



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Стефан Д. Стојановић

ИСПИТИВАЊЕ ВЕЗИВАЊА ТИГЕЦИКЛИНА ЗА ХУМАНИ
СЕРУМСКИ АЛБУМИН И ИНТЕРАКЦИЈЕ СА ЈОНИМА
МЕТАЛА И ФЛУОРОХИНОЛОНИМА – *IN VITRO*
СТУДИЈА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2018. године

Ову докторску дисертацију посвећујем породици, мајци Славици, оцу Драгану, сестри Јовани и девојци Татјани као и фамилији, која ми је пружала сву неопходну подршку да истрајем при изради исте. Такође, дисертацију посвећујем деди Миловану и баби Видосави као и покојним члановима моје породице, деди Бративоју, бабама Јованки и Милосави, који нису дочекали моје највеће успехе.

Искрено се захваљујем свом ментору, проф. др Ратомиру М. Јелићу, који ме је научио методама, руководио истраживањем, усмеравао и пружио ми несебичну помоћ током израде и писања дисертације. Захваљујем се на указаном поверењу, разумевању и свестраној подршци током спровођења овог истраживања.

Посебну захвалност дугујем проф. др Слободану М. Јанковићу који је предложио тему дисертације, увео ме у предивни свет фармације и допринео да начиним своје прве научно-истраживачке кораке. Захваљујем се на пренесеном знању током основних и докторских студија, свим корисним саветима и сугестијама.

Захваљујем се и члановима комисије, проф. др Зорану Матовићу и проф. др Гордани Поповић, на великом напору који су уложили у побољшање квалитета овог истраживања, драгоцену помоћ у спровођењу молекулског моделирања и прегледу рукописа докторске дисертације.

Захваљујем се асистентима са Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Ивану Јаковљевићу и др Емини Мркалић, на помоћи током извођења експеримената у лабораторијама.

На крају, свим колегама и пријатељима бескрајно хвала на великој подршци!

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Основни принцип везивања лека и протеина	3
1.2. Везивање лекова за протеине плазме	5
1.2.1. Компетитивно везивање лекова за протеине плазме	7
1.3. Хумани серумски албумин	8
1.3.1. Структура хуманог серумског албумина	10
1.3.2. Физиолошке улоге хуманог серумског албумина	13
1.3.2.1. Одржавање колоидно-осмотског притиска	13
1.3.2.2. Транспорт	14
1.3.2.3. Скупљање слободних радикала	14
1.3.2.4. Одржавање киселинско-базне равнотеже	15
1.3.2.5. Инфламаторни и антиинфламаторни ефекти	16
1.3.2.6. Капиларна пропустљивост	16
1.3.2.7. Реолошке промене, лепљење и активација неутрофила	17
1.3.2.8. Сигнални процеси у ћелији	17
1.3.2.9. Коагулација и хемостатски ефекти	17
1.3.2.10. Везивање лекова и фармаколошке интеракције	18
1.3.3. Везујућа места у хуманом серумском албумину	18
1.3.3.1. Место I	20
1.3.3.2. Место II	22
1.3.3.3. Додатна места	22
1.3.3.4. Cys34	23
1.3.3.5. Везујућа места за јоне метала	24
1.3.4. Интеракције на нивоу везивања за хумани серумски албумин	24
1.3.4.1. Лек-лек интеракције	24
1.3.4.2. Лек-ендогена супстанца интеракције	25
1.3.4.3. Утицај јона метала на везивање за хумани серумски албумин	27
1.3.5. Флуорофоре хуманог серумског албумина	28
1.3.5.1. Унутрашња флуоресценција	28
1.3.5.2. Спољашња флуоресценција	29

1.4. Тетрациклини	30
1.4.1. Тигециклин	34
1.5. Флуорохинолони	39
1.5.1. Ципрофлоксацин	42
1.5.2. Спарфлоксацин	43
1.5.3. Левофлоксацин	43
1.6. Технике за проучавање везивања лекова за албумине	44
1.6.1. Флуоресцентна спектроскопија	45
1.6.1.1. Процеси апсорпције и емисије светлости – Јаблонски дијаграм.....	46
1.6.1.2. Ефекат унутрашњег филтера.....	48
1.6.1.3. Механизми гашења флуоресценције	49
1.6.2. UV-Vis спектрофотометрија	50
1.6.3. AutoDock анализа	52
1.7. Значај истраживања и преглед литературе	54
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	56
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	59
3.1. Дизајн студије	60
3.2. Хемикалије и реагенси	60
3.3. Припремање фосфатног пуфера	60
3.4. Апарати	61
3.5. Снимање флуоресцентних и апсорпционих спектра	61
3.6. Испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин	62
3.7. Испитивање компетитивног везивања тигециклина са маркерима везујућих места	62
3.8. Поступак молекулског докинга тигециклина са хуманим серумским албумином	62
3.9. Испитивање утицаја јона метала на везивање тигециклина за хумани серумски албумин	64
3.10. Испитивање утицаја флуорохинолона на везивање тигециклина за хумани серумски албумин	64
3.11. Испитивање утицаја тигециклина на везивање флуорохинолона за хумани серумски албумин	64
3.12. Математичка обрада података	64

4. РЕЗУЛТАТИ	65
4.1. Везивање тигециклина за хумани серумски албумин	66
4.1.1. Гашење флуоресценције хуманог серумског албумина тигециклином.....	66
4.1.2. Константа везивања и број везујућих места	69
4.1.3. Термодинамички параметри и природа везујућих сила	71
4.1.4. Трансфер енергије са хуманог серумског албумина на тигециклин	72
4.1.5. Апсорпциона спектроскопија.....	74
4.1.6. Стехиометрија и константа стабилности	76
4.2. Компетитивно везивање тигециклина са маркерима везујућих места.....	77
4.3. Молекулски докинг тигециклина са хуманим серумским албумином.....	82
4.4. Утицај јона метала на везивање тигециклина за хумани серумски албумин	87
4.5. Утицај флуорохинолона на везивање тигециклина за хумани серумски албумин	90
4.6. Утицај тигециклина на везивање флуорохинолона за хумани серумски албумин	96
5. ДИСКУСИЈА	106
6. ЗАКЉУЧАК	121
7. ЛИТЕРАТУРА	124

1. УВОД

Последњих година, успон фармацеутске индустрије и развој нових лекова су довели до много већег интересовања истраживача за испитивање везивања лекова за протеине плазме. Оно је постало важан предмет великог броја савремених научних истраживања у медицини и фармацији. С обзиром да су стварни волумен дистрибуције и концентрација лека на месту везивања за рецептор повезани са количином неvezаног дела лека, потпуна карактеризација механизма везивања лекова за протеине плазме је постала неопходан корак за разумевање фармакокинетичког, фармакодинамичког и токсиколошког профила сваког лека.

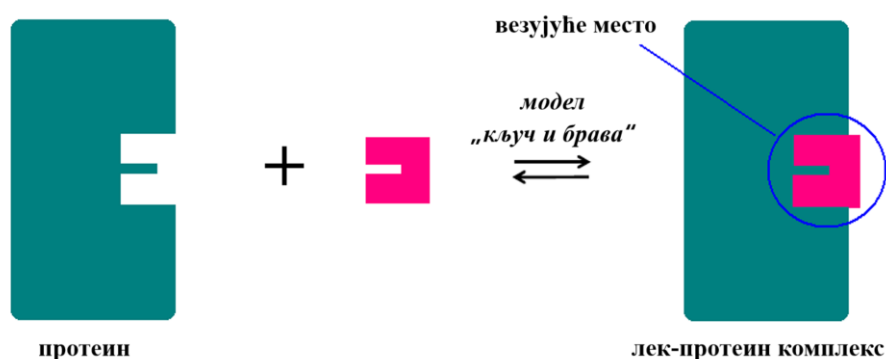
У оквиру протеина плазме, хумани серумски албумин је без сумње најважнији транспортер лекова и других малих молекула. Везивање за хумани серумски албумин је често веома специфично, барем за ниске или терапијске концентрације лекова. Два везујућа места у хуманом серумском албумину, место I и II, по класификацији Гаила Судлова (Gail Sudlow) и сарадника, укључена су у везивање невероватно великог броја класа једињења. Анализа кристалне структуре албумина је показала да су ова два главна везујућа места хидрофобне шупљине у субдоменима IIА и IIIА. Истовремена примена два лека може довести до конкуренције на нивоу везивања за албумин, која може значајно утицати на диспозицију оба лека, са могућим озбиљним физиолошким последицама. Због својих карактеристика, хумани серумски албумин је јединствени модел протеина за квантитативно и квалитативно проучавање протеин-лек интеракција.

Тигециклин је новији антибиотик који је структурно изведен из миноциклина. Познато је да тигециклин има знатно већи волумен дистрибуције у односу на друге тетрациклине (>10 L/kg) и да се везује за протеине плазме око 68%. Све већа примена овог лека у болничким условима је довела до неопходности да се изврши испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин, које до сада није спроведено.

Циљеви ове докторске дисертације су да се изврши карактеризација механизма везивања тигециклина за хумани серумски албумин и да се одреде константе везивања, капацитет везивања, термодинамички параметри и природа везујућих сила. Неопходно је утврдити механизам флуоресцентног гашења, проценити ефекат трансфера енергије, израчунати растојање везивања и идентификовати везујуће место за тигециклин у хуманом серумском албумину. Поред тога, додатни циљеви су да се процени утицај јона метала и флуорохинолона на везивање тигециклина за хумани серумски албумин. Такође, потребно је проценити и супротан ефекат, тј. утицај тигециклина на везивање флуорохинолона за хумани серумски албумин.

1.1. Основни принцип везивања лека и протеина

Сваки лек који се користи за лечење или за научно истраживање, мора да делује селективно на одређене ћелије или ткива. Другим речима, лек мора да покаже висок степен специфичности за циљно место везивања. Обрнуто, протеини који делују као циљеви за везивање лека, испољавају висок степен специфичности за одређене лиганде. Они препознају само лиганде тачно одређеног типа, а не препознају друге сличне молекуле. Овај основни принцип молекулског везивања се најчешће објашњава помоћу модела „кључ и брава“ [1]. Узајамна (комплементарна) специфичност лека и везујућег места (видети Сliku 1), која даје протеинима својство врло прецизног молекулског препознавања, важна је за разумевање многих феномена у фармакологији. Није претерано рећи да је способност протеина да ступају у интеракције са другим молекулима (укључујући ту и друге протеине), основа функционисања свих живих система. Треба нагласити да се ниједан лек не везује потпуно специфично, тј. поред примарног, постоје и друга значајна везујућа места лека (неспецифично везивање) [2].



Слика 1. Везивање лека и протеина. Специфично препознавање лека и протеина: комплементарност површине молекула лека и везујућег места на протеину.

Већина лекова има молекулску масу између 200-1000 Da, а најчешће лек-протеин интеракције су до сада забележене код лекова мањих димензија (молекулска маса <1000 Da) [3]. Први корак у везивању лека за протеин (макромолекул) јесте формирање једног реверзибилног комплекса лек-протеин, што представља реакцију која се одиграва у складу са законом о дејству маса. Лек и протеин увек теже да постигну равнотежно стање у коме ће брзина везивања лека за протеин бити једнака брзини разградње комплекса лек-протеин. Реакција се приближно може посматрати као једноставно удруживање молекула лека са ограниченим бројем везујућих места на протеину, што је аналогно интеракцији лек-рецептор.

Ако је $[L]$ концентрација слободног лека, $[P]$ концентрација слободних везујућих места на протеину, а $[LP]$ концентрација комплекса лек-протин, на основу закона о дејству маса (који каже да је брзина хемијске реакције пропорционална производу концентрација реактаната) равнотежа се постиже када је $v_1 = v_2$.



Како је $v_1 = k_1[L][P]$, а $v_2 = k_2[LP]$, у равнотежном стању је:

$$k_1[L][P] = k_2[LP] \quad (2)$$

Што се може приказати и као:

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{[L][P]}{[LP]} \quad (3)$$

где је однос k_2/k_1 константан и означава се са K_d , а представља константу дисоцијације лек-протеин комплекса. Константа дисоцијације је карактеристика лека и везујућег места на протеину. Она има димензије концентрације и бројчано је једнака концентрацији лека која је потребна да заузме 50% везујућих места у стању равнотеже. Треба нагласити да је афинитет способност лека да се веже за везујућа места на протеину, тј. афинитет је мера вероватноће да ће се лек везати за везујуће место. Што је афинитет лека за везујуће место већи, то је мања концентрација при којој се постиже дати ниво заузетости везујућих места. Јачина везивања лека за протеине може бити окарактерисана константом дисоцијације K_d или константом асоцијације K_a . Веза између ове две константе је $K_d = 1/K_a$ [2, 4].

Ако је $[P_u]$ укупна концентрација слободних везујућих места на протеину (и заузетих и слободних), онда је:

$$[P] = [P_u] - [LP] \quad (4)$$

Ако ово заменимо у једначини (3), добијамо:

$$K_d = \frac{[L]([P_u] - [LP])}{[LP]} \quad (5)$$

Даљом трансформацијом једначине добија се:

$$\frac{[LP]}{[P_u]} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (6)$$

Сваки процес откривања лека има циљ да развије лек високог афинитета (било да је то агонист/антагонист или инхибитор) за она везујућа места у организму која могу да модификују одређену болест. Пошто је K_d лека уско повезана са његовом биолошком активношћу, оправдано је одређивање јачине везивања лекова за протеине плазме [4].

1.2. Везивање лекова за протеине плазме

Крв представља двофазни систем који се састоји од уобличених елемената крви и крвне плазме. Крвна плазма је течни део крви у коме су суспендовани уобличени елементи. Она представља прави раствор електролита и малих органских молекула (глукоза и аминокиселине нпр.), колоидни раствор протеина и суспензију липида у води која чини око 90%, 9% је органског састава: протеини, аминокиселине и хормони, и 1% неорганских соли. Плазма је бистрожућкасте боје која потиче од присуства билирубина (до 20 $\mu\text{mol/L}$). Опалесцентност плазме зависи од присуства липида, пре свега у форми хиломикрона. Међутим, њена релативна густина (1,025-1,034) је мања него код крви (1,050-1,060), док је вискозност 1,5-2 пута већа од вискозности воде, а око 2 пута мања од вискозности крви. Протеини плазме су код човека заступљени у више од 100 различитих врста, а њихова концентрација износи 60-80 g/L. Око 80% протеина плазме се синтетише у јетри, а осталих 20% у плазма ћелијама. Протеини плазме су у динамичкој равнотежи са протеинима интерстицијума, где је њихова концентрација знатно мања (10-20 g/L). На пример, тако се 4-5% албумина плазме у току једног сата измени са албуминима интерстицијумског простора, а овај фактор се назива транскапиларна стопа ослобађања. Полувреме задржавања албумина у плазми износи 15-20 дана [5].

