

UNIVERZITET U BEOGRADU – HEMIJSKI FAKULTET



Tamara B. Vasović

**KARAKTERIZACIJA I EFEKTI INTERAKCIJA
ATIPIČNOG ANTIPSIHOTIKA KLOZAPINA
SA KATALAZOM, ALFA-2-
MAKROGLOBULINOM I FIBRINOGENOM, U
SIMULIRANIM FIZIOLOŠKIM USLOVIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE – FACULTY OF CHEMISTRY



Tamara B. Vasović

**CHARACTERIZATION AND EFFECTS OF
INTERACTIONS BETWEEN THE ATYPICAL
ANTIPSYCHOTIC CLOZAPINE AND
CATALASE, ALPHA-2-MACROGLOBULIN,
AND FIBRINOGEN UNDER SIMULATED
PHYSIOLOGICAL CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

KOMISIJA ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Mentori:

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

dr Nikola Gligorijević, viši naučni saradnik, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Centar za hemiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Marija Stojadinović, docent, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Simeon Minić, docent, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Miloš Šunderić, Viši naučni saradnik, Institut za primenu nuklearne energije, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija nastala je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, na katedri za Biohemiju.

Najveću profesionalnu zahvalnost dugujem svojim mentorima, prof. dr Milanu Nikoliću i dr Nikoli Gligorijeviću, na ukazanom poverenju, prenesenom znanju i podršci tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Milanu Nikoliću zahvaljujem na naučnom usmeravanju, podršci i spremnosti da svojim iskustvom i savetima doprinese izradi ove disertacije. Posebno sam zahvalna na slobodi koju mi je pružio u razvijanju istraživačkih ideja, kao i na podršci u mom profesionalnom razvoju.

Dr Nikoli Gligorijeviću zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, konsultacijama i zajedničkom rešavanju brojnih problema koji su pratili istraživanje. Njegova posvećenost, efikasnost i praktičan pristup radu bili su mi od velike pomoći, naročito onda kada je bilo potrebno pronaći rešenje i nastaviti dalje.

Članovima Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije – dr Simeonu Miniću, dr Mariji Stojadinović i dr Milošu Šunderiću – zahvaljujem na čitanju rada, korisnim sugestijama i doprinosu njegovom konačnom oblikovanju. Još više im zahvaljujem na svemu što sam od njih učila tokom godina zajedničkog rada, kroz razgovore, savete i saradnju.

Prof. dr Tanji Ćirković Veličković zahvaljujem na prilici da učim i radim i u njenoj istraživačkoj grupi, na ukazanom poverenju i mogućnostima koje su mi pomogle da steknem nova znanja i pronađem svoje mesto u naučnom radu.

Godine koje su prethodile završetku ovog rada obeležile su i brojne selidbe. Moj istraživački put započeo je u Milanovoj laboratoriji 421, a zatim se nastavio u laboratoriji 249a. Istovremeno sam radila i učila u Tanjinoj laboratoriji 434, koja je kasnije postala laboratorija 403. Danas, dok očekujem još jedno preseljenje – ovoga puta Orbitrapa na kojima radim sve ove godine – čini mi se da su se adrese laboratorija menjale mnogo češće nego ono što ih je činilo važnim. Prostor su uvek određivali ljudi, zajednički rad, razgovori, smeh, podrška, dobri rezultati, ali i dani kada ništa nije išlo kako je zamišljeno.

Jelici i Ani zahvaljujem na svemu iz naše prve laboratorije 421 i, pre svega, na prijateljstvu koje je odavno izašlo iz njenih okvira.

Posebno mesto na ovom putu pripada kolegama iz laboratorije 403. Zahvalna sam onima koji su svoje puteve nastavili na drugim mestima, a od kojih sam mnogo učila, kao i onima sa kojima i danas delim svakodnevni rad. Najmlađim kolegama zahvaljujem na novoj energiji, pitanjima i entuzijazmu koji podsećaju koliko je važno sačuvati radoznalost. Svako ko je bio deo ove laboratorije doprineo je osećaju bliskosti i zajedništva zbog kojeg ona za mene nikada nije bila samo radni prostor.

Svojim prijateljima zahvaljujem što su ostali uz mene i onda kada za njih nisam imala onoliko vremena koliko su zaslužili. Hvala im na razumevanju zbog propuštenih druženja, odloženih planova i mog čestog odsustva, kao i na tome što su uvek znali da nastavimo tamo gde smo stali.

Stefanu zahvaljujem što je tokom svih promena bio moja podrška, sigurnost i mir. Hvala mu na razumevanju, strpljenju i tome što je umeo da bude oslonac bez velikih reči, upravo onda kada mi je to bilo najpotrebnije.

Zahvalnost dugujem svojoj porodici, čija su ljubav i vera u mene bili temelj svega što sam postigla. Posebno zahvaljujem svojoj sestri Anji, mojoj najvećoj životnoj podršci. Bez nje ne bih bila osoba kakva sam danas. Hvala joj što je uvek bila uz mene, što je moje brige i radosti doživljavala kao svoje i što me je, čak i onda kada sama nisam bila sigurna kojim putem da krenem, podsećala ko sam i koliko mogu.

Na kraju, ovu disertaciju posvećujem onima koji bi bili najsrećniji i najponosniji da su mogli danas da budu ovde – **Stani i Radoju**.

Karakterizacija i efekti interakcija atipičnog antipsihotika klopapina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom, u simuliranim fiziološkim uslovima

SAŽETAK

Klopapin je atipični antipsihotik, antagonist, pre svega, dopaminskih i serotonskih receptora, sa jedinstvenom efikasnošću u terapijski rezistentnoj shizofreniji, ali njegovi plejotropni efekti nisu u potpunosti razjašnjeni na molekulskom nivou. Cilj ove disertacije bio je da se, u simuliranim fiziološkim uslovima, ispita vezivanje klopapina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom – redom, ključnim proteinima uključenim u antioksidativnu zaštitu, regulaciju proteolize i hemostazu. Vezivanje je proučeno primenom fluorescentne, UV–Vis, CD i FTIR spektroskopije, analizom termalne stabilnosti proteina, funkcionalnim i oksidativnim testovima, kao i molekulskim dokingom i simulacijama molekulske dinamike u protein-ligand kompleksima.

Klopapin je sa sva tri proteina krvi formirao nekovalentne komplekse, osrednjih konstanti vezivanja ($1,4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ za katalazu; $0,9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ za alfa-2-makroglobulin; $1,7 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ za fibrinogen), ali su posledice vezivanja zavisile od proteinskog partnera. Vezivanje leka za katalazu bilo je praćeno povećanjem termalne stabilnosti proteina, dozno-zavisnim promenama enzimske aktivnosti i zaštitom enzima od oksidativnih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima. Kod alfa-2-makroglobulina, bile su očuvane sekundarna i tercijarna struktura proteina, kao i njegova inhibitorna aktivnost prema tripsinu, dok je prisustvo leka značajno smanjilo njegovu osetljivost na oksidativna oštećenja. Doking studija je ukazala na periferno vezivanje klopapina, izvan ključnih funkcionalnih domena na alfa-2-makroglobulinu. Pokazano je i da vezivanje klopapina za fibrinogen ne menja strukturu, niti termalnu stabilnost proteina, ali da usporava trombinom indukovanu polimerizaciju i dovodi do stvaranja tanjih fibrinskih vlakana u fibrinskom ugrušku, bez promene poroznosti mreže. Istovremeno je uočen i dozno-zavisan zaštitni efekat leka na ovaj protein pri pro-oksidativnim uslovima sredine.

Rezultati ove disertacije pokazuju da direktne interakcije klopapina sa funkcionalno važnim proteinima krvi mogu doprineti efektima njegovog vanreceptorskog delovanja, pri čemu njihov ishod zavisi kako od strukture partnerskog proteina i položaja vezivnog mesta u kompleksu, tako i od koncentracije leka i oksidativnog statusa sredine.

Ključne reči: klopapin, katalaza, alfa-2-makroglobulin, fibrinogen, protein-ligand interakcije, spektroskopske metode, molekulski doking, molekulska dinamika, oksidativni stres

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Characterization and effects of interactions between the atypical antipsychotic clozapine and catalase, alpha-2-macroglobulin, and fibrinogen under simulated physiological conditions

ABSTRACT

Clozapine is an atypical antipsychotic, an antagonist, first of all, of dopamine and serotonin receptors, with unique efficacy in therapy-resistant schizophrenia. Still, its pleiotropic effects have not been fully elucidated at the molecular level. This dissertation aimed to examine, in simulated physiological conditions, the binding of clozapine to catalase, alpha-2-macroglobulin and fibrinogen - respectively, key proteins involved in antioxidant protection, regulation of proteolysis and hemostasis. Binding was studied using fluorescence, UV-Vis, CD, and FTIR spectroscopy; analysis of protein thermal stability; functional and oxidative tests; and molecular docking and molecular dynamics simulations in protein-ligand complexes.

Clozapine formed non-covalent complexes with all three blood proteins, with moderate binding constants ($1.4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ for catalase; $0.9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ for alpha-2-macroglobulin; $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ for fibrinogen), but the binding consequences depended on the protein partner. The binding of the drug to catalase was accompanied by an increase in the thermal stability of the protein, dose-dependent changes in enzyme activity and protection of the enzyme from oxidative damage caused by free radicals. In the case of alpha-2-macroglobulins, the secondary and tertiary structure of the protein was preserved, as well as its inhibitory activity towards trypsin. At the same time, the presence of the drug significantly reduced its sensitivity to oxidative damage. A docking study indicated peripheral binding of clozapine, outside the key functional domains on alpha-2-macroglobulin. It was also shown that clozapine binding to fibrinogen does not change the structure or thermal stability of the protein, but slows thrombin-induced polymerisation and leads to the formation of thinner fibrin fibres in the fibrin clot, without changing the porosity of the network. At the same time, a dose-dependent protective effect of the drug on this protein was observed under pro-oxidative environmental conditions.

The results of this dissertation show that direct interactions of clozapine with functionally important blood proteins can contribute to the effects of its extrareceptor action, whereby their outcome depends both on the structure of the partner protein and the position of the binding site in the complex, as well as on the concentration of the drug and the oxidative status of the environment.

Keywords: clozapine, catalase, alpha-2-macroglobulin, fibrinogen, protein-ligand interactions, spectroscopy, molecular docking, molecular dynamics, oxidative stress

Scientific field: Chemistry

Subfield: Biochemistry

SKRAĆENICE I AKRONIMI

5-HT – serotonin, 5-hidroksitriptamin

5-HT_{2A} – serotoniniski receptor tipa 2A

α 2M – alfa-2-makroglobulin

A.U. – arbitrarne jedinice (engl. Arbitrary Units)

AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid

ANOVA – analiza varijanse

APS – amonijum-persulfat

BAPNA – N α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid

BCA – bicinhoninska kiselina

BLC – katalaza iz goveđe jetre (engl. bovine liver catalase)

CD – cirkularni dihiroizam (engl. circular dichroism)

CLZ – klozapin (engl. clozapine)

D₂ – dopaminski receptor tipa D₂

D₃ – dopaminski receptor tipa D₃

DMSO – dimetil-sulfoksid

EC – enzimski klasifikacioni broj

ESI-MS - masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom

FIB – fibrinogen

FRET – Försterov rezonantni prenos energije

FTIR – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

GABA – gama-aminobuterna kiselina

HESI – zagrejana elektrosprej jonizacija

HORAC – kapacitet sprečavanja oksidacije hidroksil-radikalima

HPA osa – hipotalamusno-hipofizno-adrenalna osa

HPLC – visokoperformansna tečna hromatografija

IU – internacionalna jedinica

KSV – Stern–Volmerova konstanta gašenja fluorescencije

LRP1 – receptor srodan receptoru za lipoproteine niske gustine 1

MD – molekulska dinamika

MG domeni – makroglobulinu slični domeni

MM-GBSA – metoda molekulske mehanike sa generalizovanom Bornovom aproksimacijom površine

MM-PBSA – metoda molekulske mehanike sa Poisson–Boltzmannovom aproksimacijom površine

MWCO – granica propustljivosti membrane prema molekulskoj masi

NADPH – redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NaOCl – natrijum-hipohlorit

NMDA – N-metil-D-aspartat

NPT – izotermno-izobarni ansambl u molekulskoj dinamici

NVT - kanonski ansambl u molekulskoj dinamici

ORAC – kapacitet apsorpcije kiseoničnih radikala (engl. oxygen radical absorption capacity)

PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

PDB – proteinska baza podataka

PDB ID – identifikacioni kod strukture u proteinskoj bazi podataka

QM/MM – kombinacija kvantne i molekulske mehanike

RBD – receptor-vezujući domen

Rg – radijus žiracije (engl. Radius of giration)

RMSD – srednje kvadratno odstupanje koordinata atoma u odnosu na referentnu strukturu

RMSF – srednje kvadratne fluktuacije aminokiselinskih ostataka

ROS – reaktivne kiseonične vrste

SDS – natrijum-dodecil-sulfat

SDS-PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecil-sulfata

SV – Stern–Volmerova analiza

TAAR1– receptor vezan za amine u tragovima 1

TBS – Tris-puferisani fiziološki rastvor

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

Tm – temperatura topljenja proteina

TRS – terapijski rezistentna shizofrenija

UV – ultraljubičasto zračenje

UV–Vis – ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

VMD – program za vizualizaciju molekulske dinamike

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Shizofrenija i terapija antipsihoticima	2
2.1.1. Antipsihotici prve i druge generacije	3
2.1.2. Terapijski rezistentna shizofrenija i mesto klozapina	4
2.2. Klozapin	4
2.2.1. Istorijat i klinički značaj	4
2.2.2. Hemijska struktura i osnovna fizičko-hemijska svojstva klozapina	5
2.2.3. Farmakokinetika i klinički značaj metabolita klozapina	6
2.2.4. Farmakodinamika i receptorski profil klozapina	7
2.2.5. Neželjeni efekti i mehanizmi toksičnosti klozapina	9
2.3. Proteini plazme	10
2.3.1. Opšte o plazmi i raznolikosti proteina u plazmi	10
2.3.2. Katalaza – ključni antioksidativni enzim	11
2.3.2.1. Strukturne karakteristike i katalitički mehanizam	11
2.3.2.2. Uloga u održavanju ćelijskog redoks-balansa	13
2.3.2.3. Interakcije sa bioaktivnim molekulima	14
2.3.3. Alfa-2-makroglobulin – regulator proteolize i nosilac biomolekula	15
2.3.3.1. Struktura i funkcionalni domeni	16
2.3.3.2. Mehanizam inhibicije proteaza	17
2.3.3.3. Interakcije alfa-2-makroglobulina sa malim i bioaktivnim molekulima	18
2.3.4. Fibrinogen – multifunkcionalni glikoprotein u hemostazi	19
2.3.4.1. Struktura, sinteza i fiziološka uloga	20
2.3.4.2. Uloge u regulaciji hemostaze	20
2.3.4.3. Interakcije sa bioaktivnim molekulima	21
2.4. Metode u ispitivanju interakcija lekova sa proteinima	23
2.4.1. Spektroskopske metode	23
2.4.2. Funkcionalni testovi	26
2.4.3. <i>In silico</i> metode u proučavanju protein ligand interakcija	30
2.4.3.1. Molekulski doking	31
2.4.3.2. Molekulska dinamika	32
3. EKSPERIMENTALNI DEO	35
3.1. Priprema polaznog materijala, hemikalije i instrumenti	35
3.1.1. Priprema i karakterizacija goveđe katalaze	35
3.1.2. Izolovanje i karakterizacija humanog alfa-2-makroglobulina	35

3.1.3. Izolovanje i priprema humanog fibrinogena	35
3.2. Spektrofluorimetrijska analiza interakcija	36
3.2.1. Gašenje unutrašnje fluorescencije katalaze.....	36
3.2.2. Gašenje unutrašnje fluorescencije alfa-2-makroglobulina.....	37
3.2.3. Gašenje unutrašnje fluorescencije fibrinogena	37
3.3. UV-Vis spektroskopska analiza vezivanja odabranih proteina sa klozapinom	37
3.3.1. UV-vis spektroskopska analiza katalaze iz goveđe jetre	37
3.3.2. UV-vis spektroskopska analiza alfa-2-makroglobulina.....	38
3.3.3. UV analiza fibrinogena	38
3.4. Cirkularni dihiroizam katalaze i alfa-2-makroglobulina.....	38
3.4.1. CD analiza katalaze.....	38
3.4.2. CD analiza alfa-2-makroglobulina.....	38
3.5. FTIR analiza fibrinogena	38
3.6. Ispitivanje termalne stabilnosti proteina	38
3.6.1. Termalna stabilnost katalaze	39
3.6.2. Termalna stabilnost alfa-2-makroglobulina	39
3.6.3. Termalna stabilnost fibrinogena.....	39
3.7. Funkcionalna ispitivanja	39
3.7.1. Aktivnost katalaze.....	39
3.7.2. Antiproteazna aktivnost alfa-2-makroglobulina	40
3.7.3. Formiranje fibrina i poroznost fibrinskog gela	40
3.8. Ispitivanje oksidativne stabilnosti proteina i klozapina	41
3.8.1. Oksidativna stabilnost katalaze u prisustvu AAPH	41
3.8.2. Oksidativna stabilnost alfa-2-makroglobulina u prisustvu AAPH	41
3.8.3. Zaštita klozapina od oksidacije u kompleksu sa alfa-2-makroglobulinom.....	41
3.8.4. Modifikovani ORAC i HORAC testovi sa fibrinogenom.....	42
3.9. Molekulski doking i molekulska dinamika	42
3.9.1. Molekulski doking klozapina sa katalazom	42
3.9.2. Molekulska dinamika BLC–CLZ kompleksa	43
3.9.3. Molekulski doking klozapina sa alfa-2-makroglobulinom	43
3.10. Statistička obrada podataka.....	43
4. REZULTATI I DISKUSIJA	44
4.1. Interakcije klozapina sa katalazom	44
4.1.1. Fluorescentna merenja ukazuju na stabilan enzim–ligand kompleks uz statički tip gašenja fluorescencije	44
4.1.2. Uticaj vezivanja klozapina na sekundarnu i tercijarnu strukturu katalaze.....	46
4.1.3. Klozapin povećava temperaturnu stabilnost katalaze	47

4.1.4. Klozapin dozno-zavisno štiti BLC od AAPH-indukovane oksidacije.....	48
4.1.5. Klozapin dozno-zavisno menja aktivnost BLC	49
4.1.5. Predviđanje vezivnih mesta i energija interakcije pomoću molekulskog dokinga potvrđuje formiranje kompleksa	50
4.2. Interakcije klozapina sa alfa-2-makroglobulinom	51
4.2.1. Fluorescentna spektroskopija ukazuje na umereni afinitet i očuvano mikrookruženje aromatičnih amino-kiselinskih ostataka proteina.....	51
4.2.2. Sekundarna i tercijarna struktura α 2M ostaju stabilne nakon vezivanja klozapina	52
4.2.3. Klozapin ne utiče značajno na inhibitornu aktivnost α 2M prema tripsinu	53
2.4. Prisustvo klozapina smanjuje osetljivost α 2M na oksidativna oštećenja.....	54
4.2.5. Doking simulacije ukazuju na periferno vezivanje izvan funkcionalnih domena α 2M.....	56
4.3. Interakcije klozapina sa fibrinogenom	57
4.3.1. Fibrinogen vezuje klozapine srednje visokim afinitetom, bez značajnih promena mikrookruženja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka	57
4.3.2. Sekundarna struktura fibrinogena ostaje očuvana nakon vezivanja klozapina.....	58
4.3.3. Termalna stabilnost fibrinogena nije značajno promenjena u prisustvu leka	59
4.3.4. Uticaj klozapina na kinetiku polimerizacije, debljinu vlakana i poroznost fibrinske mreže ...	59
4.3.5. Klozapin deluje zaštitno na fibrinogen u uslovima oksidativnog stresa, na dozno-zavisni način	61
5. ZAKLJUČCI DISERTACIJE	62
5.1. Opšti zaključak i naučni doprinos istraživanja	62
5.2. Katalaza kao proteinski partner klozapina i drugih malih molekula	62
5.3. Alfa-2-makroglobulin: očuvanje funkcije i poređenje sa ligandima antioksidativnog tipa.....	63
5.4. Fibrinogen: interakcije sa klozapinom, antioksidansima i značaj za formiranje fibrina	63
5.5. Zajednički obrasci interakcija ispitivanih proteina sa malim molekulima	64
5.6. Značaj za razumevanje vanreceptorskih efekata klozapina	65
5.7. Ograničenja i pravci budućih istraživanja.....	65
5.8. Konačan zaključak	66
6. LITERATURA.....	67

1. UVOD

Klozapin je jedan od najznačajnijih antipsihotika u savremenoj terapiji shizofrenije, posebno zbog svoje efikasnosti kod pacijenata kod kojih drugi antipsihotici ne dovode do zadovoljavajućeg terapijskog odgovora. Iako se primenjuje decenijama, klozapin i dalje predstavlja lek od posebnog interesa, pošto se njegova klinička efikasnost ne može jednostavno objasniti samo jednim farmakološkim mehanizmom. Za razliku od mnogih drugih antipsihotika, klozapin pokazuje širok receptorski profil, delujući na dopaminske, serotonininske, muskarinske, adrenergičke i histaminske receptore. Upravo ova farmakološka raznolikost doprinosi njegovoj terapijskoj specifičnosti, ali i pojavi brojnih neželjenih efekata.

Primena klozapina ograničena je mogućnošću nastanka ozbiljnih neželjenih reakcija, među kojima su posebno značajni hematološki poremećaji, miokarditis, metaboličke promene, sedacija i poremećaji gastrointestinalne funkcije. Zbog toga se terapija klozapinom sprovodi uz redovno praćenje pacijenata, naročito njihovih hematoloških parametara. Međutim, i pored poznatih kliničkih rizika, molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi pojedinih neželjenih efekata nisu u potpunosti razjašnjeni.

Jedan od pristupa u razumevanju sveobuhvatnog delovanja lekova na organizam čoveka jeste ispitivanje njihovih interakcija sa proteinima. Proteini nisu samo pasivni nosioci lekova u organizmu, već funkcionalni molekuli čija aktivnost, stabilnost i struktura mogu biti promenjeni vezivanjem malih liganada. Takve interakcije najčešće su nekovalentne i uključuju hidrofobni efekat, vodonične veze, elektrostatičke interakcije i van der Waalsove sile. Iako pojedinačna interakcija može biti slaba, ukupni efekat vezivanja liganda za protein može biti značajan, naročito ako se vezivanje odvija u blizini funkcionalno važnih domena, aktivnog centra ili mesta odgovornih za konformacione promene proteina.

U ovoj doktorskoj disertaciji detaljno je ispitano vezivanje klozapina sa tri odabrana proteina krvi: katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom. Ovi proteini se značajno razlikuju po svojoj strukturi, lokalizaciji i biološkoj ulozi, što omogućava šire sagledavanje potencijalnih biohemijskih efekata klozapina. Katalaza je esencijalni antioksidativni hem-enzim koji razlaže vodonik-peroksid i predstavlja važan model za ispitivanje mogućeg uticaja klozapina na redoks-homeostazu. Alfa-2-makroglobulin je veliki protein plazme uključen u regulaciju proteolize, vezivanje različitih bioaktivnih molekula i zaštitu organizma od prekomerne aktivnosti proteaza. Fibrinogen je ključni protein plazme u procesu hemostaze, jer se pod dejstvom trombina prevodi u fibrin, osnovnu strukturnu komponentu krvnog ugruška. Odabir ovih proteina omogućava da se interakcije klozapina sa proteinima sagledaju kroz tri biohemijski različita, ali međusobno važna konteksta: antioksidativnu zaštitu, antiproteaznu regulaciju i hemostazu. Time se dobija mogućnost da se ispita ne samo da li se klozapin vezuje za proteine, već i da li takvo vezivanje može biti praćeno promenama u strukturi, stabilnosti i aktivnosti/funkciji ispitivanih proteina. U tome poseban značaj imaju funkcionalni testovi, pošto oni omogućavaju procenu da li vezivanje ima posledice na enzimsku aktivnost katalaze, antiproteaznu aktivnost alfa-2-makroglobulina ili formiranje fibrina iz fibrinogena.

Za ispitivanje vezivanja klozapina za ova tri proteina iz krvi iskorišćena je kombinacija eksperimentalnog i teorijskog pristupa. Spektroskopske metode omogućavaju praćenje promena u mikrokruženju aromatičnih aminokiselina, sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina, kao i procenu afiniteta vezivanja leka za protein od interesa. Funkcionalni testovi daju uvid u posledice vezivanja na biološku aktivnost proteinskog partnera, dok molekularni doking i simulacije molekulske dinamike omogućavaju predviđanje vezivnih mesta, stabilnosti protein-ligand kompleksa i prirode nekovalentnih interakcija.

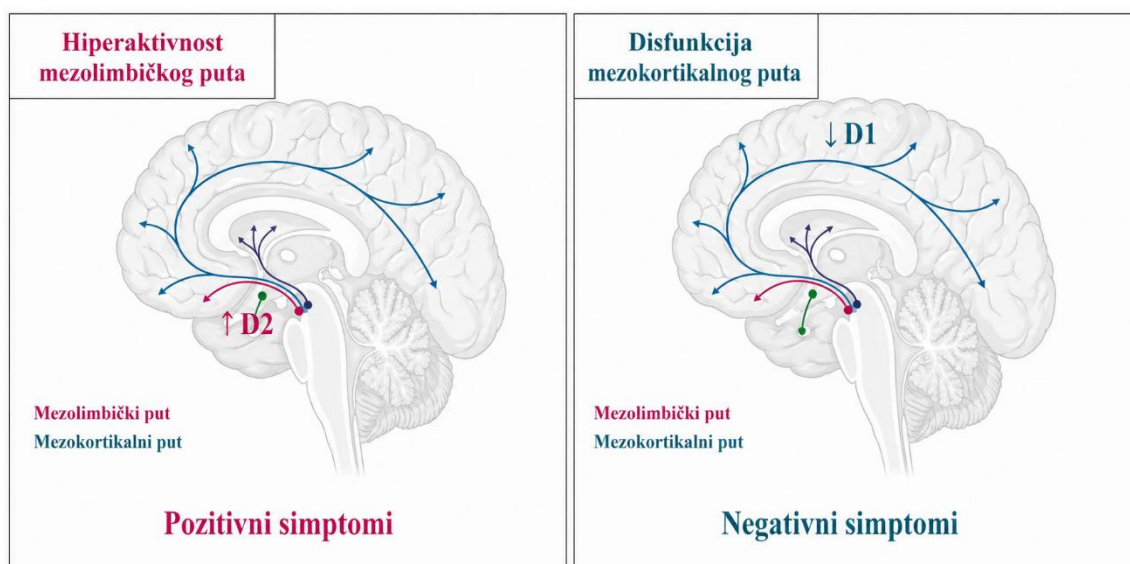
Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita sposobnost klozapina da direktno interaguje sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom, kao i da se proceni da li njegovo vezivanje dovodi do promena u strukturi, stabilnosti i funkciji navedenih proteina. Dobijeni rezultati mogu doprineti boljem razumevanju izvanreceptorskih efekata klozapina, kao i pružiti dodatni uvid u biohemijske procese koji mogu pratiti njegovu terapijsku primenu.

2. OPŠTI DEO

2.1. Shizofrenija i terapija antipsihoticima

Shizofrenija je hronični psihijatrijski poremećaj koji obuhvata poremećaje percepcije, mišljenja, emocionalnog odgovora i kognitivnog funkcionisanja. Klinička slika bolesti je heterogena i najčešće se opisuje kroz tri grupe simptoma: pozitivne, kao što su halucinacije, sumanute ideje i dezorganizovano mišljenje; negativne, kao što su emocionalna zaravnjenost, socijalno povlačenje i smanjena motivacija; kao i kognitivne simptome, koji uključuju poremećaje pažnje, pamćenja i izvršnih funkcija (Nucifora et al., 2017; Rawani et al., 2024). Zbog hroničnog toka bolesti, čestih relapsa i značajnog uticaja na svakodnevno funkcionisanje, farmakološko lečenje ima centralno mesto u dugoročnoj terapijskoj strategiji.

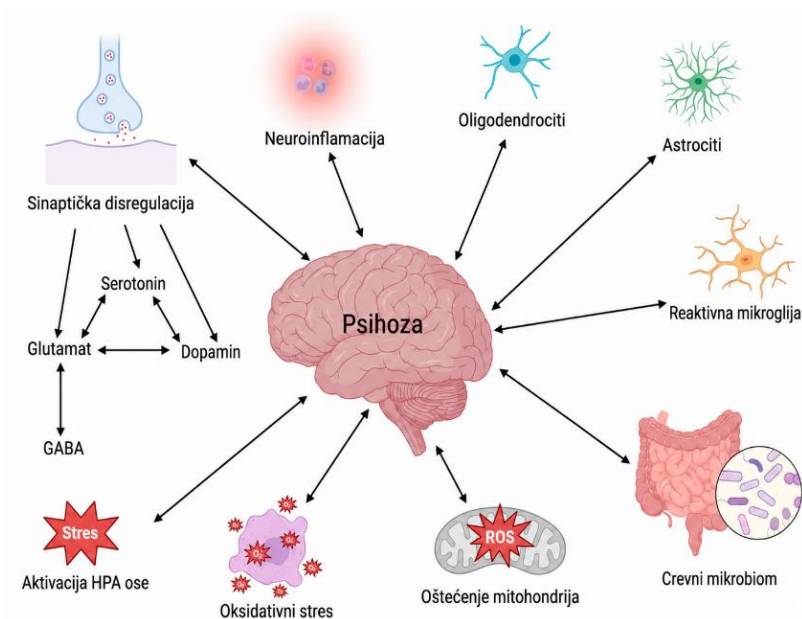
Biohemijska osnova shizofrenije nije u potpunosti razjašnjena. Najduže razmatrana dopaminska hipoteza (Slika 1) polazi od poremećaja dopaminergičke neurotransmisije u različitim moždanim putevima, pri čemu se pojačana aktivnost dopamina u mezolimbickom sistemu povezuje sa pozitivnim simptomima, dok se smanjena dopaminergička aktivnost u prefrontalnim kortikalnim regionima dovodi u vezu sa negativnim i kognitivnim simptomima. Ipak, danas je jasno da dopaminska disfunkcija ne može samostalno objasniti celokupnu kliničku i biološku složenost bolesti (Rawani et al., 2024; Yang & Tsai, 2017).



Slika 1. Dopaminska hipoteza shizofrenije. Preuzeto i adaptirano iz Anwar et al. (2025).

Pored dopamina, u patofiziologiji shizofrenije značajnu ulogu imaju glutamatergički, GABAergički, serotonergički i holinergički sistemi. Posebno je značajna glutamatergička hipoteza, zasnovana na poremećaju funkcije receptora za glutamat (NMDA) i neravnoteži između ekscitatorne i inhibitorne neurotransmisije. Ovakav poremećaj može uticati na kortikalne mreže, sinaptičku plastičnost i kognitivne funkcije, što je važno za razumevanje simptoma koji slabo odgovaraju na klasičnu dopaminsku blokadu (Hashimoto, 2014; Lin & Lane, 2019).

Savremeni pogledi na shizofreniju dodatno uključuju oksidativni stres, neuroinflamaciju, poremećaj mitohondrijalne funkcije i promene u ćelijskoj homeostazi (Slika 2). Mozak je posebno osetljiv na oksidativno oštećenje, zbog visoke potrošnje kiseonika, bogatstva polinezasićenih masnih kiselina i relativno ograničenih antioksidativnih kapaciteta. Kod pacijenata sa shizofrenijom opisane su promene u markerima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, uključujući enzime kao što su superoksid-dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza (Cuenod et al., 2022; Ong & Logue, 2023). Oksidativni stres se zato ne posmatra samo kao posledica bolesti, već i kao jedan od procesa koji može doprineti poremećaju neuronske funkcije, neuroinflamaciji i promenama u sinaptičkoj regulaciji (de Bartolomeis et al., 2022).



Slika 2. Potencijalni faktori koji utiču na nastanak i razvoj psihoze. Prezueti i adaptirani iz **Rawani et al. (2024)**.

Ovakav širi biohemijski okvir važan je za razumevanje dejstva antipsihotika. Iako su ovi lekovi prvobitno razvijani i klasifikovani prema uticaju na dopaminske receptore, njihovo delovanje ne može se svesti samo na receptorni antagonizam (**Nucifora et al., 2017; Remington et al., 2016**)

2.1.1. Antipsihotici prve i druge generacije

Farmakološko lečenje shizofrenije zasniva se na primeni antipsihotika, lekova koji ublažavaju psihotične simptome i smanjuju rizik od pogoršanja bolesti. Antipsihotici prve generacije, poznati i kao tipični antipsihotici, svoje dejstvo ostvaruju pretežno antagonizmom dopaminskih D_2 receptora. Ovakav mehanizam je efikasan u smanjenju pozitivnih simptoma, ali je često praćen ekstrapiramidnim neželjenim efektima, kao što su parkinsonizam, akatizija, akutna distonija i tardivna diskinezija (**Nucifora et al., 2017**).

Potreba za lekovima koji bi zadržali antipsihotičku efikasnost, ali uz manji rizik od neuroloških neželjenih efekata, dovela je do razvoja antipsihotika druge generacije, odnosno atipičnih antipsihotika. Ovi lekovi, pored delovanja na dopaminske receptore, pokazuju značajan afinitet prema serotoninским receptorima, naročito $5-HT_2A$ receptorima. Antagonizam $5-HT_2A$ receptora može modulirati dopaminergičku transmisiju u različitim moždanim putevima i doprineti manjem riziku od ekstrapiramidnih simptoma u poređenju sa tipičnim antipsihoticima (**Ceskova, 2022; Meltzer, 1999**).

Ipak, atipični antipsihotici *nisu* homogena grupa lekova. Oni se međusobno razlikuju po afinitetu prema dopaminskim, serotoninским, muskarinskim, adrenergičkim i histaminskim receptorima, kao i po kliničkoj efikasnosti, sedativnom potencijalu, metaboličkom riziku i kardiovaskularnim neželjenim efektima. Zbog toga podela na tipične i atipične antipsihotike ima praktičan značaj, ali ne opisuje u potpunosti farmakološku raznovrsnost ovih lekova (**De Berardis et al., 2018a; Khokhar et al., 2018**).

Među atipičnim antipsihoticima klopazin zauzima posebno mesto. On je prvi lek iz ove grupe i prototip atipičnog antipsihotika, ali se od ostalih lekova razlikuje po dokazanoj efikasnosti kod terapijski rezistentne shizofrenije (TRS, od engl. Treatment Resistant Schizophrenia). Istovremeno, njegova primena zahteva pažljivo praćenje zbog mogućnosti pojave ozbiljnih neželjenih efekata, uključujući agranulocitozu, miokarditis, konvulzije, metaboličke poremećaje i gastrointestinalnu hipomotilnost (**Fakra & Azorin, 2012; Flanagan et al., 2020**).

2.1.2. Terapijski rezistentna shizofrenija i mesto klopapina

Terapijski rezistentna shizofrenija predstavlja oblik bolesti kod koga ne dolazi do zadovoljavajućeg kliničkog poboljšanja nakon primene najmanje dva antipsihotika. Ovaj oblik bolesti ima poseban klinički značaj, jer je povezan sa težim tokom, većim funkcionalnim oštećenjem, češćim hospitalizacijama i smanjenim kvalitetom života (**Remington et al., 2016; Ying et al., 2023**).

Klozapin je jedini antipsihotik sa jasno potvrđenom superiornošću u terapiji terapijski rezistentne shizofrenije. Njegova efikasnost ne može se jednostavno objasniti samo blokadom D₂ receptora, jer pokazuje umereniju zauzetost ovih receptora u odnosu na tipične antipsihotike. Umesto toga, njegovo delovanje obuhvata više receptorskih sistema, uključujući dopaminske, serotonininske, muskarinske, histaminske i adrenergičke receptore, ali i mehanizme koji prevazilaze klasični receptorni model (**Khokhar et al., 2018; Nucifora et al., 2017**).

Uprkos dokazanom terapijskom značaju, klozapin se u kliničkoj praksi i dalje koristi manje nego što bi se očekivalo na osnovu njegove efikasnosti. Glavni razlozi su potreba za redovnim hematološkim monitoringom, strah od agranulocitoze i drugih ozbiljnih neželjenih efekata, kao i organizacione prepreke u zdravstvenom sistemu (**Remington et al., 2016; Rubio & Kane, 2020**). Zbog toga savremeni pristup klozapinu podrazumeva ravnotežu između njegove jedinstvene terapijske vrednosti i potrebe za pažljivom procenom bezbednosti.

Ovaj širi farmakološki i biohemijski profil čini klozapin posebno značajnim predmetom istraživanja. Sa jedne strane, on predstavlja najefikasniju terapijsku opciju kod TRS. Sa druge strane, njegova primena je povezana sa neželjenim efektima, koji uključuju hematološke, metaboličke, kardiovaskularne, imunološke i redoks-procese. Zbog toga se klozapin ne posmatra samo kao antipsihotik sa specifičnim receptorskim profilom, već i kao bioaktivni molekul čije interakcije sa proteinima mogu biti važne za razumevanje njegovog šireg biohemijskog ponašanja.

2.2. Klozapin

2.2.1. Istorijat i klinički značaj

Klozapin predstavlja prvi atipični antipsihotik uveden u kliničku praksu i jedan od najznačajnijih lekova u savremenoj psihofarmakologiji, pre svega zbog dokazane efikasnosti kod pacijenata sa TRS. Smatra se da se ovakav oblik bolesti javlja kod približno jedne trećine pacijenata sa shizofrenijom, zbog čega predstavlja jedan od najvećih izazova u psihijatrijskoj terapiji (**Remington et al., 2016**).

Klozapin je sintetisan 1958. godine, kao triciklično dibenzodiazepinsko jedinjenje, u periodu intenzivnog razvoja lekova sličnih hlorpromazinu i imipraminu (**Crilly, 2007**). Za razliku od tipičnih antipsihotika, koji svoje dejstvo uglavnom ostvaruju snažnom blokadom dopaminskih D₂ receptora, klozapin je od početka pokazivao neuobičajen klinički profil: izraženo antipsihotično dejstvo uz znatno manji rizik od ekstrapiramidalnih neželjenih efekata. Upravo je ovaj profil doprineo formiranju koncepta „atipičnih” antipsihotika, odnosno, lekova koji se od klasičnih neuroleptika razlikuju po širem receptorskom dejstvu i povoljnijem neurološkom bezbednosnom profilu (**Meltzer & McGurk, 1999; Seeman, 2014**).

Rani razvoj klopapina bio je, međutim, obeležen ozbiljnim bezbednosnim problemima. Nakon što su sedamdesetih godina prošlog veka u Finskoj opisani slučajevi agranulocitoze, uključujući i smrtne ishode, njegova primena je u mnogim zemljama obustavljena ili znatno ograničena. Ovaj događaj je dugo oblikovao percepciju klopapina kao efikasnog, ali potencijalno rizičnog leka. Kasnija istraživanja pokazala su da se rizik od teške neutropenije i agranulocitoze može značajno smanjiti redovnim hematološkim praćenjem, što je omogućilo ponovnu kontrolisanu primenu leka (**Remington et al., 2016**). Prekretnicu u savremenoj upotrebi klopapina predstavljala je studija Kanea i saradnika iz 1988. godine, u kojoj je pokazano da je klozapin efikasniji od hlorpromazina kod pacijenata sa shizofrenijom rezistentnom na prethodnu terapiju neurolepticima (**Kane et al., 1988**). Ovaj nalaz je kasnije potvrđen brojnim kliničkim studijama, pregledima i meta-analizama, te se

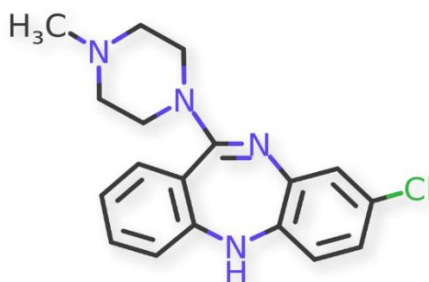
klozapin danas smatra terapijom izbora kod TRS (Asenjo Lobos et al., 2010; Erlianti et al., 2025; Kane et al., 2024).

Pored efikasnosti u TRS, klozapin ima značaj i zbog smanjenja suicidalnog ponašanja kod pacijenata sa shizofrenijom i shizoafektivnim poremećajem. Ovaj efekat dodatno ga razlikuje od drugih antipsihotika i doprinosi njegovom posebnom mestu u kliničkoj praksi. Uprkos tome, klozapin se i dalje nedovoljno koristi, često uz značajno odlaganje nakon što se ispune kriterijumi za terapijsku rezistenciju. Kao najčešći razlozi navode se strah od ozbiljnih neželjenih efekata, potreba za hematološkim praćenjem, nedovoljno iskustvo lekara i organizacione prepreke u zdravstvenom sistemu (Correll et al., 2022; Meltzer et al., 2003; Qubad & Bittner, 2023).

Savremeni pogled na klozapin kao lek zasniva se na ravnoteži između njegove izuzetne terapijske vrednosti i potrebe za pažljivim praćenjem bezbednosti. Hematološka toksičnost ostaje najpoznatiji rizik, ali se sve veća pažnja posvećuje i drugim ozbiljnim neželjenim efektima, uključujući miokarditis, kardiomiopatiju, metaboličke poremećaje, gastrointestinalnu hipomotilnost i konvulzije (Remington et al., 2016). Zbog toga se klozapin ne može posmatrati samo kao antipsihotik sa specifičnim receptorskim profilom, već kao molekul sa složenim farmakološkim, metaboličkim, imunološkim i redoks efektima.

2.2.2. Hemijska struktura i osnovna fizičko-hemijska svojstva klozapina

Klozapin je triciklično heterociklično jedinjenje iz grupe dibenzodiazepina. Njegov hemijski naziv je 8-hloro-11-(4-metilpiperazin-1-il)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin, a molekulska formula je $C_{18}H_{19}ClN_4$. Relativna molekulska masa iznosi $\sim 326,8$ g/mol (Clozapine, Guide to pharmacology, 2026). Strukturno, klozapin se sastoji od dva benzenova prstena kondenzovana sa sedmočlanim diazepinskim prstenom (Slika 3), pri čemu je na položaju 8 prisutan atom hlora, dok je na položaju 11 vezana 4-metilpiperazinska grupa. Ovakva struktura daje molekulu izraženo aromatičan i lipofilan karakter, ali istovremeno uvodi i bazne centre preko atoma azota u piperazinskom i diazepinskom delu strukture. Prisustvo aromatičnih prstenova i hlorovanog supstituenta doprinosi hidrofobnosti molekula, dok piperazinski deo omogućava protonaciju i interakcije sa polarnim grupama u biološkom okruženju (Clozapine, Guide to pharmacology, 2026; Clozapine, PubChem, 2026).



Slika 3. Hemijska struktura klozapina

Klozapin se najčešće opisuje kao slaba baza – baznost potiče, pre svega, od piperazinskog azota, koji može biti protonovan u fiziološkim uslovima. Predviđene vrednosti pK_a zavise od korišćenog modela, ali su najčešće u oblasti oko 7,4–7,8 za najizraženiji bazni centar (Clozapine DrugBank, 2006; Li et al., 2005). Ova karakteristika je važna, pošto određuje odnos između neutralnog i protonovanog oblika klozapina pri fiziološkom pH. Neutralni oblik lakše prolazi kroz hidrofobne barijere (biološke membrane), dok protonovani oblik može učestvovati u elektrostatičkim interakcijama i vodoničnom vezivanju sa amino-kiselinskim ostacima proteina.

Lipofilnost je jedno od ključnih fizičko-hemijskih svojstava klozapina. Vrednosti $\log P/XLogP$, u zavisnosti od izvora i metode izračunavanja, nalaze se u opsegu 3,2–3,9, što ukazuje na izraženu sklonost molekula ka hidrofobnom okruženju (Clozapine DrugBank, 2006). To je važno za distribuciju klozapina u organizmu, prolazak kroz biološke membrane i interakcije sa hidrofobnim delovima proteina. Lipofilni karakter molekula takođe objašnjava njegovu slabu rastvorljivost u vodi i potrebu za posebnim pristupima u farmaceutskoj formulaciji.

Klozapin pripada jedinjenjima sa niskom vodenom rastvorljivošću. U farmaceutskoj literaturi se često svrstava u jedinjenja klase II prema biofarmaceutskoj klasifikaciji, što znači da pokazuje visoku permeabilnost, ali nisku rastvorljivost (**Moghaddam & Javitt, 2012**). Bolje se rastvara u organskim rastvaračima i lipidnom okruženju. Ova kombinacija visoke lipofilnosti i niske vodene rastvorljivosti značajna je za njegovo ponašanje u biološkim sistemima, s obzirom da utiče na apsorpciju, distribuciju i vezivanje za proteine.

Broj donora i akceptora vodoničnih veza dodatno opisuje potencijal klozapina za nekovalentne interakcije. Prema izračunatim molekulskim parametrima, klozapin ima jedan donor i četiri akceptora vodoničnih veza, uz mali broj rotacionih veza i relativno malu topološku polarnu površinu (**Clozapine, Guide to pharmacology, 2026**). Ova svojstva ukazuju da je molekul leka dovoljno kompaktan i pretežno hidrofoban, ali da ipak poseduje funkcionalne grupe koje mogu ostvariti vodonične veze ili dipolne interakcije sa proteinima. U kontekstu protein-ligand interakcija, to znači da vezivanje klozapina najverovatnije uključuje kombinaciju hidrofobnih kontakata, π - π interakcija aromatičnih sistema, elektrostatičkih interakcija protonovanog piperazinskog dela i pojedinačnih vodoničnih veza.

Hemijska struktura klozapina takođe objašnjava njegovu sposobnost formiranja soli i višekomponentnih kristalnih oblika. Piperazinski azot može prihvatiti proton od kiselih koformera, što je pokazano u istraživanjima multikomponentnih kristala klozapina sa organskim kiselinama. Takvi oblici mogu poboljšati rastvorljivost i stabilnost leka, što potvrđuje da su protonovanje i međumolekulske interakcije piperazinskog dela ključne za fizičko-hemijsko ponašanje klozapina u čvrstom stanju i rastvoru (**Li et al., 2005; Lindenberg et al., 2004**).

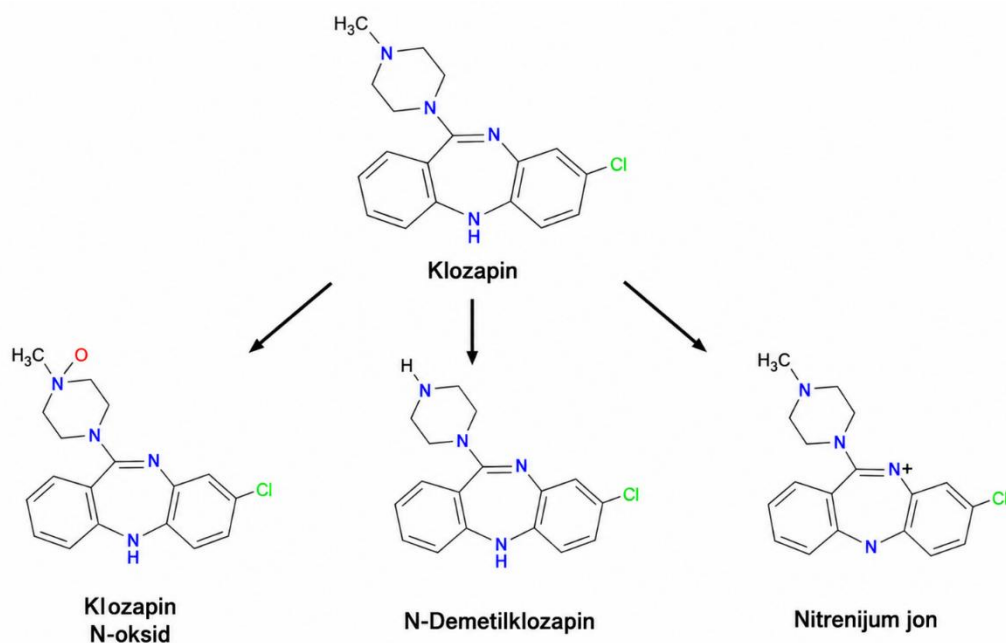
2.2.3. Farmakokinetika i klinički značaj metabolita klozapina

Nakon oralne primene, klozapin se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i podleže izraženoj međuindividualnoj farmakokinetičkoj varijabilnosti. Pregled farmakoloških i kliničkih podataka, iz rada Wagstaffa i Brysona, navodi oralnu bioraspoloživost u opsegu od približno 27–47%, dostizanje maksimalnih koncentracija u plazmi nakon približno 1,5–3,6 h i terminalno poluvreme eliminacije približno 8,1–15,8 h, uz napomenu da su vrednosti zavisne od doze, populacije i metodologije merenja (**Wagstaff & Bryson, 1995**).

Klozapin je u cirkulaciji visoko vezan za proteine, ali za potrebe ove disertacije je korisnije naglasiti prirodu tog vezivanja. Eksperimentalni radovi pokazuju da su za protein-vezanu frakciju važni serum albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein, pri čemu inflamatorna stanja, preko porasta akutnofaznih proteina, mogu promeniti odnos ukupne i slobodne frakcije klozapina (**Banis et al., 2017**). Interakcije klozapina sa albuminom mogu menjati i redoks svojstva proteinske tiolne grupe, što ukazuje da vezivanje za proteine nije samo farmakokinetički rezervoar, već moguće i biohemijski relevantan proces (**Uzelac et al., 2019**).

Metabolizam klozapina odvija se dominantno u jetri, a najvažniji metaboliti su N-desmetilklozapin, odnosno norklozapin, i klozapin-N-oksidi (**Slika 4**). U originalnom radu Linneta i Olesena, zasnovanom na cDNA-eksprimiranim humanim CYP enzimima, pokazano je da CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 katalizuju N-demetilaciju klozapina, dok je formiranje N-oksida bilo vezano za CYP3A4. Autori su pokazali da relativni doprinos pojedinačnih enzima zavisi od koncentracije supstrata i uslova modela, što objašnjava zašto u kliničkim uslovima metabolizam klozapina ne može biti sveden na jedan CYP enzim (**Olesen & Linnet, 1997**).

