijeni su drugačiji rezultati, konkretno, plavo pomeranje (od 347 na 340 nm) emisionog pika ostataka Trp je uočen u HHb–sertindol kompleksu (**slika 24D**), što ukazuje na povećanje hidrofobnosti (najmanje jednog) Trp ostatka, pri čemu se on premešta u više hidrofobno okruženje, dakle dublje u strukturu proteinske globule. Prema tome, čini se da se konformacija molekula humanog hemoglobina ponešto menja nakon vezivanja sertindola.

4.2.4. Termodinamičko ispitivanje vezivanja antipsihotika za hemoglobin

Znak promene termodinamičkih parametara (veće ili manje od nule) kao što su Gibsova slobodna energija (ΔG), promena entalpije (ΔH) i promena entropije (ΔS) tokom vezivanja liganada za proteine je korisno za određivanje tipa interakcija uključenih u obrazovanje kompleksa između HHb i analiziranog antipsihotika. Zato su kvenčing eksperimenti urađeni na tri različite temperature u cilju utvrđivanja termodinamičkih parametara vezivanja. Iz nagiba (entalpija) i odsečka (entropija) linearnog van't Hoff-ovog dijagrama ($\ln K_a$ vs. $1/T$; **slike 22–24F**), i jednačina **10** i **11** (**odjeljak 3.3.1.1.**), navedeni parametri su izračunati i dati u **tabeli 4**.

Tabela 4. Parametri vezivanja i termodinamički parametri za komplekse humanog hemoglobin i antipsihotika na tri različite temperature.

Ligand	T (K)	$K_a \times 10^4$ (M ⁻¹)	n	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)
Klozapin	298,15	2,19	1,12	-12,2		
	303,15	2,03	1,03	-12,4	+41,0	-12,5
	310,15	1,80	0,97	-12,7		
Ziprazidon	298,15	0,74	1,16	-12,3		
	303,15	0,69	1,08	-12,5	+41,2	-9,8
	310,15	0,63	1,06	-12,8		
Sertindol	298,15	1,81	1,10	-16,9		
	303,15	1,71	1,06	-17,2	+56,8	-7,4
	310,15	1,61	1,03	-17,6		

K_a , konstanta vezivanja (asocijacije); n, broj vezivnih mesta na proteinu; ΔH i ΔS , redom, promene entalpije i entropije vezivanja; ΔG , promena slobodne energije. Standardna devijacija za sve parametre bila je manja od 5% (prikazanih) srednjih vrednosti, dok su linearni koeficijenti korelacije dijagrama za određivanja K_a i n (**slike 22–24C**) bili veći od 0,99.

Za sva tri sistema protein–lek, negativni znak ΔG vrednosti (**tabela 4**) sugerise spontanost procesa molekuskog prepoznavanja na svim temperaturama (**Ross & Subramanian, 1981**). Vrednosti za ΔH bile su sve negativne ($-7,4$ kJ mol⁻¹ za sertindol, $-9,8$ kJ mol⁻¹ za ziprazidon i $-12,5$ kJ mol⁻¹ za klozapin), a vrednosti za ΔS sve pozitivne ($+41,0$ J mol⁻¹ K⁻¹ za klozapin, $+41,2$ J mol⁻¹ K⁻¹ za ziprazidon i $+56,8$ J mol⁻¹ K⁻¹ za sertindol) za tri HHb–ligand sistema.

Negativne vrednosti za promenu entalpije (ΔH) i pozitivne vrednosti za entropijski doprinos ($T\Delta S$) snažno upućuju da je vezivanje antipsihotika za hemoglobin čoveka entropijski vođen egzotermni proces. Dalje, pozitivna promena entropije ukazuje na povećanje neuređenosti HHb–antipsihotik kompleksa u vodi (u odnosu na čist protein), što je dodatna indikacija da hidrofobne sile učestvuju u procesu vezivanja (**Seal et al., 2017**). Negativna promena entalpije vezivanja potvrđuje postojanje vodoničnih veza u procesu nastajanja protein–ligand kompleksa (**Ross & Subramanian,**

1981). Ove pretpostavke su potvrđene analizom rezultata doking studije (sledeći odeljak) i visokom lipofilnošću antipsihotika (log P>3; <https://go.drugbank.com/>).

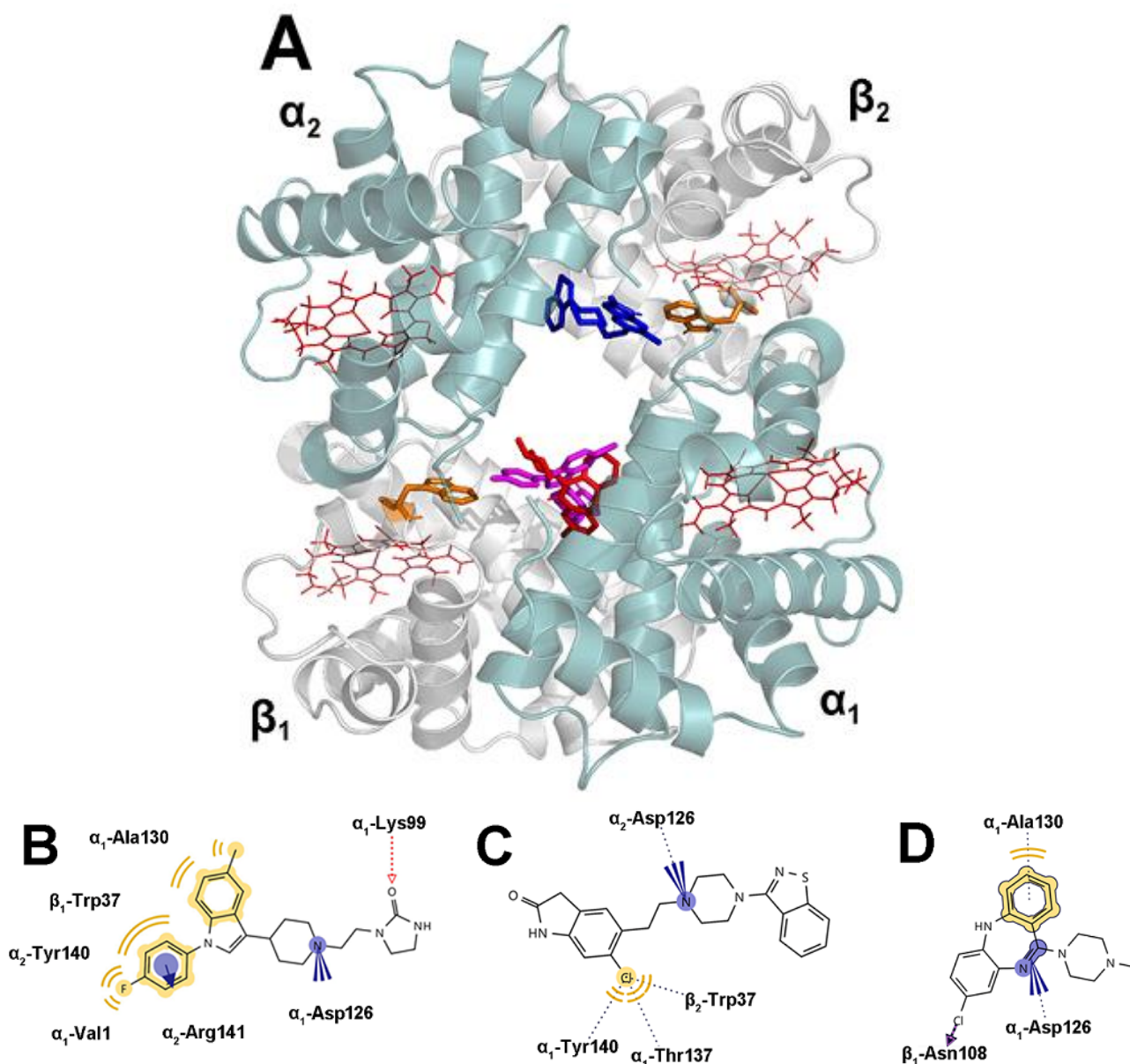
4.2.5. Rezultati doking studije hemoglobina i lekova

Za razliku od humanog serum albumina, najzastupljenijeg transportnog proteina za nepolarne lekove kroz krvotok, koji ima najmanje dva strukturno definisana ligand-vezujuća domena (Greenfield, 2006), jedino centralna šupljina hemoglobinskog tetramera (deo dostupan rastvaraču), koja sadrži funkcionalna mesta za vezivanje alosternih efektora koji olakšavaju smanjenje afiniteta kiseonika za protein (Perutz *et al.*, 1986), vezuje različite ksenobiotike. Prema tipu vezivnog mesta za ligande, izdvojene su dve lokacije u okviru centralne šupljine hemoglobina čoveka: prva, u blizini uglja (dodirne površine) koji obrazuju α_2 and β_1 podjedinica, mesto pogodno za vezivanje negativno naelektrisanih lekova, i druga, blizu α_1 podjedinice, koje teži da veže pozitivno naelektrisane ksenobiotike (Zhang *et al.*, 2009).

Tehnika molekuskog dokinga mnogo se koristi za razumevanje interakcija između proteina i liganada (odeljak 2.4.4.). Rezultati predstavljeni na slici 25 daju uvid u vezivne interakcije tri antipsihotična leka sa centralnim vezujućim mestom u molekulu hemoglobina čoveka. Doking studija je otkrila da se sva tri leka takođe vezuju unutar centralne šupljine proteinskog tetramera, pri čemu klopazipin i sertindol zauzimaju slične vezivne džepove na $\alpha_1\beta_1$ interfejsu, dok se ziprazidon prevashodno smešta u blizini α_2 i β_2 podjedinice (slika 25A). Uprosečeni vezujući doking afiniteti (engl. binding scores) ziprazidona i sertindola za HHb bili su veoma slični (-8.61 vs. -8.57 kcal mol⁻¹), dok je klopazipin pokazao nešto niži afinitet vezivanja (-7.85 kcal mol⁻¹). Ovi rezultati (brojčani podaci) nisu u skladu sa onima dobijenim za vezivanje ovih lekova za HHb koristeći spektrofluorimetriju kao metodu (odeljak 4.2.1.). To i nije iznenađujuće, pošto doking afiniteti ne uzimaju u obzir doprinos entropije energiji vezivanja liganda za protein od interesa. Stoga su oni u saglasju samo sa vezujućim entalpijama dobijenim iz eksperimenata gašenja fluorescencije (tabela 4).