После апсорпције или интравенске ињекције лекови се најпре дистрибуирају у крви, а одатле се затим брзо разносе по целом организму. Лек се у целокупној крви разблажи током једног минута, јер срце одраслог човека приликом сваке систоле убаци у крвоток приближно 70 mL крви, односно око 5 L у минути. При терапијским концентрацијама, многи лекови су присутни у плазми углавном у везаном облику. Процент везане фракције лека често је врло значајан и за неке лекове износи више од 90% укупне количине лека у крви. Фракција слободног (невезаног) лека раствореног у

воденој средини може бити и испод 1%, док је остатак везан за протеине плазме. Слободан лек је фармаколошки активан. Слободни молекули лека су једино у стању да дифундују кроз капиларе у ткиво, и представљају ефикасну концентрацију лека у крви и ткиву [2].

Најзначајнији протеин плазме је хумани албумин и за њега се везују многи кисели лекови (на пример варфарин, нестероидни антиинфламаторни лекови, сулфонамиди) и мањи број базних лекова (на пример трициклични антидепресиви, хлорпромазин). Комплекс који граде албумини са молекулима лека представља неку врсту депоа, из којег се лек постепено ослобађа, чим се у плазми смањи концентрација његових слободних молекула услед преласка у ткива или због разградње и излучивања. На тај начин се одржава динамичка равнотежа. Заправо, диполи воде теже да истисну све липосолубилне лекове, тако да се они увек у високом проценту везују за протеине плазме (најчешће албумине) који обилују хидрофобним доменима. Лек који је везан за протеин плазме не испољава своје фармаколошко дејство јер није у близини свог рецептора. Остали протеини плазме, укључујући β -глобулин и α_1 -кисели гликопротеин, чији је ниво повећан у инфламаторним обољењима, такође су укључени у везивање неких базних лекова, као што је хинин [4, 6, 7].

Степен везивања лека за протеине зависи од три фактора:

- концентрације слободног лека,
- афинитета за везујуће место на протеину,
- концентрације протеина.

Концентрација хуманог албумина у плазми је око 0,6 mmol/L (4 g/100 mL). Са два везујућа места по молекулу, капацитет хуманог албумина за везивање лекова био би око 1,2 mmol/L. За већину лекова, укупна концентрација у плазми потребна за терапијски ефекат много је мања од 1,2 mmol/L, па су при уобичајеним терапијским дозама везујућа места далеко од сатурације (засићења), а концентрација везаног лека $[LP]$ се мења приближно пропорционално са концентрацијом слободног лека $[L]$. Под овим условима, фракција везаног лека $[LP]/([L] + [LP])$, не зависи од концентрације лека. Међутим, код неких лекова постоји изузетак, на пример толбутамид и неки сулфонамиди, испољавају своје деловање при концентрацијама у плазми при којима се везивање за протеине приближава засићењу. То значи да ће даљим порастом концентрације лека у плазми концентрација слободног лека расти непропорционално.

Дакле, у оваквим условима, удвостучење дозе лека може више него двоструко повећати концентрацију слободне (фармаколошки активне) фракције лека [2, 4].

1.2.1. Компетитивно везивање лекова за протеине плазме

Везивање лекова за протеине плазме је најчешће неспецифично. Молекули лека везани за хумане албумине могу се одатле потиснути применом другог лека који има већи афинитет за иста везујућа места на албумину. За везујућа места на албумину се могу везати различити лекови, тако да се међу њима може јавити конкуренција. Због тога примена лека Б може смањити везивање лека А за албумине и тако довести до повећања концентрације слободне фракције лека А (што значи да се повећава и интензитет ефекта лека А). Да би дошло до ове појаве, лек Б мора заузети значајан број везујућих места. Мали број лекова који се користе у терапији утичу на везивање других лекова јер, при терапијским концентрацијама у плазми, лекови заузимају мали број расположивих везујућих места.

На везивање лекова за протеине плазме могу утицати и нека патолошка стања. На пример, код пацијената са уремијом, смањује се везивање лекова слабих киселина за протеине плазме (пеницилин, салицилати, барбитурати, сулфонамиди). Такође, лекови могу потиснути ендogene супстанце које се нормално везују за протеине плазме. На пример, сулфонамиди потискују билирубин са везујућих места на албумину и могу појачати жутицу код новорођенчета и довести до нагомилавања овог пигмента у једрима мозга (*kernicterus*). Фенилбутазон, на пример, у значајном степену потискује дикумарол, који се у високом проценту везује за албумине плазме. Нагло повећање концентрације активног дикумарола проузрокује снижење протромбина у крви испод жељеног нивоа, што је обично праћено нежељеним крварењима у кожи и слузницама.

Варфарин се нормално везује за албумине плазме око 98%, а само 2% остаје у слободном облику од кога зависи терапијски користан антикоагулант ефекат. Ако се са места везивања, применом фуросемида или оксифенбутазона, истисне још само 2% варфарина, онда ће се фармаколошки ефекат варфарина удвостручити. Ово ће бити довољно да проузрокује изразиту хипопротромбинемију која може бити узрок тешких па и смртоносних крварења (нпр. крварење у мозгу). До сада је овај тип интеракција често испитиван са аспекта неочекиваних последица у клиничкој пракси, али је њихов значај много мањи него што се некада сматрало [2, 4, 7].

1.3. Хумани серумски албумин

Хумани серумски албумин (ХСА) је главни екстрацелуларни протеин у крвној плазми. Његова важна физиолошка функција се састоји у складиштењу (депоновању) и транспорту широког спектра ендогених и егзогених једињења. Релативна лакоћа са којом ХСА може бити изолован и пречишћен одређује његову употребу, као јединственог модела протеина за проучавање лиганд-протеин интеракција. ХСА може послужити као средство за складиштење лека, контролу ослобађања лека до ткивних рецептора и спречавање брзог метаболизма лека. Због своје доступности, ниске цене и необичне способности за везивање различитих лиганата, хумани серумски албумин је постао један од најдетаљније испитаних и примењених протеина у биохемији [8-10].

Реверзибилно везивање лиганата за ХСА је често стереоселективно. Поред тога, енантоселективно везивање се може једноставно објаснити уколико је лек хиралан, јер два диастереомерна производа формирана између појединачних енантиомера и протеина могу имати различиту стабилност. Када је оваква ситуација, појединачни енантиомери делују као различита једињења, а њихов метаболизам, дистрибуција, и елиминација могу бити сасвим другачији. Ова околност може имати аналитичку и препаративну вредност, јер имобилисани ХСА се може искористити за раздвајање изомера лекова, који често имају различиту биолошку ефикасност. Албумин се такође користи у екстракорпоралном уклањању ендогених токсина и у лечењу предозирања наркотицима [11, 12].

Дуги низ година се за надокнаду волумена изгубљене крви као и за надокнаду изгубљених протеина плазме (нпр. код опекотина, нефротског синдрома и сл.) користе концентрати албумина (концентровани раствори) који су издвојени из крви. Овакви препарати се најчешће праве у концентрацијама од 5% и 20%. Када се примени укупно 25 g албумина, постижемо осмотски еквивалент за 500 mL плазме. Важно је нагласити да је главна предност албумина у односу на плазму у немогућности преношења вируса хепатитиса [4].

Издавање албумина из крви се изводи под контролисаним условима, посебно рН вредности, јонске јачине и температуре тако да је у финалном производу садржај албумина најмање 95% укупних протеина. Раствор хуманог албумина се припрема као концентровани раствор који садржи од 150 g/L до 250 g/L укупних протеина, или као изотонични раствор који садржи од 35 g/L до 50 g/L укупних протеина. Може да се дода погодан стабилизатор против ефекта загревања, као што су натријум-каприлат (натријум-октанат) или *N*-ацетилтриптофан или комбинација ова два у одговарајућој

концентрацији, али се не додају конзерванси ни у једној фази припреме. Раствор се пропушта кро бактериолошки филтер и дистрибуира асептички у стерилне посуде, које се затим затварају да би се спречила контаминација. Раствор се у финалној посуди загрева до $60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и одржава на овој температури најмање 10 часова. Посуде се након тога стављају у инкубатор на 30°C до 32°C и држе најмање 14 дана, или на 20°C до 25°C најмање 4 недеље, а затим се испитују визуелно на присуство микробиолошке контаминације [13].

Код здравих одраслих особа албумин се синтетише у полизомима везаним за ендоплазматски ретикулум хепатоцита стопом између 9 и 12 g дневно. Албумин се не складишти у јетри и самим тим не постоји резерва уколико дође до повећане потребе у организму [14]. Треба нагласити да у физиолошким условима само 20-30% хепатоцита јетре синтетише албумин и синтеза се може повећати на захтев повећане потребе са фактором 200-300%. Промене у стопи синтезе су првенствено регулисане променом колоидног осмотског притиска и осмолалности екстраваскуларног простора јетре. Међутим, хормонске промене, на пример, повећање концентрације инсулина, тироксина и кортизола, могу утицати на синтезу албумина [15]. Изненађујуће, хормон раста нема такав ефекат на ову синтезу. Стопа синтезе албумина може бити ограничена дефицитом аминокиселина, нарочито леуцина, аргинина, изолеуцина и валина, али се ово ретко јавља клинички, осим у стањима екстремне неухрањености. До сада није разјашњено да ли се синтеза може повећати надокнадом аминокиселина у одсуству њиховог дефицита.

Катаболизам албумина се вероватно јавља у васкуларном ендотелу ткива или непосредно поред њега, опет стопом од 9 до 12 g дневно. Албумин пиноцитозом улази у ћелије стопом која је повезана са концентрацијом атријалног натриуретичког пептида. Албумин се не катаболише претерано при гладовању и у стањима дефицита, вероватно зато што представља слаб извор есенцијалних аминокиселина и поседује веома мало тирозинских остатака.

Албумин је претежно екстраваскуларни протеин и његова концентрација у серуму износи око 40 g/L, што сугерише да је укупна интраваскуларна маса око 120 g. Његова интерстицијална концентрација је нижа (14 g/L) и варира у различитим анатомским регионима. Међутим, укупна екстраваскуларна маса албумина износи око 160 g. Одређен део ових албумина може лако бити мобилисан, посебно онај део који је смештен у лабавим интерстицијалним ткивима, док је други део чврсто везан (нарочито у кожи). Сви чиниоци указују да се циркулација албумина из интраваскуларног до

екстраваскуларног простора остварује преко лимфних судова. Такво кретање је измерено и може се исказати као полуживот албумина у циркулацији. Клиренс албумина и других протеина из интерстицијума зависи од лимфног протока који је сам по себи одређен интерстицијалним притиском течности, сопственим пумпањем лимфних судова и ефектима мишићне контракције или екстерне компресије (нпр. артеријско пулсирање) [16].

Албумин припада мултигенској фамилији протеина која чини α -фетопротин (α -АФП) и витамин Д-везујући протеин (ВДП), који је такође познат као Г комплемент (Гк). Сматра се да је α -АФП пандан албумину у фетусу али да су његове везујуће карактеристике различите. Претпоставља се да α -АФП можда има већи афинитет за неке непознате лиганде важне за развој фетуса. ВДП игра важну улогу у регулацији калцијума. Оба протеина, α -АФП и ВДП, интерагују са класом II главног комплекса хистокомпатибилности. Сви досадашњи подаци указују да ови протеини играју важну улогу у модулирању имунолошког система [17]. Албумин, иако хомологне структуре, не дели имунолошке карактеристике блиске овим протеинима. Појава α -АФП у серуму одрасле особе је често повезана са болешћу [18].

1.3.1. Структура хуманог серумског албумина

Хумани серумски албумин чини око 60% протеина присутних у плазми нормалних здравих особа [19]. Он је протеин од око 66.000 Да и мањи је у односу на друге протеине плазме. ХСА је јако растворљив, елипсастиг облика и поседује ниску сопствену вискозност. До данас је описано више од 50 малих варијанти ове аминокиселинске секвенце која садржи ХСА. Тачније, они се називају алло-албумини (енгл. *allo-albumins*) и могу да коегзистирају на начин сличан хемоглобину у српастим ћелијама [20]. Изоелектрична тачка ХСА је негде између рН 4 и 5,8. При рН вредности од 7,4 (која одговара рН вредности венске крви) албумин се налази у виду ањона, са више од 200 негативних наелектрисања по молекулу. Због овако великог броја дисоцијабилних група у молекулу, као и његове високе концентрације у крви, албумин има велики капацитет за вазивање других лиганата (нарочито позитивних јона као на пример Ca^{2+} , око 40% јона калцијума у крви се налази везано за албумин). Међутим, албумин такође везује и транспортује путем крви неполарне молекуле као што су масне киселине, некоњуговани билирубин, хормоне: тироксин, тиронин, кортизол, алдостерон и велики број различитих лекова [21].

Примарну структуру ХСА чини један пептидни ланац од 585 аминокиселина, стабилизован са 17 дисулфидних мостова, без простетичких или угљенохидратних група. У свом саставу има 35 цистеинских остатка, а на само једном (Cys34) се налази слободна сулфхидрилна група [22]. ХСА има висок проценат јонских аминокиселина (посебно је присутан глутамат и лизин), на основу којих је омогућена релативно висока растворљивост за један протеин. Међутим, ХСА има низак проценат триптофана, глицина и метионина у свом саставу.

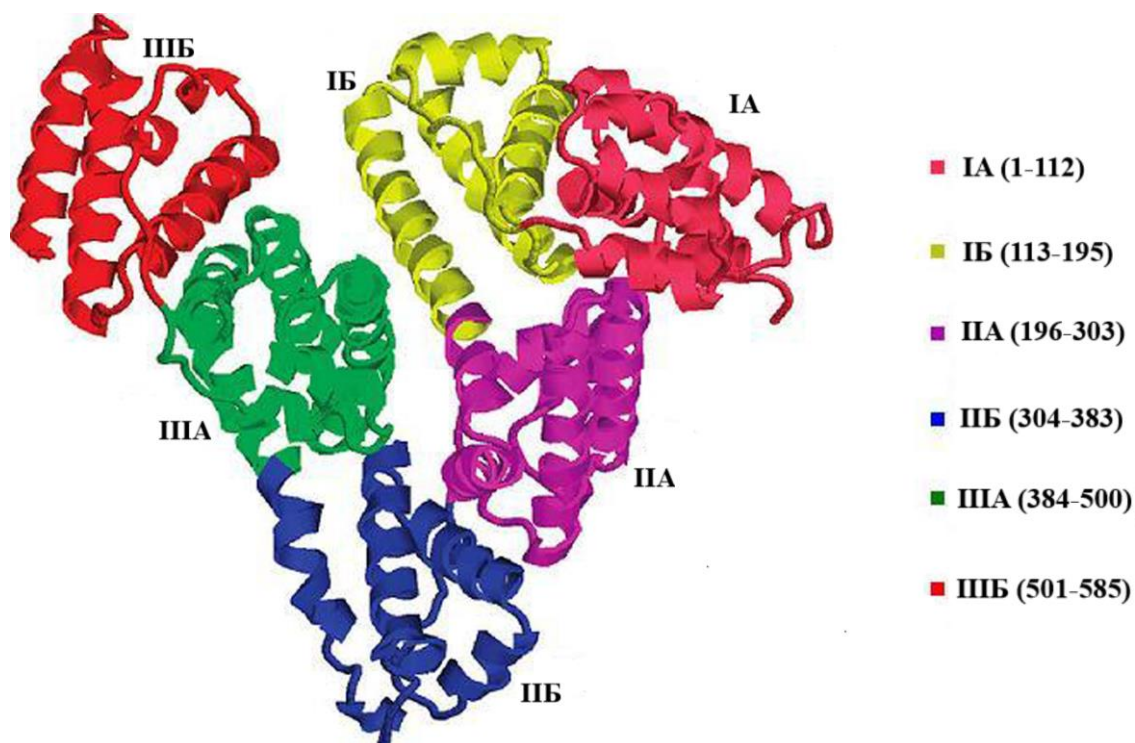
У погледу секундарне структуре, ХСА је изразито спиралан молекул: α -спирале чине 67%, продужени ланци 23% и β -кривине 10%, што је кристалографским анализама утврђено [23-25]. Неколико конформационих изомера је присутно *in vivo*, у зависности од температуре, рН вредности и јонске јачине [26].