U kliničkim i preglednim radovima najčešće se ističe uloga CYP1A2 i CYP3A4, uz doprinos CYP2C19, CYP2D6 i drugih enzima. Pušenje, inflamacija, interakcije sa lekovima i genetička varijabilnost mogu značajno promeniti koncentracije klozapina i njegovih metabolita, zbog čega je terapijsko praćenje koncentracija naročito značajno kod pacijenata sa promenljivim kliničkim stanjem (**Albitar et al., 2020; Chetty & Murray, 2007; Thorn et al., 2018**).



Slika 4. Klozapin i njegovi glavni metaboliti (Olesen & Linnet, 1997).

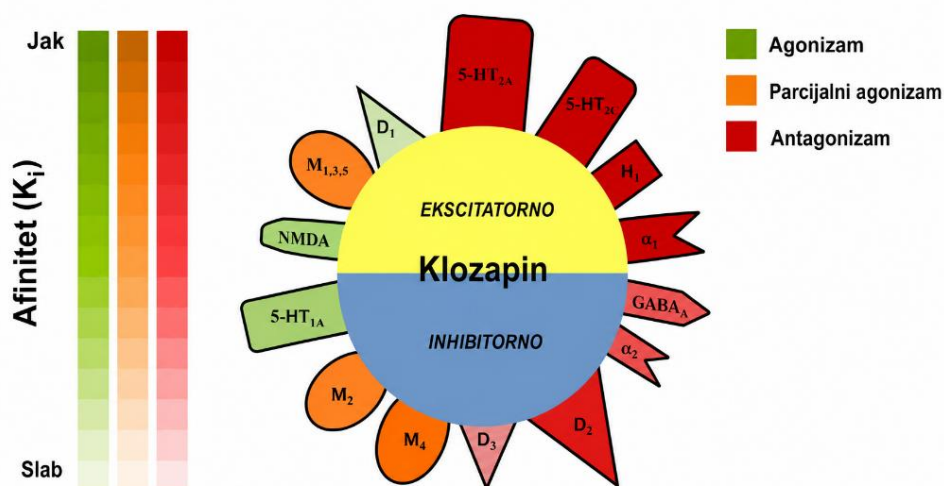
Terapijsko praćenje klozapina ne treba svoditi na jednu apsolutnu granicu. Individualna metaanaliza Northwooda i saradnika ukazuje da je opseg 250–550 ng/mL koristan kao praktičan okvir, pri čemu se koncentracije iznad približno 350 ng/mL često povezuju sa većom verovatnoćom odgovora, ali uz potrebu da se koristi procena odnosa koristi i rizika, naročito pri višim koncentracijama leka (Nordström et al., 1995). Konsenzusne smernice za terapijsko praćenje psihofarmaka takođe podržavaju upotrebu koncentracija klozapina i norklozapina u optimizaciji doziranja, proceni adherencije i tumačenju neželjenih efekata (Hiemke et al., 2018).

Norklozapin nije samo pasivan metabolit. Više eksperimentalnih radova pokazalo je da on pokazuje aktivnost na muskarinskim, serotoninским, dopaminskim i drugim receptorima, ali se rezultati razlikuju u zavisnosti od modela, vrste tkiva i funkcionalnog testa. Dakle, norklozapin može doprineti ukupnom farmakološkom profilu klozapina, ali se njegov doprinos ne može jednoznačno preneti iz jednog eksperimentalnog sistema na klinički efekat (Heusler et al., 2011; Sur et al., 2003; Thomas & Friedman, 2010; Weiner et al., 2004).

2.2.4. Farmakodinamika i receptorski profil klozapina

Farmakodinamički profil klozapina zasniva se na istovremenoj modulaciji više neurotransmiterskih sistema, što ga jasno razlikuje od tipičnih antipsihotika. Dok je kod klasičnih neuroleptika terapijski efekat dominantno povezan sa snažnim antagonizmom dopaminskih D₂ receptora, klozapin pokazuje znatno širi receptorski spektar. Njegovo dejstvo obuhvata dopaminske, serotoniniske, muskarinske, adrenergičke i histaminske receptore, zbog čega se smatra lekom sa izraženim multireceptorskim (Slika 5), odnosno polifarmakološkim profilom (Baldessarini & Frankenburg, 1991; Nucifora et al., 2017).

Jedna od najvažnijih karakteristika klozapina jeste relativno umerena zauzetost dopaminskih D₂ receptora u terapijskom opsegu. Ovaj nalaz je posebno značajan, pošto se kod većine tipičnih antipsihotika klinička efikasnost i pojava ekstrapiramidnih neželjenih efekata tesno povezuju sa visokim stepenom D₂ blokade. Kod klozapina je D₂ antagonizam prisutan, ali nije dominantan u meri koja se viđa kod klasičnih neuroleptika, što se dovodi u vezu sa znatno manjim rizikom od parkinsonizma, distonije i drugih ekstrapiramidnih simptoma. Pored toga, u literaturi je predložena hipoteza prema kojoj se klozapin relativno brzo odvaja od D₂ receptora, čime se omogućava veća konkurencija endogenog dopamina na sinaptičkom nivou. Takav profil mogao bi da doprinese njegovoj atipičnosti, mada se ne može posmatrati kao jedino objašnjenje specifičnog kliničkog dejstva leka (Farde et al., 1992; Seeman & Tallerico, 1999).



Slika 5. Pojednostavljeni šematski prikaz profila afiniteta klopazina kao agoniste (zeleno), parcijalnog agoniste (naranđasto) i antagoniste (crveno) prema ekscitatornim (žuto) i inhibitornim (plavo) receptorima. Preuzeto i adaptirano iz O'Connor & O'Shea (2015).

Pored D_2 receptora, klopazin pokazuje afinitet i prema drugim dopaminskim podtipovima, uključujući D_1 i D_4 receptore. Posebno je značajno vezivanje za D_4 receptore, pošto je u ranijim istraživanjima pokazano da klopazin ima veći afinitet prema ovom podtipu nego prema D_2 receptorima. Ipak, kasnija istraživanja nisu potvrdila da se jedinstvena terapijska efikasnost klopazina može objasniti isključivo delovanjem na D_4 receptore. Zbog toga se danas smatra da dopaminergički efekti klopazina imaju značajnu, ali ne i izolovanu ulogu u njegovom ukupnom farmakodinamičkom profilu (Meltzer et al., 2003; Nucifora et al., 2017).

Serotoninski receptori su drugi ključni deo mehanizma dejstva klopazina. Izražen antagonizam 5-HT_{2A} receptora smatra se jednim od osnovnih obeležja atipičnih antipsihotika, jer može doprineti smanjenju ekstrapiramidnih neželjenih efekata i povoljnijem uticaju na dopaminsku transmisiju u određenim moždanim regijama. Klopazin, takođe, deluje na druge serotoninske receptorske podtipove, uključujući 5-HT_{2C} , 5-HT_{1A} i 5-HT_7 receptore, pri čemu se njihova uloga povezuje sa dodatnom modulacijom afektivnih, kognitivnih i kortikalnih funkcija. Međutim, odnos između D_2 i 5-HT_{2A} antagonizma nije dovoljan da objasni posebnost klopazina, pošto i drugi atipični antipsihotici dele ovu osobinu, ali nemaju isti nivo efikasnosti kod terapijski rezistentne shizofrenije (Meltzer, 1999; Nordström et al., 1995).

Muskarinski receptori imaju posebno mesto u farmakodinamici klopazina, jer su povezani i sa terapijskim osobinama i sa neželjenim efektima leka. Klopazin pokazuje izraženo antagonistično dejstvo prema više muskarinskih receptorskih podtipova, što doprinosi antiholinergičkim efektima kao što su suvoća usta, konstipacija, tahikardija, poremećaj akomodacije i kognitivno usporenje. Ovi efekti su klinički važni jer mogu ograničiti podnošljivost terapije, posebno kod dugotrajne primene. S druge strane, glavni aktivni metabolit klopazina, N-desmetilklopazin, ima drugačiji funkcionalni profil i može delovati kao parcijalni agonista M_1 muskarinskih receptora. Zbog toga se ukupni farmakodinamički efekat terapije ne može pripisati samo matičnom jedinjenju, već zavisi i od aktivnosti njegovih metabolita i njihovog odnosa u cirkulaciji (Heusler et al., 2011; Li et al., 2005).

Značajan doprinos profilu neželjenih efekata daju i histaminski H_1 i adrenergički α_1 receptori (Tabela 1). Antagonizam H_1 receptora povezuje se sa sedacijom, povećanjem apetita i porastom telesne mase, što su česti i klinički relevantni problemi tokom terapije klopazinom. Blokada α_1 adrenergičkih receptora može dovesti do ortostatske hipotenzije, vrtoglavice i refleksne tahikardije, naročito tokom uvođenja leka i postepenog povećavanja doze. Zbog toga receptorski profil klopazina nije važan samo za razumevanje njegove efikasnosti, već i za objašnjenje potrebe za pažljivom titracijom, praćenjem pacijenta i individualizacijom terapijskog režima (Khokhar et al., 2018; Wagstaff & Bryson, 1995).

Tabela 1. Pregled najvažnijih receptorskih sistema uključenih u mehanizam delovanja klopapina (adaptirano iz Khokhar et al., 2018 i Wagstaff & Bryson, 1995).

Receptorski sistem	Dejstvo klopapina	Farmakološki značaj
Dopaminski D ₂	Umereno antagonistično dejstvo i relativno niža zauzetost u terapijskom opsegu	Antipsihotički efekat uz manji rizik od ekstrapiramidnih simptoma
Dopaminski D ₁ /D ₄	Afinitet prema više dopaminskih podtipova	Doprinos složenom dopaminergičkom profilu, bez samostalnog objašnjenja efikasnosti leka
Serotoninski 5-HT _{2A} /5-HT _{2C}	Izražen antagonizam	Deo atipičnog profila i modulacija dopaminske transmisije
Serotoninski 5-HT _{1A} /5-HT ₇	Dodatna serotonergička modulacija	Mogući doprinos afektivnim, kognitivnim i kortikalnim efektima
Muskarinski M ₁ –M ₅	Antagonizam klopapina; parcijalni M ₁ agonizam N-desmetilklopapina	Antiholinergički neželjeni efekti, ali i mogući doprinos specifičnom profilu leka
Histaminski H ₁	Antagonizam	Sedacija, povećanje apetita i telesne mase
Adrenergički α ₁	Antagonizam	Ortostatska hipotenzija, vrtoglavica i tahikardija

2.2.5. Neželjeni efekti i mehanizmi toksičnosti klopapina

Klopapinu je, iako jeste najefikasniji antipsihotik u lečenju TRS, njegova primena ograničena mogućnošću razvoja ozbiljnih neželjenih efekata. Za razliku od većine drugih antipsihotika, bezbednosni profil klopapina obuhvata hematološke, kardiovaskularne, metaboličke, neurološke i gastrointestinalne komplikacije, zbog čega je tokom terapije neophodno pažljivo kliničko i laboratorijsko praćenje pacijenata (de Leon et al., 2022; Siskind et al., 2021).

Najozbiljniji neželjeni efekat predstavlja agranulocitoza, odnosno izraženo smanjenje broja neutrofila koje povećava rizik od teških infekcija. Iako je učestalost agranulocitoze značajno smanjena uvođenjem obaveznog hematološkog monitoringa, molekulski mehanizam njenog nastanka još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da u njenom razvoju učestvuju reaktivni metaboliti klopapina, aktivacija urođenog i stečenog imunskog odgovora, genetska predispozicija i individualne razlike u detoksikacionim mehanizmima (de Leon et al., 2022). Biotransformacijom klopapina mogu nastati reaktivni intermedijeri, uključujući nitrenijum jon, koji ostvaruje kovalentne interakcije sa proteinima i može dovesti do nastanka neoantigena i aktivacije imunskog sistema. Istovremeno, povećano nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta doprinosi oksidativnom oštećenju lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Zbog toga se oksidativni stres smatra jednim od ključnih mehanizama uključenih u razvoj toksičnih efekata klopapina, iako njegov doprinos zavisi od međusobnog delovanja više molekulskih procesa (Fehsel et al., 2005; Williams et al., 2020). Pored hematološke toksičnosti, značajnu kliničku pažnju privlače miokarditis i kardiomiopatija povezani sa primenom leka. Predloženi mehanizmi uključuju imunološki posredovanu inflamaciju, povećanu produkciju citokina, oksidativni stres i direktno oštećenje mitohondrijalne funkcije. Iako su ove komplikacije tretmana klopapinom relativno retke, mogu imati ozbiljan klinički tok, zbog čega je njihovo rano prepoznavanje od velikog značaja (De Berardis et al., 2018b; Ronaldson et al., 2015).

Metabolički neželjeni efekti, uključujući povećanje telesne mase, insulinsku rezistenciju i dislipidemiju, predstavljaju jedan od najčešćih razloga smanjene adherencije terapiji klopapinom. Njihov nastanak povezuje se sa složenim međusobnim delovanjem receptorskih mehanizama, promenama u regulaciji energetskeg metabolizma, inflamacijom i oksidaciono-redukcionim procesima. Sve je više dokaza da metaboličke promene izazvane klopapinom prevazilaze klasični receptorni model i uključuju poremećaje ćelijske signalizacije i funkcije mitohondrija. Umesto jednog dominantnog mehanizma, danas preovladava mišljenje da toksičnost klopapina nastaje kao rezultat kompleksne interakcije reaktivnih metabolita, imunskog odgovora i poremećaja ćelijske homeostaze (Fehsel, 2024; Menus et al., 2020; Yuen et al., 2021).

2.3. Proteini plazme

2.3.1. Opšte o plazmi i raznolikosti proteina u plazmi

Krvna plazma predstavlja složenu biološku tečnost u kojoj se, pored vode, elektrolita, metabolita, hormona i drugih komponenti male molekulske mase, nalazi i veliki broj proteina različite strukture, koncentracije i fiziološke uloge (**Anderson & Anderson, 2002**). Proteini plazme učestvuju u održavanju osmotskog pritiska, transportu endogenih i egzogenih molekula, regulaciji hemostaze, imunološkoj odbrani, kontroli proteolitičke aktivnosti i odgovoru organizma na oksidativni i inflamatorni stres (**Schaller et al., 2008**). Zbog toga plazma ne predstavlja samo transportni medijum, već i dinamično okruženje u kome lekovi, nakon ulaska u cirkulaciju, mogu stupati u interakcije sa različitim proteinskim sistemima.

Ukupna koncentracija proteina u humanoj plazmi iznosi približno 60–80 g/L. Najzastupljeniji protein je albumin, oko 55–60% ukupnih proteina plazme, koji ima ključnu ulogu u održavanju onkotskog pritiska i transportu brojnih endogenih liganada i lekova (**Peters, 1995**). Pored albumina, značajne frakcije čine globulini i fibrinogen. Globulinska frakcija obuhvata veliki broj funkcionalno različitih proteina, uključujući transportne proteine, inhibitore proteaza, komponente komplementa, imunoglobuline i proteine akutne faze. Fibrinogen je jedan od najvažnijih koagulacionih proteina plazme i direktni prekursor fibrina, ključne komponente krvnog ugruška (**Mosesson, 2005**).

Interakcije lekova sa proteinima plazme imaju veliki značaj za farmakokinetiku, farmakodinamiku i ukupno biološko ponašanje leka. Nakon apsorpcije i ulaska u cirkulaciju, mnogi lekovi se u manjoj ili većoj meri reverzibilno vezuju za proteine plazme. Na taj način nastaje ravnoteža između slobodne i vezane frakcije leka. Slobodna frakcija je farmakološki aktivna, dostupna za prolazak kroz biološke membrane, vezivanje za ciljne receptore, metabolizam i eliminaciju, dok vezana frakcija predstavlja privremeni rezervoar leka u cirkulaciji (**Trainor, 2007**). Zbog toga stepen vezivanja za proteine može uticati na jačinu i trajanje farmakološkog efekta, distribuciju, poluvreme eliminacije i mogućnost interakcija sa drugim lekovima.

U klasičnom farmakokinetičkom smislu, najveći značaj za vezivanje lekova imaju albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein. Albumin, zbog visoke koncentracije i više vezivnih mesta, vezuje veliki broj kiselih i neutralnih lekova, dok alfa-1-kiseli glikoprotein naročito doprinosi vezivanju baznih i lipofilnih lekova (**Bteich, 2019; Kremer et al., 1988**). Međutim, fokus isključivo na ova dva proteina ne pruža potpun uvid u moguće posledice kontakta leka sa drugim proteinskim komponentama plazme. Lekovi, posebno lipofilni i biološki aktivni molekuli, mogu ostvarivati interakcije i sa drugim (ne ciljnim) proteinima, pri čemu takve interakcije, iako ne moraju nužno imati veći doprinos ukupnom vezivanju leka u plazmi, mogu biti značajne sa aspekta strukture, stabilnosti ili funkcije pojedinačnih partnerskih proteina. Ovo je posebno važno kod lekova koji se primenjuju dugotrajno i koji pokazuju izražene plejotropne efekte. Klozapin je visokopotentan, lipofilan atipični antipsihotik koji se u značajnoj meri vezuje za proteine plazme (detaljnije opisano u poglavlju 2.2.3). Iako su albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein najčešće razmatrani u kontekstu njegove farmakokinetike, interakcija klozapina sa drugim proteinskim sistemima može biti značajna za razumevanje njegovog šireg biohemijškog delovanja. Takve interakcije mogu uticati na stabilnost proteinske strukture, dostupnost funkcionalnih domena i, zato, samu aktivnost proteina.

U ovoj disertaciji su kao model-proteini izabrani katalaza (iz goveđe jetre), alfa-2-makroglobulin i fibrinogen. Ovi proteini se međusobno izrazito razlikuju po građi, molekulskoj masi, funkciji i biološkoj ulozi. Katalaza je hem-enzim uključen u razgradnju vodonik-peroksida i ključan, uz superoksid-dismutazu, za zaštitu ćelija od oksidativnog stresa. Alfa-2-makroglobulin je veliki glikoprotein plazme i inhibitor širokog spektra proteaza, sposoban za izražene konformacione promene i vezivanje različitih bioaktivnih molekula. Fibrinogen je ključni protein hemostaze, čija se funkcija zasniva na kontrolisanoj konverziji u fibrin i formiranju fibrinske mreže. Upravo zbog ovih razlika, navedeni proteini omogućavaju uporedno sagledavanje interakcija klozapina sa proteinskim sistemima različite strukturne složenosti i funkcionalnog značaja.

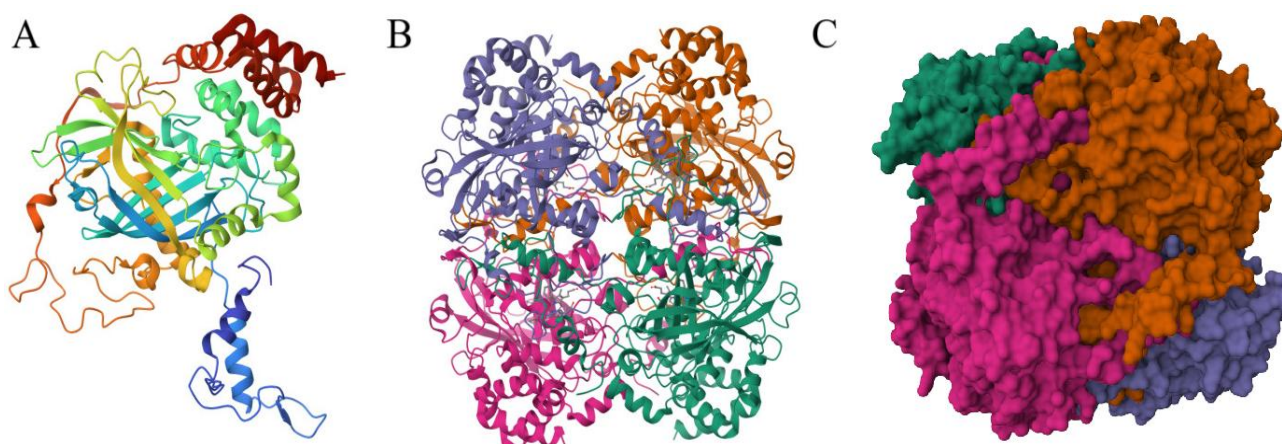
Ispitivanje ovih interakcija ne treba posmatrati samo kao pitanje farmakokinetičkog vezivanja leka, već i kao mogućnost da se proceni da li klopazin, nakon formiranja nekovalentnog kompleksa sa proteinom, može izazvati promene u njegovoj strukturi, stabilnosti ili aktivnosti i funkciji. Ovakav pristup omogućava bolje razumevanje potencijalnih plejotropnih efekata leka koji nisu razjašnjeni na molekulskom nivou. Zbog toga analiza interakcija klopazina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom može doprineti širem razumevanju njegovog biohemijskog ponašanja izvan primarnih receptorskih sistema centralnog nervnog sistema.

2.3.2. Katalaza – ključni antioksidativni enzim

Katalaza (EC 1.11.1.6) jeste jedan od najpoznatijih i najefikasnijih enzima antioksidativne zaštite. Njena osnovna funkcija je razgradnja vodonik-peroksida (H_2O_2) do vode i molekulskog kiseonika, čime se sprečava nakupljanje ovog reaktivnog molekula u ćelijama. Iako H_2O_2 učestvuje u fiziološkoj redoks-signalizaciji, njegovo povećano stvaranje, ili smanjeno uklanjanje, može dovesti do oksidativnog oštećenja proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Zbog toga katalaza ima važnu ulogu u održavanju ćelijske redoks-ravnoteže i zaštiti ćelijskih struktura od oksidativnog stresa (**Glorieux & Calderon, 2017; Goyal & Basak, 2010**). U biološkim sistemima, katalaza pripada grupi antioksidativnih enzima koji uklanjaju perokside, zajedno sa glutation-peroksidazama i peroksi-redoksinima. Njena posebnost je što omogućava veoma brzu razgradnju H_2O_2 bez potrebe za dodatnim redukujućim supstratom. Tipične katalaze su hem-proteini, a njihova katalitička aktivnost zavisi od očuvanog hem-centra, pravilne organizacije aktivnog mesta i stabilne kvaternarne strukture (**Hansberg, 2022; Zamocky et al., 2008**).

2.3.2.1. Strukturne karakteristike i katalitički mehanizam

Katalaza pripada grupi hem-proteina i najčešće je organizovana kao homotetramer (**Slika 6**) ukupne molekulske mase 220–250 kDa. Svaka subjedinica ima molekulsku masu oko 60 kDa i sadrži jednu prostetičnu hem grupu sa Fe(III) jonom u aktivnom mestu, kao i jedan molekul čvrsto vezanog NADPH (**Kirkman et al., 1999**). Iako NADPH direktno ne učestvuje u katalitičkom procesu, njegova uloga je značajna za očuvanje stabilnosti enzima i sprečavanje oksidativne inaktivacije katalaze, naročito formiranja neaktivnog „jedinjenja II forme“ (**Hillar & Nicholls, 1992**). Broj ciklusa ili prometni broj (engl. turnover number) katalaze ubraja se među najveće poznate za enzime i dostiže više od 2×10^5 reakcija u sekundi po monomeru, zbog čega je reakcija ograničena samo difuzionim faktorima (**Hadwan & Ali, 2018; Smejkal & Kakumanu, 2019**). Katalaza iz goveđe jetre (engl. bovine liver catalase, BLC) najčešće je korišćeni model enzima katalaze u biohemijskim i biofizičkim istraživanjima. Razlog tome je velika strukturna i funkcionalna sličnost sa humanom katalazom, visoka stabilnost enzima i dostupnost njenih detaljno okarakterisanih kristalnih struktura (**Zamocky et al., 2008**).

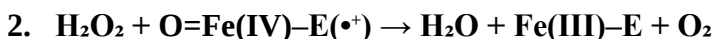
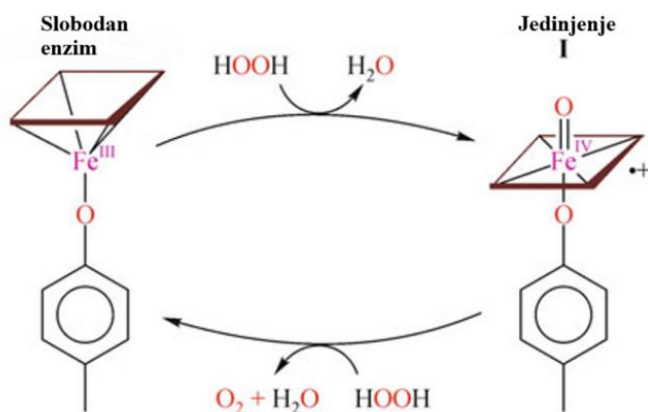
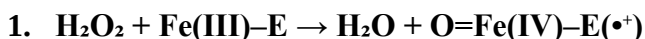


Slika 6. Shematiski prikazi monomera (A), tetramera (B) i 3D struktura tetramera katalaze (C).

PDB identifikator: 1TGU (https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001tgu).

Humana i goveđa katalaza pripadaju grupi tipičnih monofunkcionalnih hem-katalaza i pokazuju visok stepen konzerviranosti amino-kiselinske sekvence, organizacije aktivnog mesta i katalitičkog mehanizma, zbog čega se BLC smatra pogodnim modelom za proučavanje interakcija bioaktivnih molekula sa humanim enzimom. Polipeptidni lanac jedne subjedinice katalaze sastoji se od više od 500 amino-kiselinskih ostataka organizovanih u nekoliko strukturnih domena. Oko 60% strukture enzima čine uređeni sekundarni strukturni elementi, pre svega α -heliksi i β -nabrane pločice, dok ostatak čine fleksibilne petlje i neuređeni regioni koji imaju važnu ulogu u stabilizaciji tetramera. Monomer katalaze sastoji se od četiri osnovna domena. N-terminalni domen obuhvata kratke α -helikoidne regione i petlje koje učestvuju u međusobnim interakcijama subjedinica. Centralni domen predstavlja najveći deo proteinske strukture i sadrži hem grupu smeštenu duboko u unutrašnjosti proteina. Ovaj domen izgrađen je od β -bureta okruženog α -heliksima i petljama koje formiraju aktivno mesto enzima. Pakujući domen ima značajnu ulogu u stabilizaciji prostorne organizacije aktivnog mesta i sadrži tzv. esencijalni α -heliks sa ostatkom Tyr-357, koji predstavlja proksimalni ligand Fe jona hem grupe. C-terminalni domen izgrađen je dominantno od α -heliksa i doprinosi stabilizaciji tetramerne organizacije enzima. Aktivno mesto katalaze nalazi se duboko u unutrašnjosti molekula i sa površinom je povezano uskim kanalom dužine približno 30 Å (**Zamocky et al., 2008**). Kanal omogućava selektivan prolaz malih molekula, poput H_2O_2 , vode i kiseonika, dok istovremeno ograničava pristup većim molekulima. Na ulazu u kanal dominiraju hidrofilni amino-kiselinski ostaci, dok okruženje postaje izraženije hidrofobno u blizini hem grupe. Ovakva organizacija omogućava pravilnu orijentaciju supstrata i visoku efikasnost katalitičkog procesa. Hem grupa je čvrsto vezana u aktivnom mestu, interakcijama sa konzerviranim amino-kiselinskim ostacima His-75, Asn-147, Tyr-357 i Arg-353. Tyr-357 je proksimalni ligand Fe jona i ima ključnu ulogu u stabilizaciji katalitički aktivnog stanja enzima. Distalni histidin i asparagin učestvuju u polarizaciji O–O veze supstrata i transferu protona tokom reakcije. Pokazano je da prostorna organizacija ovih ostataka direktno utiče na stabilnost reaktivnih intermedijera i brzinu katalitičkog ciklusa (**Zamocky et al., 2008**).

Katalitički mehanizam katalaze odvija se u dve faze (**Goyal & Basak, 2010**):



U gornjem prikazu, Fe(III/IV)–E predstavlja gvožđe iz hema vezano za ostatak enzima. Fe(IV)–E($\bullet^+$) je mezomerna forma Fe(V)–E, što znači da gvožđe nije potpuno oksidovano do +V, ali prima elektrone od liganda. Zbog toga se ovakav hem piše kao katjon radikal ($\bullet^+$). Vodonik-peroksid (supstrat) nakon ulaska u aktivno mesto enzima interaguje sa ostacima Asn-147 i His-74, dovodeći do transfera protona iz jednog atoma kiseonika peroksida na drugi. Proces se odvija preko His-74, što produžava i polarizuje O–O vezu, koja se potom heterolitički raskida, nakon što se atom kiseonik peroksida koordinuje za gvožđe iz hema. Ovo oslobađa molekul vode i formira Fe(IV)=O i hem radikal. Radikal se brzo razgrađuje u jedno-elektronskom transferu, ostavljajući nepromenjenim prsten hema. Tokom druge faze, u sličnoj reakciji transfera dva elektrona, Fe(IV)=O reaguje sa drugim molekulom supstrata, pri čemu se oslobađa drugi molekul vode i molekul kiseonika, a enzim se vraća u originalno Fe(III)–E stanje (**Goyal & Basak, 2010**).

2.3.2.2. Uloga u održavanju ćelijskog redoks-balansa

Ćelijski redoks-balans zavisi od ravnoteže između stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i sposobnosti antioksidativnih sistema da ih uklone ili zadrže u fiziološkim granicama. Vodonik-peroksid zauzima posebno mesto u ovom sistemu, jer nije samo potencijalno štetan oksidans, već i molekul uključen u redoks-signalizaciju. Za razliku od izrazito reaktivnih radikala, H_2O_2 je relativno stabilan i može difundovati kroz ćelijske odeljke, zbog čega učestvuje u regulaciji aktivnosti redoks-osetljivih proteina, enzima i signalnih puteva. Međutim, kada njegovo stvaranje prevaziđe kapacitet antioksidativne zaštite, H_2O_2 može doprineti nastanku oksidativnog stresa i oštećenju biomolekula (Glorieux & Calderon, 2017; Zamocky et al., 2008).

Katalaza je jedan od glavnih enzima koji ograničavaju nakupljanje H_2O_2 . Ova njena uloga je naročito važna u uslovima povećanog stvaranja peroksida, kada je potrebna brza razgradnja većih količina H_2O_2 do H_2O i O_2 . Time katalaza smanjuje mogućnost da H_2O_2 učestvuje u reakcijama sa redoks-aktivnim metalima i dovede do formiranja hidroksil-radikala, jedne od najreaktivnijih kiseoničnih vrsta. Ova zaštitna uloga je značajna, pošto hidroksilni-radikal može neselektivno oksidovati amino-kiselinske ostatke u proteinima, nezasićene masne kiseline u membranama i nukleinske kiseline (Glorieux & Calderon, 2017; Ighodaro & Akinloye, 2018).

U ćelijama sisara katalaza je posebno zastupljena u peroksizomima, organelama u kojima se odvijaju oksidativni metabolički procesi praćeni stvaranjem H_2O_2 . Peroksizomalna lokalizacija omogućava da se H_2O_2 ukloni blizu mesta nastanka, pre nego što u većoj meri utiče na druge ćelijske strukture. Ipak, značaj katalaze nije ograničen samo na peroksizome. Visoka aktivnost katalaze prisutna je i u eritrocitima, što je posebno važno zbog stalnog kontakta ovih ćelija sa kiseonikom i prisustva hemoglobina, odnosno hem-proteina sposobnog da učestvuje u redoks-reakcijama. Eksperimentalni podaci pokazuju da eritrocitna katalaza može štititi druge ćelije od oštećenja izazvanog H_2O_2 , što ukazuje da eritrociti ne funkcionišu samo kao transporteri kiseonika, već i kao važan element sistemske antioksidativne zaštite (Aebi, 1984).

Katalaza ne deluje izolovano, već je deo šire mreže antioksidativnih enzima. Superoksid-dismutaza (SOD) prevodi superoksid-anjon u H_2O_2 , dok katalaza, glutation-peroksidaza i peroksiredoksini dalje uklanjaju H_2O_2 ili druge perokside. Ovi enzimi nemaju potpuno istu funkcionalnu nišu. Glutacion-peroksidaza i peroksiredoksini imaju važnu ulogu pri nižim koncentracijama H_2O_2 i u finoj regulaciji redoks-signala, dok katalaza postaje posebno značajna kada je koncentracija H_2O_2 povećana, ili kada je potreban visok kapacitet detoksikacije. Zbog toga promena aktivnosti jednog enzima može promeniti opterećenje drugih delova antioksidativnog sistema, pa se redoks-status ćelije mora posmatrati kao rezultat međusobno povezanih reakcija, a ne kao posledica aktivnosti samo jednog proteina (Baud et al., 2004; Ighodaro & Akinloye, 2018).

Promene u aktivnosti katalaze mogu imati različite posledice u zavisnosti od ćelijskog tipa, intenziteta oksidativnog opterećenja i stanja drugih antioksidativnih sistema. Smanjena aktivnost katalaze može povećati dostupnost H_2O_2 za reakcije koje vode oksidativnom oštećenju, dok povećana aktivnost predstavlja adaptivni odgovor na pojačano stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ipak, prekomerno uklanjanje H_2O_2 takođe utiče na redoks-signalizaciju, jer se H_2O_2 koristi za reverzibilnu oksidaciju redoks-osetljivih cisteinskih ostataka u regulatornim proteinima. Zbog toga katalaza ne učestvuje samo u „neutralizaciji” oksidansa, već i u održavanju opsega H_2O_2 koji omogućava fiziološku signalizaciju bez prelaska u oksidativno oštećenje (Glorieux & Calderon, 2017).

Značaj katalaze u redoks-homeostazi posebno dolazi do izražaja u tkivima izloženim visokom metaboličkom opterećenju, inflamaciji, ili lekovima koji mogu menjati oksidativni status. U eksperimentalnim modelima pokazano je da atipični antipsihotici utiču na antioksidativne enzime u različitim tkivima. Kod pacova tretiranih klopazinom, ziprasidonom, ili sertindolom, opisane su histopatološke promene u srcu, uz promene u funkciji antioksidativnih enzima – najizraženije morfološke promene zabeležene su nakon primene klopazina, a kod ove grupe je povećana aktivnost SOD1 (Nikolić-Kokić et al., 2018). U jetri pacova, primena klopazina dovela je do povećanja aktivnosti SOD1, SOD2, glutation-reduktaze i glutation-S-transferaze, ali i do smanjenja aktivnosti

katalaze, uz histopatološke promene koje su bile izraženije nego kod sertindola i ziprasidona (**Platanić Arizanović et al., 2021**). Ovi nalazi ukazuju da klopazipin može biti povezan sa promenama u redoks-enzimskom odgovoru tkiva, pri čemu se efekat ne mora jednako ispoljiti u svim organima.

Biohemijski, katalaza je važna ne samo kao enzim koji razgrađuje H_2O_2 , već i kao pokazatelj stanja celokupne antioksidativne zaštite tela. Promena njene aktivnosti može odražavati oksidativno opterećenje, adaptaciju ćelije, ili direktan uticaj malih molekula na strukturu i funkciju enzima.

2.3.2.3. Interakcije sa bioaktivnim molekulima

Iako je osnovni fiziološki supstrat katalaze H_2O_2 , ovaj enzim nije zatvoren katalitički sistem koji reaguje isključivo sa jednim malim molekulom. Aktivno mesto katalaze nalazi se duboko u proteinskoj strukturi i povezano je sa površinom proteina kanalima koji omogućavaju pristup malim molekulima. Takva organizacija obezbeđuje selektivnost prema H_2O_2 , ali istovremeno ostavlja mogućnost da pojedini egzogeni ili bioaktivni molekuli pristupe vezivnim regionima u proteinu, glavnom kanalu ili okolini hem-grupe. Zbog toga interakcije katalaze sa malim molekulima mogu imati različite posledice: od promene unutrašnje fluorescencije i lokalnog mikrokruženja aromatičnih amino-kiselina, preko promena sekundarne ili tercijarne strukture enzima, do inhibicije ili modifikacije enzimske aktivnosti (**Hansberg, 2022; Loewen et al., 2015**).

Katalaza, pored dominantne katalazne aktivnosti, može ispoljavati i sporedne peroksidazne ili oksidazne reakcije prema ne-fiziološkim supstratima. Kod katalaze iz *Bacillus pumilus* pokazano je da enzim, uz osnovnu dismutaciju H_2O_2 , može katalizovati sporiju peroksidaznu oksidaciju različitih fenolnih jedinjenja. Kristalografski i EPR podaci pokazali su da se pirogalol, katehol, rezorcinol, gvajakol, hidrohinon i 2-hlorofenol mogu vezivati u glavnom kanalu, na površini proteina, ili, kod pojedinih molekula, u distalnoj strani hema. Ovaj nalaz je značajan jer pokazuje da fenolna jedinjenja mogu pristupiti regionima katalaze koji su funkcionalno povezani sa aktivnim mestom, čak i kada ne predstavljaju njene prirodne supstrate (**Loewen et al., 2015**). Sličan koncept proširenog katalitičkog ponašanja opisan je i kod sisarskih katalaze. Vetrano i saradnici su pokazali da katalaza pokazuje oksidaznu aktivnost u prisustvu kiseonika i određenih donora elektrona, čak i bez dodatog H_2O_2 . U toj studiji ispitani su endogeni i egzogeni molekuli, uključujući indol, β -feniletilamin, peroksidazne i lakazne supstrate, kao i benzidinske derivate. Takođe, ona je pokazala i da pojedini biljni mikronutrijenti, kao što su indol-3-karbinol, ferulična kiselina, vanilinska kiselina i epigalokatehin-3-galat, mogu inhibirati oksidaznu aktivnost katalaze. Svi ovi rezultati ne menjaju osnovnu definiciju katalaze kao enzima za razgradnju H_2O_2 , ali ukazuju da hem-centar katalaze može učestvovati u dodatnim reakcijama sa malim bioaktivnim molekulima (**Vetrano et al., 2005**). Flavonoidi i fenolna jedinjenja jesu posebno interesantna grupa molekula relevantna za interakcije sa katalazom, pošto deluju i kao antioksidansi i kao redoks-aktivni ligandi. Krych i saradnici su pokazali da flavonoidi mogu redukovati „jedinjenje I“ katalaze do „jedinjenja II“, koje je manje aktivan oksiferilni oblik enzima. Ovaj proces je posebno značajan u uslovima niskog fluksa H_2O_2 , kada se katalitički ciklus može preusmeriti ka akumulaciji neproduktivnog intermedijera. Zbog toga flavonoidi ne deluju samo kao zaštitni antioksidansi – u određenim uslovima, oni mogu menjati redoks-stanje hem-centra i smanjiti katalaznu aktivnost (**Krych & Gebicka, 2013**). Ovaj primer je važan, jer pokazuje da efekat liganda na katalazu ne zavisi samo od njegovog afiniteta vezivanja, već i od njegove redoks-hemije.

Pored fenolnih supstrata i flavonoida, brojna ispitivanja su pokazala da se različiti lekovi, boje, biljni metaboliti i regulatorni molekuli vezuju za BLC i da menjanju njenu aktivnost. Hrizoidin, industrijska azo-boja, vezuje se za katalazu i smanjuje njenu aktivnost nekompetitivnim mehanizmom. Spektroskopski podaci nisu ukazali na promene ukupne konformacije proteina, dok su izotermalna titraciona kalorimetrija i molekulski doking ukazali na vezivna mesta i pozicioniranje liganda u suženju glavnog kanala ka aktivnom mestu. Ovaj primer je posebno ilustrativan i pokazuje da inhibicija katalaze može nastati bez velikog narušavanja globalne strukture proteina, već samo ometanjem pristupa supstrata ili promenom lokalne organizacije kanala (**Yang et al., 2013**). Sličan nekompetitivni tip inhibicije opisan je za 6-benzilaminopurin, sintetički citokinin koji se koristi u biljnim sistemima. Kombinacijom fluorescencione spektroskopije, UV-Vis apsorpcije, cirkularnog

dihroizma, izotermalne titracione kalorimetrije i molekuskog dokinga pokazano je da ovaj molekul formira kompleks sa katalazom, menjajući mikrokruženje Tyr i Trp ostataka i smanjujući razgradnju H_2O_2 . U stabilizaciji kompleksa učestvuju vodonične veze i van der Waalsove interakcije, dok kinetički podaci ukazuju da ligand ne mora direktno konkurisati H_2O_2 u aktivnom mestu da bi smanjio aktivnost enzima (Xu et al., 2014). 2-hidroksi-1,4-naftohinon iz biljke kane, predstavlja primer prirodnog bioaktivnog molekula koji može direktno uticati na aktivnost katalaze. U studiji na BLC pokazano je da ovo jedinjenje smanjuje aktivnost enzima nekompetitivnim mehanizmom, da menja sekundarnu strukturu i gasi unutrašnju fluorescenciju katalaze. Termodinamički i doking podaci ukazali su da su hidrofobne sile važne za formiranje protein-ligand kompleksa, dok sinhrona fluorescencija ukazuje na promene u okolini aromatičnih aminokiselinskih ostataka (Khataee et al., 2020). Ovaj primer pokazuje da molekuli poznati po antioksidativnim svojstvima mogu istovremeno imati i inhibitorni efekat na endogene antioksidativne enzime.

Interakcije lekova sa katalazom dodatno potvrđuju da je ovaj enzim osetljiv na strukturno različite male molekule. Klofazimin, lipofilni antimikobakterijski lek, vezuje se za BLC, gasi njenu fluorescenciju i dovodi do promena u sekundarnoj strukturi i hidrodinamičkom ponašanju proteina, pri čemu su doking podaci ukazali na dominantnu ulogu hidrofobnih interakcija (Zaman et al., 2017). Nifedipin, dihidropiridinski blokator kalcijumskih kanala, takođe smanjuje aktivnost katalaze nekompetitivnim mehanizmom, uz statičko gašenje fluorescencije i promene u sekundarnoj strukturi proteina (Zhou et al., 2022). Isoniazid, lek prve linije u terapiji tuberkuloze, pokazao je sposobnost vezivanja za katalazu i inhibicije njene aktivnosti (Reyes et al., 2019).

Iz navedenog proizilazi da interakcije katalaze sa bioaktivnim molekulima imaju više biohemijskih ishoda – ligand deluje kao sporedni supstrat u peroksidaznoj ili oksidaznoj reakciji, ligand pomera ravnotežu između aktivnih i manje aktivnih hem-intermedijera, blokira ili sužava pristupni kanal za H_2O_2 , ili menja lokalno mikrokruženje aromatičnih aminokiselina bez izražene promene ukupne strukture. Zbog toga se funkcionalni efekti vezivanja ne mogu predvideti samo na osnovu toga da li se ligand nalazi u samom aktivnom mestu. Vezivanje u udaljenom hidrofobnom regionu, u glavnom kanalu, ili na površinskom vezivnom mestu, može biti dovoljno da promeni dostupnost hem-centra, stabilnost protein-ligand kompleksa ili kinetiku razgradnje H_2O_2 .

U kontekstu klopazina, ovi literaturni podaci pružaju osnovu za razmatranje katalaze kao relevantnog model-proteina za ispitivanje direktnih interakcija lekova sa antioksidativnim enzimima. Klozapin je mali lipofilni bazni molekul povezan sa redoks-procesima, reaktivnim metabolitima i promenama u antioksidativnoj zaštiti. Zato ispitivanje njegovog vezivanja za katalazu ne podrazumeva da je katalaza primarna farmakološka meta leka, već omogućava da se na nivou molekula proceni da li direktna interakcija sa antioksidativnim proteinom može uticati na stabilnost, oksidacionu osetljivost ili enzimsku funkciju. Takav pristup je opravdan, upravo zato što su brojni ne-fiziološki supstrati i bioaktivni ligandi pokazali sposobnost da menjaju strukturu i aktivnost katalaze kroz različite, uglavnom nekovalentne mehanizme.

2.3.3. Alfa-2-makroglobulin – regulator proteolize i nosilac biomolekula

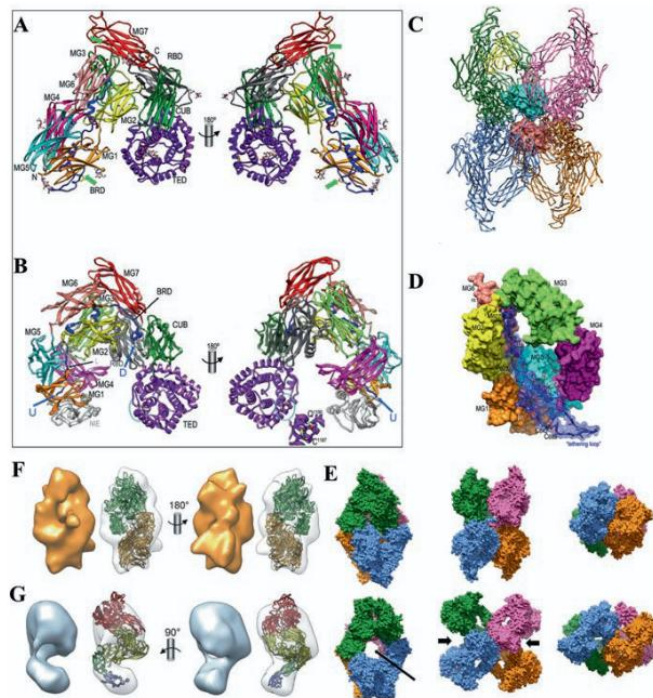
Alfa-2-makroglobulin (α_2M) je veliki glikoprotein krvne plazme, molekulske mase oko 720 kDa, koji pripada familiji α -makroglobulina. Sintetiše se pretežno u jetri i oslobađa u cirkulaciju, gde je prisutan u visokoj koncentraciji od približno 2–4 g/L. Osnovna biološka uloga α_2M je kontrola proteolitičke aktivnosti u plazmi i vanćelijskom prostoru. Za razliku od mnogih inhibitora koji deluju na užu grupu enzima, α_2M može da reaguje sa proteazama različite strukture, porekla i katalitičkog mehanizma (Barrett & Starkey, 1973; Rehman et al., 2013; Sottrup-Jensen, 1989).

Funkcionalni značaj α_2M je širi od same inhibicije proteaza. Ovaj protein vezuje endogene i egzogene bioaktivne molekule, učestvuje u njihovom transportu ili uklanjanju, i može da utiče na inflamaciju, imunski odgovor, hemostazu i ekstracelularnu proteostazu. Zbog velike molekulske mase, unutrašnje šupljine i izražene konformacione pokretljivosti, α_2M je važan model za proučavanje odnosa između vezivanja liganda, očuvanja strukture i zadržavanja proteinske funkcije (Bond et al., 2007; Vandooren & Itoh, 2021).

2.3.3.1. Struktura i funkcionalni domeni

Humani $\alpha 2M$ je homotetramer (dimer dimera) sastavljen od četiri identične polipeptidne subjedinice (**Slika 7**). Dve subjedinice se povezuju disulfidnim vezama u dimer, a dva dimera grade tetramernu strukturu nekovalentnim interakcijama. Svaka subjedinica ima 1451 amino-kiselinski ostatak i organizovana je u više domena (**Sottrup-Jensen, 1989**). Prvih sedam domena pripada grupi makroglobulinu sličnih domena (MG domeni, od engl. macroglobulin-like domains), koji su pretežno građeni od antiparalelnih β -struktura. Kristalna struktura humanog $\alpha 2M$ pokazala je da takva građa formira veliki proteinski prostor, često opisan kao molekulski kavez (**Marrero et al., 2012**).

Za aktivnost $\alpha 2M$ posebno su važni region mamca (takozvani „bait“ region), tioestarski domen i receptor-vezujući domen, koji se nalaze na svakoj subjedinici. Region mamca je fleksibilan deo polipeptidnog lanca koji sadrži mesta osetljiva na hidrolizu različitim endopeptidazama. Pošto ga mogu prepoznati brojne proteaze, ovaj region funkcioniše kao senzor povišene proteolitičke aktivnosti u okolini proteina. Njegovo cepanje je početni događaj koji pokreće transformaciju $\alpha 2M$ (**Barrett & Starkey, 1973; Marrero et al., 2012**). Tioestarski domen sadrži reaktivnu tioestarsku vezu između cisteinskog i glutaminskog ostatka. U nativnom proteinu ova veza je delimično zaštićena. Nakon cepanja regiona mamca i promene konformacije, ona postaje dostupnija nukleofilnim grupama. Kod određenih proteaza to omogućava stvaranje kovalentne veze između enzima i $\alpha 2M$, čime se kompleks dodatno stabilizuje. Ipak, i kada kovalentna komponenta izostane, proteaza može ostati fizički zarobljena u unutrašnjem prostoru proteina (**Arimura & Funabiki, 2022; Feldman et al., 1985; Marrero et al., 2012**). Receptor-vezujući domen (RBD, od engl. receptor-binding domain) postaje posebno značajan nakon aktivacije $\alpha 2M$. U nativnom obliku ovaj domen je slabije dostupan, dok se posle konformacione promene proteina izlaže na površini molekula. Tada se aktivirani $\alpha 2M$ i kompleksi $\alpha 2M$ -proteaza mogu prepoznati preko LRP1 receptora (receptor srodan receptoru za lipoproteine niske gustine 1). On posreduje u endocitozi i uklanjanju kompleksa iz cirkulacije, najčešće u hepatocitima i makrofagima (**Jenner et al., 1998; Vandooren & Itoh, 2021**).