Detaljna analiza vezujućih interakcija otkrila je da sertindol obrazuje nekoliko (energetski) povoljnih hidrofobnih interakcija sa specifičnim amino-kiselinskim ostacima kao što su: α_1 -Ala130, α_2 -Tyr 140, α_1 -Val1 i β_1 -Trp37 (slika 25B). Dodatno, fluorobenzenov prsten sertindola interaguje sa pozitivno naelektrisanim α_2 -Arg141 bočnim lancem. Takođe, atom azota iz piperidinskog prstena formira elektrostatičke interakcije sa α_1 -Asp126, dok karbonilni kiseonik obrazuje vodoničnu vezu sa α_1 -Lys99. Koplanarnost između fluorobenzenovog prstena liganda i indolovog prstena β_1 -Trp37, zajedno sa relativno kratkim rastojanjem između njihovih centroida (od 5,7 Å), ukazuje na mogućnost π - π interakcija koje dopunjuju hidrofobne interakcije između ove dve grupe. Opisani nalazi su u skladu sa primećenim plavim pomerajem u Trp sinhronim fluorescentnim spektrima HHb-a po vezivanju sertindola (slika 24D). Sa druge strane, energetski poželjne interakcije ziprazidona bile bi sa amino-kiselinskim ostacima β_2 -Trp37, α_1 -Thr137 i α_1 -Tyr140, preko supstituenta hlora na dihidro-okso-indolnom prstenu (slika 25C). Ovaj lek gradi i povoljne elektrostatičke interakcije između atoma azota iz piperazinskog jezgra i karboksilne grupe α_2 -Asp126 bočnog ostatka. Nasuprot tome, klopazipin pre svega interaguje sa α_1 -Ala130, β_1 -Asn108 i ostatkom α_1 -Asp126, putem vodoničnih veza, hidrofobnih sila i elektrostatičkih interakcija (slika 25D).

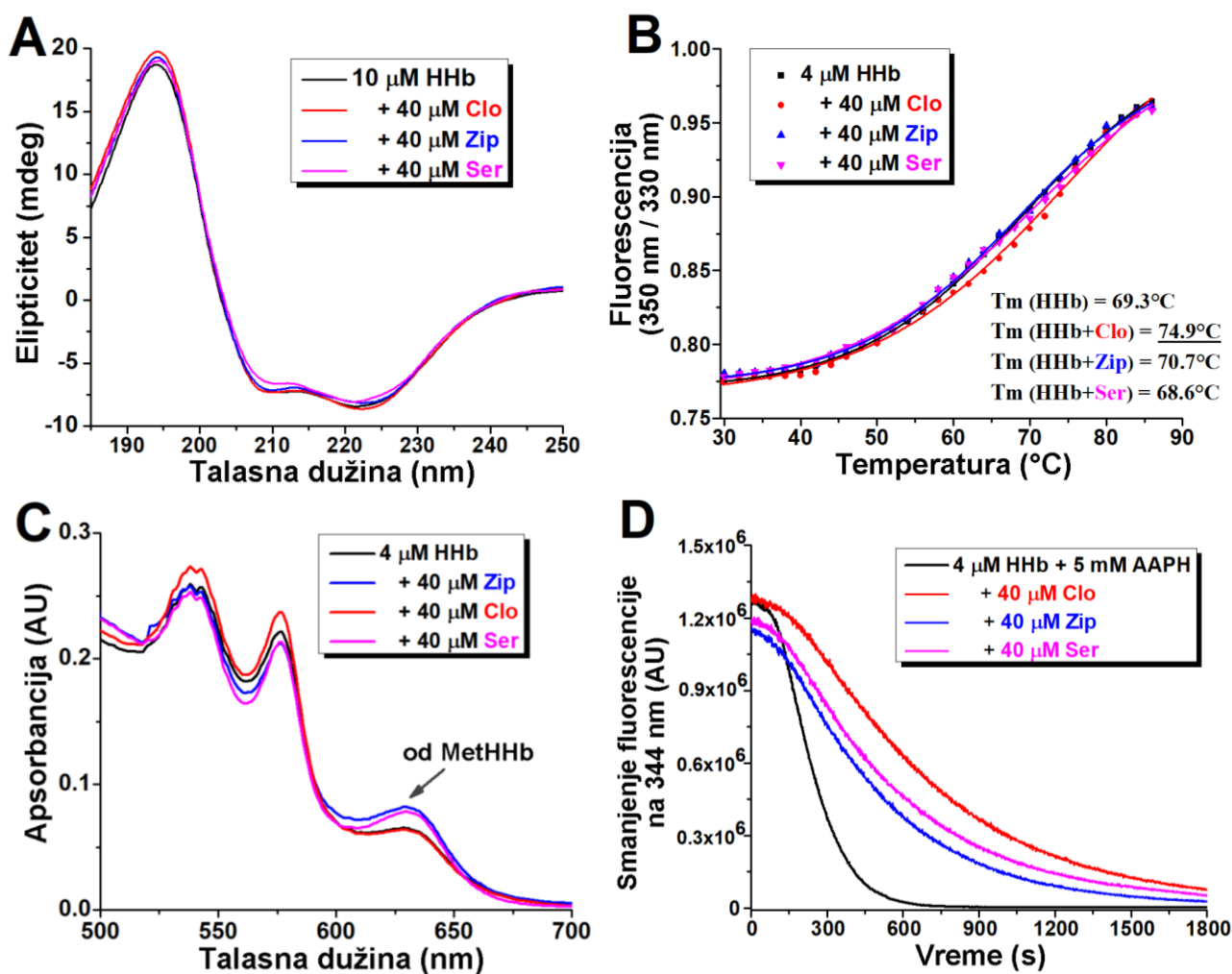
Predstavljeni rezultati molekuskog dokinga, u saglasnosti sa termodinamičkim podacima vezivanja lekova za protein, kao i sinhronim fluorescentnim spektrima, pružaju dragoceni uvid u mehanizme vezivanja lekova sertindola, ziprazidona i klopazipina u centralnu šupljinu HHb tetramera. Naime, doking studija je potvrdila da je hidrofobni efekat, praćen vodoničnim vezama i/ili elektrostatičkim interakcijama, od suštinskog značaja za vezivanje ovih atipičnih antipsihotika za molekul humanog hemoglobina. Za lekove docetaksel (Cheng *et al.*, 2011) i diklofenak (Dohare *et al.*, 2020) takođe je sugerisano da se vezuju za centralnu šupljinu HHb u blizini podjedinice α_1 , dok je za acetaminofen pretpostavljeno mesto vezivanja (takođe na osnovu podataka doking analize) blizu β -Trp37 ostatka (Seal *et al.*, 2017).



Slika 25. Shematska reprezentacija humani hemoglobina (HHb)–antipsihotici udokovanih struktura. Vezujuće poze najniže energije za ziprazidon (obeležen **plavom** bojom), klorzapin (**crven**) i sertindol (**magenta**) unutar centralne šupljine HHb-a (PDB kod: **2D60**). Ostaci Trp37 na β_1 i β_2 podjedinicama su obeleženi naranžastom bojom; slika je prikazana u PyMOL sistemu za vizuelizaciju: <https://pymol.org/2> (A). 2D interakcioni dijagrami za HHb sa sertindolom (B), ziprazidonom (C) i klorzapinom (D); ove slike su pripremljene u LigandScout 4.4 (<https://docs.inteligand.com/ligandscout>).

4.2.6. Analiza cirkularnog dihiroizma spektara hemoglobina

Da bi se utvrdio mogući efekat vezivanja atipičnih antipsihotika na α -helikoidnu (sekundarnu) strukturu humanog hemoglobina, u ovom delu disertacije je iskorišćena metoda cirkularnog dihiroizma (CD) u dalekoj UV oblasti (**odjeljak 2.4.3.**). Rezultati CD merenja (**odjeljak 3.3.2.**) sa i bez dodatka fiksnih koncentracija ispitivanih antipsihotika (molarni odnos proteina prema leku 1:4) prikazani su na **slici 26A**. U skladu sa podacima iz literature, CD spektar HHb u vodenom puferisanom rastvoru imao je karakterističnu traku jakog negativnog elipticiteta sa dva pika (minimuma signala) oko 208 nm i 222 nm, koji se pripisuje tipičnoj α -helikoidnoj strukturi proteina (**Greenfield, 2006**). Negativni pik na oko 208 nm posledica je α -helikoidnih π - π^* prelaza, dok se pik na oko 222 nm pripisuje n - π^* prelazima u okviru i α -heliksa i neuređenih delova (engl. random coil) strukture proteina (**Kelly et al., 2005**).



Slika 26. Efekti vezivanja antipsihotika klozapina (Clo), ziprazidona (Zip) i sertindola (Ser) na strukturu i oksidativnu stabilnost humanog hemoglobina (HHb). Reprezentativni daleki UV-CD spektri komercijalnog HHb u odsustvu i prisustvu testiranih lekova (A). Reprezentativne krive topljenja komercijalnog HHb, sa i bez dodatka antipsihotika, sa obeleženim srednjim vrednostima tački topljenja (T_m , engl. melting point) (B); standardna devijacija bile je manja od 5% srednjih vrednosti. Reprezentativni apsorpcioni spektar izolovanog HHb (čist i sa ligandima) u vidljivoj oblasti elektromagnetnog zračenja (C). Reprezentativne promene u emisionom intenzitetu izolovanog HHb pod uticajem 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorida (AAPH), sa i bez dodatka testiranih lekova (D).

Analiza dobijenih podataka je pokazala da sekundarna struktura korišćenog komercijalnog humanog hemoglobina sadrži 48,2% α -helikoidnih regiona. Hemoglobinski CD spektar pokazao je samo male promene nakon dodatka sva tri liganda (antipsihotika), što ukazuje na minorne efekte vezivanja klozapina, ziprazidona i sertindola na sekundarnu strukturu proteina. Ipak, kako se vidi iz podataka prikazanih u **tabeli 5**, izračunati sadržaj α -heliksa u HHb-u bio je (granično značajno; $p=0.048$) povećan (na 52,2%) u kompleksu sa klozapinom, dok je ostao praktično nepromenjen sa ziprazidonom i sertindolom. Rast sadržaja α -heliksa u strukturi hemoglobin–klozapinskog adukta sugerise nešto uvijeniju sekundarnu strukturu tetramera u odnosu na čist protein, i, zato, kompaktniju konformaciju molekula HHb-a u prisustvu vezanog leka.