Висока стопа конформационе флексибилности албумина је показана још пре много година. Документовано је постојање неколико изомера албумина који могу бити реверзибилно индуковани у функцији рН вредности [27]. Постоје претпоставке о могућим улогама појединих прелаза али физиолошки значај ових изомера остаје нејасан. Без обзира на конформациону прилагодљивост албумина, он се не денатурише једноставно и преживљава топлотну пастеризацију на температури од 60°C током 10 часова, без штетних ефеката [28].

У циркулацији је отприлике 30% слободног сулфхидрилног Cys34 оксидовано цистеином и глутатионом. Додатни облици албумина са примесама произилазе из његовог високог афинитета за масне киселине, билирубин, хематин и метале (као што су никал и бакар). На пример, неки препарати албумина садрже до 20% димеризованих албумина. Процент ових димера расте са старашћу протеина, осим уколико је Cys34 блокиран цистеином и глутатионом. Осим тога, 7-10% нормалног ХСА у циркулацији је гликозилирано, а много већи проценат је примећен код особа са дијабетесом [29].

Хумани серумски албумин је познат као релативно флексибилан молекул који поседује способност да брзо мења облик у зависности од његове околине. Заправо, његова тродимензионална структура се састоји од мономерног глобуларног протеина који је изграђен од 3 добро позната домена означена са: I, II и III, који имају сличну спиралну структуру [23-25]. Сваки домен је изграђен из два мања субдомена, А и Б. Субдомени (IA, IB, IIA, IIB, IIIA и IIIB) су тако организовани да формирају молекул у облику срца (видети Сliku 2), који се отприлике може приказати као једнакостранични троугао са страницама од ~80 Å и дубином од ~30 Å (80 x 80 x 80 x 30 Å). Домени II и III граде џеп који је формиран углавном од хидрофобних и позитивно наелектрисаних

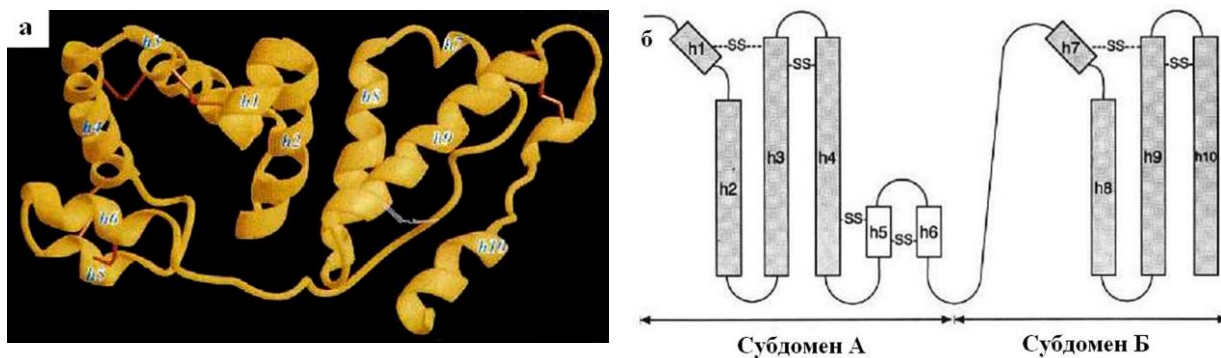
остатака где може бити смештен веома широк дијапазон једињења. Домени I (чине га остаци 1-195), II (196-383) и III (384-585) нису тополошки идентични али су веома слични у терцијарној структури.



Слика 2. Лево: Кристална структура ХСА. Субдомени (везујућа места за лиганде) су обележени различитим бојама. Десно: Број аминокиселина (секвенца) по субдомену. (*Chi and Liu. Biomacromolecules. 2011; 12: 203-209.*)

Постоји 10 главних спирала у сваком домену (h1-h10), које се могу видети на Слици 3. (а). Топологија типичног домена је додатно илустрована на Слици 3. (б). Осим тога, ових 6 субдомена деле заједнички спирални мотив. Овај мотив је првенствено аминокиселински део који обухвата двоструке дисулфидне везе 1, 3, 4, 6, 7 и 9. Сваки мотив је повезан преко псеудо двоструке осе (I:168°, II:163° и III:171°). Боље речено, субдомени А и Б деле заједнички мотив који обухвата h1, h2, h3 и h4 за субдомен А и h7, h8, h9 и h10 за субдомен Б. Постоји један изузетак, а то је да дисулфидни мост који повезује h1 и h3 не постоји у субдомену IA.

Поред овог заједничког мотива, субдомен А је допуњен са две додатне кратке непаралелне спирале, h5 и h6, које су међусобно повезане паром дисулфидних мостова при чему формирају мању дисулфидну двоструку петљу (петље 2, 4 и 8). Заједно, сви ови додаци формирају практично непрекидни спирални омотач за А субдомене који је интензивно умрежен помоћу укупно четири дисулфидна моста.



Слика 3. (а) Тракасти дијаграм домена II у ХСА. Дисулфидни мостови су приказани црвеном бојом. 10 главних спирала у сваком домену су обележене редом од h1 до h10. **(б)** Тополошка илустрација типичног домена у ХСА. Сивом бојом су обележене зоне које чине заједнички структурални мотив подељен између свих 6 субдомена. (*He and Carter. Nature. 1992; 358: 209-215.*)

Пошто су α -угљеникови атоми сваког појединачног домена међусобно зависни једни од других, због тога просечно растојање између α -угљеника (израчунато методом најмањих квадрата) износи 3,77; 4,32 и 3,63 Å између домена I-II, I-III и II-III. Везе између субдомена IA-IB, IIА-IIБ и IIIА-IIIБ су сачињене од продужених полипептида између остатака Lys106-Glu119, Glu292-Val315 и Glu492-Ala511 у доменима I, II и III. Ове везе се не јављају увек у стабилној конформацији при неутралној рН вредности. С друге стране, домени I и II и домени II и III су повезани преко спиралних продужетака h10(I)-h1(II) и h10(II)-h1(III), при чему веза IA-IIБ доводи до стварања највеће спирале у структури (h10(I)-h1(II)) која се састоји од 31 остатка. Осим тога, стваран број спирала у структури ХСА је 28, што је тачније него 30. У тродимензионалној структури, ових 17 цистеина из дисулфидних веза које се примарно јављају између α -спирала и често доводе до нарушавања локалне спиралне конформације. За Trp214, који је очуван код албумина сисара, је показано да игра важну структуралну улогу у формирању везујућег места IIА, пре свега ограничавањем приступа растварачима и учествовањем у посебној хидрофобној интеракцији између граничних површина субдомена IIА и IIIА [21-25].

1.3.2. Физиолошке улоге хуманог серумског албумина

1.3.2.1. Одржавање колоидно-осмотског притиска

Главна улога албумина је у одржавању колоидно-осмотског притиска плазме који у просеку износи 28 mmHg. Око 19 mmHg потиче од протеина плазме (75% од албумина, а око 25% од глобулина), а 9 mmHg од катјона, пре свега натријума, који

држе електричну равнотежу анјонима протеина. Због своје величине албумин не пролази кроз већину капиларних пора, тако да остаје у плазми и „везује“ молекуле воде. Треба знати да 1 g албумина „везује“ 18 mL воде у циркулацијском одељку, што је значајно у терапији шока, као и других стања када треба смањити едем или повећати запремину крви. Албумини плазме чине и ефикасну резерву аминокиселина (нпр. у хипопротеинемијским стањима). Осим тога, албумини имају и бројне друге улоге у организму [5].

1.3.2.2. Транспорт

Албумин поседује јако негативно наелектрисање, међутим слабо и реверзибилно везује јоне (катјоне и анјоне). Према томе, албумин функционише као циркулишући депо и транспортни молекул за велики број метаболита. Албумин поседује функцију неспецифичног транспортног протеина јер у себи садржи места за везивање многих хидрофобних молекула као што су масне киселине, билирубин, жучне киселине, многи лекови, стероиди и др.

Треба нагласити да се серумски албумин везује ковалентно и иреверзибилно са Д-глукозом и Д-галактозом. Отуда потиче термин – гликозилација албумина, која је до одређеног степена зависна од старости протеина, има утицај на његово наелектрисање и може утицати на карактеристике које се односе на капиларну пропустљивост. За гликозилирани албумин се сматра да има главну улогу у патогенези атеросклеротске болести код дијабетичара [30].

1.3.2.3. Скупљање слободних радикала

Албумин је главни екстрацелуларни извор редукованих сулфхидрилних (-S-H) група. Ове сулфхидрилне групе, које се називају тиоли, су сакупљачи реактивних група кисеоника и азота, тј. слободних радикала. Албумин може ограничити производњу ових реактивних група везивањем слободног јона бакра Cu^{2+} , који је познат као веома битан за убрзавање производње слободних радикала.

Показано је да примена хуманог албумина (200 mL, 20% w/v) у сепси доводи до значајног повећања нивоа плазма албумина, који остаје значајно повећан 4 часа после примене [31]. У исто време, укупни нивои тиола у плазми показују сличне трендове. За разлику од мерења нивоа албумина, где је дошло до значајног пада између 5 минута и 4 часа после примене, нивои тиола остају значајно повишени и до 18 часова после примене албумина.

Ови резултати имају неколико могућих импликација. Прво, они јасно указују да је повећање тиола у плазми после примене албумина дугорочно одрживо у поређењу са нивоима албумина, што указује на постојање размене тиола посредством албумина у плазми ових пацијената. С обиром да албумин чине већину укупног садржаја плазма тиола код нормалних здравих особа, они на овај начин највероватније утичу на оксидационо-редукциону равнотежу крвне плазме. Оксидационо-редукционо стање једне средине је одређено степеном у којем су молекули унутар ње оксидовани или редуковани. У Табели 1 су наведене оксидационе и антиоксидационе силе.

Табела 1. Оксидационо-редукциона равнотежа крвне плазме.

Оксиданси	Антиоксиданси
Прелазни метали	Трансферин
Хем/хемоглобин	Церулоплазмин
Ксантин оксидаза/хипоксантин	Албумин
Хидроген пероксид	Феритин
Супероксид	Хем оксигеназа-1
Хидрокси радикали	Билирубин
Пероксинитрит	Глутатион
Хипохлорна киселина	Витамин Ц и Е
Органски радикали	Азот-моноксид
	Супероксид дизмутаза
	Каталаза

1.3.2.4. Одржавање киселинско-базне равнотеже

Нормална концентрација H^+ у плазми износи $40 \pm 2 \text{ nmol/L}$ или рН вредност која износи $7,4 \pm 0,02$. Највећи извор H^+ је угљен-диоксид (CO_2), као један од крајњих производа оксидације глукозе и триглицерида. Албумин учествује и у одржавању сталне рН вредности крви, тј. функционише као пуфер крви [5]. Албумин је негативно наелектрисан протеин који је у високој концентрацији заступљен у плазми, па се зато с правом још и назива „анјонска пукотина“ (енгл. *anion gap*). Концентрација анјона и катјона у плазми треба да буде једнака, тако да преостали анјони долазе углавном из албумина, неорганских фосфата и хемоглобина. На основу класичног схватања, анјонска пукотина се израчунава као: $АП \text{ (mEq/L)} = (Na + K) - (Cl)$ [32].

1.3.2.5. Инфламаторни и антиинфламаторни ефекти

Оптимална течност за реанимацију код пацијената са критичним болестима тек треба да буде дизајнирана, али поред пружања оптималног интраваскуларног пуњења, она би идеално требала да модулира упалне процесе које чини сепса, синдром системског инфламаторног одговора и њихове васкуларне последице. Пацијенти са овим синдромима развијају повећану васкуларну пропустљивост, што доводи до формирања едема ткива, дисфункције вазомоторних функција са поремећајем доставе ћелијских хранљивих материја и реолошких промена које чине повећање котрљајућих неутрофила, њихово лепљење и активација.

Сваки губитак албумина односно његово смањено стварање доводи и до губитка воде у екстравазалну средину, тако да се јављају едеми. Едеми су најизраженији код нефротског синдрома, када се преко бубрега губе велике количе албумина и других протеина. Као последица се могу развити едеми руку, ногу, очних капака, асцитес (нагомилавање течности у трбушној шупљини), генерализовани едеми – анасарка.

Осим тога, и код других болести као што су дијабетес и гломерулонефритис, може доћи до појачаног излучивања албумина урином. Код опекотина долази до повећане пропустљивости крвних судова и изласка албумина у екстравазалну средину, а такође део албумина се разграђује што је праћено и изласком воде и настанком отока. Услед оштећења и инсуфицијенције јетре (на пример цироза јетре) као главног места производње албумина, смањује се његова концентрација у крви [30].

1.3.2.6. Капиларна пропустљивост

Овај феномен се односи на способност ендотелних ћелија да контролишу пропустљивост њихових зидова и простор између њих. Албумини могу и сами по себи директно утицати на васкуларни интегритет, везивањем у интерстицијалном матриксу и субендотелу, при чему могу довести до промене пропустљивости ових слојева за велике молекуле и растворе [33, 34]. Индиректни ефекти могу бити прво посредовани везивањем арахидонске киселине. Познато је да арахидонска киселина сама повећава капиларну пропустљивост [35].

Полинитроксилувани албумин штити ткива од исхемијских реперфузионих повреда, вероватно делујући на јачање ткивне осидационо-редукционе активности. Полинитроксилувани албумин се показао као потентан инхибитор ксантин-ксантин оксидаза посредованог лепљења хуманих неутрофила за култивисане хумане ендотелне

ћелије [36]. Поред тога, благотворни ефекти полинитроксилованих албумина се могу приписати и слабљењу интеракција леукоцита и ендотелних ћелија.