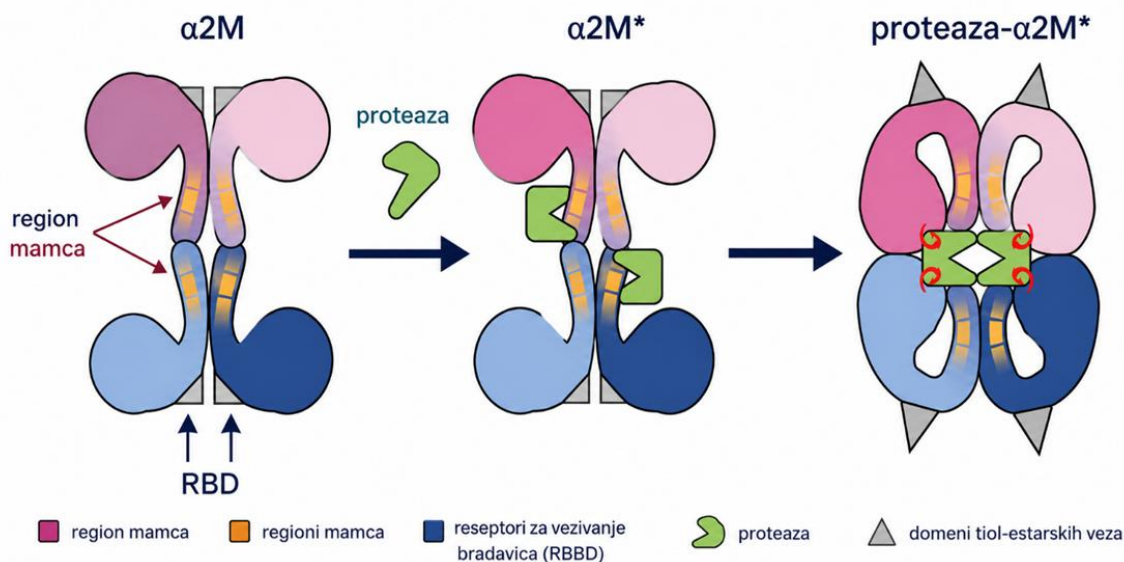
Slika 7. Trodimenzionalne eksperimentalne strukture humanog i bakterijskog $\alpha 2$ -makroglobulina. Prikazani su humani $\alpha 2$ -makroglobulin ($h\alpha 2M$) i $\alpha 2$ -makroglobulin iz *E. coli* (ECAM) u različitim konformacijama i projekcijama. Paneli **A** i **B** prikazuju monomerne strukture $h\alpha 2M$ i ECAM-a sa označenim „bait“ regionom i tioestarskom vezom. Panel **C** prikazuje model $h\alpha 2M$ sa zarobljenim molekulima HIV-1 peptidaze, dok panel **D** prikazuje detalj domena MG1–MG6 i „bait region“ domena. Panel **E** prikazuje indukovani i nativni tetramerni oblik $h\alpha 2M$ iz različitih uglova, a paneli **F** i **G** krio-EM rekonstrukcije ECAM-a (**Garcia-Ferrer et al., 2017**).

Opisana organizacija domena $\alpha 2M$ omogućava da proteolitičko cepanje regiona mamca bude povezano sa brзом konformacionom promenom, tokom koje se proteaza fizički zarobljava unutar proteinskog kompleksa, dok receptor-vezujući domen postaje izložen i dostupan za prepoznavanje receptora LRP1. Ovaj sled događaja predstavlja osnovu mehanizma inhibicije proteaza i uklanjanja kompleksa $\alpha 2M$ proteaza iz cirkulacije (Arimura & Funabiki, 2022; Marrero et al., 2012)

2.3.3.2. Mehanizam inhibicije proteaza

Mehanizam inhibicije proteaza zasniva se na principu „zamke“ (Slika 8). Proteaza najpre prepoznaje i hidrolizuje region mamca, koji se ponaša kao dostupan proteinski supstrat. Ovo cepanje dovodi do brze konformacione promene $\alpha 2M$, kada se položaj domena koji grade centralnu šupljinu, pa proteaza ostaje zatvorena unutar proteinskog kaveza (Barrett & Starkey, 1973; Marrero et al., 2012). $\alpha 2M$ ne inhibira proteaze na isti način kao klasični inhibitori aktivnog mesta. Aktivni centar zarobljene proteaze često ostaje katalitički sposoban. Ipak, pristup velikim fiziološkim supstratima postaje prostorno ograničen. Mali supstrati i kratki peptidi mogu prolaziti kroz otvore u strukturi $\alpha 2M$, dok veći proteinski supstrati ne mogu lako dospeti do aktivnog mesta enzima. Zbog toga se u testovima može detektovati preostala aktivnost vezane proteaze, iako je njeno dejstvo na velike proteine ograničeno (Barrett & Starkey, 1973; Sottrup-Jensen, 1989; Straight & McKee, 1982).

Nakon aktivacije, može doći i do reakcije tioestarske grupe sa nukleofilnim grupama na površini proteaze. Ovaj korak nije jednako izražen kod svih proteaza, ali može pojačati stabilnost kompleksa. Krajnji efekat ostaje isti: $\alpha 2M$ smanjuje dostupnost proteaze velikim supstratima i usmerava kompleks ka receptor-posredovanom uklanjanju (Arimura & Funabiki, 2022; Feldman et al., 1985), što je od značaja za inflamaciju, koagulaciju, fibrinolizu i remodelovanje vanćelijskog matriksa. U tim procesima dolazi do oslobađanja brojnih proteaza iz ćelija imunskog sistema, oštećenih tkiva i aktiviranih koagulacionih puteva. Ako njihovo dejstvo nije kontrolisano, može doći do degradacije proteina matriksa, poremećaja hemostaze i održavanja zapaljenskog odgovora – $\alpha 2M$ tada deluje kao široko specifičan zaštitni sistem koji ograničava proteolitičko oštećenje i doprinosi uspostavljanju ravnoteže u vanćelijskom prostoru (Rehman et al., 2013; Vandooren & Itoh, 2021).



Slika 8. Ilustracija interakcije između tetramera $\alpha 2M$ i aktivnih endopeptidaza. Funkcionalni $\alpha 2M$ nastaje nekovalentnim povezivanjem dva kovalentno povezana dimera. Svaki monomer sadrži region mamca za proteaze, označen ružičasto/narandžastim segmentima, i skriveni receptor-vezujući domen (RBD), označen sivim elementima. Aktivne proteaze mogu da „iseku“ region mamca, što dovodi do aktivacije $\alpha 2M$ i konformacionog preuređenja proteina. Ovaj proces rezultuje fizičkim zarobljavanjem proteaze i izlaganjem reaktivne tioestarske veze, koja može učestvovati u formiranju kovalentne veze između $\alpha 2M$ i lizinskih ostataka proteaze, označenih crvenim kukicama. Istovremeno, receptor-vezujući domeni postaju izloženi na površini proteina, čime se omogućava vezivanje $\alpha 2M$ za ćelijske receptore.* Preuzeto i modifikovano iz Vandooren & Itoh (2021).

Nakon konformacione promene $\alpha 2M$, izloženi receptor-vezujući domen omogućava vezivanje kompleksa $\alpha 2M$ –proteaza za receptor LRP1, nakon čega sledi njegova endocitoza i razgradnja unutar ćelije u lizozomima. Na taj način $\alpha 2M$ ne samo da sterički ograničava dejstvo zarobljene proteaze, već omogućava i uklanjanje kompleksa iz cirkulacije (Jenner et al., 1998; Vandooren & Itoh, 2021).

2.3.3.3. Interakcije alfa-2-makroglobulina sa malim i bioaktivnim molekulima

Alfa-2-makroglobulin najčešće se opisuje kao inhibitor proteaza širokog spektra, iako njegova biološka uloga nije ograničena samo na regulaciju proteolize. Zbog velike molekulske mase, tetramerne građe i izraženih konformacionih promena nakon aktivacije, $\alpha 2M$ može da vezuje različite bioaktivne molekule i da utiče na njihovu stabilnost, dostupnost i biološko delovanje. U literaturi je posebno dobro opisana sposobnost $\alpha 2M$ da vezuje citokine i faktore rasta, uključujući transformišući faktor rasta beta (TGF- β), faktor rasta poreklom iz trombocita (PDGF), neurotrofni faktor rasta (NGF), interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-6 (IL-6) (Rehman et al., 2013; Vandooren & Itoh, 2021). Ovo svojstvo ukazuje da $\alpha 2M$ ne deluje samo kao molekulska „zamka” za proteaze, već i kao protein plazme uključen u regulaciju vanćelijskih signala.

Vezivanje liganada za $\alpha 2M$ zavisi od konformacionog stanja proteina. Nativni $\alpha 2M$ i aktivirani oblici, nastali posle reakcije sa proteazama ili malim aminima, razlikuju se po afinitetu prema pojedinim molekulima. U slučaju faktora rasta, pokazano je da se PDGF-BB i TGF- β vezuju za $\alpha 2M$ (i nativni i aktivirani oblik), zbog čega se ovaj protein razmatra i kao mogući nosač i regulator dostupnosti signalnih molekula u cirkulaciji (Crookston et al., 1993; 1994). Zbog toga, $\alpha 2M$ treba posmatrati kao dinamičan protein čija sposobnost vezivanja zavisi od strukturnog stanja, prisustva proteaza i lokalnog biohemijskog okruženja.

Pored proteinskih medijatora, sve više se istražuju interakcije $\alpha 2M$ sa manjim bioaktivnim molekulima, naročito polifenolima i drugim antioksidansima. Ova istraživanja su značajna, pošto mnogi prirodni antioksidansi imaju ograničenu rastvorljivost, stabilnost i bioraspoloživost, te njihovo vezivanje za proteine cirkulacije može uticati na njihov transport, zadržavanje u vodenoj sredini i trajanje biološkog efekta. U preglednom radu o interakcijama antioksidanasa sa humanim proteinima istaknuto je da, osim albumina, i drugi proteini iz cirkulacije učestvuju u vezivanju bioaktivnih jedinjenja, menjajući svojstva i liganada i proteina (Nedić et al., 2023).

Flavonoidi predstavljaju posebno važnu grupu liganada za $\alpha 2M$. Miricetin, biljni polifenol sa antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima, pokazao je sposobnost vezivanja za humani $\alpha 2M$. U toj studiji su korišćene ultraljubičasto-vidljiva apsorpciona spektroskopija (UV–Vis), fluorescenciona spektroskopija, spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD) i molekularni doking. Rezultati su ukazali na formiranje protein-ligand kompleksa, gašenje unutrašnje fluorescencije i promene u mikrokruženju aromatičnih aminokiselina. Sekundarna struktura proteina nije bila značajno narušena, ali je uočena blaga promena antiproteinaznog potencijala, što ukazuje da i suptilne konformacione promene mogu imati funkcionalni značaj (Ansari et al., 2023a). Za naringenin, flavanon prisutan u citrusnom voću, takođe je pokazano vezivanje za $\alpha 2M$. U ovoj studiji primenjene su UV–Vis apsorpcija, fluorescencija, sinhrona fluorescencija, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR), CD spektroskopija, molekularni doking i simulacije molekulske dinamike. Rezultati su ukazali na formiranje stabilnog kompleksa, spontane nekovalentne interakcije i promene u konformaciji proteina. Za razliku od miricetina, naringenin je doveo do izraženijeg smanjenja antiproteinazne aktivnosti $\alpha 2M$, što pokazuje da strukturno srodni polifenoli ne moraju imati isti funkcionalni efekat nakon vezivanja za isti protein (Ansari et al., 2023b, 2024). Kvercetin je dodatno značajan primer, jer njegov efekat na $\alpha 2M$ zavisi od uslova u kojima se vezivanje odvija. Iako se često opisuje kao antioksidans, kvercetin u određenim uslovima pokazuje i pro-oksidativna svojstva. Siddiqui i saradnici pokazali su da on, naročito u prisustvu svetlosti, dovodi do gašenja fluorescencije $\alpha 2M$, promena u sekundarnoj strukturi i značajnog smanjenja inhibitorne aktivnosti prema tripsinu. Autori su ove promene povezali sa pro-oksidativnim delovanjem kvercetina i strukturnim oštećenjem proteina (Siddiqui et al., 2020). Ovaj nalaz je važan, pošto pokazuje da

vezivanje bioaktivnog molekula za protein ne mora uvek imati zaštitni efekat – ishod zavisi od koncentracije liganda, redoks-uslova i stabilnosti samog proteina.

Nasuprot tome, pojedini ligandi mogu doprineti očuvanju funkcije $\alpha 2M$ u oksidativnim uslovima. Fikocijanobilin, tetrapirolni hromofor poreklom iz cijanobakterijskog proteina C-fikocijanina, opisan je kao novi vezivni partner humanog $\alpha 2M$. Spektrofluorimetrijska ispitivanja pokazala su umereno visok afinitet vezivanja, dok su doking analize ukazale na više mogućih vezivnih mesta. Vezivanje fikocijanobilina nije izazvalo velike promene sekundarne strukture $\alpha 2M$, ali je doprinelo zaštiti proteina od oksidativnog stresa i očuvanju njegove antiproteinazne aktivnosti u oksidativnoj sredini (Šunderić et al., 2024). Ovaj primer ukazuje da interakcija malog molekula sa $\alpha 2M$ može imati i stabilizujući efekat.

Sličan značaj imaju i ispitivanja uobičajenih antioksidanasa, kao što su kvercetin, resveratrol i dihidrolipoininska kiselina, sa glavnim proteinima cirkulacije. U uporednoj studiji pokazano je da se $\alpha 2M$ može vezivati za ove molekule, a posebno je istaknuta interakcija sa resveratrolom. Vezivanje resveratrola za $\alpha 2M$ bilo je povezano sa povećanjem njegove hidrosolubilnosti i uzajamnom zaštitom proteina i liganda od oksidativnog oštećenja (Šunderić et al., 2026a). Takvi rezultati sugerisu da $\alpha 2M$ učestvuje u stabilizaciji nekih slabo rastvorljivih bioaktivnih molekula u vodenoj sredini plazme.

Interakcije $\alpha 2M$ nisu ograničene samo na prirodne antioksidanse. Za antitumorski lek 5-fluorouracil pokazano je da se vezuje za humani $\alpha 2M$, uz promene u mikrookruženju triptofana (Trp) i tirozina (Tyr), blage promene sekundarne strukture i smanjenje antiproteolitičke aktivnosti proteina. Molekulski doking i simulacije molekulske dinamike ukazali su na stabilan protein-ligand kompleks, u čijem formiranju učestvuju vodonične veze i hidrofobne sile (Zia et al., 2022). Ovaj primer pokazuje da $\alpha 2M$ može stupiti u interakcije i sa lekovima koji nisu njegovi fiziološki ligandi, pri čemu takvo vezivanje može imati posledice po funkciju proteina. Endogeni mali molekuli takođe mogu menjati strukturu i aktivnost $\alpha 2M$. Bilirubin, proizvod razgradnje hema i endogeni antioksidans, u prisustvu svetlosti vezuje se za $\alpha 2M$ i izazove konformacione promene praćene smanjenjem aktivnosti proteina (Ali et al., 2020). Ovaj nalaz povezuje $\alpha 2M$ sa redoks-aktivnim endogenim metabolitima i ukazuje da funkcionalno stanje ovog proteina može biti osetljivo na molekule prisutne u cirkulaciji pod fiziološkim ili patofiziološkim uslovima.

Ukupno posmatrano, interakcije $\alpha 2M$ sa malim i bioaktivnim molekulima imaju različite ishode. Vezivanje može biti neutralno, može stabilizovati protein ili ligand, ali može i smanjiti antiproteinaznu aktivnost i promeniti konformaciju proteina. Zbog toga $\alpha 2M$ treba posmatrati i kao veliki, konformaciono osetljiv protein koji učestvuje i u regulaciji dostupnosti, stabilnosti i biološkog delovanja različitih liganada. U kontekstu neuropsihijatrijskih poremećaja, $\alpha 2M$ je zanimljiv zbog veze sa proteostazom, neuroinflamacijom i oksidativnim stresom. Proteomska analiza cerebrospinalne tečnosti pokazala je da se nivoi $\alpha 2M$ razlikuju između pacijenata sa Parkinsonovom bolešću, neuroloških kontrola i pacijenata sa shizofrenijom. Na osnovu toga, $\alpha 2M$ je predložen kao potencijalni biomarker za praćenje farmakološkog odgovora u poremećajima povezanim sa dopaminergičkom signalizacijom. Ovaj nalaz treba izeti sa rezervom, pošto potiče iz cerebrospinalne tečnosti i ograničenih kliničkih kohorti. Ipak, on daje koristan kontekst za razmatranje $\alpha 2M$ u okviru tema koje povezuju psihofarmake, oksidativni stres i proteinsku homeostazu (Gupta et al., 2019).

U celini posmatrano, $\alpha 2M$ je protein plazme kod koga su struktura i funkcija, kao i kod svih drugih proteina, blisko povezane. Njegova sposobnost da „zarobi“ proteaze, vezuje bioaktivne molekule i učestvuje u uklanjanju molekulskih kompleksa čini ga važnim regulatorom vanćelijske homeostaze. Za ovu disertaciju posebno je značajno to što vezivanje bioaktivnog molekula za $\alpha 2M$ ne mora nužno značiti gubitak funkcije proteina. Krajnji efekat zavisi od mesta vezivanja, prirode interakcije, koncentracije liganda i (pro)oksidacionih uslova u kojima se kompleks nalazi.

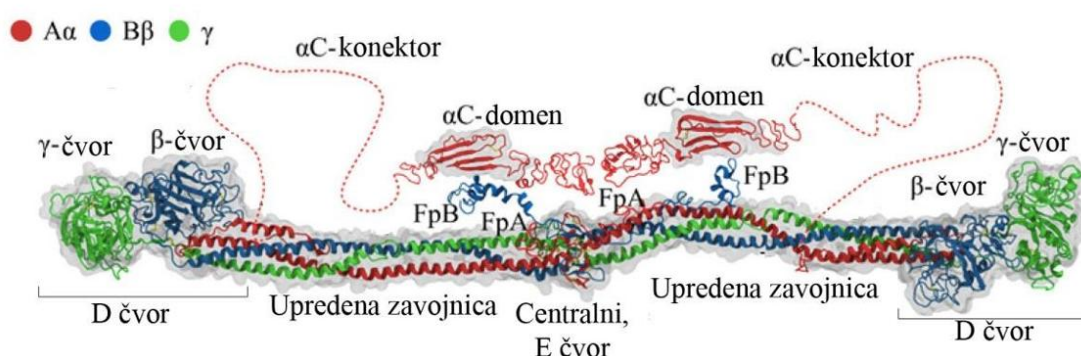
2.3.4. Fibrinogen – multifunkcionalni glikoprotein u hemostazi

Fibrinogen (faktor koagulacije I) jedan je od najzastupljenijih proteina krvne plazme. Njegova koncentracija kreće se od oko 1,5 do 4 g/L (Vilar et al., 2020). Reč je o velikom, izduženom

glikoproteinu mase oko 340 kDa, sa centralnom ulogom u hemostazi. U primarnoj hemostazi vezuje trombocite, a u sekundarnoj, kao prekursor fibrina, gradi fibrinsku mrežu (Weisel & Litvinov, 2017). Fibrinogen, međutim, nije samo faktor koagulacije. Učestvuje i u zarastanju rana, zapaljenju, urođenom imunskom odgovoru i angiogenezi (Luyendyk et al., 2019). Kao učesnik akutne faze, koncentracija mu raste tokom zapaljenja, infekcije i povrede tkiva (Davalos & Akassoglou, 2012). Uz to, on vezuje jone, male ligande i brojne proteine, što dodatno utiče na njegovu funkciju.

2.3.4.1. Struktura, sinteza i fiziološka uloga

Molekul fibrinogena je dimer. Čine ga dve identične polovine, a svaku polovinu tri različita lanca: A α , B β i γ (**Slika 9**). Ukupan sastav molekula zato se označava kao (A α B β γ)₂ (**Weisel & Litvinov, 2017**). Molekul tako ima šest lanaca: dva A α (po 610 amino-kiselinskih ostataka), dva B β (po 461) i dva γ (po 411). Povezuje ih 29 disulfidnih veza (Kattula et al., 2017). Amino-krajevi svih šest lanaca spojeni su u centralnom (E) regionu. Karboksilni krajevi B β - i γ -lanaca grade dva periferna, globularna (D) regiona (**Kollman et al., 2009**).



Slika 9. Struktura fibrinogena po domenima i subjedinicama. Adaptirano iz **Weisel & Litvinov (2017)**, preuzeto iz **Gligorijević (2018)**.

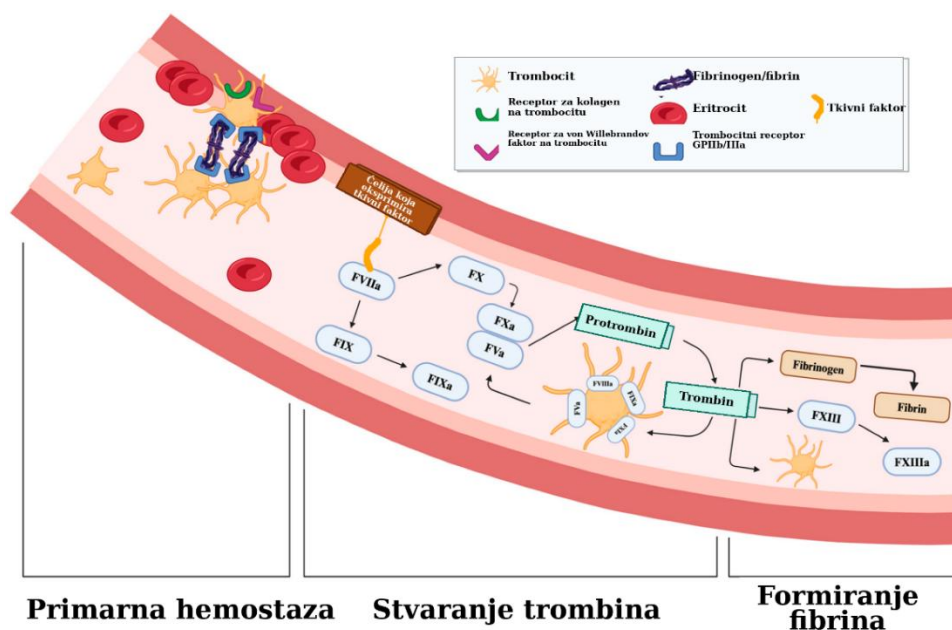
Fibrinogen ima izduženu, trinodularnu građu, dugu oko 45 nm. Centralni E čvor povezan je sa dva periferna D čvora preko dva „coiled-coil“ segmenta, a svaki segment čine po tri α -heliksa (Weisel & Litvinov, 2017). Karboksilni krajevi $\alpha\alpha$ -lanaca (α C regioni) fleksibilni su i štrče iz molekula; oni imaju važnu ulogu u kasnijem umrežavanju fibrina. Kristalna struktura humanog fibrinogena razjašnjena je za veći deo molekula (Kollman et al., 2009). Fibrinogen je glikoprotein: na $\beta\beta$ - i γ -lancima nosi vezane oligosaharidne lance (Wolberg, 2023).

Fibrinogen se sintetishe u hepatocitima jetre. Njegova tri lanca kodiraju tri gena (FGA, FGB i FGG), grupisana na hromozomu 4 (**Vilar et al., 2020**). Lanci se najpre sklapaju u polovine molekula, a zatim u ceo heksamer (**Kattula et al., 2017**). Gotov protein se izlučuje u krv, gde mu poluživot iznosi oko tri do četiri dana. Pošto je reaktant akutne faze, sinteza mu se pojačava pod dejstvom citokina, pre svega interleukina-6, pa njegova koncentracija u zapaljenskom procesu može višestruko porasti (**Davalos & Akassoglou, 2012; Wolberg, 2023**). Alternativnim splajsovanjem γ -lanca nastaje manja frakcija molekula (γ'), drugačijih funkcionalnih svojstava (**Vilar et al., 2020**).

Osnovna uloga fibrinogena je dvojaka: služi kao prekursor fibrina i posreduje u agregaciji trombocita. Tako omogućava brzo zaustavljanje krvarenja. Fibrinogen je i privremeni vanćelijski matriks tokom zarastanja rana. Uz to, povezuje hemostazu sa procesima zapaljenja i obnove (Luyendyk et al., 2019; Pieters & Wolberg, 2019; Wolberg, 2023).

2.3.4.2. Uloge u regulaciji hemostaze

U primarnoj hemostazi fibrinogen povezuje aktivirane trombocite (**Slika 10**). Vezuje se za njihov receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (glikoprotein IIb/IIIa). Glavno vezujuće mesto je C-terminalni dodekapeptid γ -lanca ($\gamma 400\text{--}411$), a u njemu su završni ostaci (AGDV) ključni (**Kattula et al., 2017**). Vezujući se istovremeno za dva susedna trombocita, fibrinogen posreduje u njihovoj agregaciji i stvaranju trombocitnog čepa (**Mosesson, 2005**).



Slika 10. Šematski prikaz nastanka tromba kroz primarnu hemostazu, stvaranje trombina i formiranje fibrina. Trombociti se vezuju za oštećeni (sub)endotel krvnog suda, aktiviraju se i agregiraju, dok koagulaciona kaskada dovodi do stvaranja trombina. Trombin prevodi fibrinogen u fibrin, koji polimerizuje u mrežu i stabilizuje ugrušak uz učešće faktora XIIIa. Preuzeto i adaptirano iz Singh et al. (2025).

U sekundarnoj hemostazi fibrinogen je supstrat trombina. Trombin odseca fibrinopeptide A i B sa amino-krajeva A α - i B β -lanaca. Time se izlažu polimerizaciona mesta, tzv. „čvorovi“ (engl. knobs) A i B. Ti „čvorovi“ se ugrađuju u komplementarne „šupljine“ (engl. holes) a i b, u D regionima susednih molekula (Weisel & Litvinov, 2017). Tako nastaju protofibrili. Oni se bočno udružuju u deblja vlakna, koja se zatim granaju i grade trodimenzionalnu mrežu. Stvoreni ugrušak stabilizuje faktor XIII, koga aktivira trombin. Aktivirani faktor XIIIa uspostavlja kovalentne veze između γ -lanaca, a potom i između α -lanaca susednih molekula (Kattula et al., 2017). Time mreža postaje čvršća i otpornija na razgradnju. Joni kalcijuma neophodni su i za polimerizaciju i za rad faktora XIIIa (Wolberg, 2023).

Fibrin reguliše i sopstvenu razgradnju (fibrinolizu). Kao kofaktor, vezuje plazminogen i njegov aktivator (tkivni aktivator plazminogena - tPA) i ubrzava stvaranje plazmina, koji razgrađuje mrežu (Weisel & Litvinov, 2017). Brzina razgradnje zavisi od građe ugruška. Gusta mreža tankih vlakana sporije se razgrađuje i povezana je sa rizikom od tromboze. Porozna mreža debljih vlakana razgrađuje se brže i pre se povezuje sa sklonošću ka krvarenju (Wolberg, 2023). Zbog ove dvojake uloge, poremećaji fibrinogena, kao i njegove povišene koncentracije, povezuju se sa rizikom od tromboze i kardiovaskularnih bolesti (Kattula et al., 2017; Vilar et al., 2020).

2.3.4.3. Interakcije sa bioaktivnim molekulima

Zbog svoje složene strukture i visoke koncentracije u cirkulaciji, fibrinogen stupa u interakcije sa različitim malim i bioaktivnim molekulima. Takve interakcije utiču na stabilnost fibrinogena, njegovu oksidativnu osetljivost, brzinu formiranja fibrina, debljinu fibrinskih vlakana i otpornost ugruška na fibrinolizu. Poseban značaj imaju interakcije fibrinogena sa antioksidansima, jer je fibrinogen osetljiv na oksidativne i nitrativne posttranslacione modifikacije. Oksidacija može promeniti strukturu fibrinogena i dovesti do formiranja fibrinskih mreža koje su gušće, manje propustljive i otpornije na razgradnju. Takve promene se povezuju sa prokoagulantnim stanjem i povećanim rizikom od tromboze u različitim patofiziološkim uslovima (Martinez et al., 2013; Nencini et al., 2025). Zato vezivanje malih molekula za fibrinogen nije važno samo sa stanovišta transporta liganda, već i sa stanovišta moguće zaštite ili promene funkcije samog proteina.

Rezveratrol je često ispitivani polifenol u ovom kontekstu. Spektrofluorimetrijska ispitivanja pokazala su da se on vezuje za fibrinogen, pri čemu to ne dovodi do razvijanja ili destabilizacije proteina. U istom radu pokazano je da fibrinogen povećava rastvorljivost resveratrola u vodenoj sredini i da postoji uzajamni zaštitni efekat: fibrinogen štiti resveratrol od oksidacije, dok rezveratrol može doprineti zaštiti fibrinogena od slobodnoradikalnog oštećenja (**Gligorijević et al., 2020**). Ovaj primer pokazuje da fibrinogen može doprineti stabilizaciji slabo rastvorljivih bioaktivnih molekula, a istovremeno biti zaštićen od oksidativnih promena. Uticaj rezveratrola na fibrinogen razmatran je i u vezi sa agregacijom trombocita. U studiji Bonechi i sar. ispitan je efekat resveratrola na promene fibrinogena i agregaciju trombocita izazvane epinefrinom. Korišćene su nuklearna magnetna rezonanca (NMR), infracrvena spektroskopija (IR) i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). Rezultati su pokazali da rezveratrol ublažava konformacione promene fibrinogena izazvane epinefrinom i da smanjuje adheziju i agregaciju trombocita (**Bonechi et al., 2017**). Time se vezivanje malog molekula sa fibrinogenom povezuje ne samo sa strukturom proteina, već i sa funkcionalnim posledicama u procesu hemostaze.

Dihidro-alfa-lipoinna kiselina (DHHA), redukovani oblik alfa-lipoinne kiseline, još jedan je primer bioaktivnog antioksidansa koji direktno interaguje sa fibrinogenom. U radu Gligorijevića i sar. pokazano je da DHHA formira kompleks sa fibrinogenom umerenog afiniteta, pri čemu molekulski doking ukazuje da se interakcija verovatno odvija u D-regionima fibrinogena. Vezivanje DHHA nije značajno promenilo termalnu stabilnost proteina, ali je dovelo do diskretnih promena sekundarne strukture i formiranja fibrina sa debljim vlaknima. Pored toga, fibrinogen vezan za DHHA bio je delimično zaštićen od oksidacije (**Gligorijević, 2020**).

Pored pojedinačnih antioksidanasa, ispitani su i biljni ekstrakti i model-polifenoli koji takođe mogu zaštititi fibrinogen od oksidativnih i nitrativnih modifikacija. Ekstrakti cveta *Prunus spinosa* L., kao i njihovi glavni polifenolni sastojci i metaboliti, smanjili su oksidativne promene fibrinogena izazvane peroksinitritom. Uočeno je smanjenje nitracije tirozinskih ostataka, oksidacije triptofana i formiranja agregata velike molekulске mase (**Marchelak et al., 2021**). Ovi rezultati podržavaju stav da polifenoli mogu delovati zaštitno prema fibrinogenu, naročito u uslovima povećanog oksidativnog i nitrativnog opterećenja. Važno je, međutim, naglasiti da zaštitni efekat bioaktivnog molekula ne zavisi samo od njegove antioksidativne aktivnosti u jednostavnom hemijskom sistemu. Ishod zavisi od toga da li se i gde molekul vezuje za fibrinogen, koje nekovalentne interakcije stabilizuje protein-ligand kompleks i da li vezivanje menja funkcionalne regione proteina. Fibrinogen ima više domena uključenih u trombin-zavisno oslobađanje fibrinopeptida, polimerizaciju fibrina, lateralnu agregaciju protofibrila i interakcije sa trombocitima. Zbog toga i relativno male promene u konformaciji ili oksidacionom stanju proteina mogu imati posledice po formiranje i osobine fibrinskog ugruška.

Interakcije fibrinogena sa lekovima važne su i za razumevanje mogućih farmakokinetičkih i funkcionalnih posledica formiranja kompleksa. Za timolol-maleat, β -blokator koji se koristi u terapiji stanja povezanih sa povišenim krvnim pritiskom i glaukomom, pokazano je da se vezuje za fibrinogen, uz gašenje unutrašnje fluorescencije i promene sekundarne strukture proteina. Termodinamički podaci i molekulski doking ukazali su na dominantnu ulogu hidrofobnih sila u stabilizaciji kompleksa (**Rao et al., 2025**). Ovaj primer pokazuje da fibrinogen, pored albumina, može biti važan protein za vezivanje pojedinih lekova u cirkulaciji.

Širi pregled interakcija prehrambenih antioksidanasa sa proteinima cirkulacije ukazuje da fibrinogen vezuje različite bioaktivne molekule, uključujući kvercetin, resveratrol i dihidrolipoinnu kiselinu. Takve interakcije mogu promeniti rastvorljivost, stabilnost i oksidacionu otpornost liganda, ali i strukturne i funkcionalne osobine proteina (**Nedić et al., 2023; Šunderić et al., 2026b**). Ovakav pristup je posebno značajan za molekule niske rastvorljivosti ili ograničene stabilnosti, pošto proteinsko vezivanje može povećati njihovu prisutnost u plazmi i omogućiti lokalno dejstvo u blizini mesta oštećenja ili inflamacije.

Interakcije malih molekula sa fibrinogenom treba posmatrati oprezno, jer isti tip molekula ne mora uvek imati isti ishod. Antioksidans može stabilizovati fibrinogen i smanjiti oksidativno

oštećenje, ali i promeniti proces formiranja fibrina, strukturu vlakana, ili dostupnost mesta za interakciju sa drugim komponentama hemostaze. Zbog toga se funkcionalni efekti vezivanja procenjuju kombinacijom spektroskopskih, termičkih, oksidacionih i koagulacionih testova. Podatak da ligand formira kompleks sa fibrinogenom nije dovoljan za zaključak o biološkom efektu vezivanja; potrebno je ispitati da li se menja polimerizacija fibrina, struktura ugruška, otpornost na oksidaciju i potencijalna osetljivost na fibrinolizu.

U kontekstu ispitivanja interakcija lekova sa proteinima, fibrinogen je posebno značajan, pošto je to protein plazme čija se aktivnost i uloga neposredno može pratiti funkcionalnim testovima formiranja fibrina. Za razliku od proteina kod kojih se posledice vezivanja liganda često tumače samo kroz promenu unutrašnje fluorescencije ili stabilnosti, kod fibrinogena je moguće povezati molekulsko vezivanje liganda sa promenom funkcionalnog ishoda, odnosno, procesom nastanka fibrinske mreže. Zato on predstavlja pogodan model za ispitivanje da li mali bioaktivni molekuli i lekovi mogu, pored vezivanja za protein, uticati i na uloge proteine važne za hemostazu.

2.4. Metode u ispitivanju interakcija lekova sa proteinima

Vezivanje malih molekula za proteine osnovni je molekulski proces delovanja lekova u telu (**Du et al., 2016**). Formirani nekovalentni kompleksi protein–ligand mogu da izmene konformaciju, stabilnost i aktivnost proteina, a time i da utiču na distribuciju, metabolizam i eliminaciju leka. Mnogi lekovi inhibitorno deluju na katalitičku aktivnost ključnih enzima, što može da ima značajne fiziološke posledice (**Chakraborti et al., 2003**). Ispitivanje protein–lek interakcija, pod uslovima koji odgovaraju fiziološkim, omogućava određivanje parametara vezivanja (konstanti afiniteta, broja vezivnih mesta i termodinamičkih veličina), kao i procenu strukturnih promena u proteinu. U narednim odeljcima opisani su principi metoda korišćenih u eksperimentalnom delu ove disertacije.

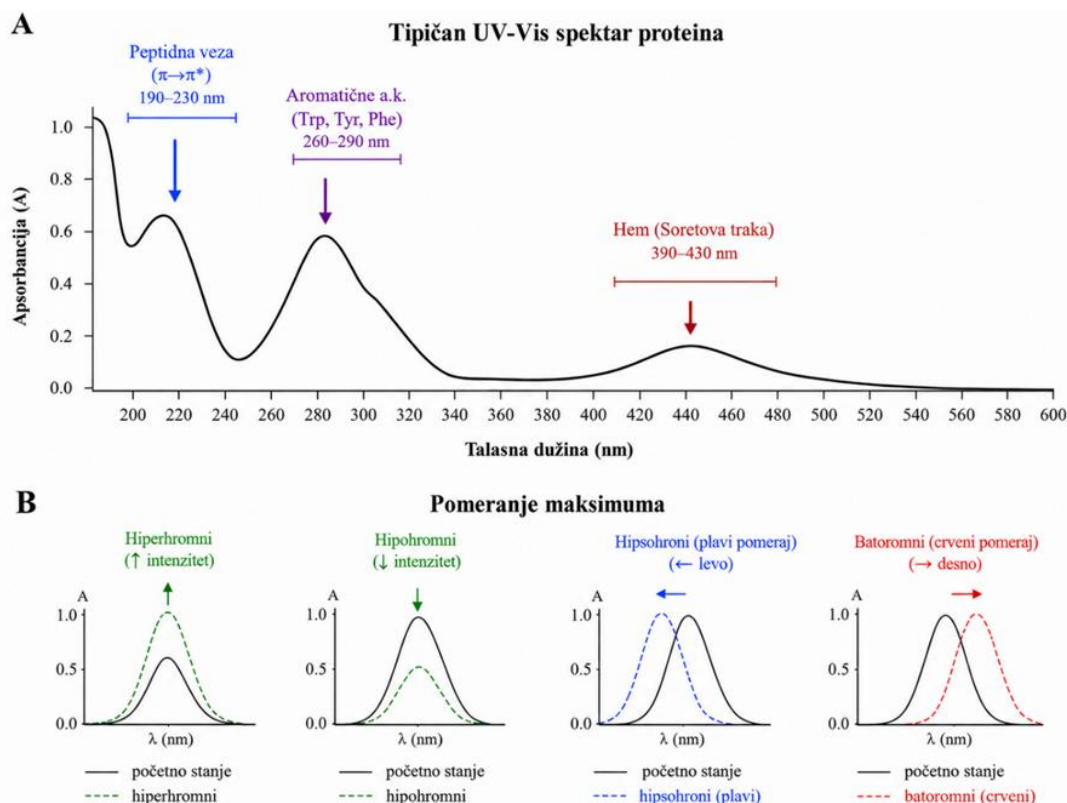
2.4.1. Spektroskopske metode

Među različitim ekperimentalnim pristupima, spektroskopske metode su neizostavni deo u izučavanju protein–ligand (protein–lek) interakcija, zbog relativno jednostavnog izvođenja, osetljivosti i mogućnosti analiza u rastvorima koji simuliraju fiziološke uslove. Ove metode zasnivaju se na na promeni elektromagnetnog zračenja biomolekula do koga može doći usled vezivanja liganda. Na osnovu dobijenih spektara moguće je proceniti jačinu vezivanja liganda za protein, broj vezivnih mesta, stabilnost kompleksa kao i uticaj interakcije na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina. Najčešće korišćene spektroskopske tehnike koje se koriste u ispitivanju ovih interakcija uključuju UV-Vis apsorpcionu spektroskopiju, fluorescentnu spektroskopiju, cirkularni dihiroizam, infracrvenu spktroskopiju sa Furijeovom transformacijom, Ramanovu spektroskopiju i mnoge druge (**Gokara et al., 2010**).

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpciona spektroskopija jednu je od često primenjivanih metoda u izučavanju protein-ligand interakcija. Ova metoda se zasniva na apsorpciji elektromagnetnog zračenja u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra, pri čemu dolazi do prelaska elektrona iz osnovnog u pobuđeno energetske stanje. Proteini i ligandi poseduju karakteristične apsorpcione maksimume, koji potiču od prisustva aromatičnih amino-kiselina, konjugovanih sistema, ili određenih funkcionalnih grupa. Kada su u pitanju proteini, apsopcija u UV oblasti potiče od peptine veze – 220 nm kao i aromatičnih amino-kiselina (tirozin, triptofan, fenilalanin) – oblast 250-300 nm, dok proteini koji imaju prostetičnu grupu apsorbuju i u vidljivom delu spektra (hem proteini – Soretova traka na oko 405 nm) (**Slika11A**) (**Schmid, 2001**).

Nakon vezivanja liganda za protein mogu nastati promene u intenzitetu apsorbanace i/ili do pomeranja apsoprcionih maksimuma, što ukazuje na promene u mikrokruženju amino-kiselinskih ostataka, ili na formiranje protein-ligand kompleksa. Hipohromni efekat podrazumeva smanjenje intenziteta apsorbanacije, dok hiperhromni efekat označava povećanje apsorbanacije. Batohromno, ili tzv. crveno pomeranje, jeste pomeranje apsopcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama, a hipsohromno, ili tzv. plavo pomeranje, označava pomeranje maksimuma ka nižim talasnim dužinama (**slika 11B**). Prednosti ove metode su jednostavnost izvođenja, brza analiza, dobra ponovljivost

rezultata, a ograničenja su manja osetljivost metode kada su interakcije slabe, ili kada su koncentracije ispitivanih supstanci veoma niske (**Schmid, 2001**).



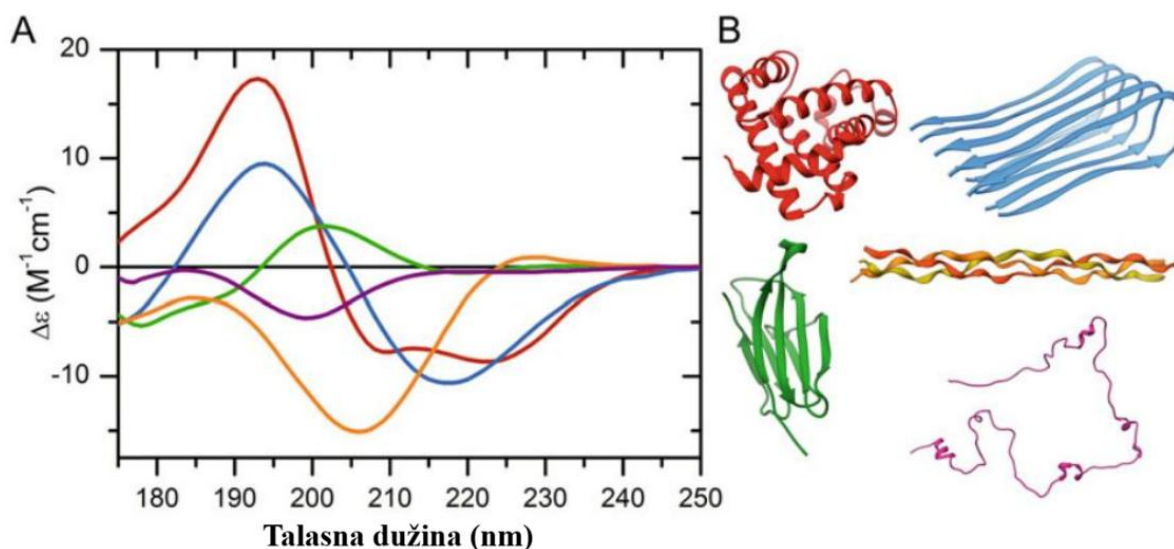
Slika 11. Ilustrativni prikaz tipičnog UV-Vis spektra proteina koji poseduje hem u strukturi (**A**).
Tipična pomeranja apsorption maksimuma proteina (**B**)

Fluorescentna spektroskopija je osetljiva metoda za proučavanje interakcija između proteina i liganada. Ova tehnika zasniva se na pojavi fluorescencije, odnosno emitovanju svetlosti od strane (bio)molekula nakon apsorpcije elektromagnetnog zračenja određene talasne dužine. U proteinima fluorescencija je uglavnom potiče od ostataka triptofana, dok tirozin i fenilalanin imaju znatno manju doprinos ukupnoj fluorescenciji. Kada dodje do vezivanja liganda za protein (kao i u slučaju UV-Vis spektroskopije) mogu nastati promene u intenzitetu fluorescencije ili položaju emisionog maksimuma. Ove promene omogućavaju praćenje procesa vezivanja i procenu prirode interakcija.

Najčešće proučavan fenomen u izučavanju protein-ligand interakcija je gašenje unutrašnje fluorescencije (engl. fluorescence quenching) proteina. Postoje dva tipa mehanizama gašenja fluorescencije proteina – statički i dinamički. Ukoliko do gašenja dolazi usled sudara molekula u pobuđenom stanju mehanizam je dinamički, dok kod statičkog dolazi do formiranja stabilnog kompleksa protein-ligand koji ne fluoreskira (**Lakowicz, 2006**). Fluorescentna spektroskopija omogućava određivanje velikog broja važnih parametara vezivanja, kao što su konstante vezivanja, broj vezivnih mesta, termodinamički parametri vezivanja i uticaj vezivanja na termalnu stabilnost proteina. Na osnovu termodinamičkih parametara moguće je proceniti dominantne međumolekulske sile koje učestvuju u stabilizaciji kompleksa, kao što su hidrofobne sile, vodonične veze, elektrostatičke sile i Van der Waalsove interakcije. Posebna prednost ove metode jeste njena visoka osetljivost, zbog čega je moguće analizirati interakcije pri veoma niskim koncentracijama uzorka (red veličine nM proteina). Takođe, moguće je iskoristiti i fluorescentne probe koje se vezuju za određene delove proteina, što omogućava detaljnije proučavanje konformacionih promena (**Minić, 2017**). Napredne i osetljivije fluorescentne tehnike, poput transfera fluorescentne rezonantne energije (engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET) omogućavaju određivanje međumolekulskih rastojanja između donorskog i akceptorskog molekula i koriste se za proučavanje strukturnih promena tokom vezivanja liganda (**Algar et al., 2019; Jares-Erijman & Jovin, 2003**). Fluorescentna korelaciona spektroskopija (FCS) i fluorescentna unakrsna korelaciona spektroskopija (FCCS)

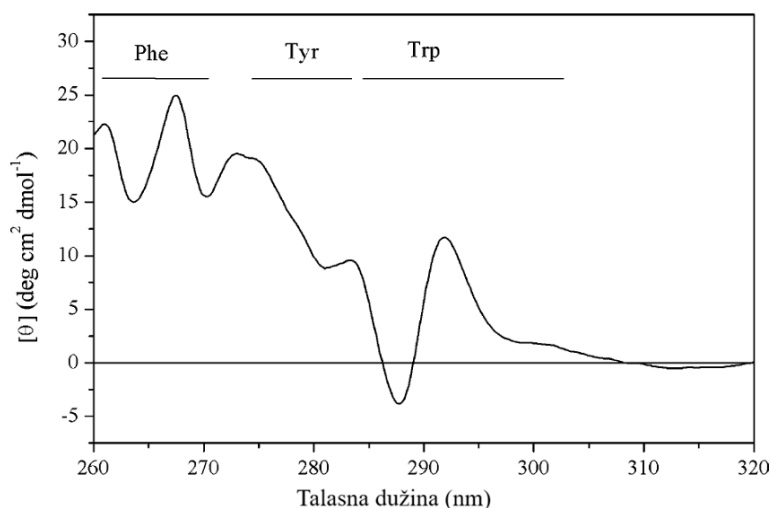
omogućavaju i praćenje difuzije i kinetike interakcija u realnom vremenu (**Bacia et al., 2006; Schwille et al., 1997**).

Cirkularni dihiroizam jeste spektroskopska tehnika koja se mnogo koristi za proučavanje prostorne organizacije, konformacije i strukturnih promena u proteinima (**Kelly et al., 2005; Zsila, 2013**). Metoda se zasniva na različitoj apsorpciji levo i desno kružno polarizovane svetlosti od strane hiralnih molekula. Budući da proteinske strukture poseduju izraženu hiralnost, usled prisustva asimetričnih ugljenikovih atoma i sekundarnih struktura (pri čemu je nemoguće preklopiti njihov lik i odraz u ogledalu), CD omogućava precizno praćenje promena u njihovoj sekundarnoj i tercijarnoj strukturi. Slično kao i kod UV-Vis spektroskopije, u CD spektroskopiji proteina apsorbancija potiče od peptidne veze (u oblasti ispod 240 nm), aromatičnih amino-kiselinskih ostataka (od 260 do 320 nm) i disulfidnih veza, koje daju slabu apsorbanciju na oko 260 nm (**Kelly et al., 2005**). U oblasti dalekog ultraljubičastog zračenja (eng. far-UV CD), od 190 do 250 nm, cirkularni dihiroizam pruža detaljne informacije o sekundarnim strukturama proteina (**Kelly et al., 2005**). Na osnovu karakterističnih signala (**Slika 12**) koje daju α -heliksi, β -nabrane pločice i nasumične zavojnice (engl. random coil), moguće je odrediti njihov relativni procentualni sadržaj u molekulu proteina, korišćenjem kompjuterskih algoritama ili matematičkih proračuna (**Minić, 2017**). Nakon vezivanja liganda, može doći do promena u obliku ili intenzitetu CD spektra, što direktno ukazuje na konformacione promene u sekundarnoj strukturi proteina pod uticajem vezivanja liganda. Takođe, merenjem dalekih-UV CD spektara, na različitim temperaturama, može se uspešno pratiti termalna stabilnost i denaturacija proteina, u odsustvu ili prisustvu ispitivanog liganda (**Greenfield, 2006**).



Slika 12. Karakteristični CD spektri u dalekoj UV oblasti različitih proteinskih sekundarnih struktura (A) - α -heliks (crveno), paralelne β -pločice (plavo), antiparalelne β -pločice (zeleno), poliprolinski heliks (narandžasto), neuređene strukture (ljubičasta). Preuzeto i adaptirano iz **Micsonai et al. (2021)**.

U oblasti bliskog ultraljubičastog zračenja (engl. near-UV CD), od 250 do 320 nm, analiziraju se promene u tercijarnoj strukturi proteina i lokalnom mikrokruženju aromatičnih aminokiselina. U ovoj oblasti, triptofan pokazuje karakterističan maksimum pika na oko 290 nm, tirozin između 275 i 282 nm, dok fenilalanin daje slabije pikove u oblasti između 255 i 270 nm (**Slika 13**). Oblik i intenzitet signala u bliskim-UV CD spektrima direktno zavise od broja aromatičnih amino-kiselina, polarnosti njihovog mikrokruženja, mobilnosti odnosno rigidnosti strukture, kao i njihovog međusobnog rasporeda u prostoru. Iako ne mogu dati detaljne atomske informacije o trodimenzionalnoj strukturi proteina, bliski-UV CD spektri predstavljaju svojevrsan „otisak prsta“ (engl. fingerprint) tercijarne strukture proteina i izuzetno su osetljiv indikator konformacionih promena koje nastaju usled formiranja kompleksa sa ligandom (**Kelly et al., 2005**).



Slika 13. Primer UV-CD spektra proteina u bliskoj oblasti. Označeni su opsezi talasnih dužina koji odgovaraju ostacima Phe, Tyr i Trp (s tim da treba naglasiti da može doći do preklapanje Tyr i Trp signala). Adaptirano iz **Krell et al. (1996)**.