Među ostalim ispitivanim lekovima, nađeno je da docetaksel, hlorokin i tramadol snižavaju sadržaj α -heliksa u komercijalnim humanim hemoglobinima, i to, redom, sa 45,3 na 42,8% pri molarnom odnosu HHb:ligand od 1:12 (**Cheng et al., 2021**), sa 35,6 na 31,0% za molarni odnos interagujućih partnera od 1:6 (**Tunç et al., 2013b**) i, konačno, sa 35,4 na 33,7% pri molarnom odnosu protein:lek od 1:2 (**Tunç et al., 2013a**). Jedino je vezivanje diklofenaka izazvalo povećanje stabilnosti α -heliksa, s obzirom na povećanje njihove zastupljenosti od početnih 41,5% na 49,6% u 20-strukom

molarnom višku leka (**Dohare et al., 2020**). Uočene razlike u (veoma) potcenjenom sadržaju α -heliksa u (čistim) rastvorima komercijalnog hemoglobina pre svega mogu da se pripišu različitosti korišćenih preparata proteina. Da je zaista tako pokazuju podaci studije u kojoj je pokazano da je (izračunati) udeo α -heliksa u strukturi sveže izolovanog HHb oko 76%. Inače, udeo sekundarnih struktura ovog hemoglobina čoveka bio je značajno manji nakon vezivanja acetaminofena (paracetamola) (**Seal et al., 2017**).

Tabela 5. Efekti obrazovanja humani hemoglobin (HHb)–antipsihotik kompleksa na odabrane parametre vezane za strukturu proteina.

Uzorci i praćeni parametri	Sadržaj α -heliksa (%)	Sadržaj met-HHb (%)	Zaštita od oksidacije (AU)
Kontrolni HHb (4 μ M)	48,2 \pm 0,7	3,96 \pm 0,20	1 (za poređenje)
+ klopazin (10 μ M)	52,2 \pm 0,5 ^a	3,86 \pm 0,23	118 \pm 4,1
+ ziprazidon (10 μ M)	50,2 \pm 0,6	5,32 \pm 0,27 ^c	78 \pm 3,2
+ sertindol (10 μ M)	49,9 \pm 1,0	5,14 \pm 0,42 ^b	60 \pm 2,8

Statistički različito od kontrolnih vrednosti: **a** - $p < 0.05$; **b** - $p < 0.01$; **c** - $p < 0.001$. Met-HHb: oksidovani, ferihemoglobin; AU: arbitrarne jedinice.

4.2.7. Efekat atipičnih antipsihotika na termalnu stabilnost hemoglobina

Testovi termičkog pomeranja (engl. thermal-shift assays) korisna su dopuna proučavanju ukupne stabilnosti proteina *per se* i za ispitivanja biohemijskih posledica delovanja lekova. Termalno ponašanje HHb izučeno je u odsustvu i prisustvu ispitivanih lekova prateći proces razvijanja (denaturacije) proteina, uz pomoć (emisione) fluorimetrije u opsegu temperatura 30–85°C (**odjeljak 3.3.1**). Relativna koncentracija hemoglobina prema svakom antipsihotiku fiksirana je u molarnom odnosu 1:10 (lek u višku). Temperatura topljenja proteina izračunata je iz (odgovarajuće) krive denaturacije hemoglobina pod uticajem temperature, kao vrednost (T_m , engl. melting point) srednje tačke prelaza (**slika 26B**).

Dobijena vrednost za tačku topljenja intaktnog komercijalnog HHb (pod primenjenim uslovima eksperimenta) bila je 69,3°C, uporediva sa rezultatima koje se dobijaju metodom CD spektrometrije (**Stadler et al., 2012**). U prisustvu vezanog klopazina, T_m vrednost je porasla na 74,9°C, dok je suštinski ostala nepromenjena u kompleksima hemoglobina čoveka sa ziprazidonom (70,7%) i sertindolom (68,6%). Ovi rezultati potvrđuju građenje antipsihotici–protein kompleksa, kao i stabilišući efekat vezivanja klopazina (videti nalaze CD studije, prethodni odeljak) na više nivoe strukture proteina, te da ziprazidon i sertindol suštinski ne utiču (barem) na apoproteinski deo tetramerne strukture hemoglobina.

4.2.8. Efekat atipičnih antipsihotika na spontanu oksidaciju hemoglobina

Hemoglobin (sa vezanim kiseonikom) spontano oksiduje do met-hemoglobina (met-Hb) (**odjeljak 2.3.3**), uz nastajanje superoksida (slobodni radikal poreklom od molekuskog kiseonika). Mehanizam ovog procesa povezan je sa interakcijama na distalnoj strani molekula hema u proteinu, što olakšava nukleofilno izmeštanje kiseonika ostatkom histidina (**Levy et al., 1990**). Apsorpciona spektroskopija u vidljivom (VIS) delu elektromagnetnog zračenja pogodan je alat za ispitivanje strukturnih promena obojenih proteina i njihove kompleksacije sa ligandima (**odjeljak 2.4.1**). Dva regiona unutar standardnog VIS spektra hemoglobina čoveka su od značaja za ova razmatranja. Prvi je Soretova traka (B traka), od čvrsto vezanog hem-gvožđe-porfirin kompleksa (prostetična grupa u strukturi hemoglobina) sa maksimumom apsorpcije oko 415 nm. Drugi region je Q traka, povezana saoksi- i dezoksi- oblicima hema na 550–600 nm. Nastajanje met-HHb praćeno je pojavom novog, malog apsorpcionog pika sa maksimumom na oko 630 nm (**Szebeni et al., 1984**).

Na **slici 26C** prikazana su odstupanja u VIS apsorpcionim spektrima izolovanog (čistog) HHb nakon produžene inkubacije sa antipsihoticima. Izračunate vrednosti za sadržaj met-hemoglobina deo su **tabele 5**. Sa slike se vidi da ziprazidon i sertindol u 10-strukom molarnom višku (u odnosu na

protein) blago, ali značajno ($p < 0,01$) povećavaju količinu met-HHb nastalog pod primenjenim eksperimentalnim uslovima (**odjeljak 3.3.3.**). Dva su moguća objašnjenja ovog nalaza: (i) oba leka imaju po jedan kiseli atom vodonika u svojoj strukturi, koji učestvuje u oksidacionom procesu i tako povećava brzinu oksidacije, ili (ii) ziprazidon i sertindol modifikuju strukturu hemoglobina na način koji vodi povećanju brzine oksidacije, ili obe navedene mogućnosti. Dodatak klozapina u reakcionu smešu niti je značajno ubrzao, niti je sprečio nastajanje oksidovanog hemoglobina, sudeći prema apsorpcionom hemoglobinskom profilu u oblasti talasnih dužina gde met-forma proteina apsorbuje svetlost (**slika 26C**), kao i nešto smanjenom sadržaju oksidovanog proteina (**tabela 5**). Zaštitni efekat klozapina na auto-oksidaciju molekula hemoglobina čoveka, u poređenju sa (potencijalno štetnim) uticajem sertindola i posebno ziprazidona, mogao bi biti posledica: (i) utvrđene dodatne stabilizacije sekundarne strukture proteina (**slika 26B i tabela 5**), što usporava inicijaciju auto-katalitičkog koraka u procesu obrazovanja met-HHb-a, ili, (ii) antioksidativne aktivnosti klozapina, uključujući neutralisanje slobodno-radikalnih vrsta (**Dalla Libera et al., 1998; Caruso et al., 2020**).

Hemoglobin je polifunkcionalni molekul, uključen u biohemijske procese i van svoje glavne fiziološke uloge transporta kiseonika (gasova): katalitička uloga ("počasni" enzim), učesće u metabolizmu azot(II)-oksida, metaboličko reprogramiranje, uloge u održanju redoks-ravnoteže i regulacije pH krvi (**Kosmachevskaya & Topunov, 2018**). Zbog toga bi svaka značajnija promena u aktivnom centru proteina (gvožđe-protoporfirin IX prostetična grupa) mogla da utiče na opštu homeostazu tela čoveka. Međutim, s obzirom na niske koncentracije ziprazidona (~100 ng/mL) (**Vogel et al., 2009**) i sertindola (~10 ng/mL) (**Juruena et al., 2011**) u plazmi hronično tretiranih pacijenata, kao i njihovu relativno nisku konstantu vezivanja za obilno zastupljen molekul hemoglobina, pokazani *in vitro* pro-oksidativni efekat ova dva leka ne bi trebalo da u većoj meri ima štetne fiziološke konsekvence.

4.2.9. Efekat atipičnih antipsihotika na oksidansima-potpomognutu oksidaciju hemoglobina

Oksidativna oštećenja izazvana prekomernim stvaranjem i/ili nagomilavanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, reactive oxygen species) mogu da devastiraju strukturu i aktivnost proteina. Zajedno sa nusproizvodima metabolizma kiseonika, stresori iz životne sredine i neki ksenobiotici (npr. anti-neoplastični lekovi) umnogome povećavaju nastajanje ROS-a (**Pizzino et al., 2017**). Hidrofilni pokretači nastajanja slobodnih radikala, kao što je molekul AAPH, podesni su analitički reagensi za procenu oksidativne stabilnosti bioaktivnih molekula (**Betigeri et al., 2005**). Sposobnost antipsihotika da zaštite elemente strukture izolovanog HHb od oksidacije ispitana je praćenjem smanjenja unutrašnje fluorescencije proteina u vremenu, izazvanog oksidativnim delovanjem AAPH molekula. Dobijeni fluorescentni spektri su prikazani na **slici 26D**, a izračunati zaštitni efekat svakoga antipsihotika (koji odgovara razlici u površinama ispod krivih u prisustvu i odsustvu leka, izražen u arbitrarnim jedinicama), pod primenjenim uslovima eksperimenta (**odjeljak 3.3.3.**), prikazan je kao deo **tabele 5**.

Iz dobijenih rezultata je očigledno da je čist humani hemoglobin podložan oksidaciji, s obzirom na brzo i značajno smanjenje intenziteta fluorescencije proteina, kao i da dodatak sva tri antipsihotika u 10-strukom molarnom višku značajno usporava ovaj proces (**slika 26D**). Efekat lekova na smanjenje signala proteina delovanjem oksidansa bio je različit: nađeno je da klozapin najviše odlaže AAPH-izazvanu oksidaciju molekula HHb-a, praćen ziprazidonom, a potom sertindolom (**tabela 5**). Prema tome, svi lekovi, a pre svega klozapin, su pokazali solidna do dobra antioksidativna svojstva i zavidnu zaštitnu aktivnost u sprečavanju oksidacije hemoglobina.