1.3.2.7. Реолошке промене, лепљење и активација неутрофила

За хумани серумски албумин је показано да сузбија респираторни излив неутрофила као одговор на излагање цитокинима који су одговорни за патогенезу критичних болести (ТНФ, фактор некрозе тумора) и компонентама комплемента (на пример Ц5а). Осим тога, хумани серумски албумин селективно и реверзибилно инхибира ширење неутрофила индукованих фактором некрозе тумора, а које је повезано са падом цикличног аденозин монофосфата (цАМП) [37].

Насупрот томе, албумин, желатин и хидроксиетилскроб у умереним количинама не показују краткорочне ефекте на лепљење и активацију гранулоцита код пацијената који су подвргнути анестезији због ортопедске операције [38].

1.3.2.8. Сигнални процеси у ћелији

Албумин у редукованом стању садржи једну слободну тиолну групу, која је главни екстрацелуларни антиоксиданс и углавном одговорна за одржавање сталног оксидационо-редукционог стања плазме [39]. Међутим, слободни тиоли су се показали као важни фактори у везивању активних ДНК транскрипционих фактора, које чини и нуклеарни фактор капа Б (НФ-кБ), на основу чега могу да утичу и на сам процес ћелијске судбине или апоптозу [40].

1.3.2.9. Коагулација и хемостатски ефекти

Албумин поседује антитромботски, антикоагулантни ефекат, вероватно због способности да веже азот-моноксид (NO), формирајући С-нитрозотиоле, при чему се инхибира брза инактивација NO и омогућава продужавање његовог антиагрегационог ефекта на тромбоците [41]. У кардиопулмоналном бајпасу, раствори албумина могу смањити таложње тромбоцита за 4-5% у односу на оно које је примећено код идентичног третмана са нормалним физиолошким раствором.

1.3.2.10. Везивање лекова и фармаколошке интеракције

Два лека могу директно да конкуришу за исто везујуће место на албумину или могу међусобно конкурисати, тако што први лек изазове промену афинитета удаљеног везујућег места које користи други лек. Ово настаје као последица конформационе промене у терцијарној структури молекула албумина.

Лекови, као на пример варфарин и фенитоин, конкуришу за исто везујуће место на албумину и постоји велика вероватноћа да један лек буде замењен другим. Међутим, варфарин и диазепам, се везују на сасвим различитим везујућим местима на албумину, тако да у овом случају један лек не може бити замењен другим.

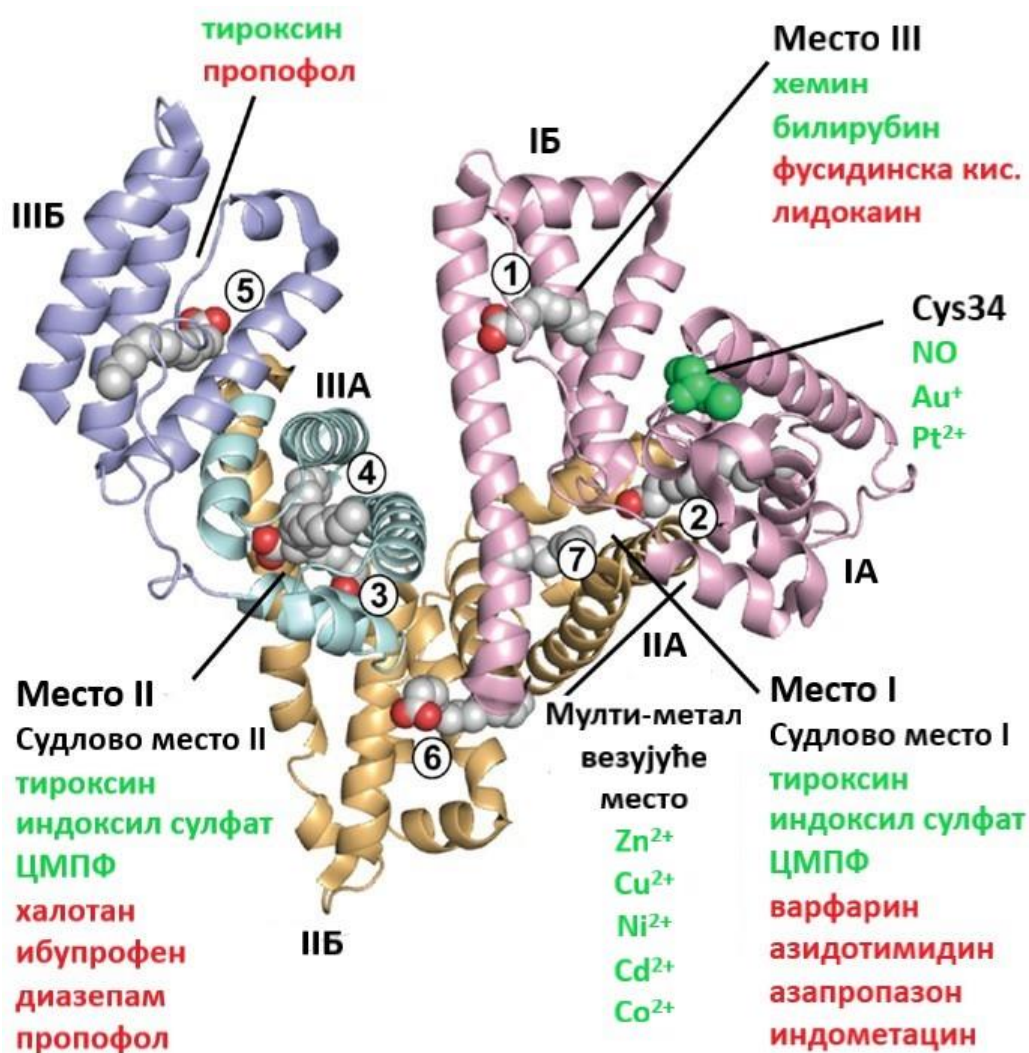
Лекови који се након примене у великом обиму везују за серумске албумине, при чему доводе до клинички значајних интеракција и смањеног нивоа безбедности су: варфарин, фенитоин, нестероидни антиинфламаторни лекови и дигоксин, а на сличан начин интерагују са албуминима и мидазолом, тиопентал и један број антибиотика [30].

1.3.3. Везујућа места у хуманом серумском албумину

ХСА реверзибилно интерагује са врло широким спектром терапијских једињења. Лекови се обично везују за једно или врло мали број везујућих места високог афинитета у ХСА (видети Табелу 2). Често поред ових основних везујућих места постоје одређена места ниског или веома ниског афинитета [11].

Важну улогу на сва даља истраживања протеин-лек интеракција која су касније спроведена, имао је пионирски рад заснован на истискивању флуоресцентних маркера, на основу кога је показано да се већина лекова везује високим афинитетом за једно од могућа два везујућа места у ХСА, која се називају место I и II (видети Табелу 2). На основу радова Судлова и сарадника, ова места се у литератури често називају Судлово место I и II. Детаљна анализа кристалне структуре ХСА је показала да су ова два главна везућа места хидрофобне шупљине у субдоменима ПА и ПИА [42, 43]. Илустрација кристалне структуре ХСА је приказана на Слици 4.

Једна од важних карактеристика места I и II је њихова висока специфичност за одређене лиганде (лекове). На пример, варфарин и аценокумарол се везују на месту I, а ибупрофен и диклофенак на месту II (видети Табелу 2) [11].



Слика 4. Кристална структура ХСА у присуству палмитинске киселине.

На Слици 4 су приказане α -спирале које су подељене на три домена (I, II и III), а сваки домен на субдомене (A и B). Везујућа места палмитинске киселине су означена бројевима од 1 до 7. Домен I (розе боја) садржи везујуће место масних киселина 1, слободан цистеин (Cys34) и везујуће место лекова III. Везујуће место масних киселина 2 се налази између домена I и II. Везујуће место метала се налази између субдомена IA и IIA. Домен II (наранџаста) садржи везујуће место лекова I (Судлово место I), као и места масних киселина 6 и 7. Домен III (плава) садржи везујућа места масних киселина 3 и 4, као и везујуће место лекова II (Судлово место II) у субдомену IIIA, и везујуће место масних киселина 5 у субдомену IIIB. Примери везујућих места за ендogene и екзогене лиганде су наведени у зеленој и црвеној боји. ЦМПФ, карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионска киселина; NO, азот-моноксид. (Sand, Bern, Nilsen, Noordzij, Sandlie and Andersen. *Front Immunol.* 2015; 5: 682.)

1.3.3.1. Место I

Место I или варфарин-азапропазон везујуће место (видети Сliku 4), је место највишег афинитета везивања за антикоагулансе (попут варфарина) и нестероидне антиинфламаторне лекове (као што су фенилбутазон и салицилат). Пре свега, веома је тешко, или можда немогуће, утврдити да ли се лиганд везује високим афинитетом на овом везујућем месту. Међутим, карактеристични лиганди који се везују на месту I су дикарбоксилне киселине и/или велики хетероциклични молекули са негативним наелектрисањем локализованим у средини молекула (Табела 2). Ово везујуће место је велико јер се лиганд величине билирубина на њему везује и зато што је пронађено неколико примера независног везивања два различита једињења [44-47].

Постоји неколико доказа који указују да је ово везујуће место флексибилно. Лиганди различитих хемијских структура се везују високим афинитетом за овај регион, што јасно указује да је ово место изузетно прилагодљиво [19, 46]. Недавно је ово поткрепљено резултатима студије која је испитивала везивање билирубина за осам различитих мутација једног остатка рекомбинантног ХСА (рХСА) [48]. Такође, уочене су међусобне интеракције већ везаних лиганада. Иако се овакви резултати вероватно могу објаснити делимичним преклапањем везујућих места, они често могу бити узроковани конформационим променама у молекулу ХСА (као што су алостерични ефекат или анти-кооперативност). Мутације једног остатка у овом региону ХСА имају значајан утицај на конформациону и термичку стабилност протеина, за разлику од мутација у месту II [49, 50].

Афинитет лекова који се везују на месту I расте са порастом рН вредности. Место I је пространо и флексибилно и има велики број индивидуалних везујућих места која су понекад независна, а у другим случајевима она међусобно утичу једна на друга. Да би се место I детаљно окарактерисало, до сада је било неколико покушаја његове датаљне поделе [45, 47, 51].

Кристалне структуре ХСА и рХСА су показале да је место I изграђено у виду цепа у субдомену IIА и обухвата усамљени триптофан (Trp214). Унутрашњи зид овог цепа је сачињен од хидрофобних бочних ланаца, док је његов улаз окружен позитивно наелектрисаним остацима [23, 25].

Табела 2. Лиганди који се везују високим афинитетом на месту I или II у ХСА [11].^a

Место I	K_1 (L/mol) ^b	Место II	K_1 (L/mol)
Варфарин	$3,4 \times 10^5$	Диазепам	$3,8 \times 10^5$
Азапропазон	$2,8 \times 10^5$	Кетопрофен	$2,5 \times 10^6$
Фенилбутазон	$1,5 \times 10^6$	Клофибрат	$7,6 \times 10^5$
Аценокумарол	$2,2 \times 10^5$	Иопаноат	$6,7 \times 10^6$
Салицилат	$1,9 \times 10^5$	Ибупрофен	$2,7 \times 10^6$
Индометацин	$1,4 \times 10^6$	Пирпрофен	$3,9 \times 10^5$
Толбутамид	$4,0 \times 10^4$	С-напроксен	$3,7 \times 10^6$
Хлорпропамид	$3,3 \times 10^5$	Етакрилат	$1,7 \times 10^6$
Сулфадиметоксин	$9,0 \times 10^4$	Хлортиазид	$5,5 \times 10^4$
Сулфатиазол	$2,5 \times 10^4$	Диклофенак	$3,3 \times 10^6$
Фуросемид	$1,9 \times 10^5$	С(-)-тиамилал	$8,7 \times 10^4$
Теноксикам	$3,7 \times 10^5$	С-етодолак	$2,0 \times 10^5$
Валпроат	$2,8 \times 10^5$	Карпрофен	$>10^6$
Пиретанид	$9,5 \times 10^4$	Супрофен	–
Спиринолактон	$3,0 \times 10^3$	Беноксапрофен	–
Бензилтиоурацил	$4,1 \times 10^4$	Циклопрофен	–
Оксифенбутазон	$3,5 \times 10^5$	Пропофол	–
Кверцетин	$2,7 \times 10^5$	Флурбипрофен	–
С-карбеницилин	$2,4 \times 10^3$	Октаноат	$1,6 \times 10^6$
Адипиодон	$9,9 \times 10^6$	Л-триптофан	$4,4 \times 10^4$
Канреноат	$2,0 \times 10^5$	Л-тироксин	$3,0 \times 10^5$
Р-сулбеницилин	$5,2 \times 10^3$	Хлоридни јон	$7,2 \times 10^2$
Билирубин	$9,5 \times 10^7$	Индол-3-ацетат	$2,1 \times 10^5$
Еикосаноиди	–	Индоксилсулфат	$1,6 \times 10^6$

^a У табели су приказани лиганди за које је познато да се везују високим афинитетом на месту I или II у ХСА; $n_1 = 1$.

^b K_1 су вредности константи асоцијација које су добијене при рН 7,4.

1.3.3.2. Место II

Место II или индол-бензодиазепин везујуће место (видети Слику 4), је такође специфично везујуће место за лекове из групе профена (као што су ибупрофен, фенопрофен, кетопрофен итд.). Лиганди који се везују на месту II су често ароматичне карбоксилне киселине са негативно наелектрисаном киселом групом на једном крају молекула удаљеном од хидрофобног центра. Место II је мање и уже од места I, што је очигледно, јер се ниједан велики лиганд (као што је билирубин, хемин, хематин или други порфирина) на њему не везује и зато што нико није успео да изврши поделу овог везујућег региона. Лекови који се везују на месту II немају способност истискивања других лиганата са ХСА. Овај везујући регион је мање флексибилан, јер на везивање често снажно утиче стереоселективност. Класичан пример је откриће да се на овом месту L-триптофан везује афинитетом који је приближно 100 пута већи од његовог D-изомера [11, 52]. Осим тога, супституција лиганда са релативно малом групом може снажно утицати на везивање. На пример, диазепам се везује на месту II али то не чини његов флуоровани аналог флунизепам. Такође, супституција метил групе на α -водонику у L-триптофану доводи до блокаде везивања. Према томе, иако место II може да веже различите лиганде са високим афинитетом (Табела 2), изгледа да има више ограничења од места I. Кристалографске анализе су показале да се место II налази у субдомену IIIА [11, 23, 25].

Истраживање кристалних структура ХСА и рХСА при резолуцији од 2,5 Å је показало да је место II заправо цеп изграђен углавном на исти начин као и место I [25]. Међу појединачним аминокиселинским остацима овог субдомена, Arg410 и Tyr411 се обично сматрају важним, што је случај, на пример, код везивања кетопрофена. Међутим, студије које су спроведене са мутантима рХСА су показале да Arg410 није важан за везивање диазепам [49].