2.4.2. Funkcionalni testovi

Ispitivanje interakcija lekova i drugih malih liganada sa proteinima ne završava se određivanjem afiniteta vezivanja i promena u spektrima proteina. Spektroskopske metode mogu da pokažu da se kompleks protein-ligand formira, da ukažu na promene u sekundarnoj ili tercijarnoj strukturi i da omoguće izračunavanje konstanti vezivanja. Ipak, one, same po sebi, ne pokazuju da li je biološka funkcija proteina zaista promenjena. Zbog toga se u ispitivanjima protein-ligand interakcija funkcionalni testovi koriste kao neophodna dopuna strukturnim i biofizičkim metodama. Kod enzima se najčešće meri brzina pretvaranja supstrata u proizvod. Kod regulatornih proteina može se pratiti sposobnost vezivanja ili inhibicije drugog proteina, dok se kod strukturnih i koagulacionih proteina ispituje sposobnost formiranja viših supramolekulskih struktura. Na taj način funkcionalni testovi omogućavaju da se razlikuje vezivanje koje je samo detektabilno, od vezivanja koje ima biohemijske posledice.

Ovaj pristup je posebno važan kada se ispituju proteini različite strukture i funkcije. Katalaza je enzim čija se funkcija ogleda u razgradnji vodonik-peroksida. Alfa-2-makroglobulin je veliki plazmatski inhibitor proteaza, čija se aktivnost zasniva na sposobnosti da zarobi proteazu i ograniči njen pristup velikim supstratima. Fibrinogen nije enzim, ali njegova funkcija zavisi od trombinom izazvane konverzije u fibrin i formiranja fibrinske mreže. Zbog toga se za svaki od ovih proteina bira funkcionalni test koji najdirektnije odražava njegovu fiziološku ulogu.

- **Ispitivanje aktivnosti katalaze**

Katalaza katalizuje razgradnju vodonik-peroksida na vodu i molekularni kiseonik. Pošto je H_2O_2 relativno stabilna reaktivna kiseonična vrsta, ali i prekursor reaktivnijih oksidativnih vrsta, aktivnost katalaze predstavlja važan deo ćelijske antioksidativne zaštite. Promena aktivnosti katalaze u prisustvu liganda ukazuje na funkcionalno značajno vezivanje, naročito ako ligand utiče na aktivno mesto enzima, kanal kojim supstrat dolazi do hem grupe, tetramernu organizaciju enzima ili opštu stabilnost proteinske strukture.

Standardni spektrofotometrijski test aktivnosti katalaze zasniva se na praćenju smanjenja apsorpcije H_2O_2 u ultraljubičastoj oblasti, najčešće na 240 nm. Vodonik-peroksid apsorbuje na ovoj talasnoj dužini, dok voda i kiseonik, kao proizvodi reakcije, ne daju isti signal. Zbog toga se brzina pada apsorpcije može koristiti kao mera brzine enzimske reakcije. Aktivnost se izražava na osnovu promene apsorpcije u jedinici vremena, uz korišćenje ekstinkcionog koeficijenta vodonik-peroksida na 240 nm. Ovaj pristup je brz, jednostavan i pogodan za poređenje aktivnosti enzima u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija liganda (**Aebi, 1984**).

Kod interpretacije ovog testa važno je uzeti u obzir nekoliko kontrola. Koncentracija H_2O_2 mora biti pažljivo pripremljena, jer se supstrat vremenom razlaže. Ispitivani ligand ne bi trebalo značajno da apsorbira na 240 nm, ili se njegov doprinos mora korigovati odgovarajućom slepom probom. Takođe je potrebno proveriti da li ligand sam hemijski reaguje sa H_2O_2 , pošto bi tada pad apsorbancije mogao delimično poticati od neenzimske reakcije. Zato se test aktivnosti katalaze najpouzdanije tumači uz kontrolne uzorke koji sadrže enzim bez liganda, ligand bez enzima, odgovarajući rastvarač i, kada je potrebno, oksidativni agens bez enzima.

Kao dopuna merenju aktivnosti u rastvoru može se koristiti zimografija. Zimografija je metoda kojom se aktivnost enzima detektuje nakon razdvajanja proteina u gelu elektroforezom u nativnim uslovima. Nakon toga se gel tretira H_2O_2 i sistemom za bojenje. Na mestima na kojima je katalaza razgradila H_2O_2 sprečava se reakcija bojenja, i aktivnost se vidi na gelu kao svetla traka na obojenoj pozadini. Intenzitet trake može se polukvantitativno analizirati denzitometrijom.

Prednost zimografije je u tome što povezuje aktivnost sa određenom proteinskom trakom. To je posebno korisno kada se želi potvrditi da smanjenje aktivnosti nije posledica nespecifičnih promena u rastvoru, već da je povezano sa samom katalazom. Ipak, zimografija je manje precizna od spektrofotometrijskog testa u rastvoru. Rezultat zavisi od uslova elektroforeze, renaturacije enzima, difuzije supstrata i trajanja razvijanja boje. Zato se zimografija najbolje koristi kao potvrdni test trenda, dok spektrofotometrijsko merenje ostaje pogodnije za kvantitativno poređenje aktivnosti.

- **Ispitivanje antiproteazne aktivnosti alfa-2-makroglobulina**

Alfa-2-makroglobulin je inhibitor širokog spektra proteaza, ali njegov mehanizam delovanja nije zasnovan na klasičnoj inhibiciji aktivnog mesta. Proteaza najpre hidrolizuje fleksibilni region „mamca“ u molekulu α_2M , što pokreće veliku konformacionu promenu. Nakon toga proteaza ostaje prostorno zarobljena unutar proteinskog kaveza. Njeno aktivno mesto može i dalje biti katalitički očuvano, ali je pristup velikim proteinskim supstratima ograničen. Mali peptidni supstrati mogu proći kroz otvore u strukturi α_2M i dospeti do aktivnog mesta zarobljene proteaze, što predstavlja osnovu funkcionalnog testa antiproteazne aktivnosti (Barrett & Starkey, 1973; Sottrup-Jensen, 1989).

Za ispitivanje antiproteazne aktivnosti α_2M često se koristi tripsin kao model-proteaza i hromogeni supstrat $N\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA). Tripsin hidrolizuje BAPNA uz oslobađanje p-nitroanilina, čija se apsorbancija meri na 405 nm. U tipičnom testu α_2M se najpre inkubira sa ispitivanim ligandom, zatim se dodaje tripsin i omogućava formiranje kompleksa α_2M -tripsin. Nakon toga se dodaje sojin inhibitor tripsina, koji inhibira slobodni, nevezani tripsin. Preostala aktivnost prema BAPNA supstratu potiče uglavnom od tripsina zarobljenog u kompleksu sa α_2M , jer mali supstrat može dopreti do aktivnog mesta proteaze. Ovakav test daje informaciju o tome da li α_2M , nakon vezivanja liganda ili izlaganja određenim eksperimentalnim uslovima, zadržava sposobnost da reaguje sa proteazom i formira funkcionalni kompleks. Ako je signal na 405 nm očuvan, to ukazuje da ligand ne remeti ključne regione potrebne za aktivaciju α_2M , zarobljavanje proteaze i očuvanje pristupa malog supstrata. Smanjenje signala može ukazivati na oštećenje ili konformacionu promenu α_2M , ali se mora tumačiti pažljivo. Najvažnija kontrola u ovom testu jeste provera da li sam ligand utiče na aktivnost tripsina ili na reakciju tripsina sa BAPNA. Ukoliko ligand direktno inhibira tripsin, smanjenje apsorbancije ne bi moglo da se pripíše promeni funkcije α_2M . Pored toga, ako se test izvodi nakon izlaganja oksidativnom stresu, potrebno je razlikovati direktno oksidativno oštećenje α_2M od eventualnog zaštitnog efekta liganda. Zbog toga se antiproteazna aktivnost α_2M najpouzdanije tumači zajedno sa kontrolama: slobodni tripsin, tripsin u prisustvu liganda, α_2M bez liganda i α_2M sa ligandom (Sottrup-Jensen, 1989).

Funkcionalni značaj ovog testa je u tome što daje odgovor na pitanje koje se ne može dobiti samo spektroskopskim merenjima. Spektroskopija može pokazati da se ligand vezuje za α_2M i da li dolazi do uočljivih promena u strukturi, ali antiproteazni test pokazuje da li protein i dalje obavlja svoju osnovnu biološku ulogu. Očuvana antiproteazna aktivnost ukazuje na funkcionalnu stabilnost α_2M , dok njeno smanjenje može ukazivati na poremećaj konformacione pokretljivosti ili dostupnosti regiona važnih za interakciju sa proteazama.

- **Ispitivanje formiranja fibrina i poroznosti fibrinskog gela**

Fibrinogen je rastvorljivi plazmatski glikoprotein i prekursor fibrina, pa se njegova funkcija ne procenjuje merenjem enzimske aktivnosti, već praćenjem sposobnosti da se pod dejstvom trombina konvertuje u fibrin i formira fibrinsku mrežu. Trombin odseca fibrinopeptide A i B sa N-krajeva A α - i B β -lanaca, čime se izlažu polimerizaciona mesta. Fibrinski monomeri zatim stvaraju protofibrile, koje se lateralno udružuju u vlakna i grade trodimenzionalni gel. Na ovaj proces utiču koncentracija fibrinogena, trombin, joni kalcijuma, jonska jačina, temperatura i prisustvo liganada ili posttranslacionih modifikacija fibrinogena (**Litvinov et al., 2021; Mosesson, 2005**).

Trombinom indukovano formiranje fibrina prati se turbidimetrijski, merenjem porasta apsorbancije tokom vremena, najčešće na 350 ili 405 nm. Kako nastaju fibrinska vlakna, povećava se rasipanje svetlosti, a time i izmerena apsorbancija. Dobijena kriva obično ima nekoliko karakterističnih delova: početnu lag fazu, fazu brzog porasta apsorbancije i završni plato. Lag faza odražava vreme potrebno za nastanak početnih oligomera, faza porasta odražava rast protofibrila i lateralno udruživanje vlakana, dok plato predstavlja završnu organizaciju formiranog gela. Iz turbidimetrijske krive mogu se izvesti funkcionalni parametri, kao što su početak polimerizacije, brzina formiranja fibrina i maksimalna apsorbancija. Maksimalna apsorbancija se često koristi kao indirektan pokazatelj debljine fibrinskih vlakana, pošto deblja vlakna jače rasipaju svetlost. Ipak, ovaj parametar nije direktna mikroskopska mera debljine vlakana. Na njega utiču i grananje mreže, koncentracija proteina, homogenost gela i eksperimentalni uslovi. Zbog toga turbidimetrija omogućava praćenje kinetike i opšte organizacije formiranja fibrina, ali ne može sama da zameni mikroskopske ili reološke metode. U ispitivanjima protein-ligand interakcija, ovaj test je posebno koristan jer može otkriti funkcionalne posledice vezivanja i onda kada globalna struktura fibrinogena deluje očuvano. Mali ligand ne mora značajno promeniti sekundarnu strukturu fibrinogena da bi uticao na dostupnost trombinskih mesta cepanja, interakcije između D i E regiona, lateralno udruživanje protofibrila ili završnu arhitekturu mreže. Zbog toga promene u kinetici formiranja fibrina mogu ukazivati na lokalno funkcionalno relevantne efekte vezivanja liganda. Dodatna informacija o funkciji fibrina dobija se ispitivanjem poroznosti fibrinskog gela. Poroznost utiče na prolaz tečnosti i proteina kroz ugrušak, dostupnost fibrinolitičkih enzima i otpornost ugruška na razgradnju. Kompaktnije mreže sa manjim porama često su otpornije na fibrinolizu, dok poroznije mreže omogućavaju lakši pristup plazminu i drugim komponentama fibrinolitičkog puta (**Undas & Ariëns, 2011a; Wolberg, 2023**).

Uobičajeni pristup za procenu poroznosti jeste određivanje Darcy-jeve konstante propustljivosti. U ovom testu se kroz prethodno formiran fibrinski gel propušta pufer pod poznatim uslovima, a meri se količina protekle tečnosti tokom određenog vremena. Darcy-jeva konstanta, Ks, izračunava se iz odnosa:

$$K_s = (Q \times L \times \eta) / (t \times A \times \Delta P)$$

gde je Q zapremina protekle tečnosti, L dužina gela, η viskoznost tečnosti, t vreme protoka, A površina preseka gela, a ΔP razlika pritiska. Veća vrednost Ks ukazuje na veću propustljivost i veću poroznost mreže, dok manja vrednost ukazuje na kompaktniju strukturu gela.

Prednost merenja Darcy-jeve konstante je u tome što se ne procenjuje samo proces nastanka fibrina, već funkcionalna propustljivost formiranog gela. Na primer, ligand može promeniti brzinu polimerizacije ili maksimalnu apsorbanciju, ali da ukupna propustljivost mreže ostane nepromenjena. Zbog toga je kombinacija turbidimetrijskog praćenja formiranja fibrina i određivanja poroznosti korisnija od jednog testa pojedinačno. Ograničenja ovog pristupa su zavisnost od homogenosti gela, odsustva mehurića, stabilnosti pritiska, pravilnog formiranja mreže i tačnosti merenja protekle tečnosti (**Undas & Ariëns, 2011a; Wolberg, 2023**).

- **Ispitivanje oksidativne stabilnosti proteina i zaštitnog efekta liganda**

Pored direktnih funkcionalnih testova, u ispitivanju protein-ligand interakcija važno mesto zauzimaju testovi oksidativne stabilnosti. Proteini su česte mete reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS,

engl. reactive oxygen species), a oksidativne modifikacije amino-kiselinskih ostataka mogu promeniti njihovu konformaciju, stabilnost, sposobnost vezivanja drugih molekula i biološku funkciju. Posebno su osetljivi triptofan, tirozin, metionin, cistein i histidin. Oksidacija aromatičnih ostataka često se može pratiti smanjenjem unutrašnje fluorescencije proteina, jer signal potiče pre svega od triptofana, a u manjoj meri od tirozina. U ovom tipu eksperimenata ne ispituje se samo da li oksidativni agens oštećuje protein, već i da li vezani ligand može da ublaži to oštećenje. Zaštitni efekat može nastati direktnim uklanjanjem slobodnih radikala, ali i posredno, stabilizacijom proteinske strukture, promenom dostupnosti osetljivih ostataka ili zaštitom mikrokruženja važnog za funkciju proteina. Zbog toga se testovi oksidativne stabilnosti nalaze između strukturnih i funkcionalnih metoda: signal se često prati spektrofotometrijski, ali je biološki značaj testa vezan za očuvanje funkcije proteina u oksidativnim uslovima (**Minić, 2017**).

Jedan od najčešće korišćenih sistema za kontrolisano stvaranje radikala u vodenoj sredini jeste 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid (AAPH). AAPH je vodorastvorno azo-jedinjenje koje se pri fiziološkoj temperaturi termički razlaže i stvara radikale, pre svega peroksilne, a u određenoj meri i alkoksilne radikale. Ovi radikali mogu oksidovati aminokiselinske ostatke i dovesti do smanjenja unutrašnje fluorescencije, promena u konformaciji, delimičnog odmotavanja proteina ili agregacije. Pošto se radikali stvaraju postepeno tokom vremena, AAPH je pogodan za kinetičko praćenje oksidativnog oštećenja proteina (**Fuentes-Lemus et al., 2016**).

Eksperimentalno se protein inkubira sa AAPH-om u odsustvu i prisustvu liganda, a promena fluorescencije se prati tokom vremena. Poređenjem kinetičkih krivih procenjuje se brzina oksidativnog oštećenja i potencijalni zaštitni efekat liganda. Zaštitni efekat (PE, engl. protective effect) može se izraziti preko očuvane fluorescencije ili preko površine ispod krive (AUC, engl. area under the curve). Veća AUC vrednost u prisustvu liganda ukazuje na sporiji pad fluorescencije, odnosno manji stepen oksidativnog oštećenja proteina. AAPH-pristup je suštinski povezan sa ORAC testom (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity), koji označava kapacitet apsorpcije kiseoničnih radikala i zasniva se na praćenju zaštite od peroksilnih radikala. U klasičnom ORAC testu prati se očuvanje fluorescencije fluorescentne probe, dok se u prilagođenoj verziji za proteine prati pad unutrašnje fluorescencije samog proteina. Takva modifikacija metode je posebno korisna kada ima za cilj da proceni da li ligand štiti protein, a ne samo da li pokazuje opštu antioksidativnu aktivnost u sistemu sa fluorescentnom probom (**Minić, 2017**).

HORAC (engl. Hydroxyl radical averting capacity), odnosno kapacitet sprečavanja dejstva hidroksilnih radikala, predstavlja srodan, ali ne isti pristup. Za razliku od ORAC testa, koji je usmeren na peroksilne radikale i često koristi AAPH, HORAC se odnosi na zaštitu od hidroksilnih radikala. Hidroksilni radikali nastaju reakcijom vodonik-peroksida sa metalnim jonima u prisustvu kompleksirajućih agenasa. Pošto su hidroksilni radikali izuzetno reaktivni, ovaj test daje informaciju o otpornosti proteina i protein-ligand kompleksa na drugačiji, hemijski agresivniji tip oksidativnog oštećenja. U širem metodološkom smislu, AAPH-indukovana oksidacija, ORAC i HORAC mogu se zajednički posmatrati kao testovi oksidativne stabilnosti proteina i zaštitnog efekta liganda. Razlika je u vrsti generisanih radikala i načinu imenovanja testa. AAPH generiše pretežno peroksilne radikale i zato se metodološki najbliže vezuje za ORAC-princip. HORAC se ne zasniva na AAPH-u, već na sistemu koji generiše hidroksilne radikale. Kada se kao meta oksidacije koristi sam protein, zajednički eksperimentalni signal može biti pad njegove unutrašnje fluorescencije (Cipollone et al., 2024).

Kod katalaze, oksidativna stabilnost je posebno značajna, jer je reč o antioksidativnom enzinu. Oksidativno oštećenje može uticati na očuvanje hem-okruženja, prolaz supstrata do aktivnog mesta i ukupnu katalitičku aktivnost. Zbog toga se praćenje oksidativno-indukovanog pada fluorescencije može povezati sa merenjem aktivnosti enzima. Ako ligand usporava pad fluorescencije i istovremeno doprinosi očuvanju enzimске aktivnosti u prisustvu oksidativnog agensa, to ukazuje na funkcionalno relevantnu stabilizaciju enzima. Ipak, potrebno je razdvojiti zaštitni efekat liganda u oksidativnim uslovima od mogućeg direktnog inhibitornog efekta na samu katalitičku aktivnost. Kod $\alpha 2M$, oksidativne modifikacije mogu narušiti konformacionu pokretljivost i sposobnost proteina da reaguje sa proteazama. Zato se oksidativna stabilnost ovog proteina može pratiti na dva nivoa: preko

očuvanja unutrašnje fluorescencije i preko očuvanja antiproteazne aktivnosti nakon izlaganja radikalima. Ukoliko ligand ublažava pad fluorescencije, a istovremeno očuva sposobnost $\alpha 2M$ da formira funkcionalni kompleks sa tripsinom, to će ukazati da zaštita nije ograničena samo na pojedine fluorescentne ostatke, već da ima značaj za funkciju proteina. Kod fibrinogena, oksidativna oštećenja imaju poseban funkcionalni značaj jer može promeniti formiranje fibrina, strukturu fibrinske mreže i osetljivost ugruška na fibrinolizu. Oksidovani fibrinogen može formirati mreže promenjene gustine, debljine vlakana i propustljivosti. Zbog toga se zaštita fibrinogena od oksidacije najbolje tumači zajedno sa testovima formiranja fibrina i poroznosti gela. Očuvanje fluorescencije u ORAC ili HORAC pristupu pokazuje manji stepen radikalski indukovane modifikacije proteina, ali ne mora automatski značiti da su sva funkcionalna svojstva fibrinogena očuvana.

Pored radikalskih sistema zasnovanih na AAPH-u ili hidroksilnim radikalima, oksidativna stabilnost može se ispitivati i pomoću natrijum-hipohlorita (NaOCl). NaOCl je hemijski model hipohloraste kiseline, koju u biološkim sistemima stvaraju mijeloperoksidaza i H_2O_2 u aktiviranim neutrofilima (**Winterbourn et al., 2016**). Ovaj oksidans može modifikovati i proteine i male molekule. U slučaju klopapina, važna je oksidacija do klopapin-N-oksida. Praćenje ove transformacije, na primer masenom spektrometrijom, omogućava da se ispita da li protein može smanjiti dostupnost leka oksidansu ili uticati na njegovu oksidativnu stabilnost. Time se testovi oksidativne stabilnosti proširuju sa zaštite proteina na mogućnost uzajamne zaštite u kompleksu protein-ligand.

Najvažnije ograničenje ovih testova jeste da očuvanje unutrašnje fluorescencije ne predstavlja direktan dokaz potpunog očuvanja ukupne proteinske strukture. Fluorescentni signal najviše odražava stanje aromatičnih amino-kiselinskih ostataka i njihovo neposredno mikrokruženje. Zbog toga se rezultati oksidativnih testova ne smeju tumačiti izolovano. Najpouzdaniji zaključak dobija se kada se očuvanje fluorescencije poveže sa očuvanjem funkcionalne aktivnosti, kao što su aktivnost katalaze, antiproteazna aktivnost $\alpha 2M$ ili sposobnost fibrinogena da formira fibrinsku mrežu.

- **Značaj funkcionalnih testova u tumačenju interakcija protein-ligand**

Funkcionalni testovi omogućavaju da se biofizički opis vezivanja poveže sa biološkim posledicama interakcije. U sistemima u kojima se ispituje vezivanje malih molekula za proteine, posebno je važno izbeći pojednostavljeno tumačenje po kome svako vezivanje nužno znači i gubitak funkcije. Ligand može da se veže za protein bez merljivog funkcionalnog efekta, može da stabilizuje protein, može da inhibira njegovu funkciju, ili može da deluje zaštitno samo u određenim uslovima, na primer pri oksidativnom stresu.

Kod katalaze, funkcionalni testovi pokazuju da li interakcija sa ligandom menja sposobnost enzima da razgrađuje H_2O_2 . Kod $\alpha 2M$, oni pokazuju da li protein zadržava sposobnost da ograniči aktivnost proteaza. Kod fibrinogena, funkcionalni testovi omogućavaju uvid u to da li vezivanje liganda utiče na konverziju fibrinogena u fibrin i na osobine formirane mreže. Testovi oksidativne stabilnosti dodatno pokazuju kako se isti kompleksi ponašaju u uslovima radikalskog opterećenja.

Zbog toga se najpouzdaniji zaključci dobijaju kombinovanjem više pristupa. Spektroskopske metode ukazuju na formiranje kompleksa i eventualne strukturne promene, *in silico* metode daju mogući model vezivnog mesta i interakcija, dok funkcionalni testovi pokazuju da li te promene imaju posledice po aktivnost ili stabilnost proteina. Takav integrisani pristup je posebno pogodan za proteine plazme, jer oni imaju različite funkcije i mogu različito reagovati na vezivanje istog liganda.

2.4.3. *In silico* metode u proučavanju protein ligand interakcija

In silico metode važan su deo savremenog pristupa u proučavanju interakcija malih molekula sa proteinima. Njihova osnovna prednost je u tome što omogućavaju uvid u prostorni raspored liganda u odnosu na proteinsku strukturu i u vrstu interakcija koje mogu stabilizovati kompleks protein–ligand. Eksperimentalne metode, kao što su fluorescentna spektroskopija, cirkularni dihiroizam ili funkcionalni testovi, mogu da pokažu da dolazi do vezivanja, da procene afinitet vezivanja i da ukažu na promene u strukturi ili aktivnosti proteina. Međutim, one najčešće ne mogu direktno da odrede

tačno vezivno mesto i orijentaciju liganda. Zbog toga se računске metode koriste kao dopuna eksperimentalnim ispitivanjima, jer omogućavaju formiranje hipoteze o načinu vezivanja i o mogućim posledicama vezivnih interakcija (**Morris & Lim-Wilby, 2008; Stanzione et al., 2021**).

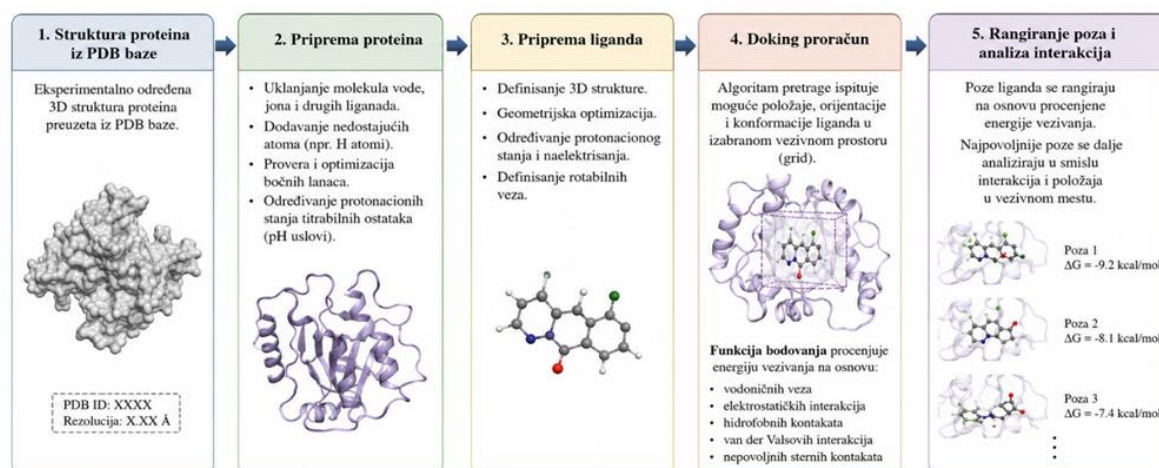
U istraživanjima interakcija lekova sa proteinima najčešće se koriste molekularni doking i molekularna dinamika. Molekularni doking služi za predviđanje mogućih položaja liganda u strukturi proteina, dok molekularna dinamika omogućava praćenje ponašanja predloženog kompleksa tokom vremena. Ova dva pristupa se međusobno dopunjuju: doking daje početni model vezivanja, a simulacije molekularne dinamike omogućavaju procenu njegove stabilnosti u uslovima koji bolje oponašaju proteinsko okruženje u rastvoru. Takav kombinovani pristup je posebno koristan kada se ispituju nekovalentne interakcije, s obzirom da one zavise od velikog broja slabijih doprinosa, uključujući vodonične veze, elektrostatičke interakcije, hidrofobne kontakte, van der Valsove sile i aromatične interakcije (**Guedes et al., 2014; Halperin et al., 2002**).

2.4.3.1. Molekularni doking

Molekularni doking je računarska metoda kojom se predviđa najpovoljniji način vezivanja liganda za protein poznate ili modelovane trodimenzionalne strukture. Cilj dokinga je da se pronađe konformacija kompleksa u kojoj su položaj, orijentacija i unutrašnja konformacija liganda energetski najpovoljniji u odnosu na izabrano vezivno mesto ili na celokupnu površinu proteina. Rezultat dokinga obično se prikazuje kroz skup mogućih poza liganda i procenjenju energiju vezivanja, na osnovu kojih se poze rangiraju i dalje analiziraju (**Brooijmans & Kuntz, 2003; Fan et al., 2019**).

Osnovu molekularnog dokinga (**Slika 14**) čine dva međusobno povezana elementa: algoritam pretrage i funkcija bodovanja. Algoritam pretrage ispituje moguće položaje i orijentacije liganda, kao i rotacije oko njegovih jednostrukih veza. Pošto je broj mogućih rešenja veliki, doking programi koriste različite strategije kako bi se efikasno pretražio konformacioni prostor. Pretraga može biti sistematska, stohastička, ili deterministička. Sistematske metode pokušavaju da ispituju veliki broj unapred definisanih konformacija, dok stohastičke metode, kao što su Monte Karlo metoda (MC, od engl. Monte Carlo) i genetski algoritmi, uvode nasumične promene u položaj ili konformaciju liganda. Deterministički pristupi, uključujući minimizaciju energije, usmeravaju sistem ka lokalno povoljnijem energetskom stanju, ali mogu biti osetljivi na početnu konformaciju (**Dias & de Azevedo, 2008; Halperin et al., 2002**). Funkcija bodovanja (od engl. scoring function) koristi se za procenu stabilnosti pojedinačnih poza liganda i njihovo rangiranje. Ona računa približan energetski doprinos interakcija između proteina i liganda, pri svega vodonične veze, elektrostatičke interakcije, hidrofobne sile, van der Valsove interakcije i nepovoljne sterne kontakte. Funkcije bodovanja su zasnovane na poljima sila, empirijskim parametrima, ili statističkim podacima izvedenim iz poznatih struktura kompleksa. U praksi se poze sa negativnijom procenjenom energijom vezivanja smatraju povoljnijim, ali se te vrednosti ne smeju tumačiti kao potpuno tačne eksperimentalne slobodne energije vezivanja. One su najkorisnije za poređenje različitih poza istog liganda u istom sistemu ili za poređenje srodnih liganada u okviru istog protokola (**Jain & Nicholls, 2008; Li et al., 2019**).

Doking se izvodi kao „usmereni“ ili „slepi“ doking. Kod usmerenog dokinga pretraga se ograničava na unapred poznato ili pretpostavljeno vezivno mesto, na primer aktivni centar enzima ili region za koji postoje eksperimentalni podaci. Kod slepog dokinga (od engl. blind doking) pretražuje se veći deo proteinske strukture ili cela površina proteina. Ovaj pristup je koristan kada mesto vezivanja nije poznato, kada protein ima više mogućih vezivnih regiona, ili kada se želi ispitati mogućnost perifernog ili alosternog vezivanja liganda (**Eberhardt et al., 2021; Trott & Olson, 2010a**).



Slika 14. Shema osnovnih koraka molekulskog dokinga

Priprema sistema je ključan korak u molekulskom dokingu. Struktura proteina se najčešće preuzima iz PDB baze (engl. Protein Data Bank), ukoliko postoji eksperimentalno određena struktura odgovarajuće rezolucije. Pre proračuna, uklanjaju se nepotrebni molekuli vode, joni ili kristalografski ligandi, dodaju se nedostajući atomi, proveravaju se bočni lanci i određuju se stanja protonovanja titrabilnih amino-kiselinskih ostataka. Ovo je posebno važan za ostatke histidina, aspartata, lizina, glutamata i arginina – njihovo naelektrisanje zavisi od pH vrednosti i lokalnog proteinskog okruženja. Nepravilno protonaciono stanje može promeniti elektrostatičke osobine vezivnog mesta i dovesti do pogrešne orijentacije liganda. Za procenu protonacionih stanja često se koriste specijalizovani alati, kao što je H++ program (Anandakrishnan et al., 2012). Ligand se takođe mora pripremiti pre doking proračuna. To uključuje definisanje njegove trodimenzionalne strukture, geometrijsku optimizaciju, određivanje protonacionog stanja, parcijalnih naelektrisanja i rotabilnih veza. Kod fleksibilnih liganada dozvoljava se rotacija oko jednostrukih veza, dok se protein u većini standardnih protokola tretira kao rigidan ili delimično fleksibilan. Ovo pojednostavljenje ubrzava proračun, ali istovremeno predstavlja jednu od glavnih metodoloških aproksimacija dokinga. Program AutoDock Vina jedan je od često korišćenih alata za molekulski doking. On kombinuje efikasnu pretragu konformacionog prostora sa empirijskom funkcijom bodovanja i omogućava relativno brzo ispitivanje velikog broja mogućih poza liganda (Eberhardt et al., 2021; Trott & Olson, 2010a).

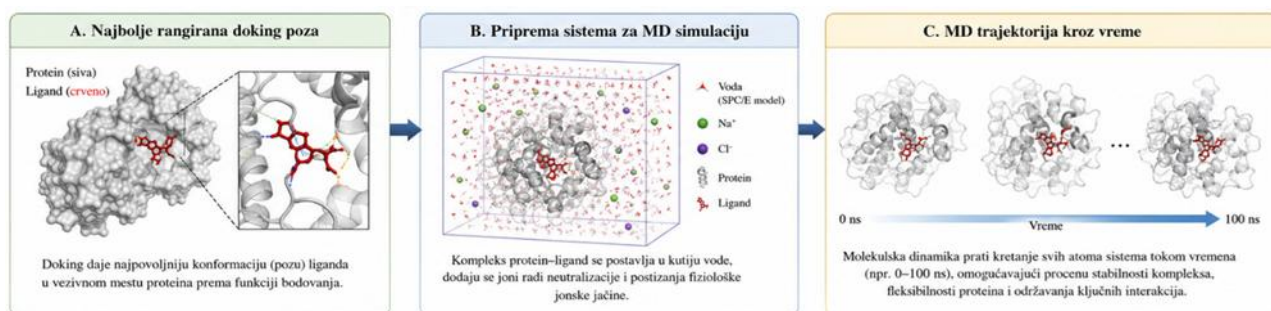
Iako je molekulski doking veoma koristan za predviđanje potencijalnih vezivnih mesta, njegova ograničenja moraju biti uzeta u obzir. Najvažnije ograničenje je pojednostavljeno predstavljanje fleksibilnosti proteina. Proteini u rastvoru nisu statične strukture, već stalno prolaze kroz manje ili veće konformacione promene. Vezivanje liganda može izazvati pomeranje bočnih lanaca, reorganizaciju petlji, ili promene u udaljenim domenima. Statični doking to često ne može da obuhvati, naročito kada je za vezivanje važan model indukovanog slaganja (Huang & Zou, 2010; Mohan et al., 2005). Dodatno ograničenje je tretman rastvarača. Molekuli vode mogu direktno učestvovati u stabilizaciji kompleksa, posredovati u vodoničnim vezama, ili menjati elektrostatičke osobine vezivnog mesta. Pošto se u mnogim doking protokolima voda uklanja, moguće je izgubiti interakcije koje su u realnom sistemu važne. Ograničenja postoje i u funkcijama bodovanja, jer one ne opisuju u potpunosti entropijske doprinose vezivanju, dinamiku proteina i kompleksnu ulogu rastvarača. Zbog toga doking može dati lažno pozitivne rezultate, odnosno poze koje su povoljne u računarskom modelu, ali nisu stabilne u realnim uslovima (Stanzione et al., 2021).

2.4.3.2. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD, od engl. molecular dynamics) je računarska metoda koja prati kretanja atoma u molekulskom sistemu tokom vremena. Za razliku od dokinga, koji najčešće daje statičan model kompleksa protein–ligand, MD simulacije omogućavaju uvid u dinamičko ponašanje sistema (Slika 15). Na taj način se prati da li ligand ostaje u predviđenom vezivnom mestu, da li

menja orijentaciju, da li se udaljava od proteina, i da li njegovo vezivanje utiče na stabilnost ili fleksibilnost proteinske strukture (**Hollingsworth & Dror, 2018; Karplus & McCammon, 2002**).

Klasična MD zasniva se na primeni Njutnovih jednačina kretanja. Sile koje deluju na atome računaju se iz potencijalne energije sistema, a ona se opisuje se pomoću polja sila. Polje sila jeste skup matematičkih funkcija i parametara kojima se opisuju vezivne i nevezivne interakcije. Vezivne interakcije obuhvataju istezanje hemijskih veza, savijanje uglova i torzione rotacije, dok nevezivne interakcije uključuju van der Waalsove i elektrostatičke doprinose. Za proteine, nukleinske kiseline, lipide i male organske molekule razvijena su različita polja sila, a izbor odgovarajućeg polja sila direktno utiče na pouzdanost (**Adcock & McCammon, 2006; Riniker, 2018**).

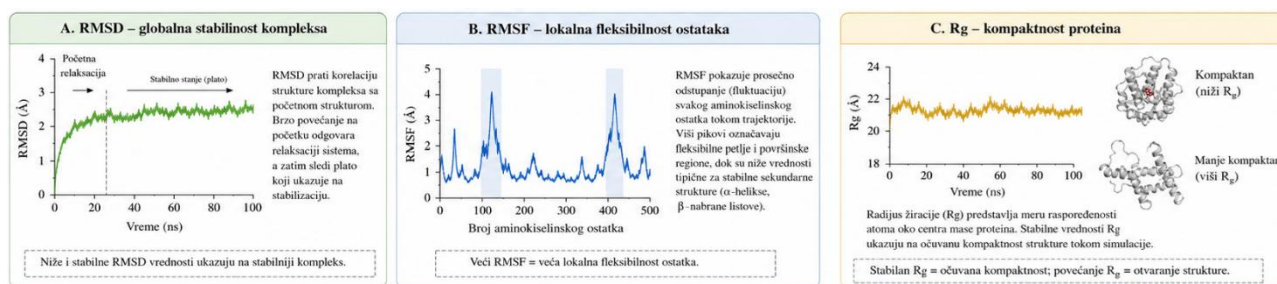


Slika 15. Shema povezivanja molekulskog dokinga i molekulske dinamike, uprošćeno

Priprema sistema za MD simulaciju obuhvata nekoliko koraka. Najpre se definiše početna struktura proteina ili kompleksa protein–ligand, najčešće na osnovu eksperimentalno određene strukture ili rezultata dokinga. Zatim se biraju odgovarajuća polja sila za protein i ligand, dodaju se nedostajući atomi vodonika i definišu protonaciona stanja. Sistem se zatim solvatiše, najčešće u kutiji eksplicitnih molekula vode, a po potrebi se dodaju joni radi neutralizacije ukupnog naelektrisanja i postizanja željene jonske jačine. Upotreba vode i periodičnih graničnih uslova omogućava da se simulacioni sistem ponaša kao deo većeg rastvora, što bolje odgovara realnim uslovima (**Gajula et al., 2016; Hollingsworth & Dror, 2018**).

Pre simulacije neophodno je ukloniti nepovoljne kontakte i stabilizovati sistem. Zbog toga se najpre izvodi minimizacija energije, zatim postepeno zagrevanje do željene temperature, a potom ekvibracija, tokom koje se prate temperatura, pritisak, energija i gustina sistema. Simulacije se mogu izvoditi u različitim ansamblima. NVT ansambl označava konstantan broj čestica, zapreminu i temperaturu (od engl. number of particles, volume, temperature), dok NPT ansambl označava konstantan broj čestica, pritisak i temperaturu (od engl. number of particles, pressure, temperature). Nakon stabilizacije sistema započinje simulacija, u kojoj se koordinate atoma čuvaju u pravilnim vremenskim intervalima i formiraju trajektoriju. Trajektorija predstavlja niz struktura sistema kroz vreme i sadrži informacije o atomskim pomeranjima, konformacionim promenama i međumolekulskim interakcijama (**Sinha et al., 2022**).

Analiza trajektorije je ključna za tumačenje MD simulacije. Najčešće korišćeni parametri (**Slika 16**) su RMSD (srednje kvadratno odstupanje koordinata atoma u odnosu na referentnu strukturu; engl. root mean square deviation), RMSF (srednje kvadratne fluktuacije aminokiselinskih ostataka; engl. root mean square fluctuation) i Rg (radijus žiracije; engl. radius of gyration). RMSD se koristi za procenu globalne stabilnosti sistema. Ako se RMSD nakon početnog perioda stabilizuje i ostane približno konstantan, to ukazuje da je sistem dostigao relativno stabilno konformaciono stanje (**Sinha et al., 2022**). RMSF daje uvid u lokalnu fleksibilnost proteina, jer pokazuje koliko pojedinačni aminokiselinski ostaci fluktuiraju tokom simulacije. Povišene RMSF vrednosti najčešće ukazuju na fleksibilne petlje, terminalne regione ili pokretne domene, dok niže na stabilnije delove strukture. Poređenjem RMSF profila slobodnog proteina i kompleksa protein–ligand može se proceniti da li vezivanje liganda povećava ili smanjuje pokretljivost određenih regiona. Rg opisuje kompaktnost proteinske strukture. Stabilne vrednosti Rg ukazuju na očuvanu prostornu organizaciju proteina, dok povećanje Rg može ukazivati na širenje ili delimičnu destabilizaciju strukture.



Slika 16. Najčešći parametri za MD simulacije

Pored ovih parametara, u analizi protein–ligand kompleksa često se prate vodonične veze, hidrofobni kontakti, udaljenosti između liganda i ključnih aminokiselinskih ostataka, kao i kontaktne mape. Ove analize omogućavaju procenu koje interakcije su kratkotrajne, a koje se održavaju tokom značajnog dela simulacije. Kod kompleksa dobijenih dokingom posebno je korisno pratiti RMSD liganda u odnosu na početnu pozu, jer se na taj način proverava da li ligand ostaje u istom vezivnom regionu ili tokom simulacije napušta predviđeno mesto (**Hollingsworth & Dror, 2018; Mohan et al., 2005**).

Za dodatnu procenu stabilnosti kompleksa mogu se koristiti metode MM-PBSA (molekulska mehanika sa Poisson–Boltzmann površinskom aproksimacijom; od engl. *molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area*) i MM-GBSA (molekulska mehanika sa generalizovanom Born površinskom aproksimacijom; od engl. *molecular mechanics generalized Born surface area*). Ove metode koriste strukture izdvojene iz MD trajektorije kako bi se procenila slobodna energija vezivanja i doprinos pojedinačnih energetskih komponenti, uključujući elektrostatičke i van der Valsove interakcije, kao i doprinos solvatacije. Iako ne daju uvek potpuno kvantitativno pouzdane vrednosti afiniteta, korisne su za poređenje srodnih kompleksa i identifikaciju aminokiselinskih ostataka koji najviše doprinose stabilizaciji vezivanja (**Genheden & Ryde, 2015**).

Molekulska dinamika pruža realističniji uvid u ponašanje protein–ligand kompleksa od statičnog dokinga, ali ima sopstvena ograničenja. Klasična MD ne može pouzdano da opiše formiranje ili raskidanje kovalentnih veza, jer je topologija sistema definisana pre početka simulacije. Zbog toga se procesi koji uključuju hemijske reakcije, promenu oksidacionog stanja metala, ili prelaze između elektronskih stanja, ne mogu adekvatno opisati bez kvantno-mehaničkih ili kombinovanih pristupa. U takvim slučajevima koriste se QM/MM metode (kombinacija kvantne mehanike i molekulske mehanike; engl. *quantum mechanics/molecular mechanics*) (**Senn & Thiel, 2009**). Drugo važno ograničenje je vremenska skala. Mnoge biološki relevantne promene, uključujući disocijaciju liganda, velike alosterne prelaze ili spore konformacione promene proteina, odvijaju se na vremenskim skalama koje mogu biti duže od standardnih simulacija. Simulacije od nekoliko desetina ili stotina nanosekundi često su dovoljne za proveru stabilnosti dokovane poze, ali ne moraju obuhvatiti sporije događaje. Pored toga, rezultati zavise od kvaliteta početne strukture, izbora polja sila, modela vode, protonacionih stanja i parametara za ligand. Zbog toga MD rezultate treba tumačiti zajedno sa eksperimentalnim podacima i u okviru jasno definisanih uslova simulacije (**Hollingsworth & Dror, 2018; Sinha et al., 2022**).

Uprkos ovim ograničenjima, kombinacija molekuskog dokinga i molekulske dinamike predstavlja jedan od najkorisnijih računarskih pristupa u proučavanju protein–ligand interakcija. Doking omogućava brzo predviđanje potencijalnih vezivnih mesta i početnih poza liganda, dok MD simulacije omogućavaju proveru stabilnosti tih poza i praćenje promena u strukturi proteina tokom vremena. Kada se ovi rezultati uporede sa spektroskopskim, termodinamičkim i funkcionalnim ispitivanjima, dobija se celovitija slika o prirodi interakcije, mogućem vezivnom mestu i potencijalnom uticaju liganda na strukturu i funkciju proteina.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema polaznog materijala, hemikalije i instrumenti

Klozapin je obezbeđen od firme Remedica Ltd. (Limassol, Kipar); čistoća preparata proverena je primenom masene spektrometrije visoke rezolucije (**Prilog 1**). Za eksperimente sa BLC, 24 mM štok rastvor klozapina pripremljen je u metanolu HPLC čistoće. U eksperimentima sa alfa-2-makroglobulinom klozapin je uglavnom rastvaran u DMSO, 8 mM štok rastvor, dok je za CD merenja štok rastvor leka pripreman u metanolu (zbog što manjeg uticaja na CD signal). U eksperimentima sa fibrinogenom, klozapin je rastvoren u DMSO, 4 mM štok rastvora leka. U svim navedenim sistemima finalna koncentracija organskog rastvarača nije prelazila 1% (v/v). Za eksperimente sa BLC i fibrinogenom korišćen je 50 mM fosfatni pufer pH 7,2, osim ako u pojedinačnom eksperimentu nije drugačije navedeno. Za alfa-2-makroglobulin korišćen je 50 mM Tris-puferisani fiziološki rastvor (TBS), pH 7,4. Sva rastvaranja i razblaženja urađena su ultračistom vodom dobijenom iz Smart2Pure sistema (Thermo Scientific, SAD).

Fluorescentna merenja izvedena su na spektrofleurimetru FluoroMax[®]-4 (Horiba Scientific, Kyoto, Japan), opremljenom Peltierovim sistemom za kontrolu temperature. UV-Vis spektri snimljeni su na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan), a CD spektri BLC i α 2M na JASCO J-815 CD spektropolarimetru (JASCO Corporation, Hachioji, Japan), takođe sa Peltierovom kontrolom temperature. FTIR analiza fibrinogena izvedena je na IRAffinity-1 spektrometru (Shimadzu, Kyoto, Japan). Za analizu masa oksidacionih proizvoda klozapina korišćen je LTQ Orbitrap XL maseni spektrometar (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, SAD), sa HESI izvorom.

3.1.1. Priprema i karakterizacija goveđe katalaze

Katalaza iz goveđe jetre (Sigma-Aldrich, kataloški broj C-9322; specifična aktivnost 2000–5000 U/mg) pripremljena je tako što je liofilizovani proteinski preparat dodat u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,2, u koncentraciji od 0,5 mg/mL, i ostavljen da se polako rastvori na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Rastvor je zatim izdijalizovan 24 sata, pomoću membrane od regenerisane celuloze (MWCO 10 kDa), naspram istog pufera na 4 °C, uz četiri izmene u cilju uklanjanja malih molekula i stabilizatora. Nakon dijalize, uzorak je izcentrifugiran na 13.000×g tokom 15 minuta, na 4 °C, kako bi se uklonile eventualne nerastvorne čestice. Supernatant je pažljivo izdvojen, a koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 276 nm, koristeći molarni ekstinkcioni $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 12.9$ (**Herskovits, 1969**). Pripremljeni rastvori korišćeni su odmah ili čuvani na 4 °C do najviše 48 sati.

3.1.2. Izolovanje i karakterizacija humanog alfa-2-makroglobulina

Humani alfa-2-makroglobulin izolovan je iz seruma zdravih davalaca krvi (n=10), uz prethodnu etičku saglasnost (INEP, br. odobrenja 02/680/2) i čuvan na –20 °C do upotrebe. Proces izolovanja α 2M odvijao se u tri koraka: frakcionisanje seruma taloženjem proteina amonijum-sulfatom, rasoljavanje uzorka dijalizom i gel-filtraciona hromatografija prema modifikovanom postupku opisanom za izolovanje i karakterizaciju α 2M (**Rehman et al., 2017; Šunderić et al., 2024**). U prvom koraku, serum je zasićen amonijum-sulfatom do 40% kako bi precipitirao α 2M. Dobijeni talog je resuspendovan u minimalnoj zapremini 50 mM fosfatnog pufera pH 7,4, zatim izdijalizovan pomoću membrane od regenerisane celuloze (MWCO 10 kDa) tokom 48 h naspram istog pufera uz četiri izmene, na 4 °C. Dijalizovani uzorak dodatno je prečišćen gel-filtracionom hromatografijom na Sephadex G-200 koloni ($V_t = 43$ mL), uz korišćenje istog pufera kao eluenta, pri protoku od 0,5 mL/min. U frakciji V_0 nalazio se α 2M, čija je čistoća potvrđena SDS PAG elektroforezom (**Prilog 2**). Koncentracija proteina određena je BCA metodom, korišćenjem standardne krive za albumin. Uzorci su čuvani na temperaturi od 4 °C i korišćeni u roku od 72h.

3.1.3. Izolovanje i priprema humanog fibrinogena

Fibrinogen je izolovan iz humanog plazma pula dobijenog od zdravih dobrovoljnih davalaca, uz etičku saglasnost, primenom metode dvostruke precipitacije amonijum-sulfatom (**Gligorijević et**

al., 2019). Zasićeni rastvor amonijum-sulfata dodat je plazmi do konačne koncentracije od 20%, nakon čega je uzorak inkubiran 30 minuta na 4 °C. Nakon inkubacije, uzorak je izcentrifugiran na 6700 x g, tokom 1 minuta na sobnoj temperaturi, a dobijeni proteinski talog rastvoren je u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,2. Taloženje je ponovljeno na isti način, a drugi talog, nakon rastvaranja u istom puferu, iskorišćen je kao izvor proteina za sve dalje analize. Homogenost dobijenog preparata potvrđena je elektroforezom u denaturišućim uslovima (SDS-PAGE) (**Prilog 3**), dok je koncentracija proteina određena spektrofotometrijski pri 280 nm, koristeći ekstinkcioni koeficijent $E_{1\%} = 15,1$ (**Kaijzel et al., 2006**). Uzorci su čuvani pri 4 °C i korišćeni u roku od 72 sata.

3.2. Spektrofluorimetrijska analiza interakcija

Sva fluorimetrijska merenja izvedena su u kvarcnoj kivetu (Hellma, Nemačka) sa optičkim putem od 10 mm i zapreminom uzorka od 3,0 mL. Širina razreza monohomatora bila je 5 nm (i za ekscitaciju i za emisiju), a svaki spektar sniman je kao prosek dve akumulacije. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Pre merenja, uzorci su filtrirani kroz najlonsku filter membranu (0,22 μ m). Praćena je unutrašnja fluorescencija proteina, koja uglavnom potiče od triptofanskih i tirozinskih ostataka, pri ekscitaciji na 280 nm.

Za sve sisteme, fluorescencija samog klopazina snimana je pod identičnim uslovima i oduzimana od spektara odgovarajuće smeše protein–lek. Intenziteti fluorescencije na emisionim maksimumima proteina korigovani su na efekat unutrašnjeg filtera prema formuli (**Bakar & Feroz, 2019; Lakowicz, 2006**):

$$F_C = F_0 \cdot 10^{((A_{ex} + A_{em})/2)} \quad (1)$$

gde su A_{ex} i A_{em} apsorbanse klopazina na talasnim dužinama ekscitacije (280 nm) i emisionog maksimuma, dok su F_0 i F_C izmerena i korigovana fluorescencija, redom.