Rezultat da je vezani klozapin najviše pozitivno uticao na oksidativnu stabilnost molekula hemoglobina nije iznenađenje. Njegova snažna antioksidativna svojstva (u različitim *in vitro* model sistemima) dobro su poznata (**Brinholi et al., 2016**), kao i slični protektivni efekti na proteine plazme kao što su fibrinogen (**Gligorijević et al., 2020**) i α -2-makroglobulin (**Šunderić et al., 2021**). Predložene terapijske koncentracije klozapina u plazmi (300 do 700 ng/mL) (**Chang et al., 1997**) znatno su veće od odgovarajućih vrednosti za ziprazidon i sertindol. Prema tome, klozapin bi zapravo mogao da smanji oksidaciju svih ovih (i drugih) proteina *in vivo*. Svi lekovi pokazuju štetne efekte,

koji izuzetno mogu biti i opasni po život pacijenata. To su i krvne diskrazije (nenormalni sastav), agranulocitoza i granulocitopenija, koje se sve povezuju sa korišćenjem klozapina kao terapijskog sredstva (Miller *et al.*, 2000). Svi rezultati iz ove disertacije upućuju da klozapin pokazuje samo *pozitivne* benefite kompleksacije sa humanim hemoglobinom, proteinom bez čije evolucije život kakav poznajemo ne bi bio moguć.

4.3. Humani eritrociti i antipsihotici klozapin, ziprazidon i sertindol: prijatelji ili ne?

U poslednjem delu ovog poglavlja, ukratko su prikazani i prodiskutovani rezultati dobijeni u eksperimentima u kojima je ispitan eventualni uticaj klozapina, sertindila i ziprazidona na fluidnost membrane i stepen hemolize eritrocita u prisustvu ovih lekova, a uz dodatak generatora slobodnih radikala kakav je 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid (AAPH).

4.3.1. Efekat atipičnih antipsihotika na membranu eritrocita

Eritrociti izolovani iz sveže krvi zdravih donora obeleženi su paramagnetnim membranskim spin probama: 5-doksil stearatom (5-DS) i 16-doksil stearatom (16-DS). Nakon inkubiranja sa aktivnim supstancama lekova (100 μM), snimljeni su EPR spektri kontrolnih i tretiranih uzoraka (odjeljak 3.4.1.). Na osnovu dobijenih podataka, izračunat je S, parametar uređenosti membrane, i parametar τ , rotaciono korelaciono vreme (formule date na slici 27), koji se koriste za procenu da li je uticaj ispitivane supstance na fluidnost membrane eritrocita statistički značajan. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 6, a izgled reprezentativnih EPR zapisa na slici 27 (sledeća strana).

Tabela 6. Određivanja parametara uređenosti spin probe (S) i rotacionog korelacionog vremena (τ) u membrani humanih eritrocita tretiranih antipsihoticima.

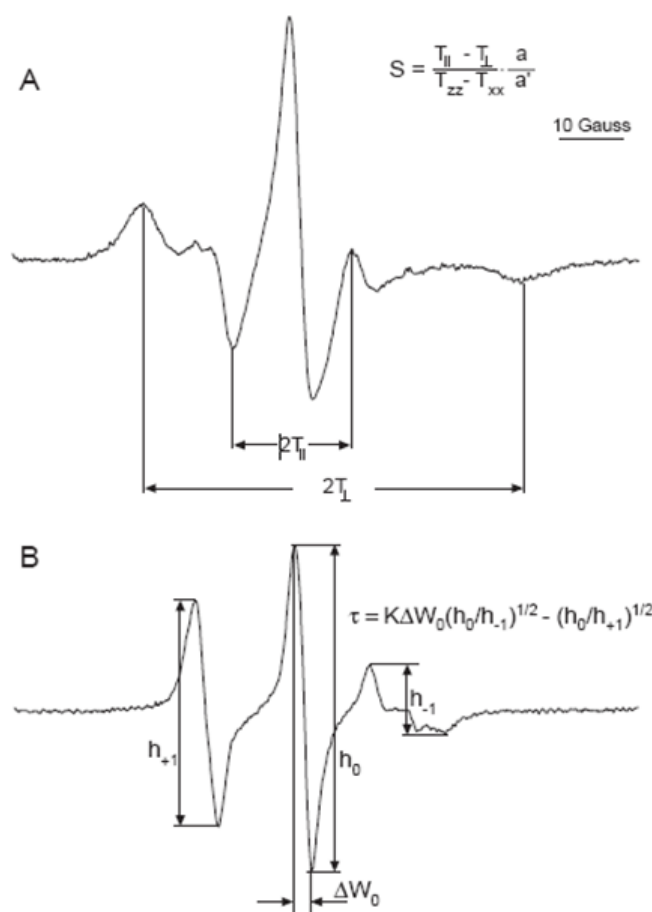
Lek	Parametar S	Parametar τ
Kontrola	0,712 \pm 0,002	17,546 \pm 0,367
Klozapin	0,707 \pm 0,006	17,776 \pm 0,750
Sertindol	0,708 \pm 0,002	17,715 \pm 0,577
Ziprazidon	0,703 \pm 0,003*	18,186 \pm 0,421*

Napomene: S, parametar uređenosti eritrocita obeleženih spin probom 5-DS; τ , korelaciona vremena eritrocita obeleženih spin probom 16-DS. Eritrociti su preinkubirani sa navedenim atipičnim antipsihoticima (100 μM). Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=4); * označava statistički značajnu razliku (ANOVA test) u odnosu na kontrolu (p<0,05).

Iz podataka u tabeli 6 proizilazi da ispitani atipični antipsihotici nemaju značajniji efekat na fluidnost membrane eritrocita čoveka, pogotovu ako se uporede sa onima iz jetre koji su posledica (hroničnog) tretmana pacova ovim psihofarmacima. Parametar uređenosti membrane (S) statistički je bio značajno različit (*smanjen*) samo u uzorcima tretiranim ziprazidonom (p=0,029). U istom uzorku i drugi ispitivani parametar (τ , rotaciono korelaciono vreme) razlikovao se u odnosu na kontrolu: tretman suspenzije eritrocita sa 100 μM ziprazidona sasvim blago *povećava* τ , s obzirom da je statistička razlika (p=0,046) bila granično značajna (p<0,05). Razlika u vrednostima oba ispitana parametra u uzorcima dobijenim preinkubiranjem (membrane) eritrocita sa klozapinom i ziprazidonom nije bilo (tabela 6).

Pošto su vrednosti za S (parametar za procenu fluidnosti hidrofilne površine membrane) i τ (parametar za procenu fluidnosti hidrofobne unutrašnjosti membrane) obrnuto proporcionalne membranskoj fluidnosti, rezultati EPR studije sugerišu da bi ziprazidon mogao da se ugrađuje u membranu humanih eritrocita *in vivo*, povećavajući njenu fluidnost u površinskim, a smanjujući fluidnost u unutrašnjim regionima. Dva druga atipična antipsihotika (klozapin i ziprazidon), barem u (primenjenoj) koncentraciji od 100 μM , ne utiču na fluidnost membrane eritrocita.

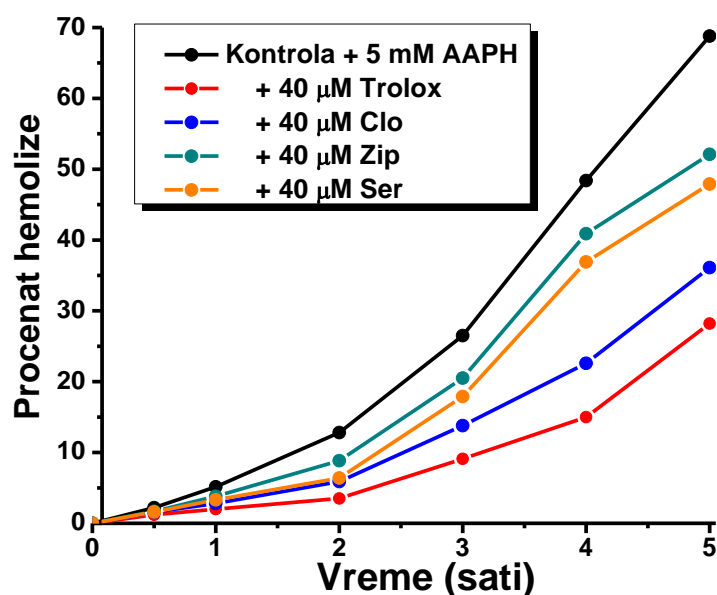
Fluidnost membrane eritrocita uslovljava ne samo reološke karakteristike ovih ćelija krvi, već i dinamičke kvalitete, izmenjene u nekim patofiziološkim stanjima (Ajdžanović *et al.*, 2011). Stoga bi dobijeni rezultati u ovom radu, koje bi trebalo potvrditi na većem broju ispitanika (i sa varijabilnim koncentracijama lekova), ukazivao da bi ziprazidon mogao da utiče na funkcionalnost ćelija u sistemske cirkulaciji. Pretpostavljeno je da bi interkalacija (umetanje) antipsihotika u membranske fosfolipide mogla da bude jedan od načina njihovih delovanja: klopazipin i ziprazidon, uz 14 drugih jedinjenja iz ove klase lekova, bili su deo ove studije (Oruch *et al.*, 2010). Hlorpromazin, antipsihotik prve generacije, povećava membransku permeabilnost i fluidnost plazmine membrane u mozgu pacova, ukazujući na ulogu poremećaja u organizaciji membrana u mehanizmu njihove destabilizacije izazvane antipsihotičnim lekovima (Maruoka *et al.*, 2007). Dalje, metaboliti haloperidola (takođe tipični antipsihotik) pokazali su veću sposobnost da izazovu oštećena membrane mozga pacova nego parentalni lek, što bi delimično moglo da objasni ekstrapiramidalne štetne efekte haloperidola (Murata *et al.*, 2007).