1.3.3.3. Додатна места

Иако је класификација на место I и место II и даље корисна [42], она не може да објасни високо афинитетно везивање свих лекова. На основу претходних студија је закључено да се снажно везани лекови, као што су пробенецид, амитриптилин и дебрисоквин, не везују значајно на једном од ова два места. Осим тога, локација места везивања дигитоксина још увек није у потпуности разјашњена. Највероватније није могуће повезати сва високо афинитетна места у модел Судлова и сарадника, посебно ако се један лек везује на више од два везујућа места [11].

Доказано је да позитивно наелектрисани лекови углавном интерагују са α_1 -киселим гликопротеином, а неки од њих се везују за албумин [19, 53], иако локације основних везујућих места за ту врсту лиганда још увек нису испитане. Од интереса је напоменути студију која је испитивала везивање пет алифатичних амина различитих дужина ланца за ХСА [54], на основу које је закључено да се они не везују на месту II. Осим тога, мало је вероватно да се ови алифатични амини везују на месту I. Исти аутори су објавили да се базни несетероидни антиинфламаторни лекови у њиховом нејонизованим облицима везују на месту I [55].

Једна од ранијих студија је приказала кристалне структуре високе резолуције рХСА са везаним пропофолом и халотаном. На основу њених резултата, пропофол има два основна везујућа места у субдоменима IIIA (место II) и IIIB, а насупрот томе, халотан има три основна везујућа места, једно у субдомену IIIA (место II) и два у спољашњој додирној површини између субдомена IIA и IIIB [56]. Међутим, у другој студији која је користила растворени ХСА и рХСА мутанте је показано да се халотан, изофлуран и 1-хлоро-1,2,2-трифлуороциклобутан везују првенствено у расцепу између субдомена IA и IIA, који садржи Trp214 као битан везујући остатак. Поред тога, везивање анестетика на месту II је такође доказано [57].

1.3.3.4. Cys34

Остатак цистеина на позицији 34 у субдомену IA је смештен у пукотини на површини албумина и не учествује у изградњи дисулфидних мостова. У просеку, половина сулфхидрилних група изолованог ХСА је присутна у виду мешовитих дисулфида са цистеином или глутатионом или су оксидовани до различитих стања. Међутим, већина блокираних и/или оксидованих тиола може настати као последица коришћења изолационих процедура, јер у нормалној свежој плазми ова фракција албумина чини мање од 10% састава [58].

Преостале сулфидрилне групе су слободно доступне (меркапталбумин) и чине највећи део слободног тиола у крви. Меркапталбумин, а највероватније и део албумина, формирањем мешовитих дисулфида, постаје способан да веже азот-моноксид и металне јоне попут Ag^+ , Hg^{2+} и Au^+ као и хомоцистеин [59] и неке лекове. Између осталих, у овој групи се налазе деривати буциламина, ауротиомалат, ауранофин, Д-пенициламин, каптоприл, етакринат, цисплатина (која се везује и за остатке метионина). Ковалентна интеракција између лекова који садрже тиолне групе и Cys34 албумина се обично дешава *in vivo*, о чему сведоче бројни примери [11].

1.3.3.5. Везујућа места за јоне метала

ХСА учествује у транспорту хормона, витамина, масних киселина, лекова, ксенобиотика и јона метала, укључујући ту физиолошке Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и Cu^{2+} , као и токсичне Cd^{2+} и Ni^{2+} . Ова различитост функција је омогућена на основу постојања великог броја везујућих места на површини молекула ХСА, укључујући хидрофобне цепове различитих величина и облика, и координацијом домена опремљених сетом донорских група које одговарају одређеним металима [60].

Везивање Fe^{3+} за албумин се класификује као токсично пошто се јавља *in vivo* само у патолошким стањима код преоптерећења гвожђем, које се првенствено транспортује трансферином [61]. Досадашњи резултати указују да се и Fe^{2+} очигледно везује за ХСА само у присуству аскорбата, који одржавају Fe^{2+} у редукованом стању, али ово везивање је неспецифично и одиграва се на површини протеина. ХСА је такође важан циљ за лекове на бази метала који садрже Pt^{2+} , VO^{4+} и Au^{1+} . Ранија истраживања су показала да у ХСА постоји велики број везујућих места за Hg^{2+} и различита органска једињења живе (шест за Hg^{2+}), са константама дисоцијације од 0,1 до 1 μM [62].

Раније је албумин веома често описиван као „сунђер“ који везује све и свашта неспецифично. Насупрот томе, током последњих деценија је показано да албумин има специфична везујућа места са посебним металним склоностима, а осим тога он има и регулаторне улоге. Већина албумина сисара, укључујући ХСА и говеђи серумски албумин (ГСА), поседују четири везујућа места за метале, која се у великој мери разликују по својој структури и специфичности за јоне метала. То су: Н-терминално место (НТМ, такође познато као АТЦУН), Cys34 остатак и његово окружење, место А индетификовано у НМР студији, а за које је касније показано да је идентично са мулти-метал везујућим местом које се налази на граничној површини домена I и II и место Б чија локација је остала непозната [62, 63].

1.3.4. Интеракције на нивоу везивања за хумани серумски албумин

1.3.4.1. Лек-лек интеракције

Пошто албумин има ограничен број региона за високо афинитетно везивање и зато што је протеин флексибилан молекул, на везивање лека често утиче истовремено везивање других лекова. Информације о таквим утицајима су важне, јер промене у везивању за протеине могу изменити волумен дистрибуције, клиренс и елиминацију лека, а могу модулирати и његов терапијски ефекат. Приликом процене утицаја оваквог

везивања на терапију, важно је узети у обзир не само потенцијалне интеракције између лекова, него и чињеницу да се метаболити лекова могу везати за албумин високим афинитетом [11].

Интеракције са другим лековима на нивоу везивања за протеине се обично посматрају у својству проблематичних споредних ефеката. Овакве интеракције се могу применити и у терапијске сврхе. На пример, у нефротском синдрому фуросемид и други диуретици Хенлеове петље имају само мали ефекат на диурезу. Ова резистенција диуретика највероватније је узрокована везивањем лека за албумин у урину. Међутим, истовремена примена једног истискивача (енгл. *displacer*), као што је буколом, значајно повећава диуретско дејство фуросемида [64].

Истискивање лека може такође бити од користи и код здравих индивидуа. Меркаптоацетилтриглицин (МАГЗ) обележен технецијумом-99м се снажно везује за албумине, али истискивање због истовремене примене буколома доводи до повећања његове невезане фракције, а тиме и до корисних ефеката код сцинтиграфије бубрега. Значајно је напоменути да су остале користи поступка истискивања радиообележених лигананда са албумина краће време чекања и мање дозе зрачења за пацијенте [65].

Недавна студија је показала да је ослобађање од бола у реуматоидном артритису код пацијената који употребљавају диклофенак супозиторије значајно боље током истовремене оралне примене набуметона. Диклофенак и један активни метаболит набуметона (6-МНА) се снажно везују на месту II у ХСА, при чему долази до пролазног повећања слободне концентрације диклофенака у серуму [66]. У неким случајевима, ова пролазна промена слободне концентрације лека може директно утицати на његову фармаколошку активност. Слично запажање је показано у студији са комбинованом применом флурбипрофен аксетила и липидне емулзије коришћењем претклиничког модела [67].

1.3.4.2. Лек-ендогена супстанца интеракције

Везивање лекова за албумине може бити промењено истовременим везивањем ендогених супстанци. Анјони дуголанчаних масних киселина могу при ниским моларним односима између лиганда и протеина ($\leq 2:1$) умањити везивање С(-) и Р(+)-тиамилала, диазепама, Л-триптофана и дансилсаркозина на месту II. При вишим релативним концентрацијама, анјони масних киселина истискују лекове са места II конкуренцијом. За лиганде који се везују на месту I, ситуација је обично другачија.

Анјони средње дугих ланаца масних киселина, као што је октаноат, се везују високим афинитетом на месту II (Табела 2), због чега се очекује изражен инхибиторни ефекат за оне лиганде који се везују на овом месту. Овакав случај је објављен за диазепам, ибупрофен, флурбипрофен, тиамилал, дансилсаркозин и Л-триптофан. Октаноат се једино ниским афинитетом везује на месту I, па је зато ефекат истискивања лекова са места I вероватно мали [11].

Стимулишући ефекат анјона дуголанчаних масних киселина на везивање лиганда на месту I је првобитно био објашњен индукцијом конформационих промена у молекулу албумина, при чему место I постаје погодније за везивање лиганда. На пример, у одсуству масних киселина, за албумин се везује 2,3,5-тријодобензоат на местима I и II [23]. У присуству миристата 2,3,5-тријодобензоат бива истиснут са места II, али бива поново везан на новом месту које је индуковано миристатом, а које је смештено у субдомену IB [68].

Неколико лекова има снажан ефекат на истискивање билирубина са његових везујућих места у албумину. Такав случај је пријављен за валпроат, цефтриаксон, сулфонамиде као што је сулфисоксазол и лекове: оксифенбутазон, фенилбутазон, сулфинпиразон, кетофенилбутазон, глибенкламид, толбутамид, варфарин, салицилат и фуросемид. Због њиховог ефекта на истискивање билирубина, ови лекови се не користе у новорођенчади.

Хронична бубрежна инсуфицијенција је удружена са акумулацијом уремичних токсина у серуму, међу којима су четири органске киселине. Присуство ових токсина доводи до смањеног везивања лекова и других лиганада за ХСА. Примери лекова који су овако истиснути су: диазепам, варфарин, салицилат, фуросемид, Л-триптофан, Л-тироксин и фенитоин.

Хлоридни јони умањују везивање многобројних лекова (варфарина, толметина, пирпрофена, етодолака, азосемида, билирубина) и можда још неких других лиганада за ХСА. Овај ефекат хлоридних јона је од великог значаја, пре свега у *in vitro* студијама везивања, јер неки аутори широко користе пуфере који садрже високе концентрације хлоридних јона (на пример у облику 0,9% NaCl), док у другим пуферима недостаје овај јон [11].

1.3.4.3. Утицај јона метала на везивање за хумани серумски албумин

У плазми су присутни јони метала који учествују у многим биохемијским процесима и могу директно утицати на реакцију везивања лекова и серумских албумина. Ови јони метала, посебно бивалентног типа, су од суштинског значаја у људском организму и играју важну структуралну и функционалну улогу у многим биомолекулима [69].

Претходно публиковане студије су показале да Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и други јони метала могу да формирају комплексе са серумским албуминима [70-75]. Испитивањем интеракција ХСА и јона метала, пронађено је да Fe^{3+} и Zn^{2+} имају само једно везујуће место, док Al^{3+} и Cu^{2+} имају два везујућа места у ХСА. Јони метала имају различите афинитете за ХСА, при чему је однос $\text{Al}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{3+}$. Осим тога, утврђено је да њихов степен везивања за ХСА не зависи од наелектрисања јона [76].

У неким случајевима, присуство јона метала може повећати константу везивања комплекса ХСА-лек, што указује да се лек јаче везује за ХСА, смањује се његова слободна фракција у плазми способна да делује на циљним ткивима, а самим тим и његов ефекат може бити значајно смањен. Више константе везивања највероватније настају из два аспекта: долази до формирања комплекса између лека и јона метала преко моста јона метала, при чему овакав комплекс боље интерагује са ХСА; или јони метала индукују конформационе промене ХСА или лека, при чему се они међусобно лакше везују.

У другим случајевима, присуство јона метала може смањити константу везивања комплекса ХСА-лек, при чему се слободна фракција лека у плазми повећава, скраћује се период депоновања и повећава његов максимални ефекат. Ниже константе везивања вероватно произилазе из два аспекта: долази до конкуренције јона метала и лека на нивоу везивања за ХСА, која може да смањи способност везивања лека за ХСА; или јони метала индукују конформационе промене ХСА или лека, при чему се они међусобно теже везују [77, 78].

На пример, резултати неколико студија су показали да присуство јона метала у плазми може довести до значајних промена антимикробне активности флуорохинолона [76, 79-81], тетрациклина [82-85], хлорамфеникола [86] и других антибиотика.

1.3.5. Флуорофоре хуманог серумског албумина

Флуоресцентни молекули или флуорофоре имају способност да апсорбују енергију на некој таласној дужини и након тога емитују енергију на некој другој таласној дужини. Процес апсорпције се такође назива и ексцитација, јер се енергија неких електрона у једињењу повећава и електрони прелазе у побуђено стање, односно у стање са енергијом већом од енергије основног стања. Коефицијент ексцитације (ϵ , изражава се у $L/mol \cdot cm$) на апсорпционом максимуму је јединствена особина сваке флуорофоре под одређеним условима средине. Таласне дужине максималне апсорпције (ексцитације) и емисије су важне карактеристике за дефинисање сваке флуорофоре. Флуоресцентна спектроскопија протеина има веома широку примену у откривању структурних и динамичких информација које се односе на микроколину флуорофора у макромолекулу. У суштини, постоје две врсте флуорофора: унутрашње и спољашње флуорофоре.

1.3.5.1. Унутрашња флуоресценција

Протеини садрже три аминокиселинска остатка који доприносе унутрашњој (интринзичкој) флуоресценцији: триптофан (Trp), фенилаланин (Phe) и тирозин (Tyr). Флуоресценција савијених протеина представља смешу флуоресценције појединачних ароматичних остатака. Флуоресценција протеина се обично посматра при ексцитацији на 280 nm или на нешто већим таласним дужинама, обично на 295 nm. При ексцитацији протеина на 295 nm његова емисија потиче доминантно од остатака триптофана, а при ексцитацији на 280 nm емисији доприноси комбинација остатака триптофана, фенилаланина и тирозина. Ова три остатка имају различите апсорпционе и емисионе таласне дужине (Табела 3). Они се у великој мери разликују у њиховим квантним приносима и дужини живота. Због ових разлика и због резонантног трансфера енергије од најближег фенилаланина до тирозина и од тирозина до триптофана, флуоресцентни спектар протеина који садржи ове остатке најчешће подсећа на флуоресцентни спектар триптофана.

Триптофан има много јачу флуоресценцију и виши квантни принос од друге две ароматичне аминокиселине. Интензитет, квантни принос и таласна дужина максимума флуоресцентне емисије триптофана су зависне од растварача. Флуоресцентни спектар се помера ка краћим таласним дужинама и интензитет флуоресценције се постепено повећава са смањењем поларности растварача који окружује остатаке триптофана. Остаци триптофана који су смештени у хидрофобном језгру протеина могу имати

спектре који су плаво или црвено померени, у зависности од поларности растварача којем су изложени.

Тирозин, попут триптофана, има јаке апсорпционе траке на 280 nm и када је побуђен на овој таласној дужини има карактеристичан емисију. Тирозин је слабији емитер од триптофана, али и даље може значајно да допринесе флуоресценцији протеина јер је присутан у већем броју. Флуоресценција тирозина може лако бити угашена најближим остатком триптофана због ефеката трансфера енергије.

Фенилаланин, аминокиселина која има само бензенов прстен и метиленску групу, је слаб емитер флуоресценције. Квантни принос и моларна апсорптивност је ниска код овог остатка. Флуоресценција фенилаланина је запажена само у одсуству оба остатка, тирозина и триптофана.