Za određivanje tipa gašenja fluorescencije iskorišćena je Stern–Volmerova jednačina (**Lakowicz, 2006**):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

gde su F_0 i F intenziteti fluorescencije bez i u prisustvu klopazina, K_{SV} je Stern–Volmerova konstanta gašenja, k_q je bimolekulska konstanta gašenja, τ_0 je prosečni životni vek ekscitovanog stanja biomolekula bez kvenčera i (tipično) iznosi 10^{-8} s (**Lakowicz, 2006**), a $[Q]$ je koncentracija leka. Za sve sisteme snimani su i sinhroni fluorescentni spektri pri $\Delta\lambda = 15$ nm (ekscitacija ostataka Tyr) i $\Delta\lambda = 60$ nm (ekscitacija ostataka Trp) (**Lakowicz, 2006**).

3.2.1. Gašenje unutrašnje fluorescencije katalaze

Merenja su izvedena u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,2 na tri temperature: 25 °C, 30 °C i 37 °C ($\pm 0,1$ °C). Štok rastvor klopazina (24 mM u HPLC metanolu) razblažen je istim puferom do radnog rastvora koncentracije 60 μ M; finalna koncentracija metanola nije prelazila 1%. Titracija je izvedena sukcesivnim dodavanjem alikvota od po 5 μ L ovog radnog rastvora u 3 mL rastvora BLC (100 nM), ukupno 10 dodataka, čime su postignute finalne koncentracije klopazina od 0,1 do 1,0 μ M (molarni odnos protein:ligand od 1:1 do 1:10). Pre svakog snimanja uzorci su inkubirani 2 minuta. Emisioni spektri snimani su u opsegu 290–440 nm, a korekcija unutrašnjeg filtera izvedena je na emisionom maksimumu BLC na 340 nm prema jednačini (1).

Konstanta asocijacije K_a i broj vezivnih mesta n određeni su Klotzovim dvostrukim recipročnim prikazom (**Klotz & Hunston, 1971**) korišćenjem jednačine:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{(n \cdot K_a \cdot [Lf])} + \frac{1}{n} \quad (3)$$

gde r predstavlja broj molova vezanog liganda po molu proteina (prema: **Klotz & Hunston, 1971**), a $[Lf]$ je molarna koncentracija slobodnog liganda. Koncentracija slobodnog liganda je izračunata korišćenjem jednačine (**Bi et al., 2004**):

$$[L_f] = [L_t] - \frac{(F_0 - F_c)}{F_0} \times [P_t] \quad (4)$$

gde je L_t molarna koncentracija liganda, P_t molarna koncentracija BLC, F_0 intenzitet fluorescencije

Termodinamički parametri vezivanja su izračunati korišćenjem sledećih jednačina:

$$\ln K_a = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

gde je R univerzalna gasna konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), a T apsolutna temperatura izražena u kelvinima, ΔG predstavlja Gibsovu slobodnu energiju (J mol^{-1}), dok su ΔH i ΔS (J mol^{-1}) promene entalpije i entropije, redom. Vrednosti ΔH i ΔS su određene su iz nagiba i odsečka Vant Hoff-ovog grafika zavisnosti $\ln K_a$ od $1/T$.

3.2.2. Gašenje unutrašnje fluorescencije alfa-2-makroglobulina

Merenja su izvedena u 50 mM TBS puferu pH 7,4 na tri temperature: 25 °C, 30 °C i 37 °C (± 0.11 °C). Štok rastvor klopapina (8 mM u DMSO) razblažen je do radnog rastvora koncentracije 1,5 mM; finalna koncentracija DMSO-a nije prelazila 1%. Titracija je izvedena sukcesivnim dodavanjem alikvota od po 5 μL ovog radnog rastvora u 3,0 mL rastvora $\alpha 2\text{M}$ (100 nM), ukupno 8 dodataka, čime su postignute finalne koncentracije klopapina od 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 i 20,0 μM (molarni odnos protein:ligand od 1:25 do 1:200). Pre svakog snimanja uzorci su inkubirani 1 minut. Emisioni spektri snimani su u opsegu 290–450 nm, a korekcija unutrašnjeg filtera izvedena je na emisionom maksimumu $\alpha 2\text{M}$ na 334 nm prema jednačini (1). Konstanta asocijacije K_a i broj vezivnih mesta n određeni su korigovanim dvostrukim logaritamskim izrazom (Lakowicz, 2006):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = -n \log \frac{1}{[L] - [P] \left(\frac{F_0 - F}{F} \right)} + n \log K_a \quad (7)$$

gde su $[L]$ i $[P]$ ukupne koncentracije liganda i proteina. Termodinamički parametri određeni su Van't Hoff-ovim jednačinom, kao i za BLC (odjeljak 3.2.1.).

3.2.3. Gašenje unutrašnje fluorescencije fibrinogena

Merenja su izvedena u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,2 na 37 °C (± 0.1 °C). Štok rastvor klopapina (4 mM u DMSO) razblažen je do radnog rastvora koncentracije 300 μM ; finalna koncentracija DMSO-a nije prelazila 1%. Titracija je izvedena sukcesivnim dodavanjem alikvota od po 5 μL ovog radnog rastvora u 3,0 mL rastvora fibrinogena (40 nM), ukupno 8 dodataka, čime su postignute finalne koncentracije klopapina od 0,5 do 4,0 μM (molarni odnos protein:ligand od 1:12,5 do 1:100). Pre svakog snimanja uzorci su inkubirani 1 minut. Emisioni spektri snimljeni su u opsegu 290–500 nm, a korekcija unutrašnjeg filtera izvedena je na emisionom maksimumu fibrinogena na 345 nm, koristeći jednačinu (1). Konstanta asocijacije K_a i broj vezivnih mesta n određeni su korigovanim dvostrukim logaritamskim izrazom (kao za $\alpha 2\text{M}$, odeljak 3.2.3.). Budući da su merenja izvedena na jednoj temperaturi, termodinamički parametri vezivanja za ovaj sistem nisu određeni.

3.3. UV-Vis spektroskopska analiza vezivanja odabranih proteina sa klopapinom

UV-Vis spektroskopija iskorišćena je za praćenje evt. promena u apsorpcionim spektrima proteina nakon vezivanja klopapina. Promene u oblasti spektra 250–320 nm ukazuju na promene u mikrokruženju aromatičnih amino-kiselinskih ostataka, dok kod hem-proteina, kao što je katalaza, promene u oblasti Soretove trake ukazuju na promene u okruženju hem grupe (Schmid, 2001).

3.3.1. UV-vis spektroskopska analiza katalaze iz goveđe jetre

Apsorpcioni spektri BLC snimljeni su na spektrofotometru na sobnoj temperaturi, u kvarcnoj kiveti optičkog puta 1 cm, u opsegu 260–600 nm. Koncentracija katalaze u ovim eksperimentima bila je 4,8 μM , a klopapin je dodat u koncentracijama 4,8, 19,2 i 48 μM (molarni odnosi BLC:CLZ od 1:1, 1:4 i 1:10), vodeći računa da % organskog rastvarača ne prelazi 1%. Spektri smeša protein-lek

korigovani su oduzimanjem spektara samog klopapina u puferu. Za bolje razdvajanje preklopljenih doprinosa aromatičnih amino-kiselina iz UV apsorpcionih spektara, izračunati su spektri četvrtog izvoda u programu OriginPro 8.5, uz primenu Savitzky-Golay algoritma (prozor od 100 tačaka), što omogućava jasnije razlikovanje doprinosa tirozina, Tyr/Trp i triptofana (Minić et al., 2020).

3.3.2. UV-vis spektroskopska analiza alfa-2-makroglobulina

UV spektri $\alpha 2M$ snimljeni su na spektrofotometru u opsegu 250–350 nm. U kivetu (optički put 1 cm) je odpipetirano 2 mL 1,5 μM rastvora $\alpha 2M$ u puferu. Klopapin je dodat u (finalnim) koncentracijama 1,5, 3, 7,5 i 15 μM (molarni odnosi $\alpha 2M:CLZ$ od 1:1, 1:2, 1:5 i 1:10), tako da udeo organskog rastvarača ne pređe 1%. Spektri smeša protein-lek korigovani su oduzimanjem spektara klopapina u puferu.

3.3.3. UV analiza fibrinogena

UV spektri fibrinogena snimljeni su u triplikatu na spektrofotometru, u kvarcnoj kiveti optičkog puta 1 cm, u opsegu 260–360 nm. Koncentracija fibrinogena bila je 5 μM a klopapin je dodavan u alikvotima (takođe vodeći računa da udeo organskog rastvarača ne prelazi 1%), tako da su njegove finalne koncentracije bile 10, 25, 50 i 100 μM (molarni odnosi fibrinogen:klopapin od 1:2, 1:5, 1:10 i 1:20). Spektri smeša korigovani su oduzimanjem spektara klopapina bez proteina.

3.4. Cirkularni dihiroizam katalaze i alfa-2-makroglobulina

3.4.1. CD analiza katalaze

CD spektri BLC snimljeni su na CD spektropolarimetru na 37 °C. Far-UV CD spektri snimani su u opsegu 185–260 nm u kiveti optičkog puta 0,5 mm; koncentracija BLC iznosila je 12 μM , a klopapin je dodat u koncentracijama 12 i 120 μM (molarni odnosi BLC:CLZ od 1:1 i 1:10). Near-UV CD spektri snimani su u opsegu 260–320 nm u kiveti optičkog puta 10 mm; koncentracija BLC bila je 8 μM , a klopapina 8, 32 i 80 μM . Svi spektri snimljeni su sa tri akumulacije i korigovani oduzimanjem odgovarajućih blankova, pri brzini snimanja od 50nm/min. Kvantitativna procena udela sekundarnih strukturnih elemenata urađena je CDPro softverom, uz CONTIN program (Sreerama & Woody, 2000).

3.4.2. CD analiza alfa-2-makroglobulina

Far-UV CD spektri $\alpha 2M$ snimani su u opsegu 200–260 nm u kiveti optičkog puta 0,5 mm na 37 °C. Koncentracija $\alpha 2M$ iznosila je 1,1 μM , a klopapin je dodavan do koncentracija od 1,1, 2,2, 5,5 i 11 μM (molarnim odnosi $\alpha 2M:CLZ$ od 1:1, 1:2, 1:5 i 1:10). Spektri protein-ligand smeša su korigovani oduzimanjem odgovarajućih blankova.

3.5. FTIR analiza fibrinogena

FTIR spektroskopija iskorišćena je za ispitivanje promena sekundarne strukture fibrinogena nakon vezivanja klopapina. Analiza promena zasnovana je na amid I regionu ($\sim 1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), koji potiče pretežno od C=O istezanja peptidne veze i osetljiva je promene u sekundarnoj strukturi proteina (Azpiazu & Chapman, 1992).

Uzorci su pripremani tako što je 50 μL rastvora fibrinogena (4 μM), samog ili u prisustvu klopapina (8, 20 i 40 μM), nanošeno na ZnSe prozore dimenzija $32 \times 2\text{ mm}$ i potom je uzorak osušen strujom azota. Spektri su snimljeni u transmisijom modu na FTIR spektrometru, sa 100 skenova po uzorku, rezolucijom od 4 cm^{-1} , u duplikatu. Korekcija bazne linije urađena je u programu Spectragryph, a izravnavanje i dekonvolucija amid I oblasti u programu OriginPro 8.6.

3.6. Ispitivanje termalne stabilnosti proteina

Termalna stabilnost u prisustvu leka je ispitana praćenjem promena unutrašnje fluorescencije proteina pri postepenom povećanju temperature, ali u različitim uslovima za tri odabrana proteina.

3.6.1. Termalna stabilnost katalaze

Termalna stabilnost BLC ispitana je u odsustvu i prisustvu klopapina. Koncentracija katalaze iznosila je 0,2 μM , a klopapin je dodat u koncentraciji 10 μM (50-struki molarni višak). Uzorci su zagrevani od 37 do 81 $^{\circ}\text{C}$, brzinom od 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, uz vreme ekvibracije od 1 minut. Ekscitacija je izvršena na 280 nm, a signal praćen kao odnos F_{330}/F_{350} . Temperatura topljenja T_m definisana je kao tačka infleksije sigmoidalne krive u funkciji temperature (Isca et al., 2025).

3.6.2. Termalna stabilnost alfa-2-makroglobulina

Termalna stabilnost $\alpha_2\text{M}$ praćena je korišćenjem fluorescentne spektroskopije u prisustvu i odsustvu klopapina. Koncentracija $\alpha_2\text{M}$ bila je 50 nM, a klopapina 20 μM (molarni odnos $\alpha_2\text{M}:\text{CLZ}$ od 1:400). Temperatura je povećavana od 35 do 85 $^{\circ}\text{C}$, brzinom od 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, uz vreme ekvibracije od 1 minut. Protein je ekscitovan na 280 nm, a emisija praćena na 334 nm; signal je korigovan za fluorescenciju klopapina u svakoj temperaturnoj tački. T_m je definisana kao prva tačka porasta unutrašnje fluorescencije, određena fitovanjem podataka Gaussovom funkcijom.

3.6.3. Termalna stabilnost fibrinogena

Termalna stabilnost fibrinogena ispitana je u odsustvu i prisustvu klopapina. Koncentracija fibrinogena bila je 40 nM, a klopapina 40 μM (molarni odnos FIB:CLZ od 1:1000). Temperatura je povećavana od 37 do 81 $^{\circ}\text{C}$, brzinom od 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, uz vreme ekvibracije od 1 minuta. Ekscitacija je urađena na 280 nm, a smanjenje unutrašnje fluorescencije proteina praćeno je na 345 nm. T_m je definisana kao tačka preloma dobijene sigmoidalne krive.

3.7. Funkcionalna ispitivanja

3.7.1. Aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze određena je spektrofotometrijski, praćenjem smanjenja apsorpcije vodonik-peroksida na 240 nm i na 37 $^{\circ}\text{C}$, prema metodi Aebija (Aebi, 1984). Merenja su izvedena u 50 mM fosfatnom puferu, pH 7,2. Početna apsorpcija 2 mL rastvora vodonik-peroksida, pre dodatka enzima, podešena je na 0,550. Katalaza, koncentracije 0,1 μM u inkubacionoj smeši, prethodno je inkubirana tokom 5 minuta sa klopapihom u koncentracijama od 1, 5, 10 i 20 μM (molarni odnos BLC:CLZ od 1:10, 1:50, 1:100 i 1:200). Za svaku ispitivanu koncentraciju pripremljen je odgovarajući kontrolni uzorak, u kome je umesto rastvora klopapina dodata ista zapremina smeše (pufer:metanol) korišćene za pripremu odgovarajućeg štoka leka. Reakcija je započeta dodavanjem 40 μL inkubacione smeše katalaze i klopapina (uzorak), odnosno odgovarajućeg kontrolnog uzorka, u pripremljeni rastvor vodonik-peroksida, tako da je ukupna zapremina reakcione smeše bude 2,04 mL. Smanjenje apsorpcije na 240 nm praćeno je kontinuirano tokom 60 s, a brzina razgradnje vodonik-peroksida određena je iz linearnog dela dobijene krive zavisnosti apsorpcije od vremena.

Aktivnost katalaze izračunata je korišćenjem molarnog apsorpcionog koeficijenta vodonik-peroksida od 43,6 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (ϵ) na 240 nm i dužine optičkog puta kivete (d) od 1 cm, prema izrazu:

$$\text{Aktivnost (U mL}^{-1} \text{ BLC)} = \frac{|\Delta A_{240}| / \text{min}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_r}{V_u} \times 10^6 \quad (8)$$

gde je $|\Delta A_{240}| / \text{min}$ apsolutna vrednost promene apsorpcije po minutu, V_r je zapremina reakcione smeše, a V_u zapremina dodatog uzorka. Faktor 10^6 je iskorišćen je za prevođenje količine razgrađenog vodonik-peroksida iz molova u mikromolove. Jedna internacionalna jedinica aktivnosti katalaze definisana je kao količina enzima koja razgradi 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ u minuti pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Aktivnost kontrolnog uzorka, odnosno katalaze inkubirane bez klopapina, uzeta je kao 100%, dok je aktivnost uzoraka inkubiranih sa klopapihom izražena kao procenat aktivnosti u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

Aktivnost katalaze ispitivana je i u uslovima oksidativnog stresa, izazvanog sa AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid]. U ovom eksperimentu uzorci katalaze, sa i bez klopapina, pripremljeni na isti, gore navedeni, su pre određivanja aktivnosti (dodavanja supstrata i merenja

promene A) inkubirani sa 10 mM AAPH tokom 30 min na 37 °C, nakon čega je aktivnost katalaze određena na isti način kao bez dodatka AAPH.

Aktivnost katalaze nakon elektroforetskog razdvajanja ispitana je i primenom PAGE-zimografije u nativnim uslovima (**Pezzoni et al., 2018; Woodbury et al., 1971**). Za analizu je korišćen nativni poliakrilamidni gel koji se sastojao od 10% razdvajajućeg gela i 4% gela za koncentrovanje. Uzorci BLC pripremljeni su u neredukujućem puferu za nanošenje uzoraka, bez SDS-a i bez prethodnog zagrevanja, kako bi se očuvala nativna konformacija proteina i njegova enzimska aktivnost. Po bunaru je nanošeno 500 ng BLC. Nakon završene elektroforeze, gel je tri puta ispiran destilovanom vodom, kako bi se uklonile komponente pufera koje bi mogle da utiču na dalji razvoj zimograma. Zatim je gel inkubiran 30 minuta u puferu sa klozapinom u koncentracijama od 0, 10 ili 20 μ M. Gel inkubiran bez klozapina iskorišćen je kao kontrola za poređenje rezultata. Nakon inkubacije sa lekom, gelovi su tretirani rastvorom H₂O₂ koncentracije 0,04 M, čime je omogućena reakcija katalaze sa supstratom. Posle ovog tretmana, gelovi su kratko isprani destilovanom vodom, a zatim inkubirani u rastvoru 2% FeCl₃ i 2% kalijum-fericijanida. Razvoj boje zasniva se na reakciji preostalog H₂O₂ sa FeCl₃ i kalijum-fericijanidom, pri čemu se formira tamnozeleno pozadina gela. Zone u kojima je katalaza očuvala aktivnost ostaju svetle, jer je enzim prethodno razgradio H₂O₂ u tim delovima gela. Aktivnost katalaze vizuelizovana je kao svetla traka na tamnozelenoj pozadini. Dobijeni gelovi su sačuvani, a intenziteti traka kvantifikovani korišćenjem programa ImageJ. Relativna aktivnost katalaze u prisustvu klozapina izračunata je poređenjem intenziteta traka sa kontrolnim uzorkom bez klozapina, koji je uzet kao referentna vrednost.

3.7.2. Antiproteazna aktivnost alfa-2-makroglobulina

Princip testa antiproteazne aktivnosti α 2M (**Saunders et al., 1971**) zasniva se na karakterističnom mehanizmu delovanja α 2M, koji nakon proteolitičkog napada u „bait“ regionu prolazi kroz izraženu konformacionu promenu i prostorno zarobljava tripsin. Ovako „uhvaćen“ tripsinski molekul ostaje katalitički aktivan prema malim supstratima, kao što je BAPNA, jer oni mogu da difunduju do aktivnog mesta enzima unutar α 2M kompleksa. Nasuprot tome, ukoliko tripsin nije vezan i zarobljen u okviru α 2M, njegova aktivnost se efikasno blokira dodatkom inhibitora tripsina iz soje, pa se hidroliza BAPNA ne detektuje ili je znatno smanjena. Na ovaj način test omogućava procenu sposobnosti α 2M da veže i funkcionalno kontroliše tripsin, kao i utvrđivanje da li prisustvo ispitivanog liganda remeti ovaj proces.

U cilju ispitivanja antiproteazne aktivnosti, α 2M (695 nM) inkubiran je sa klozapinom (10, 20, 30 i 40 μ M) tokom 30 minuta na 37 °C. Potom je u 50 μ L smeše dodat tripsin (3 μ L, 1 mg/mL) i inkubacija nastavljena 10 minuta. Slobodni tripsin je inhibiran sojinim inhibitorom tripsina (6 μ L, 1 mg/mL) tokom 10 min, nakon čega su dodati radni pufer (80 μ L; 0,1 M Tris-HCl sa 10 mM CaCl₂, pH 8,0) i BAPNA supstrat (100 μ L; 3 mM). Reakcija je zaustavljena sirćetnom kiselinom (10 μ L) nakon 30 min inkubacije na 37 °C, a apsorbancija je potom izmerena na 405 nm. Vrednost za α 2M bez klozapina uzeta je kao referentna.

Ispitano je, potom, na isti način, i da li klozapin utiče na aktivnost tripsina (blank vrednost). Pored toga, posebno je ispitan uticaj klozapina na antiproteaznu aktivnost α 2M u oksidativnim uslovima: α 2M (695 nM) inkubiran je sam, ili sa 20 μ M klozapina i 5 mM AAPH tokom 1 sat na 37 °C, nakon čega je antiproteazna aktivnost određena istim (gore opisanim) postupkom.

3.7.3. Formiranje fibrina i poroznost fibrinskog gela

Formiranje fibrina praćeno je na 37 °C merenjem porasta apsorbancije na 405 nm tokom 8 minuta, u četiri ponavljanja. Reakciona smeša sadržala je fibrinogen (0,34 μ M), CaCl₂ (2,2 mM), humani trombin (1 IU/mL) i klozapin (0,34 ili 0,68 μ M) (**Tilley et al., 2011**).

Poroznost fibrinskog gela procenjena je određivanjem Darcy-jeve konstante propustljivosti (Ks), parametra koje je direktno proporcionalan poroznosti gela. Fibrinski gelovi formirani su od 3 μ M fibrinogena u odsustvu ili prisustvu 3 i 6 μ M klozapina, uz CaCl₂ i trombin, i ostavljeni da

polimerizuju preko noći. Protok fosfatnog pufera kroz formirani gel meren je tokom 30 minuta, a Ks je izračunata prema jednačini:

$$K_s = \frac{Q \cdot L \cdot \eta}{t \cdot A \cdot \Delta P} \quad (7)$$

gde su Ks Darcy-jeva konstanta (cm²), Q zapremina protekle tečnosti (mL), L dužina gela (cm), η viskozitet pufera ($P = 1 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$), t vreme proticanja (s), A površina preseka gela (cm²), a ΔP diferencijalni pritisak (dyn cm⁻²) (Mills et al., 2002).

3.8. Ispitivanje oksidativne stabilnosti proteina i klopapina

3.8.1. Oksidativna stabilnost katalaze u prisustvu AAPH

Osetljivost BLC na oksidaciju ispitana je praćenjem smanjenja unutrašnje fluorescencije enzima tokom inkubacije sa 10 mM AAPH pri 37 °C. Koncentracija BLC iznosila je 0,1 μM , a klopapina 1, 5 i 10 μM . Merenja su izvođena tokom 30 minuta, uz ekscitaciju na 280 nm i širinu razreza monohromatora od 5 nm. Emisija je praćena na 340 nm. Zaštitni efekat (ZE) klopapina izražen je preko odnosa površina ispod krivih katalaze i katalaze sa rastućim koncentracijama leka prema jednačini:

$$\text{ZE (\%)} = \frac{(\text{AUC}_{\text{BLC}+\text{CLZ}} - \text{AUC}_{\text{BLC}})}{(\text{AUC}_{\text{BLC}+\text{CLZ}})} \times 100 \quad (8)$$

gde AUC_{BLC+CLZ} predstavlja površinu ispod krive za katalazu u prisustvu klopapina, dok je AUC_{BLC} površina ispod krive same katalaze.

3.8.2. Oksidativna stabilnost alfa-2-makroglobulina u prisustvu AAPH

$\alpha 2\text{M}$ (100 nM) inkubiran je sam ili sa klopapihom (1, 5 ili 10 μM), uz 5 mM AAPH, tokom 30 min na 37 °C. Emisija je praćena na 335 nm (ekscitacija 280 nm, razrez 3 nm). Zaštitni efekat (ZE) klopapina izražen je prema jednačini:

$$\text{ZE (\%)} = \frac{(\text{AUC}_{\alpha 2\text{M}+\text{CLZ}} - \text{AUC}_{\alpha 2\text{M}})}{(\text{AUC}_{\alpha 2\text{M}+\text{CLZ}})} \times 100 \quad (9)$$

gde AUC _{$\alpha 2\text{M}$ +CLZ} predstavlja površinu ispod krive za $\alpha 2\text{M}$ u prisustvu klopapina, dok je AUC _{$\alpha 2\text{M}$} površina ispod krive samog $\alpha 2\text{M}$.

3.8.3. Zaštita klopapina od oksidacije u kompleksu sa alfa-2-makroglobulinom

Pored zaštitnog efekta klopapina na $\alpha 2\text{M}$ u uslovima oksidativnog stresa, ispitano je i da li $\alpha 2\text{M}$ može da zaštititi klopapin od oksidativne transformacije. Ovaj eksperiment je izveden kako bi se procenilo da li interakcije između $\alpha 2\text{M}$ i klopapina imaju uzajamno zaštitni karakter, odnosno, da li vezivanje leka za protein smanjuje dostupnost klopapina oksidacionim agensima. Kao oksidacioni agens korišćen je natrijum-hipohlorit (NaOCl), pošto se klopapin u prisustvu jakih oksidansa prevodi u klopapin-N-oksidi, farmakološki manje aktivan oksidacioni proizvod (Gardner et al., 1998).

Za ovu analizu su pripremljena tri uzorka: klopapin (100 μM); klopapin u prisustvu NaOCl: 100 μM klopapina i 600 μM NaOCl; klopapin u prisustvu NaOCl i $\alpha 2\text{M}$: 100 μM klopapina, 600 μM NaOCl i 1,5 μM $\alpha 2\text{M}$. Svi uzorci su inkubirani 30 min na 37 °C, nakon čega su analizirani masenom spektrometrijom. Uzorak klopapina bez oksidansa korišćen je kao kontrola za signal intaktnog leka, dok je uzorak klopapina sa NaOCl omogućio praćenje nastanka oksidacionog proizvoda. Uzorak koji je, pored klopapina i NaOCl, sadržao i $\alpha 2\text{M}$ iskorišćen je za procenu zaštitnog efekta proteina.

ESI-MS spektri snimljeni su na hibridnom masenom spektrometru visoke rezolucije, metodom direktne injekcije, pri protoku od 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Jonizacija je izvođena u pozitivnom polaritetu, korišćenjem HESI izvora. Parametri izvora: temperatura kapilare 275 °C, napon izvora 4,2 kV, napon kapilare 49 V, napon tube lens 150 V, temperatura vaporizera 60 °C, protok glavnog i promoćnog gasa 12 i 3 A.U, redom. Vreme akvizicije iznosilo je 1 minut po uzorku. Spektri su snimani u opsegu 300–400 m/z, pri rezoluciji 30.000. U dobijenim spektrima praćeni su signali koji odgovaraju intaktnom klopapinu i klopapin-N-oksidi, pošto pojava ovog signala ukazuje na oksidaciju leka.

Poređenjem spektara klopapina tretiranog sa NaOCl u odsustvu i prisustvu α 2M procenjeno je da li prisustvo ovog proteina smanjuje formiranje oksidacionog proizvoda. Smanjenje ili odsustvo signala klopapin-N-oksida u uzorku sa α 2M ukazuje na zaštitni efekat α 2M prema klopapinu pod primenjenim oksidativnim uslovima.

3.8.4. Modifikovani ORAC i HORAC testovi sa fibrinogenom

Antioksidativni efekat klopapina na fibrinogen ispitivan je primenom modifikovanih ORAC i HORAC testova. ORAC je iskorišćen za procenu zaštite fibrinogena od oksidacije izazvane peroksil-radikalima, a HORAC za procenu zaštite fibrinogena od oksidacije hidroksil-radikalima. Za razliku od klasičnih ORAC/HORAC testova, u kojima se najčešće prati promena fluorescencije spoljašnje fluorescentne probe, u ovom radu je kao meta oksidacije iskorišćen sam fibrinogen. Zbog toga je zaštitni efekat klopapina procenjivan praćenjem smanjenja sopstvene fluorescencije fibrinogena, koja potiče prvenstveno od aromatičnih aminokiselinskih ostataka.

U ORAC testu(Cipollone et al., 2024), 100 nM fibrinogena je inkubirano bez ili u prisustvu 3,4 i 6,8 μ M klopapina (molarni odnos FIB:CLZ od 1:34 i 1:68). Oksidacija je započeta dodatkom AAPH do finalne koncentracije od 52,5 mM. Odmah nakon dodatka AAPH, uzorci su izmešani i postavljeni u spektrofлуориметар. Pad unutrašnje fluorescencije fibrinogena praćen je tokom 25 minuta na 37 °C, pri talasnoj dužini ekscitacije od 280 nm i maksimumu emisije od 345 nm, uz širinu proreza monohromatora od 5 nm.

U HORAC testu(Cipollone et al., 2024), 100 nM fibrinogena je inkubirano bez ili u prisustvu 6,8 i 13,6 μ M klopapina (molarni odnos FIB:CLZ od 1:68 i 1:136). Oksidacija je izazvana sistemom za generisanje hidroksil-radikala: 31 mM H₂O₂, 260 μ M CoF₂ × 4H₂O i 460 μ M pikolinska kiselina. Nakon dodatka svih komponenti u reakcionu smešu, uzorci su odmah analizirani pod istim spektrofлуориметриjskim uslovima kao u ORAC testu.

Zaštitni efekat klopapina izračunat je iz razlike površina ispod krivih opadanja fluorescencije:

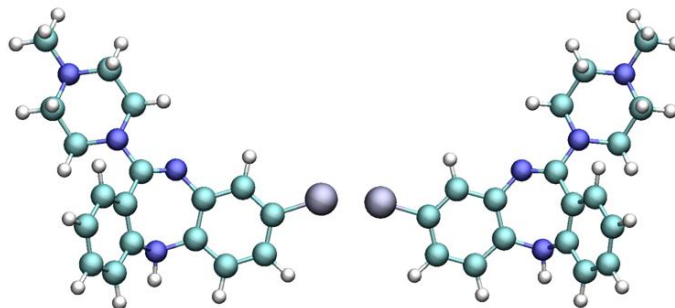
$$ZE (\%) = \frac{(AUC_{FIB+CLZ} - AUC_{FIB})}{(AUC_{FIB+CLZ})} \times 100 \quad (10)$$

gde AUC_{FIB+CLZ} predstavlja površinu ispod krive za fibrinogen u prisustvu klopapina, dok je AUC_{FIB} površina ispod krive samog fibrinogena.

3.9. Molekulski doking i molekulska dinamika

3.9.1. Molekulski doking klopapina sa katalazom

Za doking BLC–CLZ sistema iskorišćena je kristalna struktura BLC (PDB ID: 1TGU, lanac B). Molekuli vode su uklonjeni, a protonaciona stanja titrabilnih ostataka procenjena su H⁺⁺ programom; struktura je zatim optimizovana tokom 3000 koraka u CHARMM. Oba atropoizomera leka (P i M) preuzeta su iz Cambridge Structural Database (kodovi HHHOY01 i DEHBUP) i geometrijski optimizovana (Slika 17). Doking je izveden u AutoDock Vina softveru (Trott & Olson, 2010b) „blind“ pristupom, pomoću rešetke 28 × 28 × 28 Å pomerane po celoj zapremini proteina u koracima od 8 Å. Ukupno je izvedeno 1260 doking proračuna za svaki atropoizomer.



Slika 17. Strukture dva atropizomera molekula klopapina. Levo: P (plus) atropizomer. Desno: M (minus) atropizomer. Ova dva atropizomera istovremeno predstavljaju i enantiomere leka.

3.9.2. Molekulska dinamika BLC–CLZ kompleksa

Stabilnost odabranih protein-lek kompleksa ispitana je 200 ns simulacijama molekulske dinamike u Amber softveru (verzija 24) uz GPU podršku; za protein je korišćeno polje sila ff19SB, a za klopapin polje sila gaff2. Parametri hem-grupe generisani su MCPB.py alatom. Kompleks je solvatisan u oktaedarskoj kutiji sa OPC vodom. Nakon minimizacije (2000 koraka) i zagrevanja (100→298 K, 1 ns), sistem je uravnotežen 6 ns u NPT ansamblu i dodatnih 5 ns bez ograničenja. Produkciona simulacija: 200 ns, vremenski korak 2 fs, Langevinov termostat, Berendsenov barostat, SHAKE algoritam. Analiza trajektorija izvedena je u VMD programu (Humphrey et al., 1996).

3.9.3. Molekulski doking klopapina sa alfa-2-makroglobulinom

Za doking $\alpha 2M$ –CLZ sistema korišćena je kristalna struktura $\alpha 2M$ (PDB ID: 4ACQ). Nestandardna amino-kiselina N5-metilglutamin na položaju 975 zamenjena je glutaminom; nedostajući atomi bočnih lanaca dodati su u CHARMM, a struktura optimizovana 5000 koraka. Doking je izveden na pojedinačnim lancima i na C–D dimeru. Korišćena je rešetka $24 \times 24 \times 24$ Å, pomerana u koracima od 8 Å. Izvedeno je 2156 proračuna za svaki proteinski lanac i 1120 za interfejs region; svaki proračun ponovljen je za P i M atropoizomer.

Za fibrinogen u prisustvu klopapina *in silico* analiza nije rađena u okviru ove disertacije. Zbog toga zaključci o vezivnom mestu klopapina na fibrinogenu ostati zasnovani isključivo na indirektnim eksperimentalnim nalazima.

3.10. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Za poređenje grupa uzoraka iskorišćena je jednofaktorska ANOVA sa Tukey-jevim *post-hoc* testom (nivo značajnosti $p < 0,05$). Za pojedinačna poređenja korišćen je *t*-test. Za $\alpha 2M$ uzorke statistička analiza sprovedena je pomoću *t*-testa, sa graničnom vrednošću $p < 0,05$. Za fibrinogen su fluorescentna i UV merenja izvedena u triplicatu, FTIR analiza u duplikatu, a koagulacioni testovi u tetraplikatu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom poglavlju biće predstavljeni najvažniji rezultati ispitivanja interakcija atipičnog antipsihotika klopapina sa tri odabrana proteina plazme – katalazom, α -2-makroglobulinom i fibrinogenom.

4.1. Interakcije klopapina sa katalazom

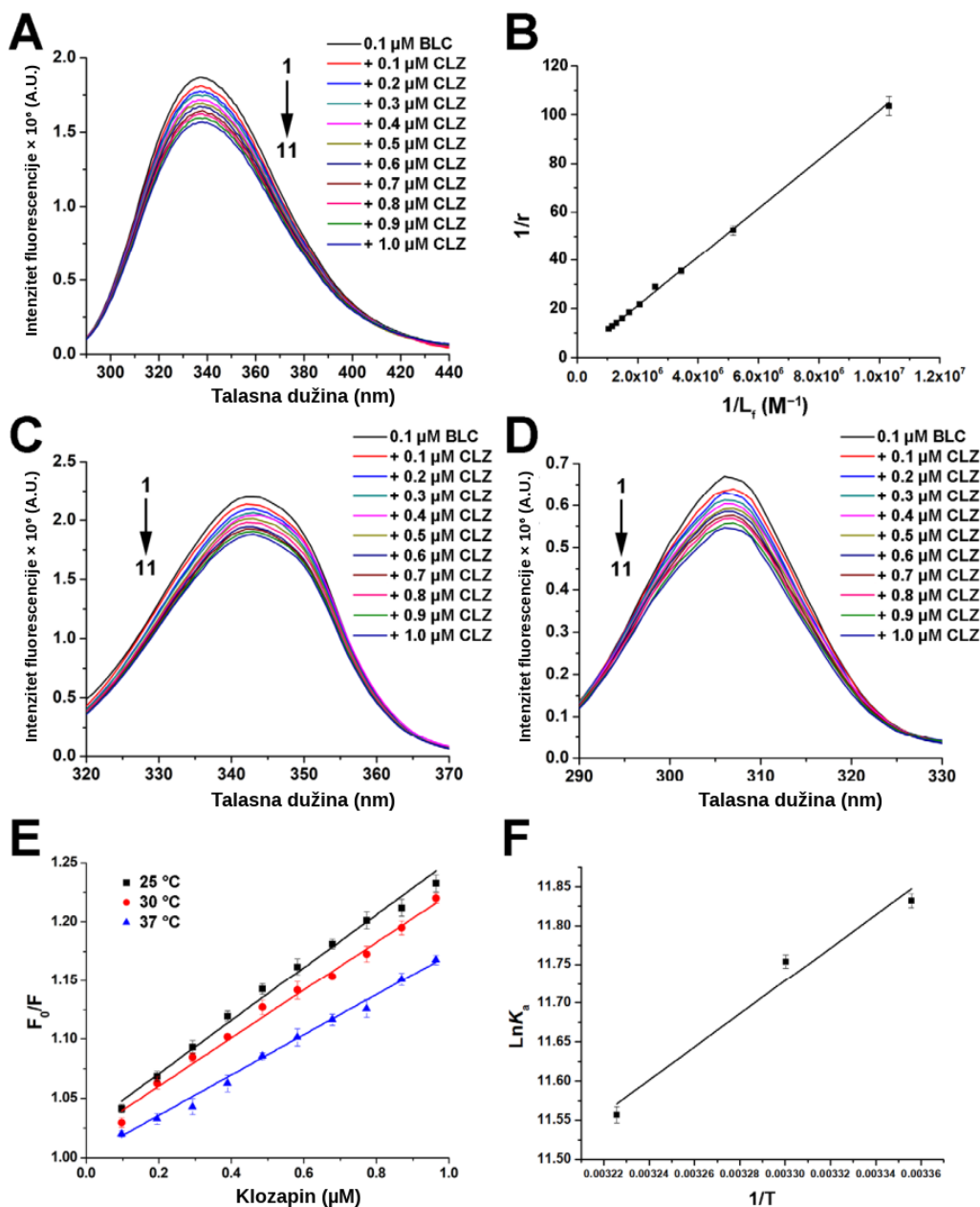
Katalaza je esencijalni antioksidativni enzim koji razlaže toksični vodonik-peroksid na vodu i kiseonik, čime štiti ćelije od oksidativnog oštećenja (poglavlje 2.3.2). Imajući u vidu da oksidativni stres ima ulogu u patofiziologiji shizofrenije, a da je katalaza jedan od primarnih zaštitnih sistema od oksidativnog stresa, ispitivanje njenog vezivanja sa klopapihom – antipsihotikom druge generacije, terapijskog izbora kod pacijenata sa refraktornom shizofrenijom – od posebnog je naučnog i kliničkog značaja. Stoga je, korišćenjem niza komplementarnih *in vitro* spektroskopskih metoda i *in silico* pristupa, sveobuhvatno okarakterisana priroda i funkcionalne posledice vezivanja klopapina za katalazu iz goveđe jetre, kao model sistema za humanu katalazu.

4.1.1. Fluorescentna merenja ukazuju na stabilan enzim–ligand kompleks uz statički tip gašenja fluorescencije

Formiranje kompleksa između BLC i klopapina najpre je ispitano metodom gašenja sopstvene fluorescencije proteina. Ova metoda pogodna je za praćenje interakcija proteina sa malim molekulima, jer vezivanje liganda dovodi do smanjenja fluorescencije aromatičnih amino-kiselinskih ostataka (pre svega Tyr i Trp), usled promena u njihovom neposrednom okruženju, ili usled formiranja protein-ligand kompleksa koji ne fluoreskira. Na **slici 17A** prikazan je emisioni spektar BLC u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (do molarog odnosa protein:lek od 1:10). Sa **slike 18A** se može videti da BLC nakon ekscitacije na 280 nm, kao i drugi proteini, pokazuje jak fluorescentni signal, sa emisionim maksimumom na oko 340 nm. Tokom titracije klopapihom nije uočeno značajno pomeranje ovog emisionog maksimuma proteina. Odsustvo takozvanog crvenog i plavog pomeraja ukazuje da vezivanje leka ne dovodi do izražene promene u polarnosti mikrokruženja aromatičnih amino-kiselina. Ovaj zaključak dodatno potvrđuju sinhroni fluorescentni spektri (**slike 18C i 18D**). Pri $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ (**slika 17C**), koji se koristi za praćenje promena u okruženju triptofana, i pri $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ (**slika 17D**), koji daje informacije o tirozinskim ostacima, uočeno je značajno smanjenje intenziteta fluorescencije, ali bez značajnog pomeranja maksimuma emisije. Ovo ukazuje da gašenje fluorescencije doprinose i Trp i Tyr ostaci, ali da se njihovo mikrokruženje ne menja u značajnoj meri. Katalaza ima 7 triptofana i 11 tirozina po subjedinici, pa identifikacija potencijalnog vezivnog mesta (odnosno njegove blizine određenom regionu enzima) na osnovu fluorescentnih spektara nije moguća.

S obzirom na pravilnost u smanjenju unutrašnje fluorescencije BLC po dodatku rastućih koncentracija leka (**slika 17A**) bilo je moguće izračunati osnovne parametre vezivanja (**odjeljak 3.2.1**). Za ovo su iskorišćeni korigovani intenziteti fluorescencije (F_c , prema jednačini (1)), zbog efekta samo-apsorpcije liganda (tzv. “unutrašnji filter-efekat”). Klotzov dvostruko recipročni prikaz (**slika 17B**) poslužio je za određivanje konstanti vezivanja, koje su određene na tri temperature (**Tabela 2**) i sve su bile reda veličine 10^5 M^{-1} , što ukazuje na umereni afinitet CLZ prema BLC (iz jednačina (3) i (4)). U poređenju sa literaturom, konstanta vezivanja CLZ za BLC je za dva reda veličine manja od vrednosti ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) za antidijabetik pioglitazon (**Yekta et al., 2017**), uporedljiva je sa vrednosti za vezivanje antimikrobnog agensa triklozana ($0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; **Zou et al., 2017**) i flavonola izoramnetina ($\sim 0,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; **Yang & Li, 2016**), a veća je od onih za antituberkolitičar klopazimin ($2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; **Zaman et al., 2017**), salicilnu kiselinu ($4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; **Wu, 2007**) i bifendatne analoge ($0,5\text{--}3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; **Wang et al., 2013**). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da katalaza, iako nije klasičan transportni protein, vezuje različite lekove i male lipofilne ligande umerenim afinitetom. Blago smanjenje konstante vezivanja sa porastom temperature (**tabela 3**) ukazuje da je kompleks CAT-CLZ stabilniji na nižim temperaturama. Ovakvo ponašanje je u skladu sa nekovalentnom prirodom interakcija u BLC-CLZ kompleksu. U cilju određivanja tipa gašenja

fluorescencije, konstruisani su odgovarajući grafici za određivanje Stern-Vormer-ovih konstanti gašenja (**slika 18E**, jednčina (2), a dobijeni podaci prikazani su u **tabeli 2**.



Slika 18. Gašenje fluorescencije katalaze iz goveđe jetre (BLC) klozapinom (CLZ). **A)** Reprezentativni emisijski spektri BLC-a (0,1 μM), snimljeni pri ekscitaciji na 280 nm, u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–1 μM). **B)** Klotz-ov dvostruko recipročni prikaz korišćen za izračunavanje konstante vezivanja, odnosno afiniteta vezivanja. Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri BLC (0,1 μM) snimljeni pri **C)** $\Delta\lambda = 60$ nm, za ostatke triptofana, i **D)** $\Delta\lambda = 15$ nm, za ostatke tirozina, u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–1 μM). **E)** Stern–Volmerov (SV) prikaz na tri temperature, 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ i 37 $^{\circ}\text{C}$, korišćen za izračunavanje Stern–Volmerovih konstanti gašenja fluorescencije (K_{SV}). **F)** Van't Hoffov dijagram korišćen za izračunavanje termodinamičkih parametara formiranja enzim-lek kompleksa. Greške prikazane na panelima **B**, **E** i **F** predstavljaju standardnu devijaciju ($n = 3$).

Na osnovu SV grafika može se videti njegova linearnost, što ukazuje na jedan dominantan tip gašenja. Opadajući trend K_{SV} sa porastom temperature odgovara statičkom tipu gašenja fluorescencije. U prilog tome idu i dobijene vrednosti za biomolekularne konstante vezivanja, koje su u opsegu $3,46\text{--}4,46 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, što je za tri reda veličine veće od brzine difuzije molekula u vodenom rastvoru (**Minić et al., 2015**). Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da do smanjenja fluorescencije proteina dolazi usled formiranja stabilnog kompleksa između BLC-CLZ, a ne usled posledice slučajnih sudara njihovih molekula u rastvoru.

Tabela 2. Parametri vezivanja za BLC-CLZ kompleks na 25 °C, 30 °C i 37 °C u 50 mM fosfatnom puferu, pH 7,2. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija (S.D.) iz dva nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu. K_a – konstanta vezivanja (asocijacije); K_{sv} – Stern–Volmerova konstanta gašenja fluorescencije; k_q – konstanta brzine gašenja fluorescencije.

T (°K)	$K_a \times 10^5$ (M ⁻¹)	S.D.	$K_{sv} \times 10^5$ (M ⁻¹)	S.D.	$k_q \times 10^{13}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
298	1,45	0,04	2,18	0,07	4,36	–29,45
303	1,37	0,01	2,04	0,07	4,08	–29,76
310	1,23	0,03	1,73	0,03	3,46	–30,21

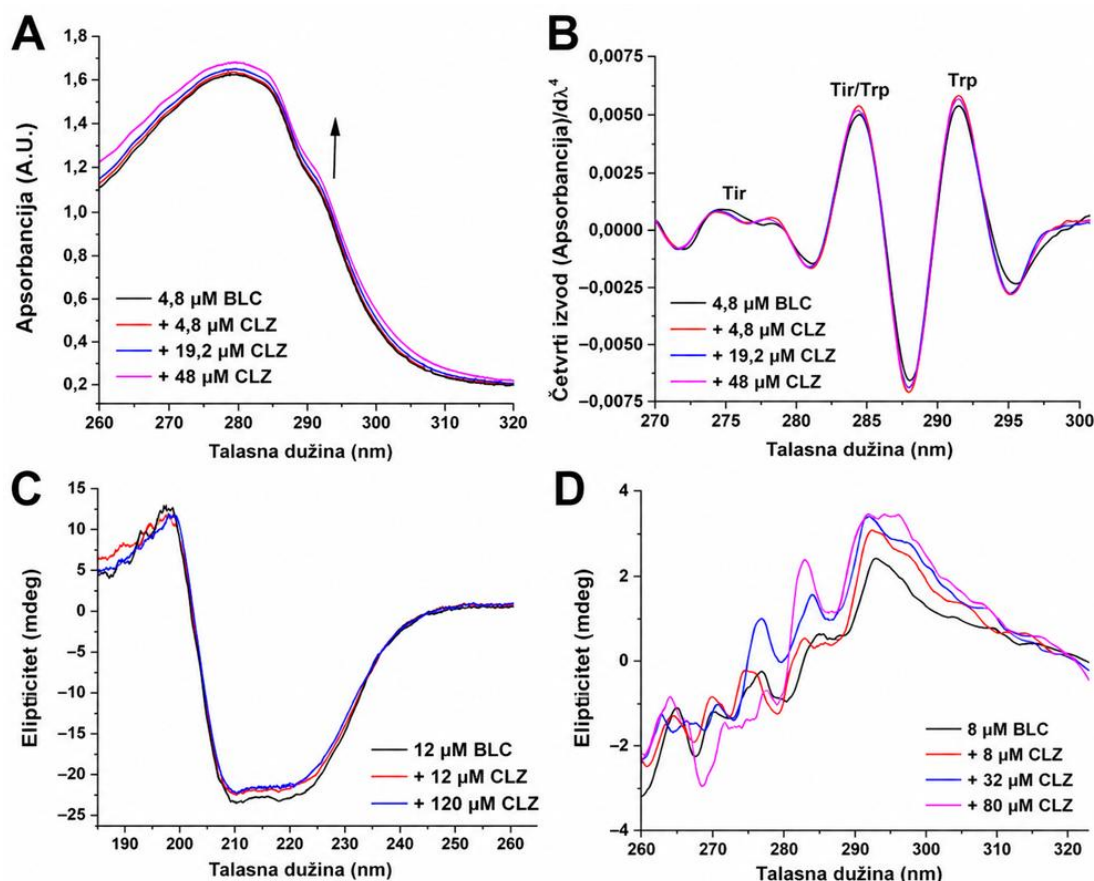
Termodinamički parametri interakcija (**tabela 3**) određeni su iz van't Hoff-ovog grafika (jednačine (5) i (6)), prikazanog na **slici 18F**, koji predstavlja zavisnost K_a od temperature. Negativne vrednosti promene Gibsove slobodne energije ukazuju da se vezivanje odvija spontano pri svim ispitivanim temperaturama ($\Delta G = -29,31$ do $-29,79$ kJ mol⁻¹). Negativna vrednost entalpije ($\Delta H = -17,8$ kJ mol⁻¹) ukazuje na egzotermnu prirodu interakcije i doprinos nekovalentnih sila – vodoničnih veza i Van der Waalsovih interakcija – stabilizaciji ovog kompleksa. Pozitivna vrednost entropije ($\Delta S = 38,8$ J mol⁻¹K⁻¹) ukazuje da je vezivanje entropijski vođen proces, što se pripisuje hidrofobnom efektu – oslobađanjem molekula vode iz hidrofobnih regiona pri formiranju kompleksa. Sveukupno, termodinamički profil BLC–CLZ kompleksa odgovara interakcijama umerenog afiniteta u kojima hidrofobni efekat ima dominantnu ulogu, pri čemu entalpija pruža dodatni doprinos u njegovoj stabilizaciji. Ovakav termodinamički obrazac prethodno je uočen i kod vezivanja triklozana, izoramnetina i pioglitazona za BLC (Yang & Li, 2016; Yekta et al., 2017; Zou et al., 2017).

4.1.2. Uticaj vezivanja klopapina na sekundarnu i tercijarnu strukturu katalaze

Radi sagledavanja strukturnih posledica formiranja BLC-CLZ kompleksa, primenjena je UV apsorpciona spektroskopija četvrtog izvoda, kao i cirkularni dihiroizam u dalekoj i bliskoj UV oblasti. UV apsorpcioni spektri katalaze u prisustvu do desetostrukog molarnog viška leka (**slike 19A i 19B**) nisu pokazali promene u položaju niti intenzitetu apsorpcionih pikova koji odgovaraju Tyr (276 nm), Tyr/Trp (284 nm) i Trp (292 nm) ostacima, niti promene u Soretovoj traci hema na 405 nm (**prilog 4**). Ovaj rezultat potvrđuje da mikrookolina aromatičnih amino-kiselinskih ostataka i integritet hem grupe (ključne za katalitičku aktivnost enzima) nisu narušeni vezivanjem klopapina, što je u skladu sa rezultatima fluorescentnih merenja.