Slika 27. Karakteristike EPR spektara eritrocita čoveka obeleženih spin probama 5-DS (A) i 16-DS (B). **A:** S , parametar uređenosti; $2T_{\parallel}$, spoljašnje superfino cepanje (engl. outer hyperfine splitting); $2T_{\perp}$, unutrašnje superfino cepanje (engl. inner hyperfine splitting); a , izotropna superfina kupljuća konstanta (engl. isotropic hyperfine coupling constant) u kristalu ($a=1/3(T_{xx}+T_{yy}+T_{zz})$); a' , izotropna superfina kupljuća konstanta (engl. isotropic hyperfine coupling constant) u membrani ($a'=1/3(T_{\parallel}+2T_{\perp})$); T_{xx} , T_{yy} , and T_{zz} , superfine (engl. hyperfine) konstante: za 5-DS je uzeto da je $T_{xx}=T_{yy}=6.1$ G i $T_{zz}=32.4$ G, a za 16-DS, $T_{xx}=6.26$ G, $T_{yy}=5.81$ G i $T_{zz}=33.46$ G (Ajdžanović *et al.*, 2011). **B:** Korelaciono vreme τ opisuje kretanje probe u pravcu koji je normalan na dužu osu probe; h_{+1} je linija visine niskog polja (engl. low-field line height); h_0 je linija visine srednjeg polja (engl. mid-field line height); h_{-1} je linija visine visokog polja (high-field line height); ΔW je linija širine srednjeg polja (engl. mid-field line width), sve u Gausima (G); $K=6.35 \times 10^{-10}$ s/G.

4.3.2. Efekat atipičnih antipsihotika na oksidansima-potpomognutu oksidaciju hemoglobina

Zaštitni efekti prisustva klozapina, serindola i ziprazidona na slobodnim radikalima izazvanu hemolizu eritrocita ispitan je nakon inkubiranja ćelija u izotonom PBS puferu sa lekovima uz dodatak AAPH (odjeljak 3.4.2.). AAPH je u vodi rastvorni mali azo molekul koji se često koristi u proučavanju peroksidacije lipida i za karakterizaciju antioksidanasa. Razgradnjom AAPH nastaje jedan mol azotovih i dva mola ugljenikovih radikala. Ugljenikovi radikali se međusobno spajaju, dajući stabilne proizvode ili reaguju sa molekulskim kiseonikom stvarajući peroksilne radikale ($\text{ROO}\cdot$), što održava stalnu brzinu proizvodnje slobodnih radikala u rastvoru (Noguchi *et al.*, 1998). Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na slici 28.



Slika 28. Zavisnost procenta hemolize od vremena inkubiranja eritrocita čoveka sa naznačenim koncentracijama atipičnih antipsihotika (ili standardnog antioksidansa Trolox-a) u prisustvu snažnog oksidansa AAPH. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti iz četiri nezavisna eksperimenta. Clo, klozapin, Zip, ziprazidon, Ser, sertindol, AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid.

Sa **slike 28** je uočljivo da stepen hemolize raste sa vremenom izlaganja oksidansu kod svih uzoraka, no da postoje značajne razlike u vrednostima između lekova u odnosu na kontrolu. Očekivano, najveći porast hemolize je zabeležen u kontrolnom uzorku (čitavih 70% nakon 5 sati), najmanji u suspenziji eritrocita sa Trolox-om (blizu 30% na kraju perioda inkubacije sa AAPH). U saglasju sa sličnim eksperimentom na humanom hemoglobinu (odjeljak 4.2.9.), klozapin je pokazao najbolji zaštitni efekat na slobodnim radikalima izazvanu hemolizu (oko 35% nakon 5 sati). Takođe, i antioksidativna aktivnost druga dva antipsihotika (sertindol i ziprazidon) odlaže hemolizu u oksidativnom okruženju eritrocita (oko 50% za 5 sati), samo u manjoj meri u odnosu na klozapin.

Opisani rezultati pokazuju da bi sva tri atipična antipsihotika, pre svega klozapin, mogla da štite biološke strukture (ćelije i makromolekule) *in vivo*, u pro-oksidativnom okruženju u kome bi mogle da se nađu (na primer u uslovima oksidativnog stresa), zahvaljujući svojoj radikal-neutrališućoj aktivnosti.

5. Zaključci

U okviru ove doktorske disertacije ispitan je učinak tri sintetička komercijalna antipsihotika druge generacije: klopapina (Clo, triciklički dibenzo-diazepin), sertindola (Ser, derivat fenil-indola) i ziprazidona (Zip, derivat benzotiazolil-piperazina) na jetru, hemoglobin i eritrocite. Polazni biološki materijali bili su: (i) tkivo i ćelije jetre pacova hronično (tokom 28 dana) tretiranih navedenim psihofarmacima (*in vivo* efekti delovanja lekova); (ii) komercijalni, ili iz pune krvi izolovani humani hemoglobin (HHb), tretiran klopapinom, sertindolom i ziprazidonom (*in vitro* efekti lekova); (iii) suspenzija eritrocita čoveka tretiranih ovim jedinjenjima (*ex vivo* efekti lekova), sa odgovarajućim kontrolnim (netretiranim) uzorcima. Za ova ispitivanja su korišćene standardne metode proteinske biohemije i histopatoloških analiza.

Iz dobijenih rezultata, prikazanih, opisanih i prodiskutovanih u **poglavlju 4**, mogu da se izvedu sledeći (opšti) zaključci:

1. Efekti atipičnih antipsihotika na jetru pacova: sva tri psihofarmaka su uticali na zaštitni antioksidativni enzimski sistem i doveli do histopatoloških promena u jetri pacova.

1.1. Svakodnevni tretman klopapinom, sertindolom i ziprazidonom, u dozama koje odgovaraju onima koje se daju ljudima sa psihozama, doveo je do promena u aktivnosti ili koncentraciji svih ključnih antioksidativnih enzima hepatocita. Od tri analizirana leka, **klopapin** je doveo do najizraženijih promena: specifična aktivnost SOD1, SOD2, GR i GST, kao i nivo GPx i GR enzima bio je značajno *veći* u poređenju sa kontrolnom (netretiranom) grupom životinja. Posebno izražena promena bila je i *smanjena* aktivnost katalaze u *svim* grupama pacova tretiranim antipsihoticima, tj. kao jedna od posledica delovanja klopapina, sertindola i ziprazidona (i/ili njihovih metabolita), zbog čega može da se zaključi da dolazi do *nagomilavanja* reaktivnih vrsta poreklom od molekuskog kiseonika u hepatocitima.

1.2. Odabrani atipični antipsihotici, za analizu njihovih plejotropnih efekata, izazvali su blage do umerene histopatološke promene u jetri, koje bi mogle da se pripisuju oksidativnom stresu spregnutim sa unošenjem lekova u telo životinja. Najuočljivije ovakve manifestacije bile su tzv. regenerativne promene u tkivu jetre (anizocitoza, anizonukleozna, hepatociti sa dva jedra) kao posledica delovanja sva tri antipsihotika, uvećane Kupferove ćelije u klopapinskoj i ziprazidonskoj grupi, kao i apoptotski hepatociti u većoj meri uočeni kod tretmana pacova ziprazidonom i sertindolom. Prema tome, može da se zaključi da **ziprazidon** ima ponajviše štetnih efekata na tkivo jetre, a svi rezultati na ovom organu upućuju da redoks-neravnoteža doprinosi oštećenju jetre nakon dugotrajne upotrebe antipsihotičnih lekova.

U trenutno dostupnoj literaturi nedostaju studije slične ovoj, koja razdvaja uticaj i doprinos oksidativnog stresa kao jednog od neželjenih dejstava antipsihotika od oksidativnog stresa koji je deo same patogeneze shizofrenije, kako su prethodno predložili **Pillai et al. (2007)**. Naši rezultati nesumljivo pokazuju da se promene na nivou hepatičnih antioksidativnih enzima pod uticajem atipičnih antipsihotika javljaju *uporedo* sa histopatološkim promenama u jetri, što sugerise da lekovima-izazvano nagomilavanje reaktivnih kiseoničnih vrsta može da doprinese oštećenju jetre.

2. Efekti atipičnih antipsihotika na hemoglobin čoveka: za potrebe ove disertacije, po prvi put su istraženi interakcioni sistemi humani hemoglobin–atipični antipsihotici, tj. okarakterisano je vezivanje i ispitane (neke) posledice nastajanja kompleksa HHb–Clo, HHb–Ser i HHb–Zip.

2.1. Sva tri leka su efikasno gasila unutrašnju fluorescenciju tetramernog proteina, pod simuliranim fiziološkim uslovima, statičkim kvenčing mehanizmom. Vezivanje klopapina, ziprazidona i sertindola za hemoglobin je nedvosmisleno utvrđeno, sa afinitetom (konstantom vezivanja) reda veličine 10^3 – 10^4 M⁻¹. Ove vrednosti su slične konstantama vezivanja većine drugih lekova za ovaj crveni protein eritrocita životinja. Iz eksperimentalnih podataka je zaključeno i da na molekulu hemoglobina postoji jedno mesto za vezivanje ispitivanih antipsihotika.

2.2. Vezivanje Clo, Ser i Zip za HHb je termodinamički spontan proces, vođen negativnom promenom entalpije i povoljnim doprinosom pozitivne promene entropije. U saglasnosti sa prethodno

opisanim studijama, koje su ispitale vezivne interakcije hemoglobina čoveka sa drugim malim lipofilnim heterocikličnim lekovima, hidrofobne sile, uz pomoć elektrostatičkih interakcija i/ili vodoničnih veza, imaju značajnu ulogu u stabilizaciji HHb–antipsihotik kompleksa. Studije molekuskog dokinga potvrdile su pretpostavku da se sva tri antipsihotika vezuju unutar centralne šupljine na molekulu hemoglobina, saglasno podacima iz literature za (druge) hidrofobne ligande.

2.3. Kao posledica *in vitro* vezivanja (međumolekulskih interakcija), klozapin je blagotvorno uticao na strukturni integritet tetramernog hemoglobina. Ovaj zaključak je izveden iz podataka da njegovo vezivanje prati povećanje sadržaja α -heliksa (najstabilnija sekundarna struktura u inače helikoidnom proteinu) i tačke topljenja, uz smanjenje narušavanja strukture proteina delovanjem snažnog oksidansa. Nasuprot tome, sertindol i ziprazidon su pokazali moguće štetne efekte u kompleksu sa humanim hemoglobinom, pre svega ubrzanje spontane oksidacije atoma gvožđa u strukturi hema, u oblik met-hemoglobina koji (reverzibilno) ne vezuje kiseonik.

3. Efekti atipičnih antipsihotika na eritrocite čoveka: ispitani atipični antipsihotici su imali relativno blag i povoljan uticaj na plazminu membranu i na integritet ovih ćelija krvi u uslovima oksidativnog stresa:

3.1. Inkubiranje eritrocita sa klozapinom i sertindolom nije menjalo vrednosti za parametre fluidnosti plazmine membrane - uređenost (S) i rotaciono korelaciono vreme (τ) spinskih proba, koji su kod inkubiranja ćelija sa **ziprazidom** bili minimalno ($p < 0,05$), redom, smanjeni i povećani. Zaključak je da ovi antipsihotici nemaju (izraženije) štetne efekte na membranu eritrocita *ex vivo*.