Табела 3. Флуоресцентне карактеристике ароматичних аминокиселина [23-25].

Аминокиселина	Апсорпција		Флуоресценција	
	Таласна дужина (nm)	Апсорптивност (L/mol·cm)	Таласна дужина (nm)	Квантни принос
Триптофан	280	5600	348	0.20
Тирозин	274	1400	303	0.14
Фенилаланин	257	200	282	0.04

Унутрашња флуоресценција ХСА при ексцитацији на 295 nm углавном потиче само од остатака триптофана [24], јер сам фенилаланин има веома низак квантни принос, а флуоресценција тирозина је готово потпуно угашена [87]. Утрашња флуоресценција ХСА је веома осетљива на његову микроколину и вероватно ће се угасити чак и ако постоји мала промена локалног окружења, као што је биомолекулско везивање, конформациона промена или денатурација протеина.

1.3.5.2. Спољашња флуоресценција

Спољашње (екстринзичке) флуоресцентне пробе су релативно мали молекули у поређењу са макромолекулима као што су протеини, нуклеинске киселине и други молекули коришћени током истраживања. Ова једињења често садрже групе које пружају осетљиву детекцију на основу одређене унутрашње атомске или хемијске карактеристике пошто флуоресцирају према протеину. Ове спољашње флуоресцентне

пробе приликом проучавања макромолекула доведе било до гашења флуоресценције макромолекула или пак до изузетног повећања флуоресценције пробе након везивања за макромолекул, што у многоме зависи од хемијске природе пробе. Неке од најчешће коришћених флуорофора у спектроскопским проучавањима протеина су: пирен, 8-анилинонафтален-1-сулфонска киселина (АНС), нилско плаво, нилско црвено и флуоресцеин [88-91].

1.4. Тетрациклини

Језгро тетрациклина се састоји од четири линеарно повезана тетрациклична прстена, са различитим функционалним групама везаним на различитим позицијама. Тетрациклини су добили име по присуству ова четири („тетра-“) угљоводонична прстена у њиховој структури. Најједноставнији молекул који показује активност је 6-деокси-6-диметилтетрациклин, који се сматра минималном фармакофором [92].

Историјски гледано, неки тетрациклини се сврставају у прву генерацију јер су добијени биосинтезом као што су: тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин и демеклоциклин. Другу генерацију тетрациклина чине полусинтетски деривати, а то су: доксициклин, лимециклин, меклоциклин, метациклин, миноциклин, ролитетрациклин. Трећу генерацију тетрациклина чине лекови који су добијени потпуном синтезом као што је тигециклин. Међутим, неки истаживачи сматрају да се тигециклин разликује од других тетрациклина и с правом га сврставају у нову групу антибиотика под називом глицилциклини [93].

У тетрациклине спада више антибиотика који имају исту основну структуру и деловање. Сви тетрациклини су амфотерне, кристалне супстанце, слабо растворљиве у води, осим ролитетрациклина који је добро растворљив. У терапији се користе у облику хлорида, а за парентералну примену користе се у посебним формулацијама као и у пуферским растворима. Они имају широк спектар антимицробног дејства, не само на грам-позитивне и грам-негативне бактерије већ и на рикеције, микоплазме, хламидије, спирохете, лептоспире и амебе. У терапијским концентрацијама тетрациклини делују бактериостатски. Они се везују за 30С подјединицу рибозома и тако блокирају дејство транспортне РНК. На овај начин се омета синтеза пептида и протеина у бактеријској ћелији. Селективност токсичног деловања тетрациклина на бактерије се јавља због њиховог транспортног механизма који пружа накупљање тетрациклина у бактеријској ћелији. Хумане ћелије немају такав транспортни механизам.

Доказано је да постоје три разлога због којих се може развити резистенција према тетрациклинима:

- смањено нагомилавање лека у унутрашњости бактерија, или због смањеног уласка у ћелију, или због повећаног избацавања лека из ћелије активним транспортом под дејством посебне протеинске пумпе,
- продукција протеина који отежавају везивање тетрациклина за рибозоме,
- ензимска инактивација тетрациклина.

Од свих процеса најважнији је развој способности бактрије да лек избаци помоћу посебне пумпе. Ова пумпа је кодирана на плазмиду и може се пренети трансдукцијом или коњугацијом. Пошто плазмиди имају гене за резистенцију и према другим антибиотицима (на пример према аминогликозидима, хлорамфениколу и сулфонамидима), ова резистенција према тетрациклинима може да послужи као маркер за мултиплу резистенцију према другим антибактеријским лековима.

Тетрациклини се међусобно разликују по фармакокинетичким особинама (видети Табелу 4). После оралне примене тетрациклини се апсорбују из црева у довољној количини, али не у потпуности. На једној страни су хлортетрациклин, окситетрациклин, демеклоциклин и метациклин који се слабије апсорбују из дигестивног тракта (од 30% до 80% оралне дозе), а излучују се већим делом преко бубрега. На другој страни су миноциклин и доксициклин који се апсорбују у потпуности из дигестивног тракта (100% и 95% оралне дозе), а преко бубрега се излучују мало (миноциклин) или нимало (доксициклин). Апсорпцију тетрациклина ометају алуминијум хидроксид, калцијум, магнезијум, соли гвожђа и бизмут субсалицилат. Разлог непотпуне апсорпције је слаба растворљивост тетрациклина у алкалној средини и стварање нерастворљивих хелата са двовалентним и тровалентним катјонима [4, 7].

Дистрибуција тетрациклина у организму је прилично равномерна. Тетрациклини добро продиру у сва ткива и телесне течности. Продирање у централни нервни систем и цереброспиналну течност је слабо, чак и кад постоји запаљење мозданица. У већој концентарцији тетрациклини се нагомилавају у костима и зубима, нарочито у периду растења. Сви тетрациклини прелазе у крвоток плода и амнионску течност.

Тетрациклини се концентришу у јетри и потом се делом излучују путем жучи, где достижу 5-10 пута већу концентрацију него у плазми. Доксициклин се делом инактивише у јетри и елиминише путем жучи у облику неактивног коњугата. Један део

лека излученог путем жучи се вероватно реапсорбује у цревима, док се остатак излучује путем столице, која садржи 80% оралне дозе тетрациклина. Око 20% оралне дозе излучује се путем мокраће, највећим делом у активном облику. Полувереме елиминације природних тетрациклина је око осам часова. Други тетрациклини се излучују из организма знатно спорије, нарочито доксициклин који има најдуже време полумелиминације.

Табела 4. Експериментални подаци и фармакокинетичке вредности тетрациклина [93].*

Једињење	logP	logS	pKa	Везивање за протеине плазме (%)	Полуживот (h)
Окситетрациклин	-0,90	-3,14	3,27	–	6-8
Тетрациклин	-1,30	-3,12	3,3	20-67	6-12
Доксициклин	-0,02	-2,87	–	>90	18-22
Демеклоциклин	0,2	-2,52	–	41-50	10-17
Хлортетрациклин	0,5	-2,7	–	50-55	5,6-9
Меклоциклин	0,4	-3,4	–	–	–
Миноциклин	0,05	–	–	55-76	11-22
Ролитетрациклин	-0,1	-2,7	–	–	–
Тигециклин	0,8	–	–	71-89	27-43

* Подаци су преузети са www.drugbank.ca.

Тетрациклини су лекови избора у терапији инфекција изазваних са *Mycoplasma pneumoniae*, хламидијама, рикецијама (пегави тифус, Q-грозница и др.) и неким спирохетама. У комбинацији са другим лековима тетрациклини се примењују у терапији желудачног и дуоденалног улкуса у циљу ерадикације *Helicobacter pylori*.

Тетрациклини се примењују у терапији инфекција изазваних грам-позитивним и грам-негативним бактеријама. Делотворни су против златног стафилокока, пнеумокока и гонокока, али нису ефикасни против стрептокока групе Б и Д. Од грам-негативних бацила на тетрациклине су осетљиви *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter*, *Brucella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* и *Haemophilus ducreyi*. У терапији колере они брзо заустављају избацавање вибриона у околину.

Тетрациклини су још увек ефикасни у терапији инфекција проузрокованих хламидијама, пре свега код инфекција гениталних органа хламидијама, укључујући и оне које се преносе сексуалним контактом. Понекад се тетрациклини користе у терапији инфекција изазваних протозоама, на пример *Entamoeba histolytica* и *Plasmodium falciparum*. Знатно ређе индикације за тетрациклине су: лајмска болест, лептоспироза, акне и егзацербација бронхитиса. Тетрациклини су корисни за лечење тежих облика акни јер инхибирају *Propionbacterium acnes* за кога се сматра да мења конзистенцију лоја и доводи до зачепљења отвора лојних жлезда.

Најчешћи нежељени ефекти при оралној примени тетрациклина су мука и повраћање, а понекад и дијареја. Ове појаве настају услед наддражајног деловања тетрациклина на слузокожу желуца или услед промене цревне флоре Јавља се дефицит комплекса витамина Б, као и суперинфекција.

Тетрациклини модификују нормалну флору дигестивног тракта. Они супримирају нормално присутне и осетљиве колиформне бактерије, али тиме онемогућују прекомерно растење и размножавање *Pseudomonasa*, *Proteusa*, стафилокока, резистентних колиформних бацила, клостридија и *Candida albicans*. Ова промена флоре има за последицу појаву цревних функционалних поремећаја, *pruritus ani*, оралну и вагиналну кандидијазу и тешки ентероколитис који се може завршити летално. Могућа је појава псеудомембранозног колитиса чији је узрочник *Clostridium difficile* и кога треба лечити метронидазолом. Парентерална примена великих доза тетрациклина може изазвати оштећење функције јетре. Код болесника који већ имају оштећену јетру или бубреге, као и у последњим месецима трудноће ова компликација може настати и при употреби уобичајених доза тетрациклина.

Пошто тетрациклини формирају хелате са Ca^{2+} , они се селективно накупљају у костима и зубима деце и могу изазвати жуту обојеност зуба, дисплазију глеђи, деформитете и застој у расту. Минерализација костију се ремети па су оне мање отпорне на механички стрес. Примена тетрациклина је контраиндикована код трудница, дојиља и деце млађе од осам година. За време употребе тетрациклина треба избегавати интензивно сунчање. На изложеним деловима коже понекад могу настати еритеми и едеми који се веома споро повлаче и понекад остављају пигментована места. Фототоксичност (преосетљивост на сунчеву светлост) је карактеристична код примене демеклоциклина.

Миноциклин може изазвати дозно зависне вестибуларне поремећаје. Високе дозе тетрациклина могу смањити синтезу протеина у ћелији домаћина (антианаболички ефекат) која може изазвати оштећење бубрега. Дуготрајна терапија може довести до оштећења костне сржи. Застарели тетрациклини могу изазвати пролазно оштећење бубрежних каналића [2, 7].

Тетрациклини који се брзо излучују примењују се орално у дози од 0,25 до 0,5 g, на сваких шест сати. Доза за децу (само ону преко осам година) износи 20-40 mg/kg/дан. Старији препарати тетрациклина који се брзо елиминишу се данас ретко користе. Уместо свих њих, данас је лек избора доксициклин који се примењује једанпут или двапут дневно у дози од 100 mg. Предност доксициклина у односу на остале тетрациклине је и у томе храна не утиче на његову апсорпцију. Због хелирања са калцијумом, препарате тетрациклина не треба примењивати са млеком или млечним производима.

Због свог широког антибактеријског спектра тетрациклини су раније врло често употребљавани у нади да ће се њиховом применом „покрити“ сви изазивачи болести. Због прекомерне употребе ових лекова дошло је до развоја резистенције чак и међу бактеријама које су биле високо осетљиве (на пример пнеумококе и стрептококе). Прекомерна употреба ових лекова у болничким условима проузроковала је, вероватно заједно са другим антибиотцима, повећану инциденцу гљивичних инфекција код хоспитализованих тешких болесника.

Паралелно са употребом у медицини, тетрациклини су коришћени као додаци животињској и сточној храни како би се убрзао раст узгајаних животиња. Ова пракса је сигурно допринела појачаном ширењу резистенције према тетрациклинима. На тај начин се објашњава чињеница да су одгајивачи живине и других домаћих животиња, као и радници у кланицама, оболевали од инфекција бактеријама које су резистентне према тетрациклинима. Није поуздано утврђено од коликог је значаја ово било за шире становништво, али је био довољан разлог да се у неким земљама забрани примена тетрациклина у исхрани стоке [7].

1.4.1. Тигециклин

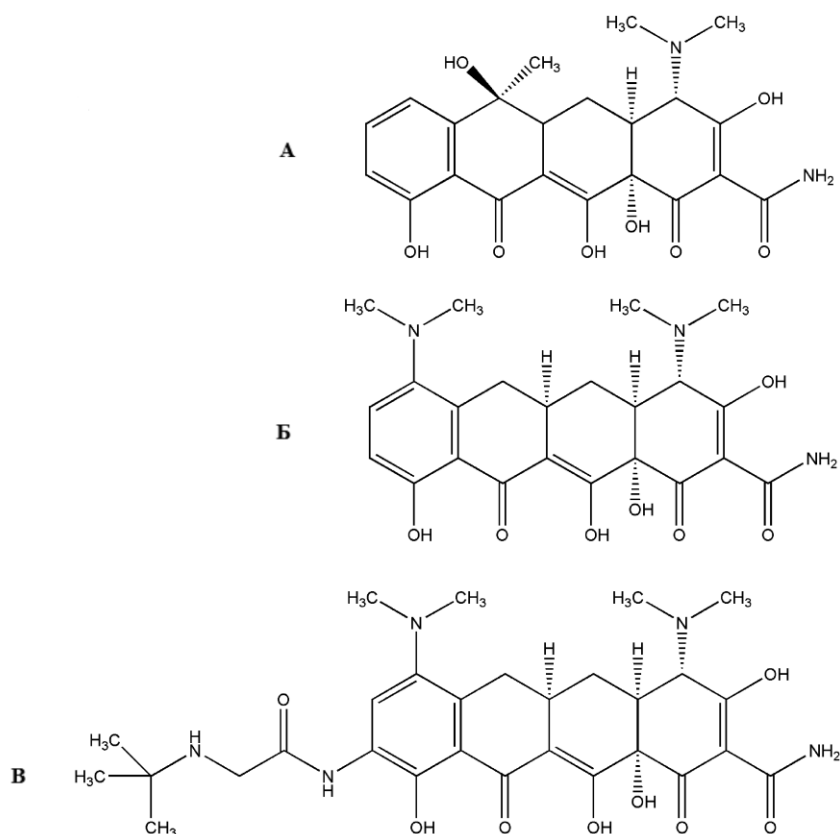
Тигециклин је релативно новији антибиотик широког спектра дејства, сличан тетрациклинима по структури, механизму дејства и бактериостатичкој ефикасности. Многи аутори га сврставају у нову групу антибиотика – глицилциклинне, чији је он први представник. Тигециклин делује везивањем за 30С подјединицу рибозома и инхибира

синтезу протеина бактерија. Од тетрациклина се разликује по већој ефикасности против полирезистентних бактерија као што је метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* и анаероба као што су *Bacteriodes* сојеви, а делује и на *Escherichia coli*, *Klebsiellae*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* и *Peptostreptococcus*. Клиничка ефикасност тигециклина је упоредива са ванкомицином и азтреонамом, и имипенем/циластатином. Тигециклин је отпоран на уобичајене механизме резистенције бактерија (као што су бета лактамазе, појачано испумпавање и др.) [94].