Nasuprot tome, CD spektroskopija u dalekom UV opsegu ukazala je na suptilne, ali reproduktivne promene u sadržaju sekundarnih strukturnih elemenata BLC (**tabela 3**). U odsustvu liganda, katalaza je pokazala karakteristični spektar globularnog proteina, sa negativnim trakama na 209 i 220 nm, i sa procenjenim sadržajem od ~23,7% α -heliksa, ~17,5% β -pločica, ~25,5% β -zavijutaka i ~33,3% neuređenih struktura. Uvođenjem klopapina u molarnom odnosu BLC:CLZ od 1:1, uočen je blagi pad sadržaja α -heliksa (22,9%) uz istovremeni porast β -pločica (20,4%), a isti trend se nastavio i pri molarnom odnosu 1:10 (α -heliks: 21,7%; β -pločica: 21,2%). Iako su ove promene kvantitativno male, statistički su konzistentne i ukazuju mehanizam indukovano konformacionog prilagođavanja (engl. induced fit), u kome lokalna konformaciona preuređenja optimizuju protein–ligand kontakte, povećavajući afinitet i specifičnost vezivanja (Zsila, 2013). Sličan efekat – smanjenje α -heliksa i porast β -pločica – uočen je i pri vezivanju triklosana za BLC, dok vezivanje pioglitazona ima suprotan efekat (stabilizacija α -heliksa), što naglašava ligand-specifičan karakter promena u strukturi katalaze (Yekta et al., 2017).

CD spektroskopija u bliskom UV opsegu (260–320 nm), osetljiva na tercijarnu strukturu proteina i asimetričnost okoline aromatičnih ostataka, pokazala je povećanje elipticiteta u regionu koji odgovara Trp ostacima pri višim koncentracijama klopapina, dok su regioni koji odgovaraju Phe i Tyr ostacima ostali gotovo nepromenjeni (**slika 19D**). Ovo povećanje CD signala u oblasti ostataka Trp ukazuje da se strukturna rigidnost asimetričnih regiona enzima oko njih povećava nakon vezivanja CLZ. Prema tome, vezivanje klopapina dovelo je do suptilnih promena u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi katalaze, bez remećenja integriteta aktivnog mesta ili denaturacije enzima.



Slika 19. Uticaj vezivanja klopazina (CLZ) na strukturu katalaze iz goveđe jetre (BLC). UV-spektri BLC (4,8 μM) u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–48 μM) (A). Četvrti izvod UV apsorpcionih spektara BLC (4,8 μM) u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–48 μM) (B). Reprezentativni CD spektri BLC u dalekoj UV oblasti (12 μM) u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–120 μM) (C). Reprezentativni CD spektri BLC u bliskoj UV oblasti (8 μM) u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0–80 μM) (D).

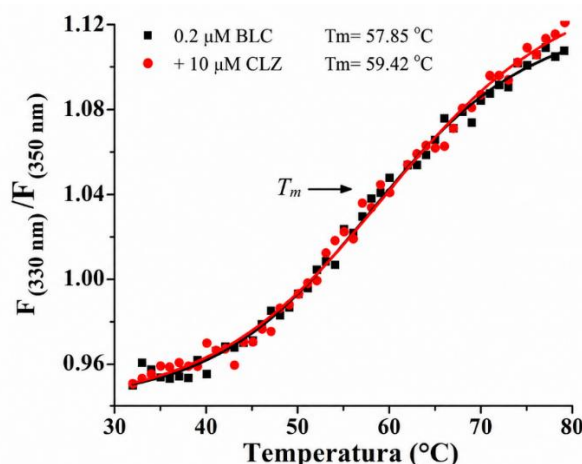
Tabela 3. Sadržaj sekundarnih strukturnih elemenata BLC u odsustvu i prisustvu klopazina.

BLC : CLZ (mol:mol)	α -heliks (%)	β -pločice (%)	β -zavijutak (%)	Neuređene strukture (%)
1:0	23,7	17,5	25,5	33,3
1:1	22,9	20,4	24,9	31,8
1:10	21,7	21,2	24,7	32,4

4.1.3. Klopapin povećava temperaturnu stabilnost katalaze

Termalna stabilnost enzima, izražena kroz temperaturu topljenja (T_m), pri kojoj je 50% enzima u denaturisanom i/ili inaktiviranom obliku, jedan je od parametara kojima se procenjuje efekat vezivanja liganda na proteinsku strukturu. Praćenjem smanjenja unutrašnje fluorescencije katalaze sa porastom temperature (od 37 do 81°C) u odsustvu i prisustvu klopazina (50-struki molarni višak), ustanovljeno je da klopapin povećava T_m katalaze sa 57,8°C (vrednost u saglasnosti sa literaturnim podacima) na 59,4°C, što predstavlja povećanje od 1,6°C (**slika 20**).

Ovo povećanje T_m BLC u prisustvu klopazina može se razumeti u svetlu prethodno opisanih strukturnih promena: stabilizujuće dejstvo, povećanje sadržaja β -pločica (termički stabilnija konformacija u odnosu na α -heliks) i povećana rigidnost tercijarne strukture (zabeležena u bliskim UV-CD spektrima) mogu doprineti otpornosti proteina prema termalnoj denaturaciji. Vezivanje liganda za nativnu konformaciju enzima smanjuje njenu slobodnu energiju, čime se ravnoteža između prirodnog i razvijenog oblika pomera u korist nativnog stanja, što eksperimentalno uočavamo kao povećanje termalne stabilnosti (Cimpmperman et al., 2008).

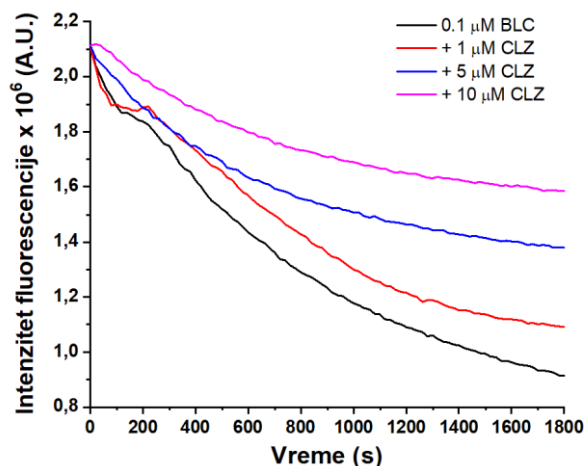


Slika 20. Uticaj formiranja BLC-CLZ kompleksa na termalnu stabilnost BLC.

4.1.4. Klozapin dozno-zavisno štiti BLC od AAPH-indukovane oksidacije

Konformacione promene i strukturni integritet katalaze u uslovima oksidativnog stresa praćeni su na osnovu promena unutrašnje fluorescencije enzima, koja dominantno odražava mikrokruženje triptofanskih ostataka. Izlaganje katalaze delovanju AAPH, generatora radikalskih vrsta, dovelo je do izraženog i vremenski zavisnog pada intenziteta fluorescencije (**slika 21**). Ovakav profil ukazuje na oksidativne promene u okolini aromatičnih amino-kiselinskih ostataka, naročito Trp, koji su izrazito osetljivi na radikalski napad. Smanjenje fluorescencije može se povezati sa hemijskom modifikacijom ovih ostataka, povećanom izloženošću polarnom rastvaraču i delimičnim narušavanjem nativne terciarne strukture enzima.

Dodatak klozapina u reakcionu smešu modifikovao je ovaj proces na dozno-zavisan način. Pri svim ispitivanim koncentracijama, klozapin je usporio pad fluorescencije BLC, pri čemu je zaštitni efekat, procenjen na osnovu AUC analize, iznosio približno 8,6%, 18,2% i 26,3%, pri koncentracijama od 1, 5 i 10 μM CLZ, redom. Povećanje zaštitnog efekta sa porastom koncentracije leka ukazuje da klozapin ublažava AAPH-indukovane promene strukture (unutrašnje fluorescencije) BLC i doprinosi očuvanju mikrokruženja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka i proteina u celini od oksidativnih oštećenja. Ovaj zaštitni efekat može se objasniti kombinacijom direktnog antioksidativnog kapaciteta leka (**Brinholi et al., 2016**), odnosno sposobnosti CLZ da reaguje sa radikalskim vrstama i/ili njegovog vezivanja za katalazu, koje može doprineti stabilizaciji kompaktne konformacije enzima. Na taj način, vezivanje klozapina smanjuje dostupnost osetljivih amino-kiselinskih ostataka oksidativnom napadu i doprinosi očuvanju terciarne strukture BLC u uslovima radikalski-indukovanog stresa.



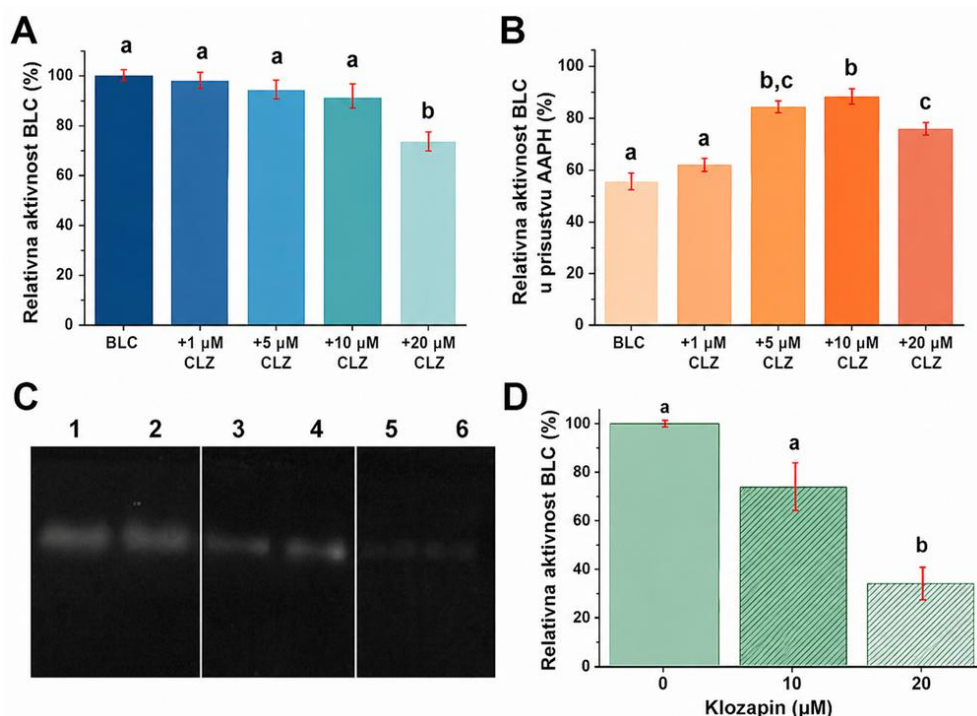
Slika 21. Uticaj AAPH-indukovane (10 mM) oksidacije na BLC (0,1 μM), sa bez dodatka klozapina (0, 1, 5 i 10 μM).

4.1.5. Klozapin dozno-zavisno menja aktivnost BLC

Funkcionalne posledice formiranja kompleksa između klozapina i katalaze ispitane su u dva eksperimentalna konteksta: (1) u uslovima bez oksidativnog stresa i (2) u prisustvu AAPH-indukovane oksidacije, kao modela oksidativnog oštećenja makromolekula.

U prvom eksperimentu, inkubacija katalaze (0,1 μM) sa rastućim koncentracijama leka (1–20 μM CLZ) praćena je spektrofotometrijski, merenjem aktivnosti enzima na osnovu razgradnje H_2O_2 (praćenje pada apsorbancije na 240 nm, koja potiče od H_2O_2). Na **slici 22A** može se videti da aktivnost katalaze ostaje statistički nepromenjena u odnosu na kontrolu pri koncentracijama klozapina od 1,5 i 10 μM , dok je pri 20 μM zabeleženo statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima ($p < 0,05$). Zimografskom analizom na poliakrilamidnom gelu potvrđen je ovaj trend: enzimaska aktivnost iznosila je 100% u kontroli, 74% pri 10 μM i 35,9% pri 20 μM klozapina, potvrđujući dozno-zavisnu inhibiciju BLC visokim koncentracijama leka (**slike 22C i 22D**).

U drugom eksperimentu, inkubacija katalaze sa AAPH (10 mM, 30 minuta) dovela je do značajnog pada enzimске aktivnosti, što odražava osetljivost katalaze na oštećenja izazvana slobodnim radikalima. Međutim, prisustvo klozapina u koncentracijama od 5 i 10 μM gotovo je potpuno sprečilo pad aktivnosti enzima, čuvajući oko 90% (početne) enzimске aktivnosti u poređenju sa kontrolom bez AAPH-a (**slika 22B**). Ovaj zaštitni efekat pripisuje se poznatim *in vitro* antioksidativnim svojstvima klozapina (Brinholi et al., 2016) – sposobnosti direktnog neutralisanja slobodnih radikala – koja su uočeni i u daljim rezultatima interakcija CLZ sa fibrinogenom i $\alpha 2$ -makroglobulinom (videti dalje). Pri koncentraciji od 20 μM , zaštitni antioksidativni efekat leka i dalje je prisutan, ali ga prati istovremena inhibicija aktivnosti enzima, dajući aktivnost enzima sličnoj kontrolnoj vrednosti bez dodatka AAPH.



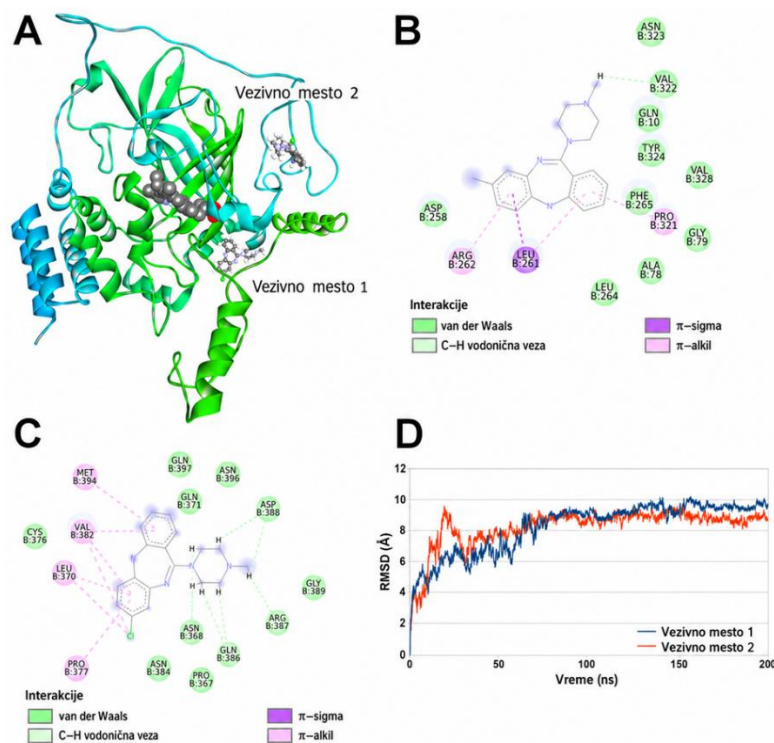
Slika 22. Efekti vezivanja klozapina (CLZ) na aktivnost katalaze iz goveđe jetre (BLC). Uticaj različitih koncentracija CLZ (0–20 μM) na aktivnost BLC (0,1 μM) u 50 mM fosfatnom puferu, pH 7,2, na 37 $^{\circ}\text{C}$ (A). Uticaj oksidacije indukovane slobodnim radikalima, izazvane 10 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrokloridom (AAPH), na aktivnost enzima (0,1 μM) u prisustvu rastućih koncentracija leka (0–10 μM) (B). Reprezentativni zimogram BLC (500 ng): BLC bez dodatka klozapina – trake 1 i 2; BLC u prisustvu 10 μM CLZ – trake 3 i 4; BLC u prisustvu 20 μM CLZ – trake 5 i 6 (C). Denzitometrijska kvantifikacija BLC traka prikazanih u panelu C (D). Prikazane su i standardne devijacije; $n = 3$ za panele A i B, odnosno $n = 2$ za panel D. Različita slova iznad stubaca označavaju statistički značajne razlike između uzoraka ($p < 0,05$).

Ovaj dozno-zavistan dualni efekat CLZ na aktivnost BLC – zaštitni pri fiziološki relevantnim, a inhibitorni pri toksičnim koncentracijama – odražava složenu farmakologiju ovog leka. Terapijska koncentracija klopazina u plazmi kod pacijenata tipično iznosi 350–600 ng/mL (oko 1,1–1,9 μM), dok nivoi iznad 1000 ng/mL ($\approx 3,1 \mu\text{M}$) nose rizik od toksičnosti (Haack et al., 2003). U svetlu ovih podataka, koncentracije leka korišćene u ovim eksperimentima (1 i 5 μM) odgovaraju klinički relevantnom opsegu i ukazuju da pri terapijskim dozama, klopazin ne narušava, već potencijalno štiti, antioksidativnu funkciju enzima. Suprotno, visoke, subtoksične koncentracije (20 μM) mogu doprineti neželjenim efektima poremećajem redoks homeostaze.

4.1.5. Predviđanje vezivnih mesta i energija interakcije pomoću molekulskog dokinga potvrđuje formiranje kompleksa

Da bi se identifikovala mesta vezivanja klopazina na katalazi i dodatno razjasnile molekularne osnove uočenih funkcionalnih efekata, urađene su simulacije molekulskog dokinga i molekularne dinamike. Klopazin postoji u obliku dva atropisomera (P i M), koji nastaju zbog ograničene rotacije oko hiralnog centra diazepinskog prstena; obe forme leka su ispitane u doking studiji (**slika 23**).

„Slepim“ doking pristupom na monomeru BLC (lanac B, PDB ID: 1TGU) identifikovana su dva specifična mesta vezivanja leka, zajednička za oba atropisomera (**slika 23A**). Prvo je smešteno pored β -bureta, između helikoidnog domena i tzv. "threading" kraka monomera enzima, i ono ne obuhvata amino-kiselinske ostatke koji direktno učestvuju u katalizi, niti je u neposrednoj blizini čvrsto vezanog NADPH (**slika 23A**). Ipak, blizina aktivnog mesta ukazuje da zasićenje ovog mesta vezivanja pri višim koncentracijama klopazina (procenjeno na više od 50% pri 20 μM , na osnovu izmerene konstante afiniteta) može alosternim mehanizmom uticati na katalitičku efikasnost enzima, u skladu sa eksperimentalno uočenom inhibicijom aktivnosti BLC. Interakcionu mapu u prvom mogućem mestu vezivanja čine Van der Waalsove sile, ugljovodnično-vodonične (CH/H) veze i π -interakcije sa ostacima Leu261, Arg262, Pro321, Val322 i Tyr324 (**slika 23B**). Energija vezivanja klopazina P atropisomera u ovom mestu je $-7,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, a M atropisomera $-7,7 \text{ kcal mol}^{-1}$.



Slika 23. Rezultati molekulskog modelovanja kompleksa katalaze iz goveđe jetre i klopazina (BLC–CLZ). (A) Vezivna mesta P i M atropizomera CLZ za BLC sa hemom, dobijena na osnovu simulacija molekulskog dokinga; (B, C) 2D prikazi interakcija P atropizomera klopazina sa BLC na vezivnim mestima 1 i 2 dobijeni molekulskim dokingom, redom; (D) Grafik srednje kvadratne devijacije (RMSD) simulacija molekulske dinamike na vezivnom mestu 1 (plavo) i vezivnom mestu 2 (crveno).

Drugo mesto vezivanja smešteno je centralno unutar jedine β -nabrane pločice katalaze, u regionu koji prethodno identifikovan kao mesto vezivanja polifenolnih jedinjenja (kvercetin, elaginska kiselina). Amino-kiselinski ostaci koji interaguju u ovom mestu su ostaci Asn368, Leu370, Pro377, Val382, Arg387, Asp388 i Met394 (**slika 23C**). Energija vezivanja u ovom mestu iznosi -7,8 i -7,5 kcal mol⁻¹ za P i M atropisomere, redom. Blizina vezanih ostataka „obmotavajućeg“ domena (engl. wrapping domain) enzima ukazuje da vezivanje leka na ovom mestu može uticati na konformacionu dinamiku susedne β -nabrane pločice, u saglasnosti sa povećanom termalnom stabilnošću katalaze, uočenom eksperimentalno.

Energije vezivanja izračunate ovim pristupom odgovaraju termodinamičkim parametrima vezivanja leka (**odeljak 4.1.1.**). Naime, energije vezivanja su u opsegu od -7,5 do -7,8 kcal mol⁻¹, preračunato, 31,38 do 32,64 kJ mol⁻¹, a dobijene vrednosti za energije vezivanja korišćenjem fluorescentne spektroskopije su u opsegu $\Delta G = -29,31$ do $-29,79$ kJ mol⁻¹ (**tabela 2**).

Simulacije molekularne dinamike (200 ns, NPT ansambl, ff19SB/gaff2 forcfield, OPC model vode) potvrdile su stabilnost oba predviđena kompleksa: vrednosti RMSD okosnice oba molekula leka stabilizovale su se nakon inicijalnog perioda ekvibracije i ostale relativno konstantne tokom ostatka simulacije (**slika 23D**). Ovi rezultati pružaju direktni dokaz o specifičnom, stabilnom vezivanju klopapina za katalazu i pružaju molekulsku osnovu za razumevanje eksperimentalno uočenih efekata vezivanja CLZ na strukturu i aktivnost enzima.

4.2. Interakcije klopapina sa alfa-2-makroglobulinom

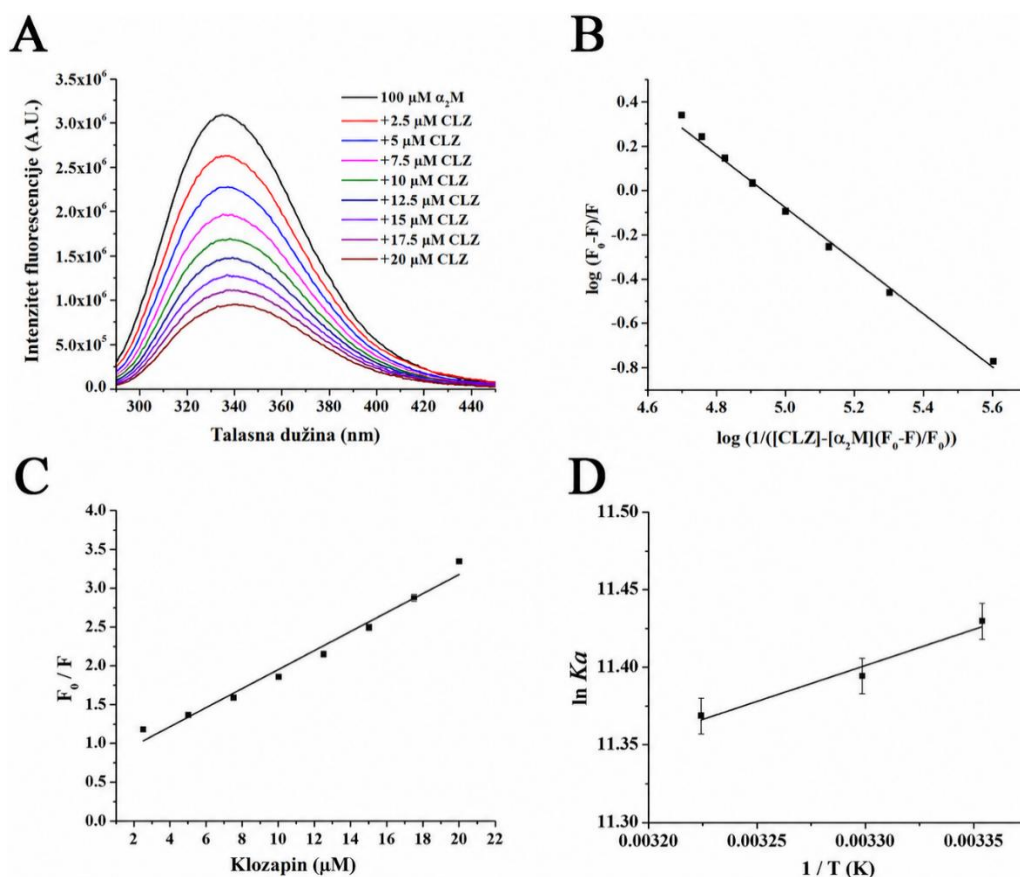
Alfa-2-makroglobulin je homotetramerni glikoprotein (720 kDa), visoko zastupljen u plazmi (2–4 g/l, tj. 2,7–5,5 μ M), koji funkcioniše kao univerzalni inhibitor proteaza i važan regulator proteostaze. Pored ove svoje uloge, α 2M vezuje brojne male molekule, citokine i hormone, a ponaša se kao i molekularni pratilac pogrešno uvijenih proteina (**Crookston et al., 1994; Rehman et al., 2013**). Imajući u vidu visoku zastupljenost α 2M u cirkulaciji i njegovu ulogu u zaštiti nervnog tkiva od poremećene proteostaze i oksidativnog stresa, ispitivanje interakcije CLZ sa ovim proteinom pružilo je nove uvide u mehanizme plejotropnih efekata ovog leka.

4.2.1. Fluorescentna spektroskopija ukazuje na umereni afinitet i očuvano mikrookruženje aromatičnih amino-kiselinskih ostataka proteina

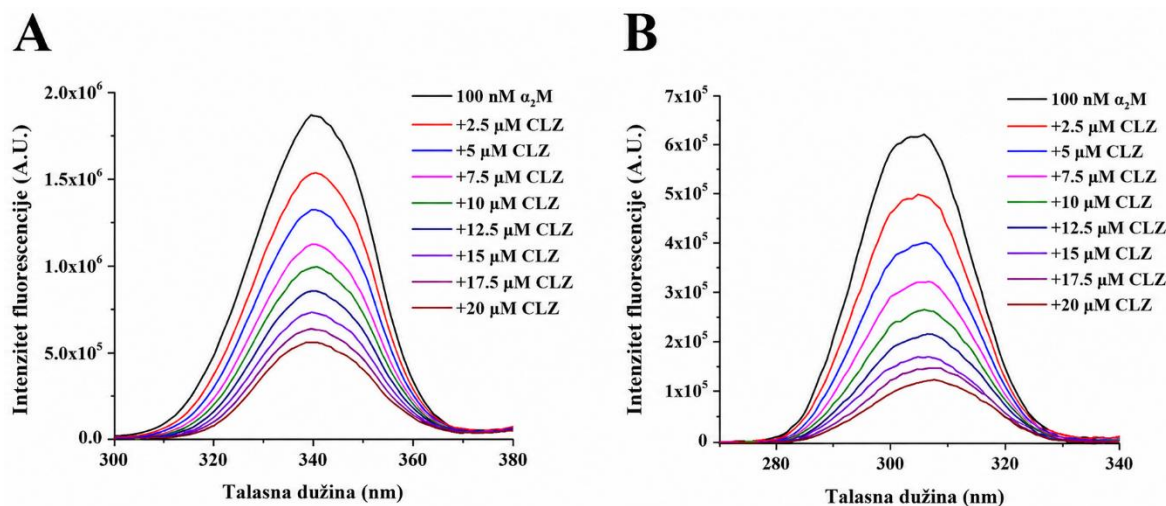
Gašenje sopstvene fluorescencije α 2M, rastućim koncentracijama klopapina (2,5–20 μ M), potvrđuje formiranje nekovalentnog kompleksa između ova dva molekula. Emisioni maksimum α 2M ostao je nepromenjen (334 nm) tokom titracije klopapinom, bez hipsohromnog ili batohromnog pomeranja, što ukazuje na odsustvo značajnih promena u polarnosti okoline Trp i Tyr ostataka nakon vezivanja leka (**slika 24A**). Sinhronom fluorimetrijskom spektroskopijom ($\Delta\lambda = 60$ nm za Trp; $\Delta\lambda = 15$ nm za Tyr) potvrđen je isti zaključak: oba tipa aromatičnih ostataka doprinose gašenju fluorescencije, bez pomeranja emisionih pikova (**slika 25A i 25B**).

Konstanta afiniteta vezivanja ($K_a = 0,9 \pm 0,02 \times 10^5$ M⁻¹ na 37°C) ukazuje na umereni afinitet vezivanja leka. Stern-Volmerova konstanta gašenja ($K_{SV} = 1,2 \times 10^5$ M⁻¹) i biomolekularna konstanta brzine ($k_q = 1,2 \times 10^{13}$ M⁻¹s⁻¹), tri reda veličine veća od difuziono-kontrolisane granice (10^{10} M⁻¹s⁻¹), potvrđuju dominantan statički mehanizam gašenja, u skladu sa formiranjem stabilnog kompleksa u osnovnom stanju.

Analiza termodinamičkih parametara vezivanja (van't Hoff-ov dijagram; **slika 25D**) pokazala je da je vezivanje leka egzotermno ($\Delta H = -3,77$ kJ mol⁻¹) i entropijski vođeno ($\Delta S = 82,3$ J mol⁻¹K⁻¹), sa negativnom slobodnom energijom ($\Delta G = -29,3$ kJ mol⁻¹). Ovakav termodinamički profil, gde pozitivna entropija dominira nad malim egzotermnim doprinosom entalpije, karakteriše interakcije vođene hidrofobnim efektom uz doprinos vodoničnih veza, u saglasnosti sa rezultatima molekulskog dokinga. Vrednosti K_a za α 2M/klopapin kompleks su u sličnom opsegu kao i za prethodno opisan kompleks CLZ sa humanim serum-albuminom ($K_a \sim 10^4$ M⁻¹) (**Uzelac et al., 2019**).



Slika 24. Reprezentativni emisijski spektri alfa-2-makroglobulina (α_2M) u odsustvu i u prisustvu rastućih koncentracija klopazina (CLZ) (A). Određivanje konstante afiniteta kompleksa α_2M/CLZ (B). Stern–Volmerov dijagram: određivanje konstante gašenja fluorescencije (C). Van't Hoffov dijagram: određivanje termodinamičkih parametara vezivanja (D). Napomena: vrednosti SD bile su manje od prečnika tačaka na graficima B i C.

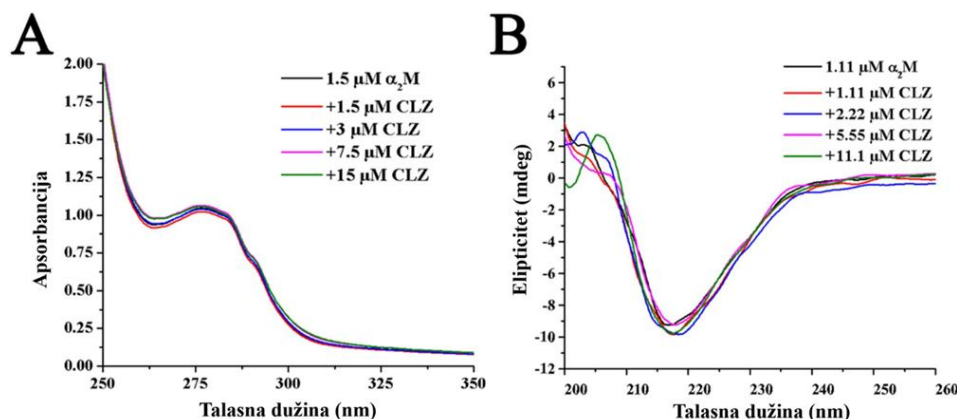


Slika 25. Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri alfa-2-makroglobulina (α_2M), snimljeni pri $\Delta\lambda = 60$ nm za Trp ostatke (A) i pri $\Delta\lambda = 15$ nm za Tyr ostatke (B), u prisustvu rastućih koncentracija klopazina (CLZ).

4.2.2. Sekundarna i tercijarna struktura α_2M ostaju stabilne nakon vezivanja klopazina

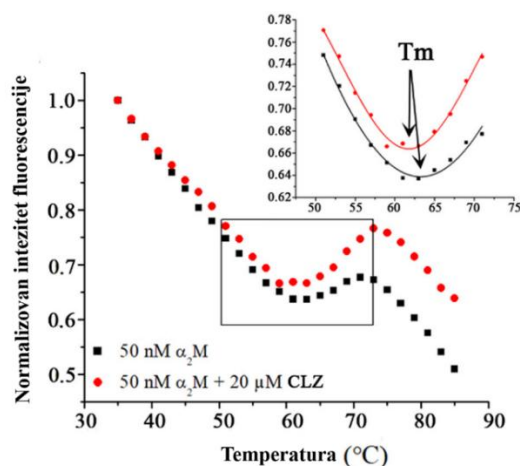
UV apsorpciona spektroskopija proteina u prisustvu leka (molarni odnosi $\alpha_2M:CLZ$ od 1:1 do 1:10) nije pokazala promene u apsorpcionim maksimumima koji odgovaraju aromatičnim amino-kiselinama, što potvrđuje da se njihova mikro-okolina nije izmenila pri vezivanju liganda (**slika 26A**). CD spektroskopija u dalekom UV opsegu (200–260 nm) potvrdila je da sekundarna struktura α_2M

ostaje praktično neizmenjena i pri molarnom višku klopapina (**slika 26B**). Ovaj nalaz je u skladu sa strukturom mesta vezivanja klopapina na osnovu doking simulacijr (videti dalje): džep koji odgovara klopapinskom mestu vezivanja čine neuređenih petlji (engl. loops) bez strukturiranih sekundarnih elemenata, tako da vezivanje liganda ne indukuje preraspodelu sekundarnih strukturnih elemenata.



Slika 26. Reprezentativni UV apsorpcioni spektri (A) i CD spektri u dalekoj UV oblasti (B) alfa-2-makroglobulina ($\alpha_2\text{M}$) samog i u prisustvu rastućih koncentracija klopapina (CLZ).

Termalna denaturacija $\alpha_2\text{M}$ praćena je promenom fluorescencije u funkciji temperature (**slika 27**). Utvrđeno je da CLZ blago smanjuje T_m proteina: sa 63,1 $^{\circ}\text{C}$ (čisti $\alpha_2\text{M}$) na 61,9 $^{\circ}\text{C}$ (u prisustvu 20 μM klopapina). Ovo blago smanjenje (1,2 $^{\circ}\text{C}$) ukazuje na određeni stepen destabilizacije proteina, za razliku od termalne stabilizacije uočene kod BLC–CLZ kompleksa. Međutim, $\alpha_2\text{M}$ pokazuje netipičnu dvofaznu krivu denaturacije (prvo smanjenje, zatim porast, pa ponovni pad fluorescencije sa temperaturom), što komplikuje direktno poređenje T_m vrednosti. Smanjenje T_m može se pripisati vezivanju leka unutar fleksibilnog džepa sačinjenog od petlji, čije konformacione slobode mogu biti narušene prisustvom liganda, potencijalno destabilizujući kvaternarnu strukturu proteina bez remećenja sekundarne organizacije.



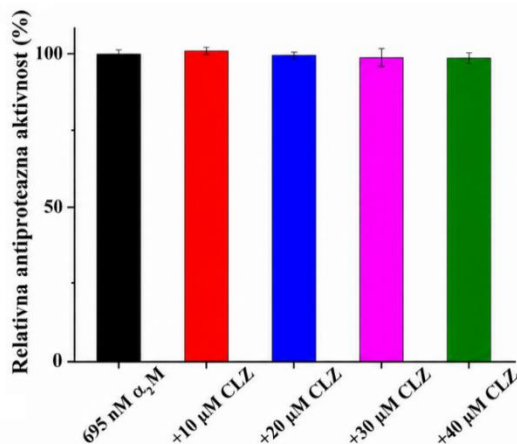
Slika 27. Krive termalne denaturacije $\alpha_2\text{M}$ samog i u prisustvu klopapina, sa označenim temperaturama topljenja (T_m) na uvećanim segmentima krivih (podaci u oblasti oko T_m vrednosti fitovani su Gaussovom funkcijom).

4.2.3. Klopapin ne utiče značajno na inhibitornu aktivnost $\alpha_2\text{M}$ prema tripsinu

Antiproteazna aktivnost $\alpha_2\text{M}$ ispitana je spektrofotometrijskim praćenjem rezidualne aktivnosti tripsina prema hromogenom supstratu BAPNA (N α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilid), u prisustvu inhibitora tripsina iz soje.

Antiproteazna aktivnost $\alpha_2\text{M}$ (695 nM) određena je u prisustvu klopapina u opsegu koncentracija od 10 do 40 μM . Dobijeni rezultati pokazali su da klopapin, u ispitivanim koncentracijama (**slika 28**), nije izazvao statistički značajnu promenu rezidualne tripsinske aktivnosti.

Ovo ukazuje da interakcija klopapina sa α_2M ne narušava sposobnost proteina da zarobi tripsin i ograniči njenu dostupnost velikim proteinskim supstratima i inhibitorima. Drugim rečima, iako se CLZ vezuje za α_2M , formiranje kompleksa, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, ne dovodi do funkcionalno merljivog poremećaja osnovne antiproteazne uloge ovog proteina plazme.



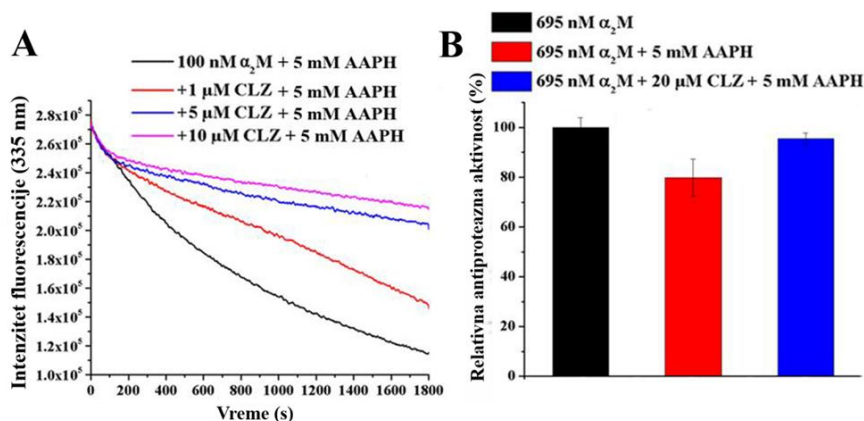
Slika 28. Uticaj klopapina na antiproteaznu aktivnost α_2M , prikazan kao apsolutna aktivnost α_2M -vezanog tripsina.

Dobijeni rezultat je značajan, pošto je α_2M jedan od najvažnijih nespecifičnih regulatora proteolitičke aktivnosti u cirkulaciji. Očuvanje njegove funkcije u prisustvu klopapina ukazuje da formiranje kompleksa α_2M –CLZ, ukoliko se javlja u plazmi, ne mora nužno imati negativan efekat na zaštitnu ulogu α_2M u kontroli aktivnosti proteaza.

Rezultati ovog funkcionalnog testa u skladu su sa predviđanjima molekulskog dokinga, koja su detaljnije prikazana u poglavlju 4.2.5.

2.4. Prisustvo klopapina smanjuje osetljivost α_2M na oksidativna oštećenja

Oksidativna oštećenja α_2M ispitana su praćenjem promene intenziteta unutrašnje fluorescencije proteina u prisustvu AAPH (5 mM), generatora slobodnih radikala, pre svega peroksilradikala. Kao što je prikazano na **slici 29A**, inkubacija α_2M sa AAPH-om dovela je do izraženog pada intenziteta fluorescencije proteina tokom vremena, ukazujući na oksidativne promene u okruženju aromatičnih amino-kiselinskih ostataka (triptofana i tirozina). Prisustvo CLZ ublažilo je ovaj pad fluorescencije na dozno-zavisani način. Zaštitni efekat klopapina pri koncentracijama od 1, 5 i 10 μM iznosio je 15,4%, 24,5% i 27,1%, redom. Budući da se navedene koncentracije CLZ delimično preklapaju sa opsegom u cirkulaciji tokom terapijske primene, ovaj rezultat može biti značajan za razumevanje ponašanja kompleksa α_2M –klopapin u uslovima oksidativnog stresa.

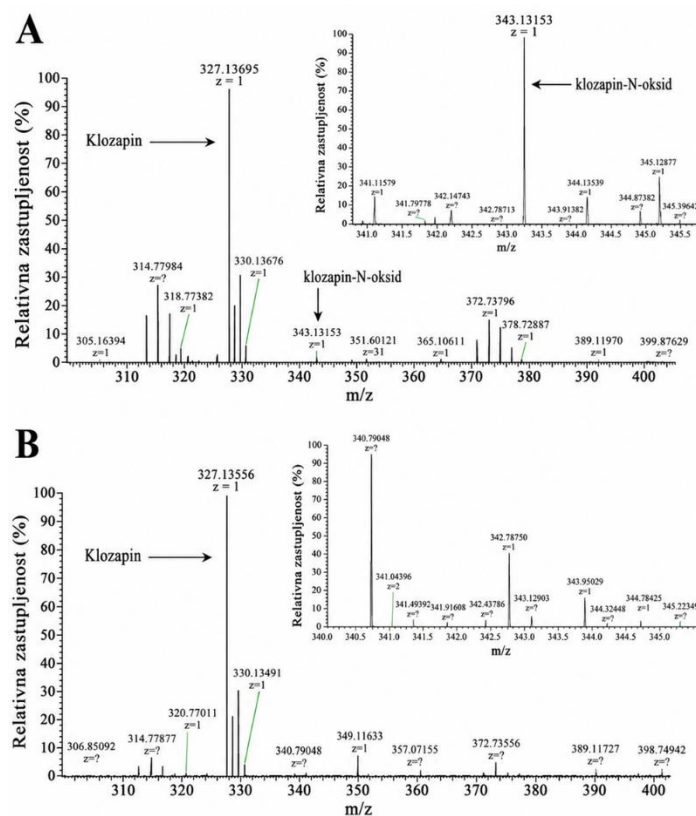


Slika 29. Promene intenziteta emisije fluorescencije alfa-2-makroglobulina (α_2M), izazvane 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohloridom (AAPH), u odsustvu i u prisustvu rastućih koncentracija klopapina (CLZ) (A). Relativni zaštitni efekat klopapina na antiproteaznu aktivnost α_2M u prisustvu AAPH (B).

Zaštitni efekat CLZ može se povezati sa njegovim antioksidativnim svojstvima i sposobnošću da učestvuje u neutralizaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta: ovaj lek može smanjiti oksidativne modifikacije amino-kiselinskih ostataka $\alpha 2M$ važne za stabilnost i aktivnost proteina. Klozapin je hlorisani dibenzodiazepinski derivat sa piperazinskim prstenom, što doprinosi njegovoj reaktivnosti prema pojedinim oksidativnim vrstama (Geib et al., 2020). Pored toga, $\alpha 2M$ i sam poseduje unutrašnji zaštitni kapacitet: metioninski ostaci deluju kao lokalni „čistači“ reaktivnih kiseoničnih vrsta, pri čemu se oni oksiduju do sulfoksida i time štite funkcionalno važnije delove proteina (Luo & Levine, 2009; Rehman et al., 2013). Zbog toga možemo pretpostaviti da u kompleksu $\alpha 2M$ –CLZ postoji komplementaran zaštitni efekat: $\alpha 2M$ delimično amortizuje oksidativni napad preko sopstvenih osetljivih amino-kiselinskih ostataka, dok lek dodatno doprinosi smanjenju oksidativnog oštećenja proteina.

Funkcionalni značaj ove zaštite potvrđen je ispitivanjem antiproteinazne aktivnosti $\alpha 2M$ u oksidativnim uslovima. Prethodna inkubacija $\alpha 2M$ sa AAPH značajno je smanjila antiproteinaznu aktivnosti u odnosu na nativni protein (slici 29B). Međutim, u prisustvu CLZ, štetan efekat AAPH bio je znatno ublažen, a antiproteinazna aktivnost $\alpha 2M$ ostala je skoro očuvana. Ovo pokazuje da zaštitni efekat leka nije ograničen samo na očuvanje i zaštitu $\alpha 2M$ od oksidacije, već i doprinosi očuvanju sposobnosti $\alpha 2M$ da kontroliše aktivnost proteaza u oksidativnom okruženju.

Dodatno, rezultati prikazani na slici 30 ukazuju da zaštitni odnos između $\alpha 2M$ i leka može biti uzajaman. Analiza masenom spektrometrijom pokazala je da oksidacija klozapina natrijum-hipohloritom dovodi do pojave signala koji odgovara N-oksidu klozapina (slika 30A), dok je u prisustvu $\alpha 2M$ ovaj signal bio znatno smanjen ili odsutan (slika 30B). Ovaj rezultat ukazuje da $\alpha 2M$ može delimično zaštititi CLZ od oksidativne transformacije. Ovakav rezultat je naročito važan imajući u vidu da oksidacija može smanjiti količinu intaktnog leka i potencijalno uticati na njegovu farmakološku aktivnost. Stoga se interakcija $\alpha 2M$ i klozapina može posmatrati ne samo kao vezivanje leka za protein plazme, već i kao zaštitni odnos u kome oba partnera delimično smanjuju međusobnu izloženost oksidativnim oštećenjima.



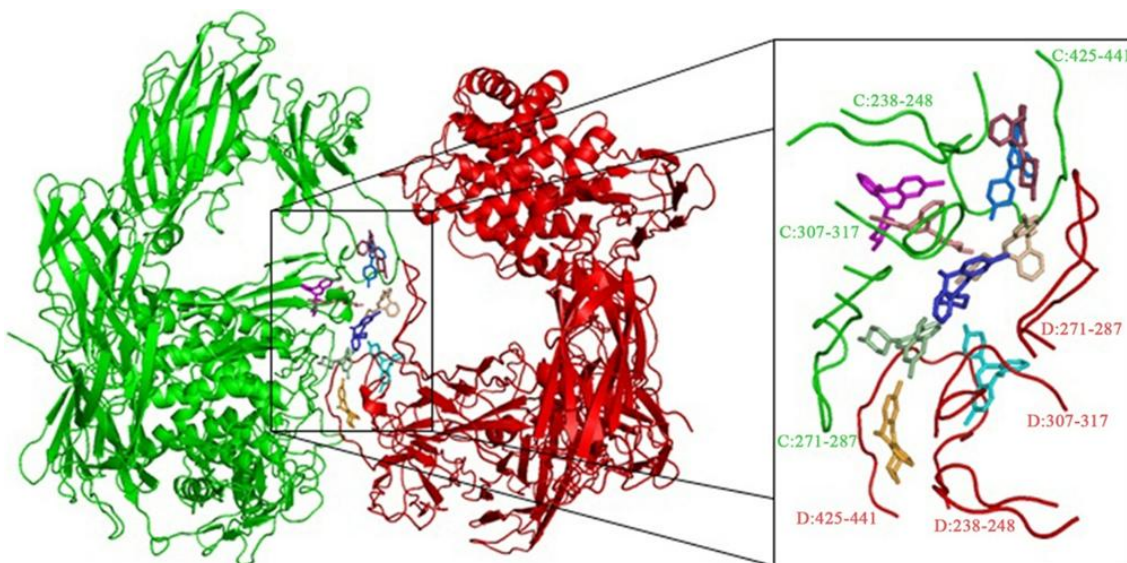
Slika 30. Maseni spektri klozapina (A) i leka u prisustvu alfa-2-makroglobulina (B) nakon oksidacije sa NaOCl. Strelice označavaju signale koji potiču od intaktnog klozapina i jona

klozapin-N-oksida, zajedno sa njihovim molekulskim masama i naelektrisanjima. Uvećani prikazi spektara u oblasti molekulske mase klozapin-N-oksida prikazani su zasebno.

U fiziološkom i patofiziološkom kontekstu, ovi nalazi mogu imati značaj u stanjima praćenim pojačanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta, uključujući inflamatorne procese. U takvim uslovima, očuvanje antiproteazne aktivnosti $\alpha 2M$ može biti važno za održavanje proteazno-antiproteazne ravnoteže i zaštitu tkiva od prekomerne proteolitičke aktivnosti.

4.2.5. Doking simulacije ukazuju na periferno vezivanje izvan funkcionalnih domena $\alpha 2M$

Molekulski doking na dve strukture, pojedinim lancima (C, D, A) i C–D kovalentnom dimeru $\alpha 2M$ (PDB ID: 4ACQ), identifikovao je jedno dominantno vezno mesto za oba atropisomera CLZ. Na interfejsu C–D dimera otkrivena je prostrana unutrašnja šupljina (džep) veličine oko $5000 \text{ \AA}^3$, omeđena sa osam fleksibilnih petlji (četiri iz lanca C, četiri iz lanca D). S obzirom da zapremina molekula klozapina iznosi oko $700 \text{ \AA}^3$, procenjeno je da se ovaj džep može simultano smestiti najmanje tri molekula liganda, što mu daje kapacitet za višestruko vezivanje leka (**slika 31**).

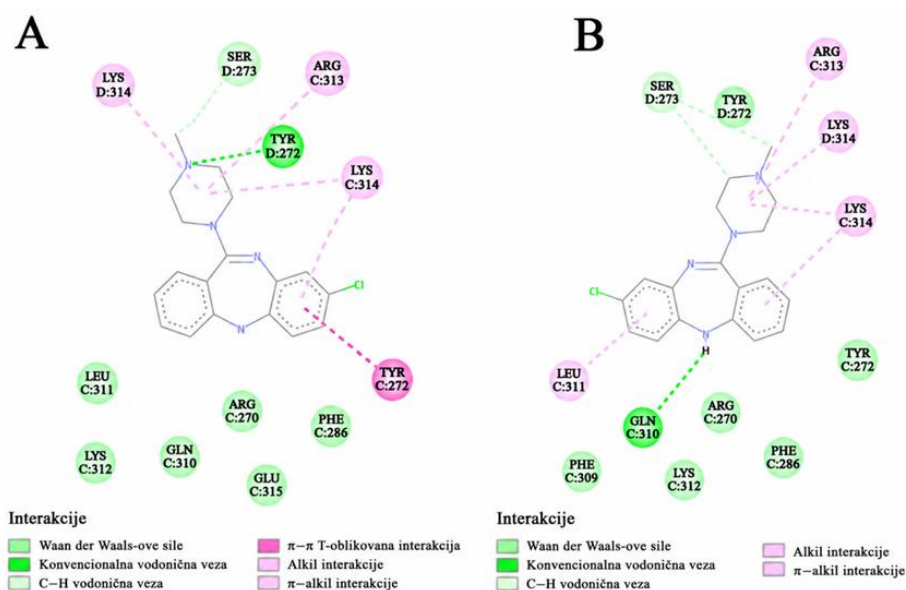


Slika 31. Vezivni džep klozapina sa devet različitih vezivnih mesta na interfejsu između lanaca C i D alfa-2-makroglobulina (brojevi amino-kiselinskih ostataka odgovaraju numeraciji u PDB strukturi 4ACQ).