3.2. Sva tri antipsihotika su pokazala solidan zaštitni efekat na oksidansima-izazvanu hemolizu eritrocita. Slično rezultatima sa HHb kao vezujućim partnerom, prisustvo **klozapina** u suspenziji ćelija se pokazalo kao sredstvo koje najviše odlaže raspadanje eritrocita, u skladu sa njegovom najizraženijom antioksidativnom aktivnošću (sposobnošću neutralisanja slobodnih radikala), u poređenju sa druga dva psihofarmaka.

Kaže se da znamo da "lekovi deluju ako imaju štetne efekte". Naravno, delovanje lekova van mesta na kojima se očekuje da ispolje terapijske efekte (mozak u slučaju antipsihotika) može da ima i pozitivne učinke. Opšti zaključak koji proističe iz predstavljenih rezultata ovog rada je da oni dodatno potvrđuju izrečene tvrdnje, pri čemu plejotropni efekti lekova u istom sistemu (organizmu) mogu da budu i međusobno suprotni. Od tri analizirana atipična antipsihotika, tretman **klozapinom** pokazao je najviše štetnih nuzpojava u jetri ("neprijatelj"), dok je njegov učinak na hemoglobin i eritrocite čoveka bio izuzetno pozitivan ("prijatelj"). Tako posmatrano, **ziprazidon** se našao više na "negativnoj" strani (najštetniji efekti na jetru u histopatološkim ispitivanjima), a sertindol "negde između". S obzirom da je sertindol manje proučen antipsihotik druge generacije, iz jednostavnog razloga da nikada nije bio odobren za korišćenje u kliničkoj praksi u SAD, dobijeni rezultati ove doktorske disertacije i naučnih radova koji su iz nje proistekli imaju dodatnu vrednost.

6. Literatura

- Agarwal S, Mehrotra R. An overview of molecular docking. *JSM Chem.* 2016; 4(2):1024. ISSN: 2333-6633.
- Ahmed M, Narain R. Biochemical assays used for *in vitro* and *in vivo* gene expression (Chapter 11). In: *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy.* 2016; pp. 257-270. doi: 10.1016/B978-0-08-100520-0.00011-4.
- Ajdžanović V, Spasojević I, Sošić-Jurjević B, Filipović B, Trifunović S, Sekulić M, Milošević V. The negative effect of soy extract on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. *J Membr Biol.* 2011; 239(3):131-5. doi: 10.1007/s00232-010-9332-8.
- Arizanović L, Kadralija D, Nikolić M, Miljević Č. Neželjena dejstva lekova - primer psihofarmaka. *Hemijski pregled.* 2018; 59(2):2-8. ISSN 0440-6826
- Ashton N. Physiology of red and white blood cells. *Anaesth. Intensive Care Med.* 2013; 14(6), 261-266. doi: 10.1016/j.mpaic.2013.03.00.
- Atkinson HJ, Babbitt PC. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry.* 2009; 48(46):11108-16. doi: 10.1021/bi901180v.
- Baig MR, Navaira E, Escamilla MA, Raventos H, Walss-Bass C. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: A possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *J Psyc Practice* 2010; 16(5):325-33. doi:10.1097/01.pra.0000388627.36781.6a.
- Balestrieri M, Vampini C, Bellantuono C. Efficacy and safety of novel antipsychotics: a critical review. *Hum Psychopharmacol.* 2000; 15(7):499-512. doi: 10.1002/1099-1077(200010)15:7<499::AID-HUP194>3.0.CO;2-3.
- Bedham C, Miceli JJ, Obach RS. Ziprasidone metabolism, aldehyde oxidase, and clinical implications. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; 23(3):229-32. doi: 10.1097/01.jcp.0000084028.22282.f2.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1):3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3.
- Bi S, Dinga L, Tiana Y, Songa D, Zhou X, Liua X, Zhanga H. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J Mol Struct.* 2004; 703(1-3):37-45. doi: 10.1016/j.molstruc.2004.05.026.
- Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol.* 2011; 9(2):301-12. doi: 10.2174/157015911795596595.
- Brinholi FF, de Farias CC, Bonifácio KL, Higachi L, Casagrande R, Moreira EG, Barbosa DS. Clozapine and olanzapine are better antioxidants than haloperidol, quetiapine, risperidone and ziprasidone in *in vitro* models. *Biomed Pharmacother.* 2016; 81:411-415. doi: 10.1016/j.biopha.2016.02.047.
- Caruso G, Grasso M, Fidilio A, Tascetta F, Drago F, Caraci F. Antioxidant properties of second-generation antipsychotics: Focus on microglia. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020; 13(12):457. doi: 10.3390/ph13120457.
- Chakraborti AS. Interaction of porphyrins with heme proteins - a brief review. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253(1-2):49-54. doi: 10.1023/a:1026097117057
- Chang WH, Lin SK, Lane HY, Hu WH, Jann MW, Lin HN. Clozapine dosages and plasma drug concentrations. *J Formos Med Assoc.* 1997; 96(8):599-605. PMID: 9290269
- Cheng H, Liu H, Bao W, Zou G. Studies on the interaction between docetaxel and human hemoglobin by spectroscopic analysis and molecular docking. *J Photochem Photobiol B.* 2011; 105(2):126-132. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.004.
- Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2008; 390(1-2):1-11. doi: 10.1016/j.cca.2007.12.025.

- Claiborne A. Catalase Activity. In Greenwald RA, Ed., CRC Handbook of methods for oxygen radical research, Boca Raton, 1985; 283-284.
- Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016; 95:27-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- Craescu CT, Schaeffer C, Mispelter J, Garin J, Rosa J. High resolution NMR studies of histidine-substituted and histidine-perturbed hemoglobin variants. Histidine assignments, electrostatic interactions at the protein surface, and implications for hemoglobin S polymerization. *J Biol Chem.* 1986; 261(17):7894-901. doi: 10.1016/S0021-9258(19)57487-7.
- Dalla Libera A, Scutari G, Boscolo R, Rigobello MP, Bindoli A. Antioxidant properties of clozapine and related neuroleptics. *Free Radic Res.* 1998; 29(2):151-157. doi: 10.1080/10715769800300171.
- David S, Hamilton JP. Drug-induced liver injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev.* 2010; 6:73-80. PMID: 21874146.
- Dayabandara M, Hanwella R, Ratnatunga S, Seneviratne S, Suraweera C, de Silva VA. Antipsychotic-associated weight gain: management strategies and impact on treatment adherence. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017; 13: 2231-2241. doi: 10.2147/NDT.S113099.
- De Hert M, Mittoux A, He Y, Peuskens J. Metabolic parameters in the short- and long-term treatment of schizophrenia with sertindole or risperidone. *Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci.* 2011; 261(4):231-9. doi: 10.1007/s00406-010-0142-x.
- Dean L. Clozapine therapy and CYP2D6, CYP1A2, and CYP3A4 genotypes. In: Medical genetics summaries [Internet], Pratt VM, McLeod HL, Rubinstein WS, et al. (Eds), Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2016.
- Dohare N, Siddiquee MA, Parray MD, Kumar A, Patel R. Esterase activity and interaction of human hemoglobin with diclofenac sodium: A spectroscopic and molecular docking study. *J Mol Recognit.* 2020; 33(8):e2841. doi:10.1002/jmr.2841.
- Dufour C, Dangles O. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721(1-3):164-173. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.10.013.
- Eyer P, Lierheimer E, Strosar M. Site and mechanism of covalent binding of 4-dimethylaminophenol to human hemoglobin, and its implications to the functional properties. *Mol Pharmacol.* 1983; 24(2):282-90. PMID: 6888371.
- Fan J, Fu A, Zhang L. Progress in molecular docking. *Quant Biol.* 2019; 7:83-89. doi: 10.1007/s40484-019-0172-y.
- Frukawa S, Fujita T, Shimabukuro MI, Yamada M, Nakayama Y, Nakayama Y, Makishima O, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114(12):1752-61. doi:10.1172/JCI21625.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-606.
- Gaertner HJ, Fischer E, Hoss J. Side effects of clozapine. *Psychopharmacology (Berl).* 1989; 99 Suppl:S97-100. doi: 10.1007/BF00442570.
- Gama CS, Salvador M, Andrezza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30(3):512-5. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.11.009.
- Gibson GG, Skett P. Introduction to Drug Metabolism (3rd Ed.), Nelson Thornes Ltd., 2001
- Gladyshev VN. Selenoproteins and Selenoproteomes. In: Hatfield D, Berry M, Gladyshev V (Eds) Selenium. Springer, New York, NY, 2011. doi: 10.1007/978-1-4614-1025-6_9.

- Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*. 1974; 30(6):665-7. doi: 10.1007/BF01921531.
- Glgorijević N, Minić S, Radibratović M, Papadimitriou V, Nedić O, Sotiroudis TG, Nikolić MR. Nutraceutical phycocyanobilin binding to catalase protects the pigment from oxidation without affecting catalytic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021; 251: 119483. doi: 10.1016/j.saa.2021.119483.
- Glgorijević N, Vasović T, Lević S, Miljević Č, Nedić O, Nikolić, M. Atypical antipsychotic clozapine binds fibrinogen and affects fibrin formation. *Int J Biol Macromol*. 2020; 154:142-149. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.119.
- Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutation Res*. 2005; 569(1-2):101-110. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021.
- Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. 2010; 1(10):888-97. doi: 10.1007/s13238-010-0113-z
- Green B. Focus on ziprasidone. *Curr Med Res Opin*. 2001; 17(2):146-50. PMID: 11759185.
- Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc*. 2006; 1(6):2527-35. doi: 10.1038/nprot.2006.204.
- Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2006; 1(6):2876-2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202.
- Guitton C, Kinowski JM, Aznar R, Bressolle F. Determination of clozapine and its major metabolites in human plasma and red blood cells by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997; 690(1-2):211-22. doi: 10.1016/s0378-4347(96)00362-3.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974; 249:7130-39. PMID: 4436300.
- Haddad PM, Correll CU. The acute efficacy of antipsychotics in schizophrenia: A review of recent meta-analyses. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018; 8(11):303-318. doi: 10.1177/2045125318781475.
- Harding JJ. Nonenzymatic covalent posttranslational modification of proteins in vivo. *Adv Protein Chem*. 1985; 37:247-334. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60066-2
- Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS. *Applied statistics for behavioral sciences*. 2nd Ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1994.
- Hirsch RE, Nagel RL. Conformational studies of hemoglobins using intrinsic fluorescence measurements. *J Biol Chem*. 1981; 256:1080-1083. PMID: 7451490.
- Juruena MF, de Sena EP, de Oliveira IR. Sertindole in the management of schizophrenia. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2011; 3:75-85. doi: 10.4137/JCNSD.S5729.
- Keane S, Lane A, Larkin T, Clarke M. Management of clozapine-related hepatotoxicity. *J Clin Psychopharmacol*. 2009; 29(6):606-7. doi:10.1097/JCP.0b013e3181c163ef.
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1751(2):119-39. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- Korb O, Stützle T, Exner TE. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J Chem Inf Model*. 2009; 49(1):84-96. doi: 10.1021/ci800298z.
- Kosmachevskaya OV, Topunov AF. Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin. *Biochem Mosc*. 2018; 83:1575-1593. <https://doi.org/10.1134/S0006297918120155>.
- Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(2):205-15. doi: 10.1016/s1357-2725(03)00195-x.