Индикације тигециклина су:

1. компликоване инфекције коже и меких ткива које изазивају *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* (само ванкомицин-осетљиви изолати), *Staphylococcus aureus* (метицилин-осетљиви и метицилин-резистентни изолати), *Streptococcus agalactiae*, *S. anginosus* група (коју чине *S. anginosus*, *S. intermedius* и *S. constellatus*), *S. pyogenes* и *Bacteroides fragilis*;
2. компликоване интраабдоминалне инфекције које изазивају *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* (ванкомицин-осетљиви изолати јер су само они тестирани на људима), *S. aureus* (метицилин-осетљиви изолати јер су само они тестирани на људима), *S. anginosus* група (коју чине *S. anginosus*, *S. intermedius* и *S. constellatus*), *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *Clostridium perfringens* и *Peptostreptococcus micros* [95].

Истраживања глицилциклина као посебне групе антибиотика, који поседују четири угљоводонична прстена идентична језгру тетрациклина, почела су почетком 1990-их, када је откривено да додавање модификованог (гломазног) глициламидног остатка на прстену Д превазилази испумпавање и рибозомски тип резистенције бактерија. Тигециклин је настао додавањем бочног ланца на миноциклин (видети Сliku 5), у облику 9-*terc*-бутил-глициламидног остатка који се везао на положају 9 прстена Д, при чему је то био нови дериват за који се на крају показало да поседује проширене микробиолошке и терапијске предности. Тигециклин је мали молекул (хемијска формула $C_{29}H_{39}N_5O_8$), просечне молекулске масе од 585,65 Да, умерено липофилан ($\log P = 0,8$), понаша се као слаба киселина ($pK_a = 5,02$) и слабо растворљив у води (0,45 g/L) [93, 95-97].



Слика 5. Хемијске структуре: (А) тетрациклин, (Б) миноциклин и (В) тигециклин.

Тигециклин се користи у компликованим инфекцијама коже и меких ткива као што су целулитис и велики апсцеси, у инфекцијама интраабдоминалних органа као што су компликовани апендицитис, холециститис, интраабдоминални апсцеси, перфорације црева и улкуса желуца и дуоденума – праћени дифузним перитонитисом. Почетна доза тигециклина за одрасле особе је 100 mg у виду споре интравенске инфузије у трајању од 30 до 60 минута, па се наставља са дозом од 50 mg на 12 часова током 5-14 дана – зависно од места инфекције, њене тежине и клиничког ефекта [94].

Примарни пут елиминације тигециклина остварује се преко жучи (59%), у неизмењеном облику. Секундарни путеви елиминације чине бубрежно излучивање (22% дозе лека се елиминише у неизмењеном облику у мокраћи) и глукуронидација, а остатак се јавља у виду неактивних метаболита (епимер тигециклина и N-ацетил-9-аминоминоциклин) [98]. За витално угрожене пацијенте и оне са више лекова у терапији је важно што тигециклин не утиче на цитохром П450 (ЦИП450) ензимски систем, укључујући изоформе ЦИП1А2, ЦИП2С8, ЦИП2С19, ЦИП2Д6 и ЦИП3А4, а на основу *in vitro* испитивања, за тигециклин се не очекује да ће изменити метаболизам лекова који се метаболишу преко ЦИП450 ензима. Сам тигециклин се не метаболише преко ЦИП450 [99].

Тигециклин је структурно изведен из миноциклина, а интеракције лекова које се јављају са миноциклином ће се вероватно јавити и са тигециклином. Пошто је за миноциклин познато да смањује потребу за инсулинском терапијом код пацијената са дијабетес мелитусом, смањује ефикасност оралних контрацептива, доводи до повећања нивоа урее у крви код пацијената са претходним оштећењем бубрега који узимају диуретике, неопходан је опрез и код пацијената који користе тигециклин истовремено са овим лековима. Међутим, интеракције путем везивања или формирања комплекса са суплементима који садрже калцијум или гвожђе, лаксативима који садрже магнезијум, холестирамином или холестиполом, су мало вероватне јер се тигециклин примењује само интравенским путем [100].

У студијама спроведеним на здравим особама, где је тигециклин примењиван истовремено са варфарином и дигоксином, показано је да нема клинички релевантних интеракција између ових лекова. Истовремена примена тигециклина (100 mg, а затим 50 mg на 12 часова) и варфарина (једна доза од 25 mg) на здравим особама доводи до повећања C_{\max} Р- и С-варфарина за 38% и 43% и повећања AUC_{0-12h} за 68% и 29%. Најважније је да ова интеракција не доводи значајних промена у ИНР-у. Механизам ове интеракције још увек није потпуно разјашњен. Уколико се тигециклин даје са варфарином, треба контролисати протромбинско време или вршити друге адекватне антикоагулантне тестове, али није неопходно прилагођавање дозе лека. Тигециклин у препорученом режиму дозирања незнатно смањује C_{\max} дигоксина за 13%, али не утиче на AUC_{0-12h} . Оштећење бубрега не утиче на фармакокинетички профил тигециклина и он се не елиминише хемодијализом. Сви наведени фактори чине дозирање тигециклина једноставним и без компликација [101-103].

Тигециклин има знатно већи волумен дистрибуције (>10 L/kg) у односу на друге тетрациклине (0,14-1,6 L/kg), а његово везивање за протеине плазме износи приближно 68% [100]. Волумен дистрибуције тигециклина у равнотежном стању се креће између 500 и 700 L (од 7 до 9 L/kg), што указује да се интензивно дистрибуира изван волумена плазме и концентрише у ткивима [104].

Једна од студија је испитивала дистрибуцију тигециклина у равнотежном стању примењеног у почетној дози од 100 mg интравенски, затим 50 mg интравенски на сваких 12 часова, у течности која облаже плућни епител и алвеоларним ћелијама здравих особа. Површина испод криве серумска концентрација лека/време од 0 до 12 часова (AUC_{0-12h}) у алвеоларним ћелијама (134 mg·h/mL) је била скоро 77,5 пута већа од

AUC_{0-12h} пронађене у серуму. AUC_{0-12h} тигециклина у течности која облаже плућни епител ($2,28 \text{ mg}\cdot\text{h/mL}$) је била за око 32% већа од оне у серуму [105].

У другој студији са појединачном дозом тигециклина од 100 mg примењеног интравенски код пацијената који су били заказани за елективну хирургију или медицинске процедуре за екстракцију ткива, концентрација тигециклина је премашила ону пронађену у серуму и то 38 пута у ткиву жучне кесе, 8,6 пута у плућном ткиву и 2,3 пута у цревном ткиву. Концентрација тигециклина у овим ткивима после вишеструких доза лека није испитивана, али се очекује да нивои у равнотежном стању немају ниже вредности од оних после појединачне дозе [106].

Фармакокинетичке студије су показале да вишеструке дозе у инфузијама од 30 минута по 50 mg тигециклина на сваких 12 часова прате линеаран фармакокинетички профил, са дугим терминалном полуживотом ($t_{1/2}$) од 42 часа и максималном концентрацијом у плазми (C_{\max}) од $0,87 \mu\text{g/mL}$. Једна доза од 100 mg тигециклина има $t_{1/2}$ од 27 часова. Минимална серумска концентрација (C_{\min}) забележена за тигециклин је $0,13 \mu\text{g/mL}$, а површина испод криве серумска концентрација лека/време од 0 до 24 часа (AUC_{0-24h}) износи $4,7 \text{ mg h/mL}$. Просечан волумен дистрибуције тигециклина у равнотежном стању (V_{ss}) је 639 L, што указује да тигециклин накупља у ткивима и да се не задржава у интраваскуларном простору без обзира на његово везивање за протеине плазме [107].

Тигециклин је контраиндикован код трудница, деце и адолесцената до 18 година старости. На његов фармакокинетички профил не утичу старост, пол и раса пацијената. Дозу лека није потребно подешавати код пацијената са бубрежном дисфункцијом и код пацијената са благом до умереном дисфункцијом јетре. Међутим, у присуству тешког оштећења јетре препоручује се корекција терапије и примена половине уобичајене дневне дозе тигециклина [99, 108].

Тигециклин се генерално добро подноси, изузев његових гастроинтестиналних нежељених дејства. Мучнина и повраћање се углавном јављају током прва два дана терапије, пролазног су карактера и обично су благе или умерене јачине. У 3. фази клиничког испитивања, најчешћи разлог за обустављање тигециклина из терапије су били мучнина и повраћање. Узимање хране побољшава подношљивост тигециклина, док учесталост и тежину мучнине и повраћања не може побољшати продужавање трајања инфузије са 1 на 4 часа или превентивно узимање антиеметика. Млађе особе и женски пол су фактори ризика за појаву мучнине и повраћања повезаних са узимањем тигециклина. Ова нежељена дејства су дозно зависна, што може бити објашњење зашто

се тигециклин даје два пута дневно упркос његовом дугом времену полуелиминације ($t_{1/2}$). Поред тога, честа нежељена дејства тигециклина су анорексија, диспепсија, абдоминални болови и псеудомембранозни колитис, фотосензибилизација, апсцеси, флебитис, вртоглавица, могуће су алергијске реакције пруритус и оспа до анафилаксе. У лабораторијским налазима се може јавити продужено протромбинско време и повишени нивои трансaminaза АЛТ и АСТ [94, 109].

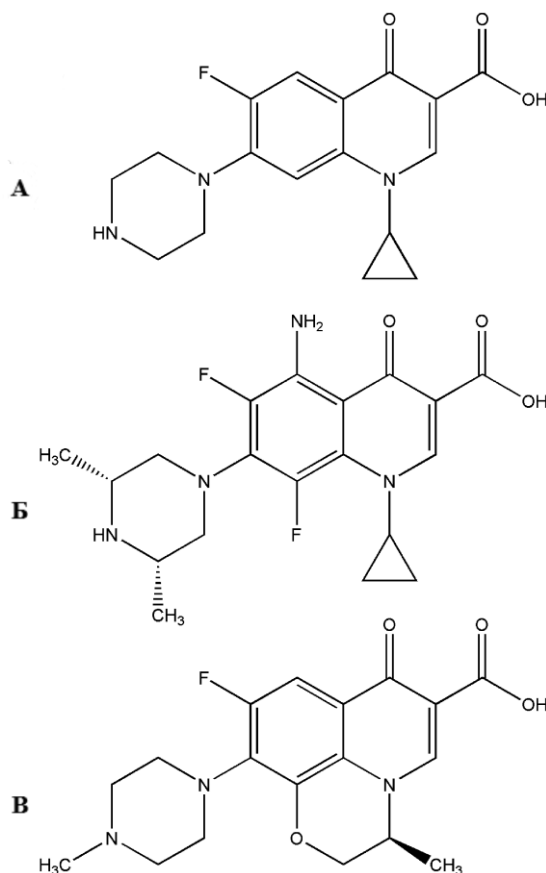
У раније објављеним *in vitro* студијама, везивање тигециклина за протеине плазме је мерено методама ултрафилтрације и ултрацентрифугирања на 37°C. По методи ултрафилтрације *in vitro* везивање тигециклина за протеине плазме при концентрацијама од 0,1 до 1,0 $\mu\text{g/mL}$ се кретало у распону од 71% до 87%, а по методи ултрацентрифугирања *in vitro* везивање при концентрацијама од 0,1 до 1,0 $\mu\text{g/mL}$ се кретало у распону од 73% до 79%. Такође, примећено је да везивање тигециклина за протеине плазме расте са повећањем његове концентрације [110, 111]. Механизам овог атипичног процеса везивања је непознат, али се може односити на његову способност да формира комплексе са јонима метала. Показало се да формирање таквих комплекса између тетрациклина и јона метала доводи до сложених интеракција са серумским протеинима које утичу на стопу дифузије кроз семипермеабилне мембране и везивање за ћелијске протеине [112-114].

1.5. Флуорохинолони

Хинолони су синтетски антимицробни лекови чији је развој почео још 1962. године увођењем налидинске киселине. Антибиотицима у ужем смислу могу се сматрати само флуорохинолони: ципрофлоксацин, флероксацин, офлоксацин и други, који су ефикасни у лечењу системских инфекција. Остали чланови низа: пипемидинска киселина, налидинска киселина, циноксацин, норфлоксацин и други, су ефикасни само у лечењу уринарних инфекција јер се недовољно апсорбују из дигестивног тракта и постижу довољну концентрацију за елиминацију бактерија само у уринарном тракту [94]. Флуорохинолони у свом молекулу садрже по један атом флуора и пиперазинску групу (Слика 6). Ови лекови инхибирају ДНК гиразу, ензим који је неопходан за „супер-намотавање“ бактеријске ДНК, односно за формирање бактеријског хромозома. Еукариотске ћелије немају ДНК гиразу, али садрже један сличан тип ензима – ДНК топоизомеразу. Ово је разлог зашто флуорохинолони слабије делују на еукариотске него на бактеријске ћелије. У терапијским концентрацијама делују бактерицидно [4].

У свету је актуелна класификација флуорохинолона на четири генерације:

- 1. генерацију представљају: налидинска киселина и циноксацин, који су само уроантисептици, јер су њихове концентрације у плазми ниске и не делују на системске инфекције.
- 2. генерација се дели у две веће групе: у првој су норфлоксацин, еноксацин и ломефлоксацин, који су такође само уроантисептици, а у другој групи ове генерације су ципрофлоксацин и офлоксацин, који су прави антибиотици широког спектра дејства са претежним дејством на грам-негативне бактерије, док ципрофлоксацин делује и на *Pseudomonas*, али не делује на грам-позитивне бактерије и анаеробе.
- 3. генерација су левофлоксацин, спарфлоксацин и гатифлоксацин који боље него претходни делују на грам-позитивне бактерије, али не делују на анаеробе.
- 4. генерација су моксифлоксацин и тровафлоксацин, који поред свих особина антибиотика широког спектра делују боље на грам-позитивне бактерије и анаеробе, због чега се користе и код интраабдоминалних инфекција и инфекција мале карлице.



Слика 6. Хемијске структуре флуорохинолона који су коришћени у овом истраживању: (А) ципрофлоксацин, (Б) спарфлоксацин и (В) левофлоксацин.

Флуорохинолони се примењују у терапији уринарних инфекција, чак и када су те инфекције изазване псеудомонасом који је резистентан на велики број лекова. Терапијске дозе норфлоксацина (400 mg), ципрофлоксацина (500 mg) и офлоксацина (400 mg) се примењују два пута дневно. Исти ови лекови су доказано ефикасни у терапији бактеријске дијареје изазване токсигеном *E. coli*, шигелама, салмоелама и кампилобактером. Инфекције меких ткива, костију и зглобова лече се на исти начин, па и када су изазване мултирезистентним псеудомонасом и ентеробактером. Остале индикације су гонококне инфекције, уретритис и цервицитис изазван хламидијама и легионелоза.