Unutar ovog džepa identifikovano je devet delimično preklapajućih vezivnih pozicija sa predviđenim energijama vezivanja CLZ od $-7,7$ do $-8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ za P atropisomer i $-7,7$ do $-8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ za M atropisomer. Najpreferentnije vezivno mesto za oba atropisomera (**slika 32**), smešteno je u centru džepa (energija vezivanja $-8,7$ i $-8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, redom).

U P atropisomeru, vodonična veza se formira između azota piperazinskog prstena i hidroksilne grupe Tyr272 iz lanca D, dok Tyr272 iz lanca C ostvaruje $\pi-\pi^*$ interakciju sa hlorobenzenskim prstenom klozapina. Arg313, Lys314 i Lys314 iz odgovarajućih lanaca ostvaruju alkil–alkil i π -alkil interakcije sa piperazinskim i hlorobenzenskim prstenom leka. Analiza svih identifikovanih vezivnih pozicija u džepu pokazala je da su najzastupljenije interakcije hidrofobnog karaktera (π -alkil i alkil-alkil), što je u skladu sa termodinamičkim podacima dobijenom fluorescentnom spektroskopijom, koji ukazuju na hidrofobni efekat kao dominantnu pokretačku silu ovog vezivanja. Prema doking analizi, energetski najpovoljnija mesta vezivanja CLZ nalaze se u prostranom i fleksibilnom džepu na interfejsu C–D lanaca $\alpha 2M$, formiranom od više petlji. Ovaj region je prostorno udaljen od „bait“ regiona, ključnog za početnu interakciju sa proteazama, kao i od reaktivnog tioesterskog centra, koji stabilizuje konformaciono promenjeni oblika $\alpha 2M$. Zbog takvog položaja vezivnog mesta, lek verovatno direktno ne ometa proteolitički napad tripsina na „bait“ region, niti sprečava konformacione promene koje omogućavaju zarobljavanje proteaze. Prostorna udaljenost svih identifikovanih vezivnih mesta od „bait“ regiona (regiona za „mamljenje“

proteaza) i od katalitičkog Cys972, koji učestvuje u kovalentnom vezivanju proteaza, objašnjava eksperimentalno uočeno odsustvo efekta klopazina na anti-proteaznu aktivnost $\alpha 2M$.



Slika 32. 2D dijagram interakcija protein–ligand za najpovoljnije vezivno mesto P atropoizomera (A) i M atropoizomera (B). Napomena: brojevi amino-kiselinskih ostataka odgovaraju numeraciji u PDB strukturi 4ACQ.

Kao i u slučaju BLC, energije vezivanja dobijene *in silico* metodama od $-7,7$ do $-8,5$ kcal mol⁻¹, preračunato, od 32,2 do 35,6 kJ mol⁻¹, što je u skladu sa energijama vezivanja izračunatih korišćenjem fluorescentne spektroskopije ($\Delta G = -29,3$ kJ mol⁻¹).

4.3. Interakcije klopazina sa fibrinogenom

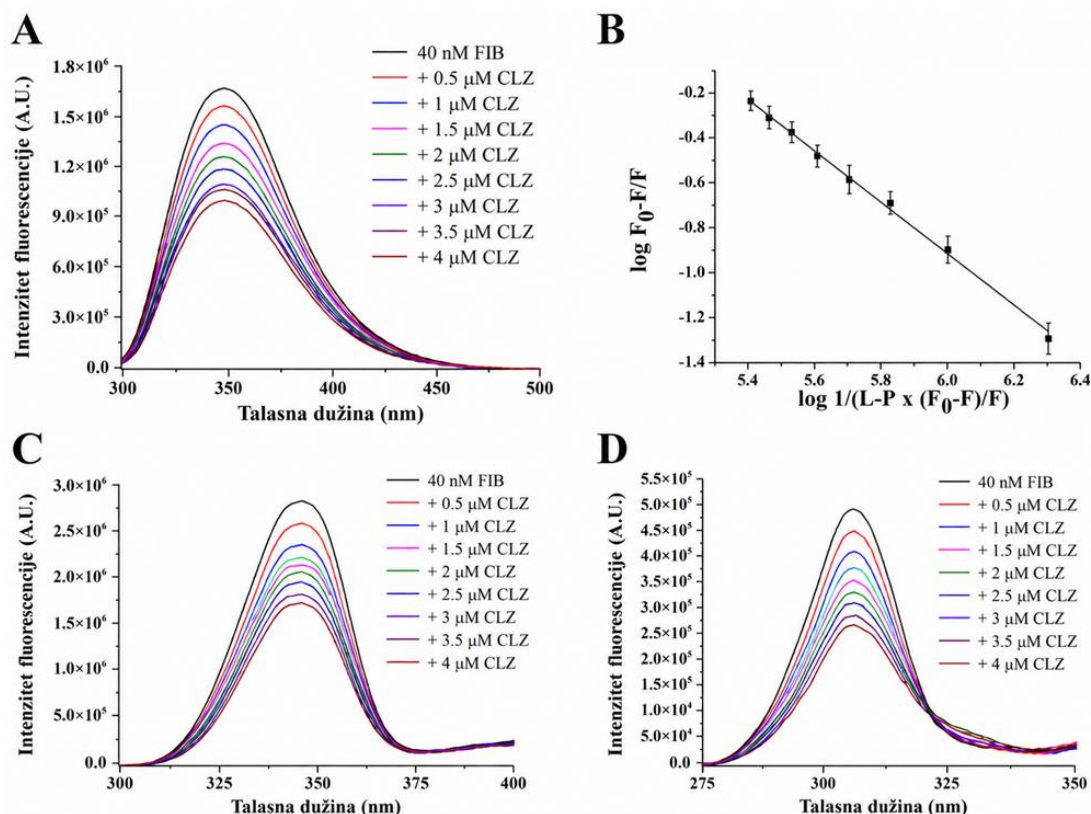
Fibrinogen je jedan od najzastupljenijih proteina plazme (2–4 g/L, tj. 5,9–11 μ M), ključan za primarnu hemostazu (interakcijom sa trombocitima) i sekundarnu hemostazu (formiranjem fibrinskog ugruška) (Mosesson, 2005; Weisel & Litvinov, 2017). Klinički je dobro dokumentovano povećanje rizika od venskog tromboembolizma kod pacijenata na hroničnoj terapiji CLZ, međutim, molekulske osnove ove veze ostaju nerazjašnjene. Ispitivanjem direktnih interakcija klopazina sa fibrinogenom i njihovih funkcionalnih posledica, ova studija pruža prvi molekularni uvid u mogući doprinos lek–fibrinogen interakcija trombogenoju predispoziciji pacijenata na hroničnoj klopazinskoj terapiji.

4.3.1. Fibrinogen vezuje klopazine srednje visokim afinitetom, bez značajnih promena mikrokruženja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka

Metodom gašenja unutrašnje fluorescencije proteina utvrđeno je da klopazin efikasno smanjuje fluorescenciju fibrinogena pri ekscitaciji na 280 nm, u dozno-zavisnom maniru (slika 33A). Emisioni maksimum fibrinogena (345 nm) ostao je nepromenjen u prisustvu leka u celom ispitivanom opsegu koncentracija (0,5–4 μ M), bez pomeranja emisionog maksimuma ka nižim ili višim talasnim dužinama, ukazujući da polarnost mikrokoline Trp i Tyr ostataka nije izmenjena vezivanjem leka. Iz dvostrukog logaritamskog dijagrama (slika 33B), izračunata je konstanta afiniteta od $K_a = 1,7 \pm 0,38 \times 10^5$ M⁻¹, sa brojem vezivnih mesta $n = 1,2 \pm 0,08$.

Dobijen afinitet je za red veličine viši od afiniteta klopazina za albumin iz humanog seruma ($K_a \sim 10^4$ M⁻¹), koji je primarni transportni protein klopazina u krvi (oko 95% leka je vezano za albumin). Ovo je naizgled iznenađujući nalaz, ali treba imati u vidu da je koncentracija fibrinogena u plazmi (5,9–11 μ M) znatno niža od koncentracije albumina (530–750 μ M), tako da fibrinogen značajno ne kompetira sa albuminom za vezivanje CLZ pri normalnim fiziološkim uslovima. Ipak, u patološkim stanjima kao što su hronična inflamacija (praćena povećanim sadržajem fibrinogena),

hipoalbuminemija (npr. pri oštećenoj funkciji bubrega), ili glikovanje albumina (*Dijabetes mellitus*), ravnoteža između ova dva proteina u vezivanju klopazina može biti pomešana, povećavajući frakciju leka vezanu za fibrinogen, i tako pojačavajući funkcionalne posledice ove interakcije, posebno od značaja za pacijente sa shizofrenijom koji imaju i metabolički sindrom ili dijabetes.



Slika 33. Gašenje fluorescencije humanog fibrinogena (FIB) klopazinom (CLZ). **A)** Reprezentativni emisijski spektri FIB (40 nM), snimljeni pri ekscitaciji na 280 nm, u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0,5–4 μM). **B)** Dvostruki logaritamski prikaz korišćen za izračunavanje konstante, odnosno afiniteta vezivanja CLZ za FIB. Reprezentativni sinhroni fluorescentni spektri FIB (40 nM) snimljeni pri **C)** $\Delta\lambda = 60$ nm, za ostatke triptofana, i **D)** $\Delta\lambda = 15$ nm, za ostatke tirozina, u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0,5–4 μM).

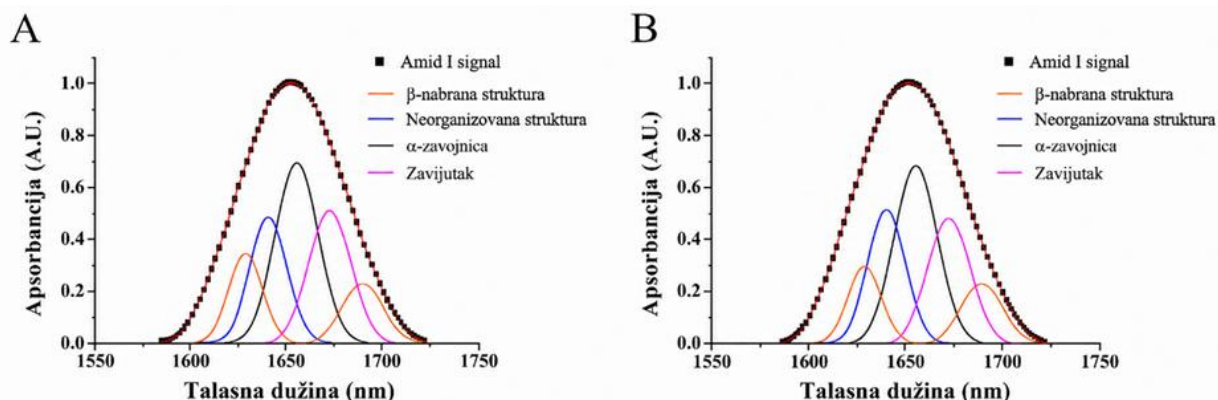
Linearnost Stern-Volmerovog (**slika 33B**) ukazuje na jedan dominantan tip gašenja unutrašnje fluorescencije fibrinogena. Biomolekularna konstanta brzine gašenja ($k_q = 1,52 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) znatno premašuje difuziono-kontrolisanu granicu ($10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), potvrđujući statički mehanizam gašenja – formiranje stabilnog nekovalentnog kompleksa u osnovnom stanju. Sinhronom fluorimetrijskom spektroskopijom ($\Delta\lambda = 15$ nm za Tyr; $\Delta\lambda = 60$ nm za Trp) pokazano je da oba tipa aromatičnih ostataka doprinose gašenju fluorescencije (**slike 33C i 33D**). Budući da humani fibrinogen sadrži 41 Trp i 67 Tyr ostataka, rezultati sinhronne fluorimetrije ne daju pouzdanu informaciju o vezivnom mestu za lekove na ovom proteinu.

4.3.2. Sekundarna struktura fibrinogena ostaje očuvana nakon vezivanja klopazina

Za razliku od katalaze, fibrinogen je krupan fibrilarni glikoprotein (340 kDa, struktura $(\text{A}\alpha\text{B}\beta\gamma)_2$), zbog čega njegova struktura nije podložna konformacionim promenama indukovanim malim ligandima (**Medved et al., 2001; Mosesson, 2005**).

FTIR spektroskopija, primenjena na uzorke fibrinogena (4 μM) u prisustvu do 40 μM leka, nije pokazala značajne razlike u zastupljenosti sekundarnih strukturnih elemenata (**slika 32**). Dekonvolucijom amidne I trake ($1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$) utvrđen je sastav sekundarnih struktura fibrinogena: oko 33% α -heliksa, 21% β -nabranih pločica, 24% zavijenih struktura (engl. coil) i 22% nasumičnih konformacija, u saglasnosti sa literaturnim FTIR podacima za fibrinogen (**Azpiazu &**

Chapman, 1992). Ovaj sastav uređenih struktura ostao je praktično nepromenjen i pri desetostrukom molarnom višku klopapina u odnosu na protein.

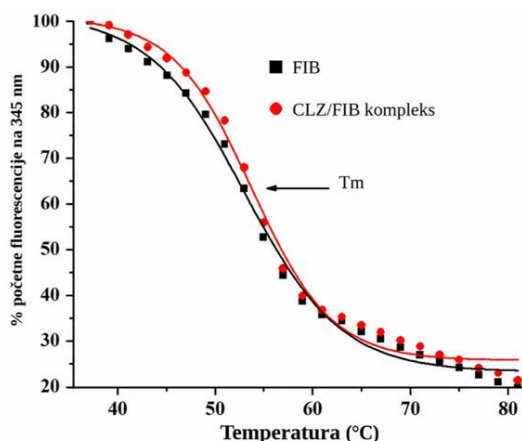


Slika 34. FT-IR apsorpsioni spektri (dekonvulirani rezultati) (A) samog fibrinogena 4 μM i (B) fibrinogena u prisustvu 40 μM klopapina.

Ovi rezultati sugerišu da su strukturni efekti CLZ na proteine selektivni i protein-specifični: dok je vezivanje klopapina izazvalo detektabilne promene sekundarne i tercijarne strukture BLC (manjeg, globularnog enzima), isti lek nije izmenio sekundarnu organizaciju fibrinogena. Ovo se može objasniti razlikama u veličini, arhitekturi i fleksibilnosti ova dva proteina, kao i razlikama u lokalizaciji vezivnih mesta – klopapin se na fibrinogenu verovatno vezuje u regionima koji ne doprinose dominantno CD ili FTIR signalu.

4.3.3. Termalna stabilnost fibrinogena nije značajno promenjena u prisustvu leka

Termalna stabilnost fibrinogena praćena je merenjem pada unutrašnje fluorescencije proteina pri postepenom povećanju temperature (37–81 $^{\circ}\text{C}$, brzina grejanja 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, **odjeljak 3.6.**) u odsustvu i prisustvu leka u velikom molarnom višku (1000:1, tj. 40 μM CLZ i 40 nM fibrinogena). Temperatura topljenja fibrinogena u odsustvu leka bila je oko 62 $^{\circ}\text{C}$, u prisustvu klopapina neznatno viša, za svega 0,8 $^{\circ}\text{C}$. Odsustvo statistički značajnog efekta CLZ na termalnu stabilnost fibrinogena u skladu je sa celokupnim profilom vezivanja ovog leka: fibrinogen, kao krupan, fibrilarni protein, nije sklon lakim konformacionim promenama, a vezivanje CLZ – koje ne menja sekundarnu niti tercijarnu strukturu proteina – očekivano ne doprinosi njegovoj značajnoj termalnoj (de)stabilizaciji.



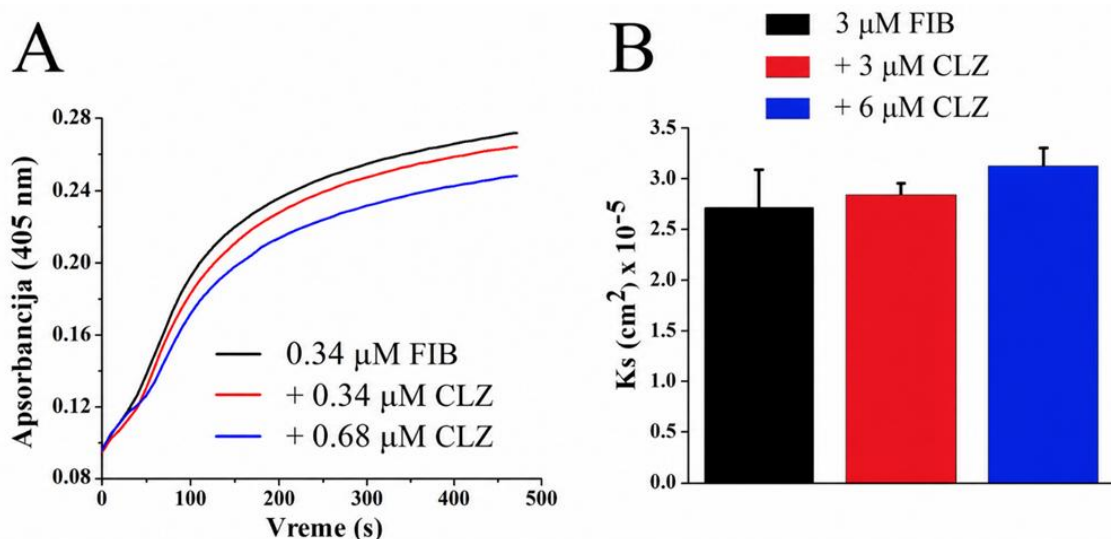
Slika 35. Uticaj leka na termalnu stabilnost proteina. Krive topljenja fibrinogena samog i fibrinogena sa klopapinom. Prevojna tačka označava vrednost temperature topljenja (T_m).

4.3.4. Uticaj klopapina na kinetiku polimerizacije, debljinu vlakana i poroznost fibrinske mreže

Fibrinogen učestvuje i u primarnoj i u sekundarnoj hemostazi, sa ključnom ulogom u agregaciji trombocita i formiranju fibrinske mreže. Iako su poznati (in)direktni mehanizmi koji mogu

dovesti do trombotičkih komplikacija kod pacijenata na terapiji klopazinom (Axelsson et al., 2007; Paciullo, 2008; Walker et al., 1997) precizni mehanizmi na molekularnom nivou nisu razjašnjeni. Zbog toga smo ispitali razlike u funkcionalnim svojstvima nativnog fibrinogena i kompleksa fibrinogen–klopazin (odjeljak 3.7.3.). Ukratko, funkcionalne posledice vezivanja CLZ za fibrinogen ispitane su u koagulacionom ogledu, praćenjem promene apsorbancije na 405 nm, kada se prati kinetika trombinski indukovane polimerizacije fibrinogena u fibrin. Ovaj ogled je izveden sa izolovanim fibrinogenom ($0,34 \mu\text{M}$) u prisustvu rastućih koncentracija CLZ ($0,34$ i $0,68 \mu\text{M}$, što odgovara molarnim odnosima ligand:protein od 1:1 i 2:1) i fizioloških koncentracija CaCl_2 ($2,2 \text{ mM}$) i humanog trombina (1 IU/mL).

Sa porastom koncentracije CLZ, fibrinogen je formirao fibrinski ugrušak manjom brzinom, što je procenjeno na osnovu logaritamske faze procesa formiranja fibrina, dok su nastala fibrinska vlakna bila tanja, na osnovu vrednosti maksimalne apsorbancije na 405 nm izmerene na kraju procesa formiranja fibrina (slika 36A). Ovakve funkcionalne karakteristike fibrinogena slične su rezultatima dobijenim nakon inkubacije fibrinogena sa visokim ($10+ \text{ mM}$) koncentracijama glukoze (Dunn et al., 2005), kao i svojstvima fibrinogena izolovanog od pacijenata nakon akutnog infarkta miokarda (Becatti et al., 2014), kod kojih je protein bio izražen post-translaciono modifikovan. Iako su fibrinski ugrušci sastavljeni od tanjih vlakana obično kompaktniji i manje porozni, to nije bio slučaj u našem istraživanju. Nativni fibrin i fibrin, formiran u prisustvu svih ispitivanih koncentracija klopazina, pokazali su sličnu poroznost (slika 36B).



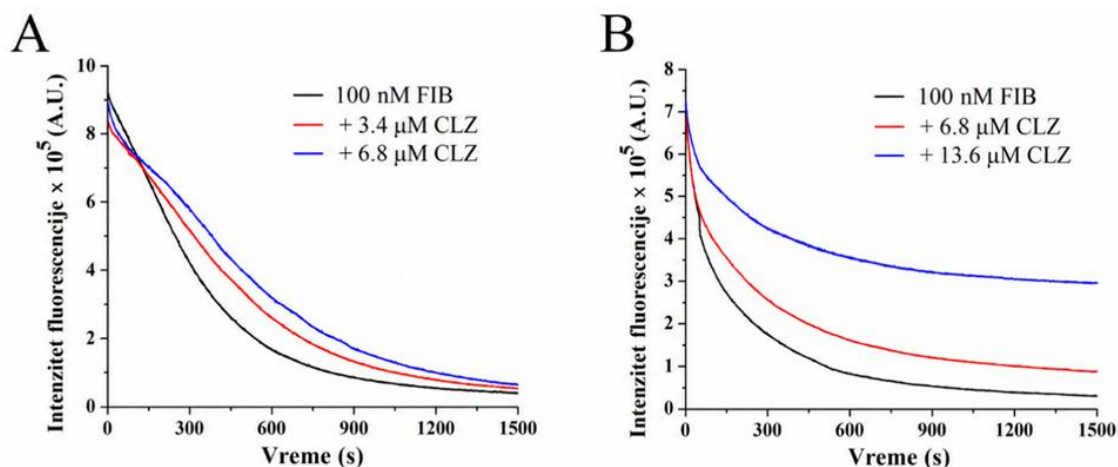
Slika 36. Formiranje fibrinskog gela u odsustvu i prisustvu klopazina (A) i poroznost fibrinskog gela izolovanog fibrinogena ($3 \mu\text{M}$) i prisustvu 3 i $6 \mu\text{M}$ klopazina (B).

Brojni faktori prisutni u krvi utiču na tok formiranja fibrinskog ugruška i na njegove karakteristike (Litvinov et al., 2019). Dalje, kod pojedinih patoloških stanja formiraju se fibrinski ugrušci i sa debljim i sa tanjim vlaknima u poređenju sa zdravim kontrolama (Scott et al., 2004). Formiranje fibrina veoma je složen proces, u kome učestvuje veliki broj faktora. Promene u formiranju fibrina nastale kao posledica vezivanja CLZ, same po sebi, nisu dovoljno izražene da dovedu do merljivih promena poroznosti fibrinske mreže, ili da neposredno izazovu protrombotičko ponašanje. Međutim, utvrđeni uticaj CLZ na formiranje fibrina mogao bi delovati sinergistički sa drugim faktorima i doprineti poremećaju procesa koagulacije, koji se zatim može razviti u trombozu. U brojnim istraživanjima opisana je smanjena poroznost fibrinskih ugrušaka izgrađenim od tanjih fibrinskih vlakana (Jörneshog et al., 1996; Li et al., 2016; Undas & Ariens, 2011; Wolberg, 2010). Pokazano je i da pacijenti sa shizofrenijom mogu biti u hiperkoagulabilnom i hipofibrinolitičkom stanju, što povećava rizik od venske tromboembolije (Chow et al., 2015). Potrebna su dalja kontrolisana istraživanja, na uzorcima pune plazme pacijenata koji su dugotrajno lečeni klopazinom, kako bi se utvrdilo u kojoj meri su izmenjena koagulaciona svojstva fibrinogena.

Rezultati ovog dela istraživanja pokazuju da klopapin, na način zavisen od koncentracije, utiče na funkcionalna svojstva fibrinogena, jednog od ključnih proteina u procesu koagulacije.

4.3.5. Klopapin deluje zaštitno na fibrinogen u uslovima oksidativnog stresa, na dozno-zavisni način

Fibrinogen je jedan od plazma proteina najosetljivijih na oksidativne modifikacije, koje narušavaju i njegovu strukturu i funkciju: oksidovani fibrinogen formira ugruške fibrina otpornije na fibrinolizu (razgradnju od strane plazmina), čime raste rizik od tromboze (Nencini et al., 2025). U ORAC i HORAC eksperimentima, gde dolazi do smanjenja unutrašnje fluorescencija fibrinogena pri izloženosti reaktivnim vrstama (AAPH ili Fentonova smeša), što je marker oksidativnog oštećenja proteina, pokazano je da CLZ statistički značajno i dozno-zavisno štiti fibrinogen od slobodno-radikaliski indukovane oksidacije.



Slika 37. Efekti vezivanja fibrinogena i klopapina (CLZ) na oksidaciju proteina indukovanu slobodnim radikalima. Pad intenziteta fluorescencije fibrinogena (0,1 μ M) u **A)** ORAC i **B)** HORAC antioksidativnim testovima, u prisustvu rastućih koncentracija CLZ (0, 3,4 i 6,8 μ M u ORAC testu, odnosno, 0, 6,8 i 13,6 μ M u HORAC testu).

U ORAC esaju (**slika 37A**), zaštitni efekat (ZE, izražen kao razlika površina ispod krive fluorescencije u prisustvu i odsustvu leka) iznosio je 71 A.U., pri 3,4 μ M klopapina, i 128 A.U., pri 6,8 μ M klopapina. Isti, čak i izraženiji, trend dozno-zavisne zaštite potvrđen je i u HORAC esaju (**slika 37B**). Uočena antioksidativna zaštita pripisuje se sposobnosti klopapina da direktno neutrališe slobodne radikale (peroksil i hidrosilne), sprečavajući modifikacije Trp i Tyr ostataka fibrinogena koje dovode do smanjenja fluorescencije proteina.

Iz kliničke perspektive, antioksidativna zaštita fibrinogena od strane klopapina mogla bi biti korisna u smanjenju formiranja oksidovanih fibrinskih ugrušaka, koji su otporniji na fibrinolizu i koji su protrombogeni, dok istovremeno usporjena polimerizacija može menjati karakteristike fibrinskog ugruška na složen, dozno-zavistan način.

5. ZAKLJUČCI DISERTACIJE

5.1. Opšti zaključak i naučni doprinos istraživanja

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da klopapin, pored dobro poznatih receptorskih efekata u mozgu, ostvaruje direktne interakcije sa funkcionalno različitim proteinima: katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom. Ovi proteini su odabrani za analizu pošto predstavljaju tri biohemijski različita sistema: komponentu antioksidativne zaštite, vančelijsku proteostazu i regulator hemostaze. Dobijeni rezultati ukazuju da se vanreceptorski efekti klopapina ne mogu svesti samo na nespecifično vezivanje za proteine plazme, već obuhvataju formiranje protein-ligand kompleksa sa merljivim posledicama po strukturu, stabilnost, oksidativnu otpornost i funkciju ispitanih proteina.

Zajedničko za sva tri protein-ligand sistema jeste da CLZ formira nekovalentne interakcije sa proteinskim partnerima, osrednjeg afiniteta, pri čemu u stabilizaciji kompleksa učestvuje hidrofobni efekat, vodonične veze, van der Waalsove sile i lokalno prilagođavanje vezivnog mesta na proteinu ligandu. Ipak, posledice vezivanja CLZ nisu iste za sve proteine. Kod katalaze se vezivanje odražava na stabilnost i aktivnost enzima na dozno-zavisan način; kod $\alpha 2M$ vezivanje ne narušava anti-proteaznu aktivnost, već doprinosi zaštiti u oksidativnim uslovima sredine; kod fibrinogena vezivanje leka ne remeti globalnu strukturu proteina, ali menja proces formiranja fibrina. Takve razlike pokazuje da biološki značaj interakcija malog molekula sa nekim proteinom zavisi od strukture proteina, položaja vezivnog mesta na proteinu i funkcionalne osetljivosti proteinskog sistema.

Važan doprinos ove disertacije je i povezivanje rezultata sa širim konceptom interakcija proteina sa malim bioaktivnim molekulima. Klopapin u ovom radu ne treba posmatrati izolovano, već kao jedan od liganada koji pokazuje da antioksidativni enzimi i proteini plazme menjaju svoja svojstva u kompleksu sa malim molekulima. Literatura o vezivanju katalaze, $\alpha 2M$ i fibrinogena sa flavonoidima, antioksidansima, prehrambenim fenolima, farmakološki aktivnim molekulima i drugim nefiziološkim ligandima, potvrđuje da ono ima strukturne, funkcionalne i redoks posledice.

5.2. Katalaza kao proteinski partner klopapina i drugih malih molekula

Rezultati ovog rada pokazuju da klopapin specifično vezuje katalazu i formira nekovalentan BLC-CLZ kompleks. Vezivanje leka dovodi do blagih promena sekundarne i tercijarne strukture proteina, povećava njegovu termalne stabilnosti i menja katalitičku aktivnost u zavisnosti od koncentracije liganda. Pri nižim, fiziološki relevantnijim koncentracijama, CLZ ne pokazuje izražen inhibitorski efekat i može doprineti očuvanju aktivnosti katalaze u pro-oksidativnom okruženju, dok pri višim dovodi do inhibicije enzima. Ovaj rezultat je posebno značajan, pošto pokazuje da interakcija leka sa katalazom nije samo štetna, ili samo zaštitna, već efekat vezivanja zavisi od koncentracije leka i uslova u kojima se protein nalazi.

Ovi rezultati se uklapaju u literaturne podatke da je aktivnost katalaze osetljiva na vezivanje različitih malih molekula. Na primer, pioglitazon, antidiabetik iz grupe tiazolidindiona, vezuje se za BLC, menja njenu strukturu i povećava aktivnost enzima do tri puta, tako da ligand nužno ne mora biti inhibitor da bi imao efekat na enzim (Yekta et al., 2017). Suprotan obrazac je opisan za puerarin, koji se vezuje u blizini kanala aktivnog mesta katalaze, što ometa dostupnost supstrata i smanjuje aktivnost enzima (Zhang et al., 2019). U tom smislu, rezultati za klopapin i BLC zauzimaju „srednju“ poziciju između zaštitnog i inhibitorskog modela protein-lek interakcija.

Slična poređenja važe i sa drugim ligandima. Clofazimin, lipofilni antimikobakterijski lek, vezuje se za katalazu uz gašenje fluorescencije, promene u sekundarnoj strukturi proteina i stabilizaciju kompleksa pretežno hidrofobnim silama (Zaman et al., 2017). Maltol, mali prehrambeni aditiv, takođe formira kompleks sa katalazom, menja konformaciju proteina i blago povećava aktivnost enzima (Huo et al., 2020). Ovi primeri potvrđuju da katalaza nije samo enzim koji pasivno razgrađuje H_2O_2 , već protein čija se funkcija može modulisati direktnim vezivanjem malih molekula.

U poređenju sa ovim ligandima, specifičnost CLZ se ogleda u kombinaciji više efekata: vezivanje leka je dovoljno stabilno da promeni lokalno mikrookruženje proteina, ali ne dovodi do

izražene denaturacije proteina; termalna stabilnost proteina raste; oksidativna oštećenja se smanjuju; a katalitička aktivnost se menja u zavisnosti od koncentracije leka. Sve to ukazuje da katalaza može biti jedan od molekulskih partnera preko kojih klopapin učestvuje u regulaciji redoks ravnoteže, naročito u uslovima oksidativnog stresa, kada je povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Dakle, interakcije klopapina sa katalazom treba tumačiti u okviru šire grupe protein-ligand interakcija koje mogu promeniti aktivnost antioksidativnih enzima. U tom kontekstu, CLZ pokazuje svojstva malog bioaktivnog molekula koji istovremeno ima zaštitni i inhibitorski potencijal, zavisno od svoje doze i oksidativnog opterećenja.

5.3. Alfa-2-makroglobulin: očuvanje funkcije i poređenje sa ligandima antioksidativnog tipa

Ispitivanje vezivanja CLZ sa $\alpha 2M$ pokazalo je da ovaj protein plazme vezuje klopapin sa umerenim afinitetom, bez narušavanja sekundarne strukture i bez gubitka anti-proteazne aktivnosti proteina. Ovo je jedan od važnijih zaključaka ove disertacije, jer pokazuje da formiranje protein-ligand kompleksa nužno ne vodi do funkcionalnog oštećenja proteina. Kod $\alpha 2M$ je posebno značajno da je su prisustvu leka bolje očuvani protein i ligand u pro-oksidativnom okruženju (usled izloženosti NaOCl i AAPH).

Ovakav obrazac u skladu je sa novijim radovima koji $\alpha 2M$ posmatraju ne samo kao inhibitor proteaza, već i protein uključen u vanćelijsku proteostazu, vezivanje oštećenih proteina i odgovor na oksidativni stres. Interakcije $\alpha 2M$ sa malim molekulima i prirodnim antioksidansima dodatno podržavaju ovu hipotezu. Fikocijanobilin, tetrapiroлни pigment fikobilinskih proteina, vezuje se za $\alpha 2M$, blago utičući na sekundarnu strukturu proteina i štiteći ga od oksidacije, čuvajući njegovu anti-proteaznu aktivnost (Šunderić et al., 2024). Sličan nalaz je dobijen u ovoj disertaciji, pošto u oba slučaja ligand ne remeti aktivnost $\alpha 2M$, već doprinosi očuvanju proteina u oksidativnom okruženju.

Slično tome, rezveratrol se vezuje za $\alpha 2M$ i povećati svoju rastvorljivost u vodenoj sredini, dok istovremeno dolazi do uzajamne zaštite i proteina i liganda od oksidativnog oštećenja (Šunderić et al., 2026a). Takvi podaci pokazuju da $\alpha 2M$ može imati ulogu makromolekulskog partnera koji utiče na stabilnost i raspoloživost malih hidrofobnih (slabo rastvorljivih) molekula. U tom kontekstu, vezivanje klopapina za $\alpha 2M$ nije samo farmakokinetički fenomen, već i redoks-modulatorni događaj.

Interakcije $\alpha 2M$ sa malim molekulima ne moraju uvek biti zaštitne. Kvercetin, iako često opisan kao antioksidans, pod određenim uslovima može pokazuje pro-oksidativno delovanje i izaziva konformacione promene $\alpha 2M$ uz smanjenje njegove anti-proteazne aktivnosti (Siddiqui et al., 2019). Miricetin takođe menja strukturu i anti-proteolitički potencijal $\alpha 2M$, bez izraženog narušavanja sekundarne strukture (Ansari et al., 2023a). Ovi podaci su važni, zato što pokazuju da biološki efekat liganda zavisi ne samo od njegove hemijske strukture već i koncentracije, uslova sredine (svetlost, prisustvo oksidanasa) i funkcionalnog stanja proteina.

U odnosu na podatke iz literature, CLZ se u kompleksu sa $\alpha 2M$ ponaša više ponoša kao zaštitni ligand nego kao ligand koji narušava funkciju proteina. On ne smanjuje anti-proteaznu aktivnost $\alpha 2M$, a u oksidativnim uslovima doprinosi očuvanju njegove aktivnosti. Time rezultati ove disertacije proširuju shvatanje $\alpha 2M$ kao proteina koji formira funkcionalno relevantne komplekse ne samo sa proteazama i endogenim partnerima, već i sa malim bioaktivnim ksenobiotcima.

U zaključku, $\alpha 2M$ može biti važan vanćelijski regulator interakcija između malih molekula, oksidativnog stresa i proteostaze. U slučaju vezivanja klopapina, njihove interakcije podržavaju ideju da lek može učestvovati u vanreceptorskim efektima čuvanjem funkcije proteina plazme i uzajamnom zaštitom pod pro-oksidativnim uslovima.

5.4. Fibrinogen: interakcije sa klopapinom, antioksidansima i značaj za formiranje fibrina

Rezultati dobijeni za fibrinogen i CLZ pokazuju drugačiji obrazac u odnosu na katalazu i $\alpha 2M$. Klopapin se vezuje za fibrinogen sa merljivim afinitetom, ne izaziva izraženo narušavanje globalne

strukture proteina i ne menja značajno njegovu termalnu stabilnost, ali utiče na formiranje fibrina. U prisustvu klopapina dolazi do promena brzine koagulacije i morfologije fibrinskih vlakana, što ukazuje da ligand može delovati na funkcionalni proces i kada globalna proteinska struktura ostaje relativno očuvana (**Glorigorijević et al., 2020**).

Ovaj zaključak je posebno značajan, jer se uklapa u literaturu koja pokazuje da su fibrinogen i fibrin osetljivi na male molekule, oksidativne promene i posttranslacione modifikacije. Fibrinogen nije samo pasivni prekursor fibrina, već protein čija struktura i funkcionalna svojstva utiču na debljinu vlakana, poroznost mreže, brzinu polimerizacije i osetljivost ugruška na fibrinolizu. Promene u fibrinskoj mreži mogu imati značaj za hemostazu, trombozu i reparaciju tkiva.

Poređenje sa dihidro- α -lipoinskom kiselinom (DHLLA) pokazuje da mali antioksidativni molekuli može direktno vezati fibrinogen i menjati osobine fibrina. DHLLA se vezuje za fibrinogen, blago utiče na njegovu sekundarnu strukturu, štiti protein od oksidacije i dovodi do formiranja debljih fibrinskih vlakana, što se tumači kao povoljan efekat u uslovima oksidativno izmenjenog fibrinogena (**Glorigorijević et al., 2020**). Resveratrol se takođe vezuje za fibrinogen, povećava svoju rastvorljivost i pokazuje uzajamno zaštitni efekat sa proteinom tokom oksidacije (**Glorigorijević, et al., 2020**).

U odnosu na ove ligande, CLZ pokazuje delimično preklapajući, ali funkcionalno drugačiji obrazac. Kao i DHLLA i resveratrol, klopapin može smanjiti oksidaciju fibrinogena i formirati stabilan kompleks sa proteinom. Međutim, njegov uticaj na formiranje fibrina ukazuje na promenu antioksidacionog profila. Zbog toga se efekat klopapina na fibrinogen ne može opisati samo kao antioksidativan i zaštićen, već kao kombinovan efekat, koji uključuje zaštitu od oksidacije, ali i promenu funkcionalnog procesa polimerizacije fibrina.

Ova razlika je važna, pošto literatura pokazuje da oksidativne modifikacije fibrinogena mogu promeniti strukturu fibrinskog ugruška, često u pravcu gušćih mreža, tanjih vlakana i smanjene podložnosti fibrinolizi (**Nencini et al., 2025**). S druge strane, različiti ligandi mogu imati suprotne efekte na fibrin, u zavisnosti da li oni stabilizuju određene regione fibrinogena, menjaju dostupnost mesta za polimerizaciju, ili utiču na bočne interakcije između protofibrila. Zbog toga je neophodno oprezno tumačiti rezultate sa CLZ: oni ne sugerišu direktan klinički mehanizam tromboze, već moguću molekulsku osnovu kako klopapin može doprineti promenama u hemostatskom sistemu.

Zaključno, fibrinogen je najfunkcionalnije osetljiv na vezivanje CLZ od tri ispitana proteina. Dok kod α 2M dominira očuvanje aktivnosti/funkcije, a kod katalaze dozno-zavisna modulacija aktivnosti enzima, kod fibrinogena i mala promena u lokalnom vezivanju može uticati na organizaciju fibrinske mreže. To pokazuje da se značaj protein-ligand interakcija ne meri samo promenama strukture proteina, već i posledicama koje vezivanje ima na biološki proces u kome protein učestvuje.

5.5. Zajednički obrasci interakcija ispitivanih proteina sa malim molekulima

Kada se rezultati ove disertacije uporede sa literaturom o interakcijama katalaze, α 2M i fibrinogena sa drugim malim molekulima, mogu se izdvojiti zajednički principi. Prvo, vezivanje malog molekula za protein detektuje se kao gašenje unutrašnje fluorescencije, promene u UV-Vis apsorpciji, promene u CD spektrima proteina, ili promene termalne stabilnosti. Međutim, ovi pokazatelji ne moraju nužno ukazivati na funkcionalne promene proteina. Funkcionalni testovi su, zato, neophodni za tumačenje biološkog značaja interakcija.

Drugo, isti protein može različito reagovati na različite ligande. Katalaza može biti aktivirana, inhibirana, ili stabilizovana, u zavisnosti od položaja vezivnog mesta i mesta vezivanja liganda u odnosu na kanal u aktivnom mestu enzima. α 2M može očuvati ili izgubiti anti-proteaznu aktivnost u zavisnosti da li ligand deluje zaštitno ili pro-oksidativno. Fibrinogen može zadržati globalnu strukturu, ali ipak promeniti način formiranja fibrina. Ovi primeri pokazuju da je funkcionalna interpretacija važnija od same činjenice da je došlo do vezivanja liganda za protein.

Treće, redoks efekti su zajednička tačka sva tri sistema. Klopapin, fikocijanobilin, resveratrol, DHLLA i drugi ligandi menjaju oksidativnu stabilnost proteinskih partnera. Nekada kompleks štiti protein od oksidacije, u drugim uslovima ligand može delovati pro-oksidativno i narušiti funkciju

proteina. Zbog toga se interakcije proteina sa malim molekulima trebaju posmatrati u kontekstu oksidativnog okruženja molekula, a ne samo u standardnim fiziološkim uslovima.

Četvrto, proteini mogu menjati svojstva liganada koje vezuju. Vezivanje za fibrinogen ili $\alpha 2M$ može povećati rastvorljivost hidrofobnih molekula, smanjiti njihovu oksidaciju i produžiti njihovu stabilnost u vodenoj sredini. Ovo je pokazano za resveratrol, ali se isti princip može primeniti i na klopazipin kao lipofilan molekul. Drugim rečima, protein-ligand kompleks nije samo promenjeni protein, već i promenjeni ligand.

Na osnovu svih ovih principa, rezultati ove disertacije podržavaju širu hipotezu da direktne interakcije lekova i bioaktivnih malih molekula sa proteinima mogu biti važan, često potcenjen nivo njihovog dejstva. One se ne uklapaju u klasični receptorski model, ali mogu doprineti efektima leka preko promene redoks ravnoteže, proteostaze, enzimske aktivnosti i hemostatskih procesa.

5.6. Značaj za razumevanje vanreceptorskih efekata klopazipina

Dobijeni rezultati pokazuju da se vanreceptorski (plejotropni) efekti klopazipina mogu posmatrati kroz tri povezana nivoa. Prvi je direktno vezivanje za proteine, potvrđeno spektroskopskim metodama. Drugi nivo je promena strukturnih i dinamičkih osobina proteina, uključujući lokalne promene mikrookruženja aromatičnih amino-kiselinskih ostataka, termalnu stabilnost i dostupnost funkcionalnih regiona. Treći su funkcionalne posledice: modulacija aktivnosti katalaze, očuvanje anti-proteazne aktivnosti $\alpha 2M$ i promena formiranja fibrina.

Ovakav pristup je važan, pošto objašnjava kako isti lek može imati različite biohemijske efekte koji nisu neposredno povezani sa neurotransmiterskim receptorima kao njegovom primarnom terapijskom metodom. Klopazipin je lipofilan, strukturno fleksibilan molekul i sposoban za više tipova nekovalentnih interakcija. Zato on može prepoznati različita vezivna mesta na proteinu i stabilizovati različite tipove kompleksa. U zavisnosti od proteina, koncentracije i oksidativnog statusa sredine, posledice vezivanja leka mogu biti zaštitne, neutralne ili potencijalno nepovoljne.

U tom smislu, ovo istraživanje doprinosi razumevanju molekulskih osnova plejotropnih efekata klopazipina. Od značaja je i to što su svi ispitani proteini povezani sa procesima koji se često pominju u kontekstu neželjenih efekata leka: oksidativni stres, inflamacija, promene u proteazno-antiproteaznoj ravnoteži i hemostaza. Iako rezultati ove studije ne dokazuju direktnu kliničku uzročnost, oni daju biohemijski osnov za dalje ispitivanje kako interakcije klopazipina sa proteinima krvi mogu doprineti korisnim i neželjenim efektima leka.

5.7. Ograničenja i pravci budućih istraživanja

Glavno ograničenje istraživanja jeste da su ispitivanja sprovedena u kontrolisanim *in vitro* uslovima. Takav pristup je neophodan za molekulsko razumevanje protein-ligand interakcija, ali ne obuhvata punu složenost plazme, prisustvo drugih proteina, metabolita, lipoproteina, ćelijskih komponenti i dinamičkih promena koncentracije leka. Zbog toga rezultate studije treba tumačiti kao biohemijski osnov, a ne kao direktan dokaz kliničkih efekata leka.

Drugo ograničenje odnosi se na koncentracije liganda. Klopazipin pokazuje dozno-zavisne efekte, naročito u sistemu sa katalazom i fibrinogenom. Zbog toga je u budućim istraživanjima važno razdvojiti terapijski relevantne koncentracije leka, njegove visoke eksperimentalne koncentracije i one koje mogu nastati lokalno, ili u uslovima poremećenog metabolizma. Ovo je naročito važno za tumačenje potencijalno zaštitnih i štetnih efekata klopazipina u krvi.

Treći pravac budućih istraživanja trebalo bi da obuhvati metabolite klopazipina, posebno nor-klopazipin i klopazipin-N-oksid, kao i reaktivne oksidativne intermedijere. Moguće je da ovi metaboliti imaju drugačiji afinitet prema katalazi, $\alpha 2M$ i fibrinogenu, kao i drugačije redoks posledice svog vezivanja za proteine. Poređenje klopazipina i njegovih metabolita dalo bi potpuniji uvid koji oblik leka najviše doprinosi njegovim vanreceptorskim efektima.

Bilo bi od koristi proširiti ispitivanja i na složenije modele: rekonstituisane sisteme plazme, kompetitivno vezivanje leka u prisustvu albumina i drugih proteina plazme, oksidovane oblike proteina, kao i funkcionalne testove koagulacije i fibrinolize. Dalje, ispitati da li prisustvo klopapina utiče na stabilnost fibrinskog ugruška, aktivnost plazmina i strukturu fibrinske mreže, u uslovima koji bolje oponašaju fiziološko i inflamatorno okruženje.

Još jedan pravac daljeg istraživanja bio bi poređenje efekata klopapina sa drugim malim molekulima: antioksidansi, flavonoidi, prehrambeni fenoli i, pre svega, lekovi drugih terapijskih grupa. Takva poređenja bi omogućila da se utvrdi da li su uočeni efekti posledica specifične strukture klopapina, ili, opštije, karakteristika lipofilnih i aromatičnih liganada da se vezuju za proteine i menjaju njihovu oksidativnu stabilnost.

5.8. Konačan zaključak

Na osnovu svih dobijenih rezultata, klopapin ostvaruje direktne i funkcionalno relevantne interakcije sa katalazom, $\alpha 2M$ i fibrinogenom, esencijalnim proteinima krvi. Ove su zasnovane na formiranju nekovalentnih protein-ligand kompleksa i dovode do različitih posledica: modulacije aktivnosti katalaze, očuvanja anti-proteazne aktivnosti $\alpha 2M$ u oksidativnim uslovima i promene procesa formiranja fibrina. Time je pokazano da klopapin može delovati i preko proteinskih sistema koji nisu klasične farmakološke mete njegovog delovanja.

Poređenje sa literaturnim podacima o interakcijama ovih proteina sa drugim biomolekulima pokazuje da se dobijeni rezultati uklapaju u širi biohemijski koncept: ligandi mogu menjati stabilnost, aktivnost/funkciju i oksidativnu otpornost proteina, a proteini rastvorljivost, stabilnost i reaktivnost vezanih liganada. U tom okviru, klopapin je bioaktivan ligand čiji se efekti u telu ne završavaju na receptorima, već uključuju i direktne interakcije sa proteinima uključenim u redoks ravnotežu, proteostazu i hemostazu.

Završni zaključak disertacije bio bi da vezivanje i interakcije klopapina sa katalazom, $\alpha 2M$ i fibrinogenom predstavljaju jedan od molekulskih osnova njegovih vanreceptorskih (plejotropnih) efekata. Oni nisu uniformni, već zavise od proteinskog partnera, položaja vezivnog mesta na njemu, koncentracije leka i oksidativnog statusa sredine. Ovakav zaključak proširuje razumevanje biohemijskog delovanja klopapina i otvara prostor za dalja istraživanja interakcija psihofarmaka i drugih malih bioaktivnih molekula sa funkcionalno važnim proteinima.