- Krivokuća D, Šaranović Đ, Vuković M, Moljević N, Veljković R. Anatomske, histološke i funkcionalne karakteristike jetre. *Medicina danas* 2005; 4(3-4):420-432.
- Krummer S, Thiermann H, Worek F, Eyer P. Equipotent cholinesterase reactivation *in vitro* by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate. *Arch Toxicol.* 2002; 76(10):589-95. doi: 10.1007/s00204-002-0382-2.
- Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, Aithal GP. Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut* 2017; 66(6):1154-1164. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313369.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy. University of Maryland school of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, 2006; 277-330. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* 1973; 12(21), 4161-4170. doi: 10.1021/bi00745a020.
- Levy A, Kuppusamy P, Rifkind JM. Multiple heme pocket subconformations of methemoglobin associated with distal histidine interactions. *Biochemistry* 1990; 29(40):9311-9316. doi: 10.1021/bi00492a002.
- Liguori, I., G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13:757-72. doi:10.2147/CIA.S158513.
- Lisi DM. Drug-induced liver injury: An overview. *Gastroenterology* 2016; 41:30-34.
- LiverTox. 2012. Clinical and research information on drug induced liver injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Ziprasidone. Accessed 2017 October 16. Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/s/bookNBK548663/>
- Lundbeck HAS. Safety study of sertindole versus risperidone under normal conditions of use (SCoP) [NCT00856583]. 2014. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00856583?sect=X30156#evnt>
- Maruoka N, Murata T, Omata N, Takashima Y, Tanii H, Yonekura Y, Fujibayashi Y, Wada Y. Effects of chlorpromazine on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain: a dynamic positron autoradiography and fluorescence polarization study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007a; 31(1):178-86. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.08.019.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8):595-603. doi: 10.1016/s0009-9120(99)00075-2.
- Maurya N, Ud Din Parray M, Maurya JK, Kumar A, Patel R. Interaction of promethazine and adiphenine to human hemoglobin: A comparative spectroscopic and computational analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018; 199:32-42. doi: 10.1016/j.saa.2018.03.023.
- Mayer KT, Freedman RZ. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin Chim Acta.* 1983; 127(2):147-84. doi: 10.1016/s0009-8981(83)80002-3.
- Miljević C, Nikolić M, Nikolić-Kokić A, Jones D, Niketić V, Lečić-Tosevski D, Spasić MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34(2):303-7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.024.
- Miller DD. Review and management of clozapine side effects. *J Clin Psychiatry* 2000; 61(Supl. 8):14-17; diskusija 18-19. PMID: 10811238.
- Miller JN. Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proc Anal Div Chem Soc.* 1979; 16:203-208.

- Minić S, Stanić-Vučinić D, Radomirović M, Radibratović M, Milčić M, Nikolić M, Ćirković Veličković T. Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin. *Food Chem.* 2018; 239:1090-1099. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.066.
- Mittal M, Rizwan Siddiqui M, Tran K, Reddy S, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants.* 2014; 20(7):1126-67. doi: 10.1089/ars.2012.5149.
- Mohandas N, Gallagher GP. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008; 112(10):3939-48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
- Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biol.* 2017; 11:240-53. doi:10.1016/j.redox.2016.12.011.
- Mueser TC, Rogers PH, Arnone A. Interface sliding as illustrated by the multiple quaternary structures of liganded hemoglobin. *Biochemistry* 2000; 39(50):15353-15364. doi: 10.1021/bi0012944.
- Murdoch D, Keating MG. Sertindole: a review of its use in schizophrenia. *CNS Drugs.* 2006; 20(3):233-55. doi: 10.2165/00023210-200620030-00005.
- Naheed M, Green B. Focus on Clozapine. *Curr Med Res Opin.* 2001; 17(3):223-9. doi: 10.1185/0300799039117069.
- Nedić O, Penezić A, Minić S, Radomirović M, Nikolić M, Ćirković Veličković T, Gligorijević N. Food antioxidants and their interaction with human proteins. *Antioxidants* 2023; 12(4):815. doi: 10.3390/antiox12040815.
- Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: A comprehensive literature review. *CNS Drugs* 2005; 19(Supplement 1):1-93. doi: 10.2165/00023210-200519001-00001.
- Nguyen-Lefebvre AT, Horuzsko A. Kupffer cell metabolism and function. *J Enzymol Metab.* 2015; 1(1):101. PMID: 26937490.
- Nicolson SE, Nemeroff CB. Ziprasidone in the treatment of mania in bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007; 3(6):823-34. doi: 10.2147/ndt.s794.
- Noguchi N, Yamashita H, Gotoh N, Yamamoto Y, Numano R, Niki E. 2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo initiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24: 259-268. doi: 10.1016/s0891-5849(97)00230-x.
- Nohl H, Stolze K. The effects of xenobiotics on erythrocytes. *General Pharmacology.* 1998; 31(3): 343-7. *Gen Pharmacol.* 1998; 31(3):343-7. doi: 10.1016/s0306-3623(97)00457-6.
- Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH. PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J Chem Theory Comput.* 2011; 7:525-537. doi: 10.1021/ct100578z.
- Oruch R, Lund A, Pryme IF, Holmsen H. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J Chem Biol.* 2010; 3(2): 67–88. doi: 10.1007/s12154-009-0034-6
- Pace NC, Scholtz MJ, Grimsley GR. Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* 2014; 588(14):2177-2184. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.006.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1):158-69. PMID: 6066618.
- Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011; 155(2):131-6. doi: 10.5507/bp.2011.027.

- Pedretti A, Mazzolari A, Gervasoni S, Fumagalli L, Vistoli G. The VEGA suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. *Bioinformatics* 2021; 37:1174-1175. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa774.
- Perutz MF, Fermi G, Abraham DJ, Poyart C, Bursaux E. Hemoglobin as a receptor of drugs and peptides: x-ray studies of the stereochemistry of binding. *J. Am. Chem. Soc.* 1986; 108(5):1064-1078. doi: 10.1021/ja00265a036.
- Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro JV, Bernardi RC, Buch R, Fiorin G, Hénin J, Jiang W, *et al.* Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys.* 2020; 153:044130. doi: 10.1063/5.0014475.
- Pillai A, Parikh V, Terry A, Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatment and crossover studies in rats: Differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatric Res.* 2007; 41(5):372-86. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.01.011.
- Pirmohamed MD, Williams S, Madden E, Templeton E, Park BK. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 272(3):984-90. PMID: 7891353.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
- Qinyu LV, Zhenghui YI. Antipsychotic drugs and liver injury. *Shanghai Arch Psychiatry.* 2018; 30(1):47-51. doi: 10.11919/j.issn.1002-0829.217090.
- Raha S, Taylor VH, Holloway AC. Effect of atypical antipsychotics on fetal growth: Is the placenta involved? *J. Pregnancy* 2012; 1:315203. doi: 10.1155/2012/315203.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija (peto izdanje)*. Data status, Beograd, 2005; 525-34.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J.* 2008; 22(3):659-61. doi:10.1096/fj.07-9574LSF.
- Reed S. *Essential Physiological Biochemistry: An Organ-Based Approach*, Wiley, 2009.
- Ristić AJ, Savić D, Sokić D, Bogdanović Pristov J, Nestorov J, Bašćarević V, Raičević S, Savić S, Spasojević I. Hippocampal antioxidative system in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2015; 56(5):789-99. doi: 10.1111/epi.12981.
- Rogers DM, Jasim SB, Dyer NT, Auvray F, Réfrégiers M, Hirst JD. Electronic circular dichroism spectroscopy of proteins. *Chem* 2019; 5(11):2751-2774. doi: 10.1016/j.chempr.2019.07.008.
- Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 1981; 20(11):3096-3102. doi: 10.1021/bi00514a017.
- Schmid F-X. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. In *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. 2001;1-4. doi: 10.1038/npg.els.0003142.
- Seal P, Sikdar J, Roy A, Haldar R. Acetaminophen interacts with human hemoglobin: optical, physical and molecular modeling studies. *J Biomol Struct Dyn.* 2017; 35(6):1307-1321. doi: 10.1080/07391102.2016.1180262.
- Senoner T, Dichtl W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? *Nutrients.* 2019; 11(9):2090. doi:10.3390/nu11092090.
- Sheehan JJ, Sliwa JK, Amatniek JC, Carla M. Atypical antipsychotic metabolism and excretion. *Current Drug Metabolism* 2010; 11(6):516-25. doi:10.2174/138920010791636202.
- Simpson GM. Atypical antipsychotics and the burden of disease. *Am J Manag Care.* 2005; 11(8 Suppl):S235-41. PMID: 16180961.