6. LITERATURA

- Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews*, 106(5), 1589–1615. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121–126). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Albitar, O., Harun, S. N., Zainal, H., Ibrahim, B., & Sheikh Ghadzi, S. M. (2020). Population Pharmacokinetics of Clozapine: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2020, 9872936. <https://doi.org/10.1155/2020/9872936>
- Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S., & Medintz, I. L. (2019). FRET as a biomolecular research tool—Understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature Methods*, 16(9), 815–829. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8>
- Ali, S. S., Zia, M. K., Siddiqui, T., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2020). Bilirubin binding affects the structure and function of alpha-2-macroglobulin. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 41(5), 841–851. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1783290>
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W537–541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (2002). The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 1(11), 845–867. <https://doi.org/10.1074/mcp.r200007-mcp200>
- Ansari, S., Ahsan, H., Zia, M. K., Gatasheh, M. K., & Khan, F. H. (2023a). Exploring the interaction of myricetin with human alpha-2-macroglobulin: Biophysical and in-silico analysis. *Journal of Biological Physics*, 49(1), 29–48. <https://doi.org/10.1007/s10867-022-09621-z>
- Ansari, S., Ahsan, H., Zia, M. K., Gatasheh, M. K., & Khan, F. H. (2023b). Exploring the interaction of myricetin with human alpha-2-macroglobulin: Biophysical and in-silico analysis. *Journal of Biological Physics*, 49(1), 29–48. <https://doi.org/10.1007/s10867-022-09621-z>
- Ansari, S., Zia, M. K., Ahsan, H., Hashmi, M. A., & Khan, F. H. (2024). Binding characteristics and conformational changes in alpha-2-macroglobulin by the dietary flavanone naringenin: Biophysical and computational approach. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 42(14), 7485–7500. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2240420>
- Anwar, A., Mustafa, A. M., Abdou, K., A Rabie, M., El-Shiekh, R. A., & El-Dessouki, A. M. (2025). A comprehensive review on schizophrenia: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, conventional treatments, and proposed natural compounds used for management. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 398(11), 15231–15255. <https://doi.org/10.1007/s00210-025-04351-0>
- Arimura, Y., & Funabiki, H. (2022). Structural Mechanics of the Alpha-2-Macroglobulin Transformation. *Journal of Molecular Biology*, 434(5), 167413. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167413>
- Asenjo Lobos, C., Komossa, K., Rummel-Kluge, C., Hunger, H., Schmid, F., Schwarz, S., & Leucht, S. (2010). Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(11), CD006633. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006633.pub2>
- Axelsson, S., Hägg, S., Eriksson, A. C., Lindahl, T. L., & Whiss, P. A. (2007). In vitro effects of antipsychotics on human platelet adhesion and aggregation and plasma coagulation. *Clinical*

and *Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(8), 775–780.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04650.x>

- Azpiazu, I., & Chapman, D. (1992). Spectroscopic studies of fibrinogen and its plasmin-derived fragments. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1119(3), 268–274. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90213-w](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90213-w)
- Bacia, K., Kim, S. A., & Schwille, P. (2006). Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods*, 3(2), 83–89. <https://doi.org/10.1038/nmeth822>
- Bakar, K. A., & Feroz, S. R. (2019). A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand-protein binding affinity. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 223, 117337. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117337>
- Baldessarini, R. J., & Frankenburg, F. R. (1991). Clozapine. A novel antipsychotic agent. *The New England Journal of Medicine*, 324(11), 746–754. <https://doi.org/10.1056/NEJM199103143241107>
- Banis, G. E., Winkler, T., Barton, P., Chocron, S. E., Kim, E., Kelly, D. L., Payne, G. F., Ben-Yoav, H., & Ghodssi, R. (2017). The Binding Effect of Proteins on Medications and Its Impact on Electrochemical Sensing: Antipsychotic Clozapine as a Case Study. *Pharmaceuticals*, 10(3), 69. <https://doi.org/10.3390/ph10030069>
- Barrett, A. J., & Starkey, P. M. (1973). The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *The Biochemical Journal*, 133(4), 709–724. <https://doi.org/10.1042/bj1330709>
- Baud, O., Greene, A. E., Li, J., Wang, H., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(7), 1531–1540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-03.2004>
- Becatti, M., Marcucci, R., Bruschi, G., Taddei, N., Bani, D., Gori, A. M., Giusti, B., Gensini, G. F., Abbate, R., & Fiorillo, C. (2014). Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1355–1361. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303785>
- Bi, S., Ding, L., Tian, Y., Song, D., Zhou, X., Liu, X., & Zhang, H. (2004). Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 703(1–3), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.05.026>
- Bond, J. E., Cianciolo, G. J., & Pizzo, S. V. (2007). Incorporation of low molecular weight molecules into alpha(2)-macroglobulin by nucleophilic exchange. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(2), 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.151>
- Bonechi, C., Lamponi, S., Donati, A., Tamasi, G., Consumi, M., Leone, G., Rossi, C., & Magnani, A. (2017). Effect of resveratrol on platelet aggregation by fibrinogen protection. *Biophysical Chemistry*, 222, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.12.004>
- Brinholi, F. F., Farias, C. C. de, Bonifácio, K. L., Higachi, L., Casagrande, R., Moreira, E. G., & Barbosa, D. S. (2016). Clozapine and olanzapine are better antioxidants than haloperidol, quetiapine, risperidone and ziprasidone in in vitro models. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 81, 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.047>
- Brooijmans, N., & Kuntz, I. D. (2003). Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>

- Bteich, M. (2019). An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: Highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon*, 5(11), e02879. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02879>
- Ceskova, E. (2022). Has the utilization of serotonin receptor antagonism made an impact on schizophrenia treatment? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 23(17), 1865–1868. <https://doi.org/10.1080/14656566.2022.2137403>
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., & Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253(1–2), 269–285. <https://doi.org/10.1023/a:1026028303196>
- Chetty, M., & Murray, M. (2007). CYP-mediated clozapine interactions: How predictable are they? *Current Drug Metabolism*, 8(4), 307–313. <https://doi.org/10.2174/138920007780655469>
- Chow, V., Reddel, C., Pennings, G., Scott, E., Pasqualon, T., Ng, A. C. C., Yeoh, T., Curnow, J., & Kritharides, L. (2015). Global hypercoagulability in patients with schizophrenia receiving long-term antipsychotic therapy. *Schizophrenia Research*, 162(1–3), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.12.042>
- Cimpmperman, P., Baranauskiene, L., Jachimoviciūte, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Matuliene, J., Sereikaite, J., Bumelis, V., & Matulis, D. (2008). A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophysical Journal*, 95(7), 3222–3231. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.134973>
- Cipollone, M. A., Abraham, A. G., Fontana, A., & Tironi, V. A. (2024). Autochthonous Fermentation as a Means to Improve the Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Proteins and Phenolic Compounds of Yellow Pea Flour. *Foods*, 13(5), 659. <https://doi.org/10.3390/foods13050659>
- Clozapine DrugBank*. (2006). [Online post]. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00363>
- Clozapine, Guide to pharmacology*. (2026). [Online post]. Guide to Pharmacology. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?ligandId=38>
- Clozapine, PubChem*. (2026). [Online post].
- Correll, C. U., Agid, O., Crespo-Facorro, B., de Bartolomeis, A., Fagiolini, A., Seppälä, N., & Howes, O. D. (2022). A Guideline and Checklist for Initiating and Managing Clozapine Treatment in Patients with Treatment-Resistant Schizophrenia. *CNS Drugs*, 36(7), 659–679. <https://doi.org/10.1007/s40263-022-00932-2>
- Crilly, J. (2007). The history of clozapine and its emergence in the US market: A review and analysis. *History of Psychiatry*, 18(1), 39–60. <https://doi.org/10.1177/0957154X07070335>
- Crookston, K. P., Webb, D. J., Lamarre, J., & Gonias, S. L. (1993). Binding of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 to alpha 2-macroglobulin in vitro and in vivo: Comparison of receptor-recognized and non-recognized alpha 2-macroglobulin conformations. *The Biochemical Journal*, 293 (Pt 2)(Pt 2), 443–450. <https://doi.org/10.1042/bj2930443>
- Crookston, K. P., Webb, D. J., Wolf, B. B., & Gonias, S. L. (1994). Classification of alpha 2-macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1533–1540. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42289-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42289-7)
- Cuenod, M., Steullet, P., Cabungcal, J.-H., Dwir, D., Khadimallah, I., Klauser, P., Conus, P., & Do, K. Q. (2022). Caught in vicious circles: A perspective on dynamic feed-forward loops driving oxidative stress in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 1886–1897. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01374-w>

- Davalos, D., & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8>
- de Bartolomeis, A., Barone, A., Vellucci, L., Mazza, B., Austin, M. C., Iasevoli, F., & Ciccarelli, M. (2022). Linking Inflammation, Aberrant Glutamate-Dopamine Interaction, and Post-synaptic Changes: Translational Relevance for Schizophrenia and Antipsychotic Treatment: a Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, 59(10), 6460–6501. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02976-3>
- De Berardis, D., Rapini, G., Olivieri, L., Di Nicola, D., Tomasetti, C., Valchera, A., Fornaro, M., Di Fabio, F., Perna, G., Di Nicola, M., Serafini, G., Carano, A., Pompili, M., Vellante, F., Orsolini, L., Martinotti, G., & Di Giannantonio, M. (2018a). Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: A focus on the adverse effects of clozapine. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(5), 237–256. <https://doi.org/10.1177/2042098618756261>
- De Berardis, D., Rapini, G., Olivieri, L., Di Nicola, D., Tomasetti, C., Valchera, A., Fornaro, M., Di Fabio, F., Perna, G., Di Nicola, M., Serafini, G., Carano, A., Pompili, M., Vellante, F., Orsolini, L., Martinotti, G., & Di Giannantonio, M. (2018b). Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: A focus on the adverse effects of clozapine. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(5), 237–256. <https://doi.org/10.1177/2042098618756261>
- de Leon, J., Schoretsanitis, G., Ruan, C.-J., De Las Cuevas, C., Kane, J. M., & Correll, C. U. (2022). An international clozapine titration guideline to increase its safety and move forward on the route started by German-speaking psychiatrists in the 1960s. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 272(4), 537–540. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01407-7>
- Dias, R., & de Azevedo, W. F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*, 9(12), 1040–1047. <https://doi.org/10.2174/138945008786949432>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., & Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Dunn, E. J., Ariëns, R. a. S., & Grant, P. J. (2005). The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia*, 48(6), 1198–1206. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1742-2>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- Erlianti, K., Alfaqeeh, M., Puspitasari, I. M., Purba, F. D., & Suwantika, A. A. (2025). Evaluating the Role of Clozapine in Treatment-Resistant Schizophrenia: A Narrative Synthesis of Clinical, Economic, and Quality-of-Life Outcomes. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 21, 2479–2493. <https://doi.org/10.2147/NDT.S566527>
- Fakra, E., & Azorin, J.-M. (2012). Clozapine for the treatment of schizophrenia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 13(13), 1923–1935. <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.709235>
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>
- Farde, L., Nordström, A. L., Wiesel, F. A., Pauli, S., Halldin, C., & Sedvall, G. (1992). Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Archives of General Psychiatry*, 49(7), 538–544. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820070032005>
- Fehsel, K. (2024). Metabolic Side Effects from Antipsychotic Treatment with Clozapine Linked to Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Activation. *Biomedicines*, 12(10), 2294. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102294>

- Fehsel, K., Loeffler, S., Krieger, K., Henning, U., Agelink, M., Kolb-Bachofen, V., & Klimke, A. (2005). Clozapine induces oxidative stress and proapoptotic gene expression in neutrophils of schizophrenic patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 25(5), 419–426. <https://doi.org/10.1097/01.jcp.0000177668.42640.fe>
- Feldman, S. R., Gonias, S. L., & Pizzo, S. V. (1985). Model of alpha 2-macroglobulin structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(17), 5700–5704. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.17.5700>
- Flanagan, R. J., Lally, J., Gee, S., Lyon, R., & Every-Palmer, S. (2020). Clozapine in the treatment of refractory schizophrenia: A practical guide for healthcare professionals. *British Medical Bulletin*, 135(1), 73–89. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa024>
- Fuentes-Lemus, E., Dorta, E., Escobar, E., Aspée, A., Pino, E., Abasq, M. L., Speisky, H., Silva, E., Lissi, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2016). Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: Role of alkoxyl and peroxy radicals. *RSC Advances*, 6(63), 57948–57955. <https://doi.org/10.1039/C6RA12859A>
- Gajula, M., Kumar, A., & Ijaq, J. (2016). Protocol for Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *BIO-PROTOCOL*, 6(23). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2051>
- Garcia-Ferrer, I., Marrero, A., Gomis-Rüth, F. X., & Goulas, T. (2017). α 2-Macroglobulins: Structure and Function. *Sub-Cellular Biochemistry*, 83, 149–183. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_6
- Gardner, I., Zahid, N., MacCrimmon, D., & Uetrecht, J. P. (1998). A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes. *Molecular Pharmacology*, 53(6), 991–998. [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(24\)13268-3](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(24)13268-3)
- Geib, T., Thulasingam, M., Haeggström, J. Z., & Sleno, L. (2020). Investigation of Clozapine and Olanzapine Reactive Metabolite Formation and Protein Binding by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 33(9), 2420–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00191>
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gligorijević, N., Minić, S., Robajac, D., Nikolić, M., Ćirković Veličković, T., & Nedić, O. (2019). Characterisation and the effects of bilirubin binding to human fibrinogen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.124>
- Gligorijević, N., Radomirović, M., Rajković, A., Nedić, O., & Ćirković Veličković, T. (2020). Fibrinogen Increases Resveratrol Solubility and Prevents it from Oxidation. *Foods*, 9(6), 780. <https://doi.org/10.3390/foods9060780>
- Gligorijević, N., Šukalović, V., Penezić, A., & Nedić, O. (2020). Characterisation of the binding of dihydro-alpha-lipoic acid to fibrinogen and the effects on fibrinogen oxidation and fibrin formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.098>
- Gligorijević, Nikola J. (2018). *Uticaj posttranslacionih modifikacija fibrinogena na njegovu reaktivnost i funkciju* [Doktorska disertacija, Unic+verzitet u Beogradu]. <https://phaidrabg.bg.ac.rs/o:19076>
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

- Gokara, M., Sudhamalla, B., Amooru, D. G., & Subramanyam, R. (2010). Molecular interaction studies of trimethoxy flavone with human serum albumin. *PloS One*, 5(1), e8834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008834>
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: Looking for complete identity. *Protein & Cell*, 1(10), 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*, 1(6), 2527–2535. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.204>
- Guedes, I. A., De Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>
- Gupta, A. K., Pokhriyal, R., Khan, M. I., Kumar, D. R., Gupta, R., Chadda, R. K., Ramachandran, R., Goyal, V., Tripathi, M., & Hariprasad, G. (2019). Cerebrospinal Fluid Proteomics For Identification Of α 2-Macroglobulin As A Potential Biomarker To Monitor Pharmacological Therapeutic Efficacy In Dopamine Dictated Disease States Of Parkinson's Disease And Schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 2853–2867. <https://doi.org/10.2147/NDT.S214217>
- Haack, M. J., Bak, M. L. F. J., Beurskens, R., Maes, M., Stolk, L. M. L., & Delespaul, P. A. E. G. (2003). Toxic rise of clozapine plasma concentrations in relation to inflammation. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 13(5), 381–385. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(03\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(03)00042-7)
- Hadwan, M. H., & Ali, S. K. (2018). New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 542, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.013>
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47(4), 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
- Hansberg, W. (2022). Monofunctional Heme-Catalases. *Antioxidants*, 11(11), 2173. <https://doi.org/10.3390/antiox11112173>
- Hashimoto, K. (2014). Targeting of NMDA receptors in new treatments for schizophrenia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(9), 1049–1063. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.934225>
- Herskovits, T. T. (1969). Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 130(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90004-6)
- Heusler, P., Bruins Slot, L., Tourette, A., Tardif, S., & Cussac, D. (2011). The clozapine metabolite N-desmethylozapine displays variable activity in diverse functional assays at human dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptors. *European Journal of Pharmacology*, 669(1–3), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.031>
- Hiemke, C., Bergemann, N., Clement, H., Conca, A., Deckert, J., Domschke, K., Eckermann, G., Egberts, K., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, U., Hefner, G., Helmer, R., Janssen, G., Jaquenoud, E., Laux, G., Messer, T., ... Baumann, P. (2018). Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, 51(01/02), 9–62. <https://doi.org/10.1055/s-0043-116492>
- Hillar, A., & Nicholls, P. (1992). A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation. *FEBS Letters*, 314(2), 179–182. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80969-n](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80969-n)

- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Huang, S.-Y., & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38, 27–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Huo, M., Zhao, L., Wang, T., Zong, W., & Liu, R. (2020). Binding mechanism of maltol with catalase investigated by spectroscopy, molecular docking, and enzyme activity assay. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 33(3), e2822. <https://doi.org/10.1002/jmr.2822>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Isca, V. M. S., Nikolić, M., Filipović, N., Mori, M., & Rijo, P. (2025). Plectranthus-derived Abietanes as Protein Kinase C- δ Activators: In Silico Design, Human Serum Albumin Interaction, and Stability Evaluation. *Chemistry & Biodiversity*, 22(12), e00670. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202500670>
- Jain, A. N., & Nicholls, A. (2008). Recommendations for evaluation of computational methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 22(3–4), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s10822-008-9196-5>
- Jares-Erijman, E. A., & Jovin, T. M. (2003). FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1387–1395. <https://doi.org/10.1038/nbt896>
- Jenner, L., Husted, L., Thirup, S., Sottrup-Jensen, L., & Nyborg, J. (1998). Crystal structure of the receptor-binding domain of alpha 2-macroglobulin. *Structure*, 6(5), 595–604. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00061-6](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00061-6)
- Jörniskog, G., Egberg, N., Fagrell, B., Fatah, K., Hessel, B., Johnsson, H., Brismar, K., & Blombäck, M. (1996). Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia*, 39(12), 1519–1523. <https://doi.org/10.1007/s001250050607>
- Kaijzel, E. L., Koolwijk, P., van Erck, M. G. M., van Hinsbergh, V. W. M., & de Maat, M. P. M. (2006). Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 4(9), 1975–1981. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02081.x>
- Kane, J., Honigfeld, G., Singer, J., & Meltzer, H. (1988). Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry*, 45(9), 789–796. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1988.01800330013001>
- Kane, J. M., Schoretsanitis, G., Rubio, J. M., & Correll, C. U. (2024). Clozapine in treatment-resistant schizophrenia: Reflections from the Hallmark US clinical trial and beyond. *Schizophrenia Research*, 268, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2024.01.035>
- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>
- Kattula, S., Byrnes, J. R., & Wolberg, A. S. (2017). Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(3), e13–e21. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.308564>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1751(2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>

- Khataee, S., Dehghan, G., Rashtbari, S., Dastmalchi, S., & Iranshahi, M. (2020). Noncompetitive Inhibition of Bovine Liver Catalase by Lawsone: Kinetics, Binding Mechanism and in silico Modeling Approaches. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 19(1), 383–397. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.111600.13255>
- Khokhar, J. Y., Henricks, A. M., Sullivan, E. D. K., & Green, A. I. (2018). Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective. *Advances in Pharmacology*, 82, 137–162. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.009>
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908–13914. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13908>
- Klotz, I. M., & Hunston, D. L. (1971). Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. *Biochemistry*, 10(16), 3065–3069. <https://doi.org/10.1021/bi00792a013>
- Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., & Doolittle, R. F. (2009). Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 48(18), 3877–3886. <https://doi.org/10.1021/bi802205g>
- Krell, T., Horsburgh, M. J., Cooper, A., Kelly, S. M., & Coggins, J. R. (1996). Localization of the active site of type II dehydroquinases. Identification of a common arginine-containing motif in the two classes of dehydroquinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24492–24497. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24492>
- Kremer, J. M., Wilting, J., & Janssen, L. H. (1988). Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 40(1), 1–47.
- Krych, J., & Gebicka, L. (2013). Catalase is inhibited by flavonoids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.070>
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Li, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences*, 11(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>
- Li, W., Sigley, J., Pieters, M., Helms, C. C., Nagaswami, C., Weisel, J. W., & Guthold, M. (2016). Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophysical Journal*, 110(6), 1400–1410. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.021>
- Li, Z., Huang, M., Ichikawa, J., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (2005). N-desmethyloclozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via stimulation of M1 muscarinic receptors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(11), 1986–1995. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300768>
- Lin, C.-H., & Lane, H.-Y. (2019). Early Identification and Intervention of Schizophrenia: Insight From Hypotheses of Glutamate Dysfunction and Oxidative Stress. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 93. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00093>
- Lindenberg, M., Kopp, S., & Dressman, J. B. (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 58(2), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.001>
- Litvinov, R. I., Nabiullina, R. M., Zubairova, L. D., Shakurova, M. A., Andrianova, I. A., & Weisel, J. W. (2019). Lytic Susceptibility, Structure, and Mechanical Properties of Fibrin in Systemic

- Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 10, 1626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01626>
- Litvinov, R. I., Pieters, M., de Lange-Loots, Z., & Weisel, J. W. (2021). Fibrinogen and Fibrin. *Sub-Cellular Biochemistry*, 96, 471–501. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58971-4_15
- Loewen, P. C., Villanueva, J., Switala, J., Donald, L. J., & Ivancich, A. (2015). Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: Substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Proteins*, 83(5), 853–866. <https://doi.org/10.1002/prot.24777>
- Luo, S., & Levine, R. L. (2009). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(2), 464–472. <https://doi.org/10.1096/fj.08-118414>
- Luyendyk, J. P., Schoenecker, J. G., & Flick, M. J. (2019). The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood*, 133(6), 511–520. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-818211>
- Marchelak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Wasielewska, P., Nowak, P., & Olszewska, M. A. (2021). The Effects of *Prunus spinosa* L. Flower Extracts, Model Polyphenols and Phenolic Metabolites on Oxidative/Nitrative Modifications of Human Plasma Components with Particular Emphasis on Fibrinogen In Vitro. *Antioxidants*, 10(4), 581. <https://doi.org/10.3390/antiox10040581>
- Marrero, A., Duquerroy, S., Trapani, S., Goulas, T., Guevara, T., Andersen, G. R., Navaza, J., Sottrup-Jensen, L., & Gomis-Rüth, F. X. (2012). The crystal structure of human $\alpha 2$ -macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angewandte Chemie*, 51(14), 3340–3344. <https://doi.org/10.1002/anie.201108015>
- Martinez, M., Weisel, J. W., & Ischiropoulos, H. (2013). Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.039>
- Medved, L., Tsurupa, G., & Yakovlev, S. (2001). Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, 185–204. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03505.x>
- Meltzer, H. Y. (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 21(2 Suppl), 106S–115S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00046-9)
- Meltzer, H. Y., Alphs, L., Green, A. I., Altamura, A. C., Anand, R., Bertoldi, A., Bourgeois, M., Chouinard, G., Islam, M. Z., Kane, J., Krishnan, R., Lindenmayer, J. P., Potkin, S., & International Suicide Prevention Trial Study Group. (2003). Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Archives of General Psychiatry*, 60(1), 82–91. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.1.82>
- Meltzer, H. Y., & McGurk, S. R. (1999). The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 25(2), 233–255. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033376>
- Menus, Á., Kiss, Á., Tóth, K., Sirok, D., Déri, M., Fekete, F., Csukly, G., & Monostory, K. (2020). Association of clozapine-related metabolic disturbances with CYP3A4 expression in patients with schizophrenia. *Scientific Reports*, 10(1), 21283. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78474-0>
- Micsonai, A., Bulyáki, É., & Kardos, J. (2021). BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. *Methods in Molecular Biology*, 2199, 175–189. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11

- Mills, J. D., Ariëns, R. A. S., Mansfield, M. W., & Grant, P. J. (2002). Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 106(15), 1938–1942. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000033221.73082.06>
- Minić, S., Annighöfer, B., Hélyary, A., Hamdane, D., Hui Bon Hoa, G., Loupiac, C., Brûlet, A., & Combet, S. (2020). Effect of Ligands on HP-Induced Unfolding and Oligomerization of β -Lactoglobulin. *Biophysical Journal*, 119(11), 2262–2274. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.019>
- Minic, S. L., Milcic, M., Stanic-Vucinic, D., Radibratovic, M., Sotiroudis, T. G., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. Č. (2015). Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga Spirulina, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin. *RSC Advances*, 5(76), 61787–61798. <https://doi.org/10.1039/C5RA05534B>
- Minić, Simeon. (2017). *Struktura, biološka aktivnost i interakcije sa proteinama fikocijanobilina i hromopeptida C-fikocijanina iz cijanobakterije Arthrospira platensis* [Univerzitet u Beogradu]. <http://phaidrabi.bg.ac.rs/o:17149>
- Moghaddam, B., & Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: The glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(1), 4–15. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.181>
- Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., & DesJarlais, R. L. (2005). Docking: Successes and challenges. *Current Pharmaceutical Design*, 11(3), 323–333. <https://doi.org/10.2174/1381612053382106>
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Mosesson, M. W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 3(8), 1894–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- Nedić, O., Penezić, A., Minić, S., Radomirović, M., Nikolić, M., Ćirković Veličković, T., & Gligorijević, N. (2023). Food Antioxidants and Their Interaction with Human Proteins. *Antioxidants*, 12(4), 815. <https://doi.org/10.3390/antiox12040815>
- Nencini, F., Giurranna, E., Borghi, S., Taddei, N., Fiorillo, C., & Becatti, M. (2025). Fibrinogen Oxidation and Thrombosis: Shaping Structure and Function. *Antioxidants*, 14(4), 390. <https://doi.org/10.3390/antiox14040390>
- Nikolić-Kokić, A., Tatalović, N., Nestorov, J., Mijović, M., Mijusković, A., Miler, M., Oreščanin-Dušić, Z., Nikolić, M., Milošević, V., Blagojević, D., Spasić, M., & Miljević, Č. (2018). Clozapine, ziprasidone, and sertindole-induced morphological changes in the rat heart and their relationship to antioxidant enzymes function. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 81(17), 844–853. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1495587>
- Nordström, A. L., Farde, L., Nyberg, S., Karlsson, P., Halldin, C., & Sedvall, G. (1995). D1, D2, and 5-HT2 receptor occupancy in relation to clozapine serum concentration: A PET study of schizophrenic patients. *The American Journal of Psychiatry*, 152(10), 1444–1449. <https://doi.org/10.1176/ajp.152.10.1444>
- Nucifora, F. C., Mihaljevic, M., Lee, B. J., & Sawa, A. (2017). Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 14(3), 750–761. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0552-9>
- O'Connor, W. T., & O'Shea, S. D. (2015). Clozapine and GABA transmission in schizophrenia disease models: Establishing principles to guide treatments. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 47–80. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.005>

- Olesen, O. V., & Linnet, K. (1997). Metabolism of the tricyclic antidepressant amitriptyline by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. *Pharmacology*, 55(5), 235–243. <https://doi.org/10.1159/000139533>
- Ong, G., & Logue, S. E. (2023). Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants*, 12(5), 981. <https://doi.org/10.3390/antiox12050981>
- Paciullo, C. A. (2008). Evaluating the association between clozapine and venous thromboembolism. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 65(19), 1825–1829. <https://doi.org/10.2146/ajhp070638>
- Pezzoni, M., Pizarro, R. A., & Costa, C. S. (2018). Detection of Catalase Activity by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) in Cell Extracts from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio-Protocol*, 8(11), e2869. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2869>
- Pieters, M., & Wolberg, A. S. (2019). Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 3(2), 161–172. <https://doi.org/10.1002/rth.2.12191>
- 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. (2021). Effects of several atypical antipsychotics clozapine, sertindole or ziprasidone on hepatic antioxidant enzymes: Possible role in drug-induced liver dysfunction. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 84(4), 173–182. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1844827>
- Qubad, M., & Bittner, R. A. (2023). Second to none: Rationale, timing, and clinical management of clozapine use in schizophrenia. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 13, 20451253231158152. <https://doi.org/10.1177/20451253231158152>
- Rao, N. G., Pathania, A. R., Kour, H. D., Ballal, S., Singh, A., Bhowmik, A., & Zeru, B. A. (2025). Insights into the interaction of Fibrinogen with Timolol Maleate and elucidation of binding sites via. Spectroscopic and molecular docking study. *Scientific Reports*, 15(1), 31524. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-00929-z>
- Rawani, N. S., Chan, A. W., Dursun, S. M., & Baker, G. B. (2024). The Underlying Neurobiological Mechanisms of Psychosis: Focus on Neurotransmission Dysregulation, Neuroinflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction. *Antioxidants*, 13(6), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox13060709>
- Rehman, A. A., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2013). α -2-Macroglobulin: A physiological guardian. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1665–1675. <https://doi.org/10.1002/jcp.24266>
- Rehman, A. A., Sarwar, T., Arif, H., Ali, S. S., Ahsan, H., Tabish, M., & Khan, F. H. (2017). Spectroscopic and thermodynamic studies on ferulic acid – Alpha-2-macroglobulin interaction. *Journal of Molecular Structure*, 1144, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.034>
- Remington, G., Lee, J., Agid, O., Takeuchi, H., Foussias, G., Hahn, M., Fervaha, G., Burton, L., & Powell, V. (2016). Clozapine's critical role in treatment resistant schizophrenia: Ensuring both safety and use. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(9), 1193–1203. <https://doi.org/10.1080/14740338.2016.1191468>
- Reyes, Y. I. A., Janairo, G. C., & Franco, F. C. (2019). Theoretical insights on the binding of isoniazid to the active site residues of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *Tuberculosis*, 114, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.11.005>
- Riniker, S. (2018). Fixed-Charge Atomistic Force Fields for Molecular Dynamics Simulations in the Condensed Phase: An Overview. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(3), 565–578. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00042>

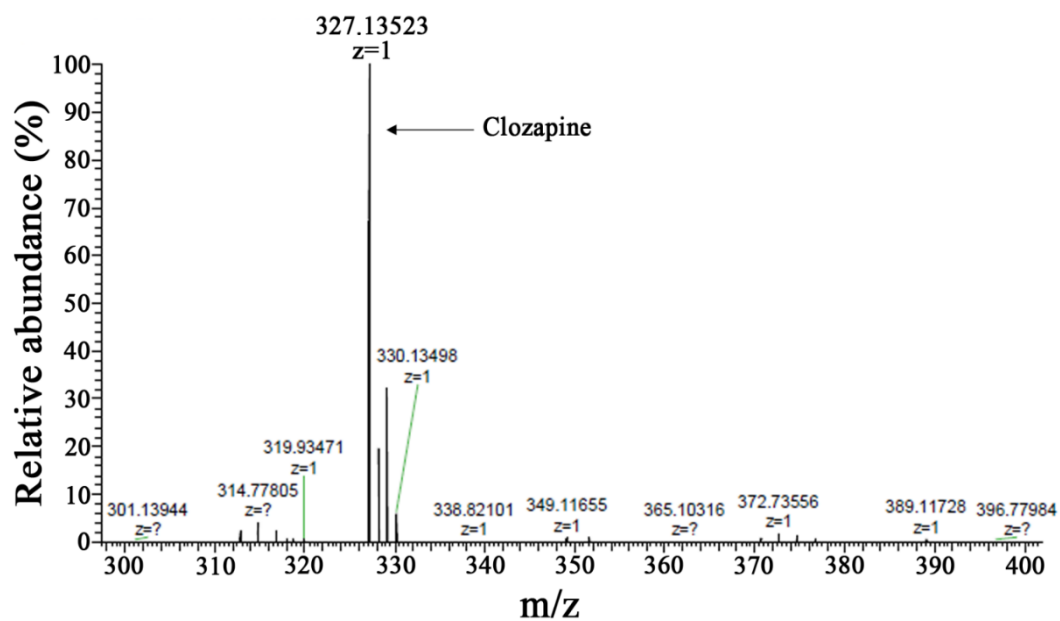
- Ronaldson, K. J., Fitzgerald, P. B., & McNeil, J. J. (2015). Clozapine-induced myocarditis, a widely overlooked adverse reaction. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 132(4), 231–240. <https://doi.org/10.1111/acps.12416>
- Rubio, J. M., & Kane, J. M. (2020). How and when to use clozapine. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 141(3), 178–189. <https://doi.org/10.1111/acps.13111>
- Saunders, R., Dyce, B. J., Vannier, W. E., & Haverback, B. J. (1971). The separation of alpha-2 macroglobulin into five components with differing electrophoretic and enzyme-binding properties. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(11), 2376–2383. <https://doi.org/10.1172/JCI106736>
- Schaller, J., Gerber, S., Kämpfer, U., Lejon, S., & Trachsel, C. (2008). *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470724378>
- Schmid, F. (2001). Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. In Wiley, *Encyclopedia of Life Sciences* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1038/ngp.els.0003142>
- Schwille, P., Bieschke, J., & Oehlenschläger, F. (1997). Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophysical Chemistry*, 66(2–3), 211–228. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(97\)00061-6](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(97)00061-6)
- Scott, E. M., Ariëns, R. A. S., & Grant, P. J. (2004). Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function: Relevance to clinical disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), 1558–1566. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000136649.83297.bf>
- Seeman, P. (2014). Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(1), 24–29. <https://doi.org/10.1021/cn400189s>
- Seeman, P., & Tallerico, T. (1999). Rapid release of antipsychotic drugs from dopamine D2 receptors: An explanation for low receptor occupancy and early clinical relapse upon withdrawal of clozapine or quetiapine. *The American Journal of Psychiatry*, 156(6), 876–884. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.6.876>
- Senn, H. M., & Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie*, 48(7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
- Siddiqui, T., Zia, M. K., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2020). Quercetin-induced inactivation and conformational alterations of alpha-2-macroglobulin: Multi-spectroscopic and calorimetric study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 38(14), 4107–4118. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1671232>
- Siddiqui, T., Zia, M. K., Ali, S. S., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2019). Inactivation of Alpha-2-Macroglobulin by Photo-Illuminated Gallic Acid. *Journal of Fluorescence*, 29(4), 969–979. <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02410-3>
- Singh, T., Hasan, M., Gaule, T. G., & Ajjan, R. A. (2025). Exploiting the Molecular Properties of Fibrinogen to Control Bleeding Following Vascular Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1336. <https://doi.org/10.3390/ijms26031336>
- Sinha, S., Tam, B., & Wang, S. M. (2022). Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes*, 12(9), 844. <https://doi.org/10.3390/membranes12090844>
- Siskind, D., Sharma, M., Pawar, M., Pearson, E., Wagner, E., Warren, N., & Kisely, S. (2021). Clozapine levels as a predictor for therapeutic response: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 144(5), 422–432. <https://doi.org/10.1111/acps.13361>
- Smejkal, G. B., & Kakumanu, S. (2019). Enzymes and their turnover numbers. *Expert Review of Proteomics*, 16(7), 543–544. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1630275>

- Sottrup-Jensen, L. (1989). Alpha-macroglobulins: Structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11539–11542.
- Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252–260. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4880>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273–343. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Straight, D. L., & McKee, P. A. (1982). Effect of protease binding by alpha 2-macroglobulin on intrinsic fluorescence. *Biochemistry*, 21(19), 4550–4556. <https://doi.org/10.1021/bi00262a006>
- Šunderić, M., Gligorićević, N., Milčić, M., Minić, S., Nedić, O., & Nikolić, M. (2024). Phycocyanobilin is a new binding partner of human alpha-2-macroglobulin that protects the protein against oxidative stress. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 42(17), 8761–8771. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2248273>
- Šunderić, M., Šukalović, V., Penezić, A., Nikolić, M. R., Nedić, O., Minić, S., Četić, D., & Gligorićević, N. (2026a). Binding of the commonly used antioxidants (quercetin, resveratrol, and dihydrolipoic acid) to major circulating proteins—Spectroscopic and in silico docking and molecular dynamic simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 44(5), 2550–2562. <https://doi.org/10.1080/07391102.2025.2460087>
- Šunderić, M., Šukalović, V., Penezić, A., Nikolić, M. R., Nedić, O., Minić, S., Četić, D., & Gligorićević, N. (2026b). Binding of the commonly used antioxidants (quercetin, resveratrol, and dihydrolipoic acid) to major circulating proteins—Spectroscopic and in silico docking and molecular dynamic simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 44(5), 2550–2562. <https://doi.org/10.1080/07391102.2025.2460087>
- Sur, C., Mallorga, P. J., Wittmann, M., Jacobson, M. A., Pascarella, D., Williams, J. B., Brandish, P. E., Pettibone, D. J., Scolnick, E. M., & Conn, P. J. (2003). N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13674–13679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835612100>
- Thomas, A. A., & Friedman, J. H. (2010). Current use of clozapine in Parkinson disease and related disorders. *Clinical Neuropharmacology*, 33(1), 14–16. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181c47168>
- Thorn, C. F., Müller, D. J., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2018). PharmGKB summary: Clozapine pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenetics and Genomics*, 28(9), 214–222. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000347>
- Tilley, D., Levit, I., & Samis, J. A. (2011). Development of a microplate coagulation assay for Factor V in human plasma. *Thrombosis Journal*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1477-9560-9-11>
- Trainor, G. L. (2007). The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(1), 51–64. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.1.51>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010a). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010b). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

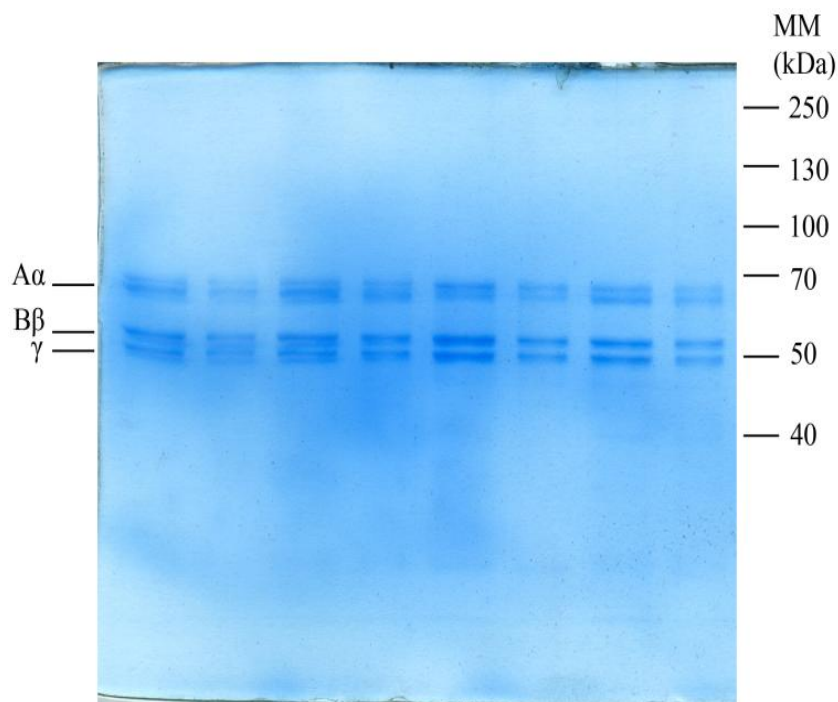
- Undas, A., & Ariëns, R. A. S. (2011a). Fibrin clot structure and function: A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), e88-99. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230631>
- Undas, A., & Ariëns, R. A. S. (2011b). Fibrin clot structure and function: A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), e88-99. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230631>
- Uzelac, T. N., Nikolić-Kokić, A. L., Spasić, S. D., Mačvanin, M. T., Nikolić, M. R., Mandić, L. M., & Jovanović, V. B. (2019). Opposite clozapine and ziprasidone effects on the reactivity of plasma albumin SH-group are the consequence of their different binding properties dependent on protein fatty acids content. *Chemico-Biological Interactions*, 311, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108787>
- Vandooren, J., & Itoh, Y. (2021). Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections. *Frontiers in Immunology*, 12, 803244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244>
- Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372–35381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503991200>
- Vilar, R., Fish, R. J., Casini, A., & Neerman-Arbez, M. (2020). Fibrin(ogen) in human disease: Both friend and foe. *Haematologica*, 105(2), 284–296. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.236901>
- Wagstaff, A. J., & Bryson, H. M. (1995). Clozapine: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Patients with Schizophrenia Who Are Unresponsive to or Intolerant of Classical Antipsychotic Agents. *CNS Drugs*, 4(5), 370–400. <https://doi.org/10.2165/00023210-199504050-00006>
- Walker, A. M., Lanza, L. L., Arellano, F., & Rothman, K. J. (1997). Mortality in current and former users of clozapine. *Epidemiology*, 8(6), 671–677. <https://doi.org/10.1097/00001648-199710000-00010>
- Wang, R., Zhang, L., Wang, R., Dou, H., Li, H., Wang, Y., Pu, J., & Wang, R. (2013). Spectroscopic study on the interaction of catalase with bifendate and analogs. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.10.039>
- Weiner, D. M., Meltzer, H. Y., Veinbergs, I., Donohue, E. M., Spalding, T. A., Smith, T. T., Mohell, N., Harvey, S. C., Lamah, J., Nash, N., Vanover, K. E., Olsson, R., Jayathilake, K., Lee, M., Levey, A. I., Hacksell, U., Burstein, E. S., Davis, R. E., & Brann, M. R. (2004). The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylozapine in the unique clinical effects of clozapine. *Psychopharmacology*, 177(1–2), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1940-5>
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2017). Fibrin Formation, Structure and Properties. *Sub-Cellular Biochemistry*, 82, 405–456. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13
- Williams, J. C., Harowitz, J., Glover, J., Tek, C., & Srihari, V. (2020). Systematic review of racial disparities in clozapine prescribing. *Schizophrenia Research*, 224, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.07.023>
- Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>

- Wolberg, A. S. (2010). Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 16 Suppl 3, 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02253.x>
- Wolberg, A. S. (2023). Fibrinogen and fibrin: Synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 21(11), 3005–3015. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.08.014>
- Woodbury, W., Spencer, A. K., & Stahman, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 301–305. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7)
- Wu, Y. (2007). Study on the interaction between salicylic acid and catalase by spectroscopic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(3), 796–801. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.016>
- Xu, Q., Lu, Y., Jing, L., Cai, L., Zhu, X., Xie, J., & Hu, X. (2014). Specific binding and inhibition of 6-benzylaminopurine to catalase: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking study. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 123, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.021>
- Yang, A. C., & Tsai, S.-J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>
- Yang, B., Hao, F., Li, J., Chen, D., & Liu, R. (2013). Binding of chrysoidine to catalase: Spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 128, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.006>
- Yang, Y., & Li, D. (2016). Investigation on the interaction between isorhamnetin and bovine liver catalase by spectroscopic techniques under different pH conditions. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 31(5), 1130–1137. <https://doi.org/10.1002/bio.3082>
- Yekta, R., Dehghan, G., Rashtbari, S., Sheibani, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 30(12). <https://doi.org/10.1002/jmr.2648>
- Ying, J., Chew, Q. H., McIntyre, R. S., & Sim, K. (2023). Treatment-Resistant Schizophrenia, Clozapine Resistance, Genetic Associations, and Implications for Precision Psychiatry: A Scoping Review. *Genes*, 14(3), 689. <https://doi.org/10.3390/genes14030689>
- Yuen, J. W. Y., Kim, D. D., Procyshyn, R. M., Panenka, W. J., Honer, W. G., & Barr, A. M. (2021). A Focused Review of the Metabolic Side-Effects of Clozapine. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 609240. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.609240>
- Zaman, M., Nusrat, S., Zakariya, S. M., Khan, M. V., Ajmal, M. R., & Khan, R. H. (2017). Elucidating the interaction of clofazimine with bovine liver catalase; a comprehensive spectroscopic and molecular docking approach. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 30(8). <https://doi.org/10.1002/jmr.2619>
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1527–1548. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
- Zhang, B., Li, M., Wang, Q., & Zhai, A. (2019). Exploring adverse effects of puerarin on catalase by multiple spectroscopic investigations and docking studies in vitro. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(5), e22296. <https://doi.org/10.1002/jbt.22296>

- Zhou, L., Zhou, H., Xiao, H., Zhang, Z., Xiong, Z., Tuo, X., & Guo, H. (2022). Elucidation on inhibition and binding mechanism of bovine liver catalase by nifedipine: Multispectroscopic analysis and computer simulation methods. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 37(9), 1547–1556. <https://doi.org/10.1002/bio.4330>
- Zia, M. K., Siddiqui, T., Ahsan, H., & Khan, F. H. (2022). Characterization of the binding between anti-tumor drug 5-fluorouracil and human alpha-2-macroglobulin: Spectroscopic and molecular docking analyses. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 40(17), 7949–7959. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1905550>
- Zou, L., Mi, C., Yu, H., Gu, W., & Teng, Y. (2017). Characterization of the interaction between triclosan and catalase. *RSC Advances*, 7(15), 9031–9036. <https://doi.org/10.1039/C6RA26431J>
- Zsila, F. (2013). Circular dichroism spectroscopic detection of ligand binding induced subdomain IB specific structural adjustment of human serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 117(37), 10798–10806. <https://doi.org/10.1021/jp4067108>

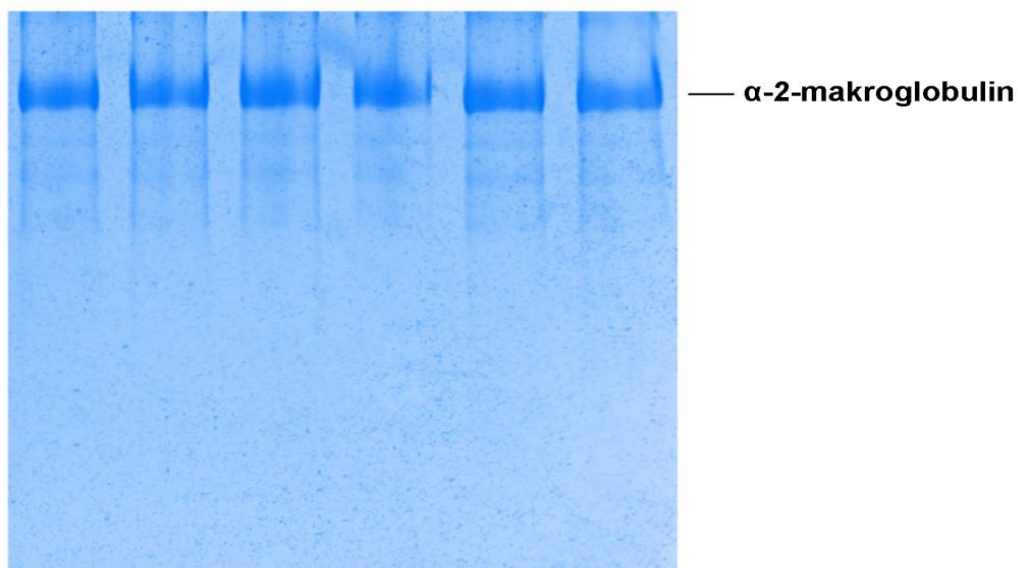
PRILOG 1. Provera čistoće klozapina.

Maseni spektar klozapina.

PRILOG 2. Provera čistoće fibrinogena.

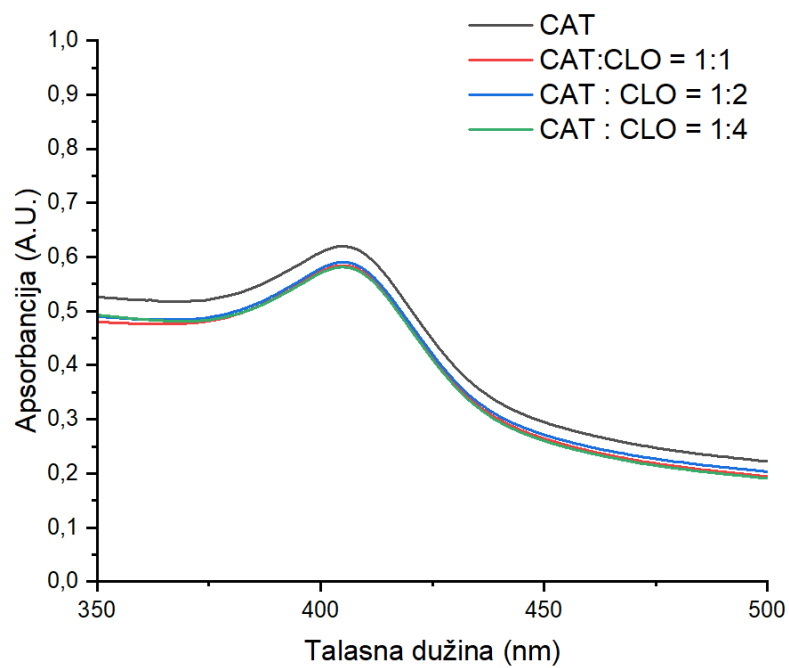
10% AA gel, redukujući uslovi.

PRILOG 3. Provera čistoće alfa-2-makroglobulina.



5% AA gel, nativni uslovi.

PRILOG 4. Soretova traka (uveličano) za sistem CAT:CLZ.



Biografija autora

Tamara Vasović rođena je 29. jula 1991. godine u Pančevu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Tokom školovanja bila je član Regionalnog centra za talente „Mihajlo Pupin”.

Osnovne akademske studije završila je 2016. godine, a master akademske studije biohemije 2017. godine na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu. Nakon toga upisala je doktorske akademske studije iz oblasti biohemije.

Od 2018. godine zaposlena je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, u Laboratoriji za masenu spektrometriju. Njeno naučnoistraživačko i stručno angažovanje usmereno je na primenu masene spektrometrije visoke rezolucije i proteomičkih pristupa u identifikaciji i karakterizaciji proteina, peptida i drugih biološki značajnih molekula. Posebno se bavi ispitivanjem interakcija proteina sa malim, biološki aktivnim molekulima, promena u strukturi, stabilnosti i funkciji proteina, kao i povezivanjem spektroskopskih, biohemijskih i in silico metoda u karakterizaciji ovih sistema. Deo njenog naučnog rada obuhvata razvoj i primenu analitičkih pristupa u istraživanjima alergena, rekombinantnih proteina i potencijalnih biomarkera, kao i ispitivanje interakcija mikro- i nanoplastike sa proteinima i drugim komponentama bioloških sistema.

Učestvovala je u realizaciji više domaćih i međunarodnih projekata, među kojima su FoodEnTwin, CAPSIDO, PoC-5894 i IMPTOX. U okviru projekta FoodEnTwin učestvovala je u organizaciji naučnih skupova, radionica i škola, a tri meseca je boravila na stručnom usavršavanju na Univerzitetu KU Leuven u Belgiji.

Učestvovala je u izvođenju teorijskih i eksperimentalnih vežbi na predmetu Instrumentalne metode u biohemiji (434B1), kao i u obuci studenata i mladih istraživača za rad na instrumentima masene spektrometrije visoke rezolucije i pripremu proteinskih uzoraka.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Srpskog udruženja za proteomiku. Dobitnica je stipendije Federacije evropskih biohemijskih društava (FEBS) za učešće na Forumu mladih naučnika 2021. godine, kao i FEBS stipendija za učešće na kongresima 2021. i 2022. godine.

Prema podacima baze Scopus, koautorka je 20 naučnih radova. Njen ORCID identifikator je 0000-0001-6119-7220.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Tamara B. Vasović

Broj indeksa: DB02/2017

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Karakterizacija i efekti interakcija atipičnog antipsihotika klozapina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom, u simuliranim fiziološkim uslovima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Tamara B. Vasović

Broj indeksa: DB02/2017

Studijski program Biohemija

Naslov rada: **Karakterizacija i efekti interakcija atipičnog antipsihotika klopazina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom, u simuliranim fiziološkim uslovima**

Mentori: dr Milan Nikolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet i dr Nikola Gligorijević. Viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, institut od nacionalnog značaja

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu,

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija i efekti interakcija atipičnog antipsihotika klopapina sa katalazom, alfa-2-makroglobulinom i fibrinogenom, u simuliranim fiziološkim uslovima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo - bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Potpis autora

U Beogradu,

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.