- Slim M, Medina-Caliz I, Gonzalez-Jimenez A, Cabello MR, Mayoral-Cleries F, Lucena MI, Andrade RJ. Hepatic Safety of Atypical Antipsychotics: Current Evidence and Future Directions. *Drug Saf.* 2016; 39(10):925-43. doi: 10.1007/s40264-016-0436-7.
- Sprouse JS, Reynolds LS, Braselton JP, Rollema H, Zorn SH. Comparison of the novel antipsychotic ziprasidone with clozapine and olanzapine: inhibition of dorsal raphe cell firing and the role of 5-HT1A receptor activation. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 21(5):622-31. doi: 10.1016/S0893-133X(99)00057-3.
- Stadler AM, Garvey CJ, Bocahut A, Sacquin-Mora S, Digel I, Schneider GJ, Natali F, Artmann GM, Zaccai G. Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics. *J R Soc Interface* 2012; 9(76):2845-2855. doi: 10.1098/rsif.2012.0364.
- Stewart JJP. MOPAC: A Semiempirical Molecular Orbital Program. *J Comput Aided Mol Des.* 1990; 4:1-105. doi: 10.1007/BF00128336.
- Stewart JJP. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *J Mol Model.* 2013; 19:1-32. doi: 10.1007/s00894-012-1667-x.
- Stroup TS, Gray N. Management of common adverse effects of antipsychotic medications. *World Psychiatry* 2018; 17(3):341-56. doi:10.1002/wps.20567.
- Šunderić, M.; Vasović, T.; Milčić, M.; Miljević, Č.; Nedić, O.; Nikolić, M.R.; Gligorijević, N. Antipsychotic clozapine binding to alpha-2-macroglobulin protects interacting partners against oxidation and preserves the anti-proteinase activity of the protein. *Int J Biol Macromol.* 2021, 183, 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.155>
- Szebeni J, Winterbourn CC, Carrell RW. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem J.* 1984; 220(3):685-692. doi: 10.1042/bj2200685.
- Tentori L, Salvati AM. Hemoglobinometry in human blood. In: Antonini E, Rossi-Bernardi L, Hiancone E, Eds. *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, 1981; 707-715. doi: 10.1016/0076-6879(81)76152-4.
- Tetsuhito M, Nobuyuki M, Naoto O, Yasuhiro T, Kazuo I, Fumiyo K, Yasuhisa F, Yuji W. Effects of haloperidol and its pyridinium metabolite on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31(4):848-57. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.01.023.
- Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(18):4574. doi: 10.3390/ijms20184574.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350. Betigeri S, Thakur A, Raghavan K. Use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs. *Pharm Res.* 2005; 22(2):310-317. doi: 10.1007/s11095-004-1199-x.
- Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010; 31(2):455-61. doi: 10.1002/jcc.21334.
- Tschoner A, Engl J, Laimer M, Kaser S, Rettenbacher M, Fleischhacker WW, Patsch JR, Ebenbichler CF. Metabolic side effects of antipsychotic medication. *Int J Clin Pract.* 2007; 61(8):1356-70. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01416.x.
- Tunç S, Cetinkaya A, Duman O. Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins. *J Photochem Photobiol B.* 2013a; 120:59-65. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.011.

- Tunç S, Duman O, Bozoğlan BK. Studies on the interactions of chloroquine diphosphate and phenelzine sulfate drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins by spectroscopic techniques. *J Lumines*. 2013b; 140:87-94. doi: 10.1016/j.jlumin.2013.03.015.
- Umbreit J. Methemoglobin - it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol*. 2007; 82(2):134-44. doi: 10.1002/ajh.20738.
- Undeland I, Kristinsson HG, Hultin HO. Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: effect of pH and hemoglobin source. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(14): 4444-4451. doi: 10.1021/jf030560s.
- Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G. Metabolism of atypical antipsychotics: Involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Current Drug Metabolism* 2008; 9(5):410–18. doi:10.2174/138920008784746373.
- Vadadi KS, Soosai E, Vaddadi G. Low blood selenium concentrations in schizophrenic patients on clozapine. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55(3):307-9. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01773.x.
- Valeur B. Molecular fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, FRG. 2001; 34-71. doi: 10.1002/3527600248.
- Verhaegen AA, Van Gaal LF. Drug-induced obesity and its metabolic consequences: a review with a focus on mechanisms and possible therapeutic options. *J Endocrinol Invest*. 2017; 40(11):1165-1174. doi: 10.1007/s40618-017-0719-6.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry* (3rd Edn.). John Wiley & Sons, Inc, 2004; 406-410.
- Vogel F, Gansmüller R, Leiblein T, Dietmaier O, Wassmuth H, Gründer G, Hiemke C. The use of ziprasidone in clinical practice: analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects from data of a drug monitoring survey. *Eur Psychiatry* 2009; 24(3):143-148. doi: 10.1016/j.eurpsy.2008.09.003.
- Vredenburg G, Vassell KP, Commandeur JN, Vermeulen NP, Vos JC. 2013. Reconstitution of the interplay between cytochrome P450 and human glutathione S-transferases in clozapine metabolism in yeast. *Toxicology Letters* 2013; 222(3):247-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.023.
- Ware WR. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process. *J Phys Chem*. 1962; 66:455-458. doi: 10.1021/j100809a020.
- Williams GM, Iatropoulos MJ. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol*. 2002; 30(1):41-53. doi: 10.1080/01926230252824699.
- Xu H, Zhuang X. Atypical antipsychotics-induced metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: A critical review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019; 15:2087-2099. doi: 10.2147/NDT.S208061.
- Yokoyama T, Neya S, Tsuneshige A, Yonetani T, Park S-Y, Tame JRH. R-State haemoglobin with low oxygen affinity: crystal structures of deoxy human and carbonmonoxy horse haemoglobin bound to the effector molecule 135. *J Mol Biol*. 2006; 356:790-801. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.018.
- Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013; 17(4):507-18. doi: 10.1016/j.cld.2013.07.002.
- Zhang H-Mei, Wang Y-Q, Jiang M-L. A fluorimetric study of the interaction of C.I. Solvent Red 24 with haemoglobin. *Dyes Pigm*. 2009; 82(2):156-163. doi: 10.1016/j.dyepig.2008.12.008.
- Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, Huai C, Shen Lu, Zhang Na, He L, Qin S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(23):12808. doi: 10.3390/ijms222312808.
- Zlatković J, Todorović N, Tomanović N, Bošković M, Djordjević S, Lazarević-Pašti T, Bernardi RE, Đurđević A, Filipović D. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative

stress in rat liver: A histopathological study. *Er J Pharmac Sci.* 2014; 59:20-30. doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.010.

7. Prilozi

BIOGRAFIJA

Lena Platanić Arizanović je rođena 05.03.1990. godine u Novom Pazaru. Osnovnu školu „Sveti Sava“ završila je u Požarevcu, kao nosilac Vukove diplome i specijalnih diploma iz hemije, fizike, srpskog jezika i likovne umetnosti. Požarevačku gimnaziju završila je kao nosilac Vukove diplome, uz zahvalnicu za izuzetne rezultate u javnoj i kulturnoj delatnosti škole. Hemijski fakultet u Beogradu, studijski program Biohemičar, kandidatkinja je upisala 2009. godine, a završila 2013. godine, sa prosečnom ocenom 9,10 i ocenom 10 za završni rad: "Efekti odabranih antipsihotika na hemoglobin i membranu humanih eritrocita: *in vitro* studija". Kao jedan od tri najbolja studenta generacije, bila je kandidat za diplomu "Đorđe Stefanović". Po završetku osnovnih, upisuje master studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu i završava ih sledeće, 2014. godine, sa prosečnom ocenom 9,80. Diplomski rad: "Metabolički efekti atipičnih antipsihotika kod pacova *in vivo*" eksperimentalno je uradila na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu, a isti je ocenjen najvišom ocenom. Nakon završenih master studija, u oktobru 2014. godine upisuje doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, smer Biohemija. Na doktorskim studijama je položila svih šest ispita predviđenih planom i programom, svaki sa ocenom 10, i ostvarila 145 ESPB poena. Uporedo sa master studijama, zapošljava se u genetičkoj laboratoriji "DNK Centar" na mestu DNK analitičara, gde je radila analize, obrađivala rezultate i izrađivala nalaze iz oblasti forenzičkih i medicinskih DNK analiza, utvrđivanja srodstva i praporekla. Oskora radi u kancelariji MDPI (izdavač naučnih časopisa otvorenog pristupa) na Novom Beogradu. Usavršavala se na brojnim domaćim i međunarodnim seminarima i kursevima, od kojih su značajniji: 11. kurs kliničke citogenetike u Goldreju, Italija (2016. godina), gde odlazi kao stipendista Evropskog udruženja za humanu genetiku (ESHG, European Society of Human Genetics), kao i 28. Kongres Internacionalnog udruženja za forenzičku genetiku (ISFG, International Society for Forensic Genetics), 2019. godine. U okviru svog naučno-istraživačkog rada, kandidatkinja pre svega izučava metaboličke i plejotropne efekte odabranih atipičnih antipsihotika. Zainteresovana je i za ispitivanja veze između određenih genskih mutacija i polimorfizama i njihovih posledice po zdravlje, kod muškaraca sa Klinefelterovim sindromom i kod žena u reproduktivnom periodu života. Lena Platanić Arizanović je član Biohemijskog društva Srbije. Aktivna je i u Udruženju za borbu protiv šećerne bolesti grada Beograda "Plavi krug". Udata je, a 2020. godine ostvarila se i u ulozi majke.

Objavljeni radovi koji čine deo disertacije:

M21 – Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima

1. Platanić Arizanović L, Gligorijević N, Cvijetić I, Mijatović A, Krstić Ristivojević M, Minić S, Nikolić Kokić A, Miljević Č, Nikolić M. Human Hemoglobin and Antipsychotics Clozapine, Ziprasidone and Sertindole: Friends or Foes? *Int J Mol Sci.* 2023; 24(10):8921. doi: 10.3390/ijms24108921.

M22 – Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima

1. Platanić Arizanović L, Nikolić-Kokić A, Brkljačić J, Tatalović N, Miler M, Oreščanin-Dušić Z, Vidonja Uzelac T, Nikolić M, Milošević V, Blagojević D, Spasić S, Miljević Č. Effects of several atypical antipsychotics clozapine, sertindole or ziprasidone on hepatic antioxidant enzymes: Possible role in drug-induced liver dysfunction. *J Toxicol Environ Health A.* 2021; 84(4):173-182. doi: 10.1080/15287394.2020.1844827.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Лена Платанић Аризановић**

Број индекса: **ДБ11/2014**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клозапина, сертиндола и зипразидона на јетру пацова и еритроците човека"

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Лена Платанић Аризановић**

Број индекса: **ДБ11/2014**

Студијски програм: **Доктор биохемијских наука**

Наслов рада:

"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клозапина, сертиндола и зипразидона на јетру пацова и еритроците човека"

Ментори: в. проф. др Милан Николић и доцент др Чедо Миљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањења у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

"Молекулске основе деловања атипичних антипсихотика клозапина, сертиндола и зипразидона на јетру пацова и еритроците човека"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање. Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

Потпис аутора

У Београду, _____

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