Старији флуорохинолони се не препоручују за рутинску терапију пнеумоније и других инфекција респираторног тракта. Међутим, релативно новији флуорохинолони (спарфлоксацин и левофлоксацин) имају појачану активност против грам-позитивних бактерија и других атипичних узрочника пнеумоније као што су хламидије, микоплазма и легионеле, па њихова примена може бити корисна [7, 94].

После оралне примене флуорохинолони се добро апсорбују (њихова биолошка расоположивост је 80-95%), а затим се добро дистрибуирају у телесним течностима и ткивима. Њихово време полуелиминације из крви износи: 3 сата за норфлоксацин и ципрофлоксацин, 5 сати за офлоксацин, 10 сати за перфлоксацин и чак 20 сати за спарфлоксацин. Флуорохинолони са дугим временом полуелиминације могу се узимати једанпут дневно.

Ови антибиотици се концентришу у многим ткивима, нарочито у бубрезима, простати и плућима, где су њихове концентрације веће од оних у серуму. Сви хинолони се концентришу у фагоцитима. Већина не успева да прође хематоенцефалну баријеру, осим перфлоксацина и офлоксацина. Оралну апсорпцију флуорохинолона ометају двовалентни и тровалентни катјони, укључујући оне који се налазе у антацидима (магнезијум и алуминијум). Ципрофлоксацин, норфлоксацин и енрофлоксацин се једним делом елиминишу преко метаболизма у јетри, посредством П450 ензима (које они могу инхибирати и појачати могућност интеракција са другим лековима). У бубрежној инсуфицијенцији флуорохинолони се кумулирају. У таквим случајевима неопходно је индивидуално подешавање терапијских доза.

Флуорохинолони се релативно добро подносе. Нежељени ефекти су ретки, веома благи и нестају са престанком примене лека. Најчешћи нежељени ефекти су наузеја, повраћање и дијареја. Могући су такође главобоља, вртоглавица, несаница, оспе по кожи, оштећење јетре и фотосензибилизација. Истовремена примена ципрофлоксацина

са теофилином проузрокује повећање концентрације теофилина у крви (клинички важна интеракција која настаје услед директне инхибиције П450 ензима), која даље доводи до појаве симптома токсичности теофилина, пре свега код асматицара лечених флуорохинолонима.

Флуорохинолони могу оштетити зглобну хрскавицу и изазвати артропатију. На срећу, ова артропатија је реверзибилне природе. Контраиндиковани су код трудница, у периоду лактације и код деце млађе од 18 година јер ремете нормалан раст зглобних хрскавица. Осим тога, не треба их давати болесницима са обољењима ЦНС-а јер могу изазвати конвулзије. Код старијих особа могу проузроковати конфузно стање.

Посебно је значајна њихова способност да продуже QT интервал у ЕКГ-у. Требало би избегавати њихову примену код болесника који већ имају продужен QT интервал, код оних који имају некориговану хипокалиемију, код оних који се већ лече антиаритмцима (хинидин, прокаин-амид, соталол), као и код оних који већ примају лекове за које се поуздано зна да продужавају QT интервал (еритромицин, трициклични антидепресиви).

Нажалост, резистенција на већину флуорохинолона се брзо развија, чак и у току саме терапије, посебно ако је узрочник псеудомонас. Поред тога, постоји и укрштена резистенција између чланова ове групе лекова [2, 4, 7].

1.5.1. Ципрофлоксацин

Ципрофлоксацин припада 2. генерацији флуорохинолона и током година је постао најзначајнији лек из ове групе антибиотика, највише коришћен у свету и у клиничкој пракси лек избора код многих индикација [94]. Он је антибиотик широког спектра дејства, ефикасан против грам-позитивних и грам-негативних организама. Ципрофлоксацин има изванредно дејство против ентеробактерија, укључујући и друге организме резистентне на пеницилине, цефалоспорине и аминокликозиде. Такође, лек је веома ефикасан против *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter* sp. и псеудомонаса. Од грам-позитивних организама, врло слабо инхибира стрептококе и пнеумококе, а има високу инциденцу стафилококне резистенције.

Ципрофлоксацин треба избегавати код метицилин резистентних стафилококних инфекција. После оралне примене брзо и добро се апсорбује из гастроинтестиналног тракта, а апсолутна биорасположивост износи око 70%, без значајног губитка услед метаболизма првог проласка кроз јетру. Везивање за протеине плазме износи 20-40%. Орално је активан антибиотик са временом полумелиминације од 4,5 сата. Око 40-50%

орално примењене дозе се излучује у урину у виду неизмењеног лека. Нежељени ефекти ципрофлоксацина су гастроинтестинални поремећаји, реакције преосетљивости и ретко поремећаји ЦНС-а [2].

1.5.2. Спарфлоксацин

Спарфлоксацин припада 3. генерацији флуорохинолона. Лек је показао снажну антимикробну активност против широког спектра грам-позитивних и грам-негативних бактерија, анаероба, *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp. и *Mycobacterium* spp. Метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* је такође веома остетљив на спарфлоксацин. Максимална концентрација у плазми од око 0,7 mg/L се постиже за 3-5 сати након оралне дозе од 200 mg спарфлоксацина. Након тога следи једнофазни лагани пад концентрације у плазми, са временом полуелиминације од 15 до 20 сати. Уношење хране не утиче на апсорпцију и фармакокинетику спарфлоксацина.

Спарфлоксацин се слабо везује за протеине плазме (37%) и показује одличну дистрибуцију у ткива и ефикасно продирање у екстрацелуларне течности. Његове концентрације у већини ткива су сличне или веће од истовремених концентрацијама у плазми. Спарфлоксацин се дистрибуира слабо у цереброспиналној течности. Лек се метаболише до глукуронида. Уринарно излучивање у виду неизмењеног лека чини 10-14% од примењене дозе лека. Чак и код пацијената са тешком бубрежном инсуфицијенцијом, нема значајног продужења времена полуелиминације након оралне примене. Вероватноћа да ће спарфлоксацин утицати на фармакокинетику теофилина је изузетно ниска. Антациди који у себи садрже алуминијум хидроксид смањују оралну биорасположивост спарфлоксацина за 25 до 35%. Због свих фармакокинетичких својстава његово дозирање је једанпут дневно у лечењу различитих инфекција.

Спарфлоксацин се генерално добро подноси. Гастроинтестинални поремећаји су најчешћа нежељена дејства спарфлоксацина, а због потенцијалне фотосензитивности и продужења QT интервала у ЕКГ-у његова примена захтева посебан опрез. Због фототоксичног потенцијала, његову примену треба ограничити на респираторне инфекције изазване резистентним организмима [115, 116].

1.5.3. Левофлоксацин

Левофлоксацин припада 3. генерацији флуорохинолона и представља оптички активан Л-изомер офлоксацина. Примарно је индикуван код респираторних инфекција: акутни синуситис, акутна егзацербација хроничног бронхитиса, пнеумоније настале ван

болнице, али и код некомплицованих и компликованих уринарних инфекција укључујући пијелонефритис, код хроничног простатитиса и инфекција коже и меких ткива. Његова фармакокинетика је иста после оралне и интравенске примене, а време полумелиминације износи 6-8 сати, што му омогућава дозирање 1-2 пута дневно, у зависности од тежине инфекције и осетљивости претпостављеног патогена. Апсорпција левофлоксацина после појединачних или вишеструких доза од 200 до 400 mg је предвидива, а количина лека која се апсорбује расте пропорционално са дозом. Везивање левофлоксацина за протеине плазме износи 24-38%. Углавном се излучује у неизмењеном облику у урину и има лимитиран метаболизам код људи. Код тешких инфекција терапија се може започети интравенским инфузијама, а после 2 дана наставити оралним путем. Профил нежељених ефеката левофлоксацина је сличан са другим флуорохинолонима, укључујући оштећења ткива и зглобова, надражај ЦНС-а и повећан ризик од конвулзија, продужење QT интервала и хепатотоксичност различите тежине [94].

1.6. Технике за проучавање везивања лекова за албумине

Генерално, процес везивања лекова за протеине може бити праћен и проучаван помоћу много различитих експерименталних приступа. Различите технике, које чини флуоресцентна спектроскопија, еквилибријум дијализа, циркуларни дихроизам (ЦД), ултраљубичасто-видљива (енгл. *ultraviolet-visible*, UV-Vis) спектрофотометрија, бројне електрохемијске методе, Фуријеова (Joseph Fourier) трансформациона инфрацрвена спектроскопија (ФТИР) и нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија (НМР) се обично користе за проучавање молекулских интеракција лекова и албумина. Технике се заснивају на праћењу промена физичко-хемијских карактеристика лек-протеин комплекса после везивања, било директно (директне технике) или након одвајања везане и слободне фракције испитиваног лека (индиректне технике). Међу свим постојећим директним техникама, флуоресцентна спектроскопија се данас интензивније користи и сматра се супериорнијом у односу на индиректне технике (еквилибријум и динамичка дијализа, ултрафилтрација и гел филтрација) јер се њоме не ремети везујућа равнотежа са одвајањем [117].

Конвенционални приступи у поређењу са спектроскопским техникама имају мањак осетљивости, дуго експериментално време и захтевају високе концентрације протеина које превазилазе константу дисоцијације лек-протеин комплекса и испитивање лек-протеин интеракције [118]. Спектралне методе могу идентификовати

везивање лекова и албумина при врло ниским концентрацијама. Поступак гашења флуоресценције се често примењује у циљу проучавања молекулске интеракције због своје високе осетљивости, репродуктивности и релативно једноставне употребе. Спектралне промене уочене при везивању лекова за албумине су важна оруђа за истраживање топологије везујућих места, конформационих промена и описивање супстрата на којима се везују лекови [91]. UV-Vis апсорпциона спектрофотометрија је једноставна и ефикасна метода која се користи у циљу истраживања структурних промена и добијања важних информација о формирању комплекса [119-121]. Молекулско моделирање, као допунска метода, може да пружи важне информације на молекулском нивоу и процени учешће одређених хемијских група и њихових интеракција у стабилизацији комплекса [122].

1.6.1. Флуоресцентна спектроскопија

Флуоресцентна спектроскопија је врста електромагнетне спектроскопије којом се анализира флуоресценција узорка, а комплементарна техника јој је апсорпциона спектроскопија. Заснива се на мерењу интензитета флуоресцирајуће светлости коју емитује испитивана супстанца, у односу на светлост коју емитује одговарајућа стандардна супстанца. Након излагања ултраљубичастом или видљивом светлошћу, побуђују се електрони код неких молекула, а ређе и код атома, што узрокује секундарну емисију светлости веће таласне дужине од ексцитационе (побудне) светлости. Емисиона светлост је карактеристична за супстанцу која је емитује. Сама појава је позната под називом фотолуминисценција. Уколико емисија светлости траје колико и ексцитација, реч је о флуоресценцији, а уколико траје и после гашења ексцитационе светлости, говоримо о фосфоресценцији [13, 91, 123].

Флуоресцентна спектроскопија представља комбинацију апсорпционе и емисионе спектрометрије. Физички процес се састоји у апсорпцији фотона $h\nu_1$ и емисије фотона мање енергије $h\nu_2$. Изглед флуоресцентног спектра зависи од природе и агрегатног стања супстанце, а може бити везан за атоме, молекуле или кристале [123].

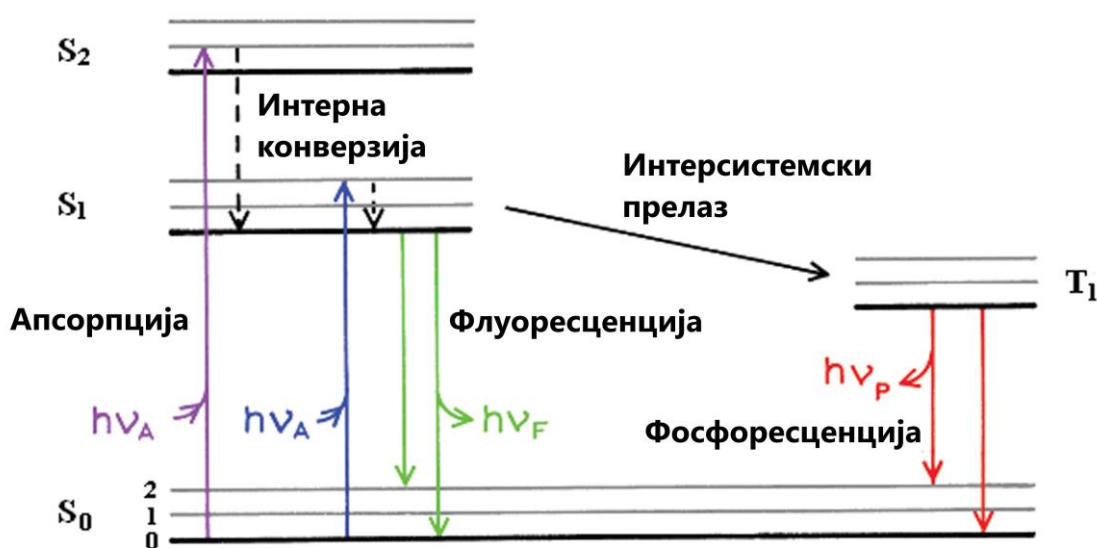
Апарати који мере флуоресценцију се зову флуориметри. На почетку поступка, испитивана супстанца се раствори у одређеном растварачу или смеси растварача, раствор се пренесе у ћелију или кивету флуориметра и осветли ексцитирајућим светлосним зраком одређене таласне дужине, који треба да буде монохроматски. У типичном експреименту, различите таласне дужине флуоресцентне светлости које емитује узорак се мере коришћењем монохроматора, а интензитет емисионе светлости

се мери под углом од 90° у односу на ексцитирајући зрак, при чему настаје емисиони спектар. Код квантитативног одређивања у апарат се прво унесе растварач или смеша растварача која се користи за растварање испитиване супстанце и подеси нулта вредност апарата. Важно је подесити одговарајућу осетљивост апарата и ширину зареза. Након тога се може унети раствор испитиване супстанце и извршити мерење. Уколико се врши друго подешавање променом ширине зареза, мора се поново подесити нулта вредност апарата [13].

Спектрални подаци добијени из флуоресцентних мерења се приказују у облику емисионих спектра. Флуоресцентни емисиони спектар је график зависности интензитета флуоресценције од таласне дужине (nm) или таласног броја (cm^{-1}). Емисиони спектри веома варирају, а зависе од хемијске структуре флуорофоре и од растварача у коме је растворена. Важна карактеристика флуоресцентне спектроскопије је висока осетљивост детекције, која је 100-1000 пута осетљивија од осталих спектроскопских техника [91].

1.6.1.1. Процеси апсорпције и емисије светлости – Јаблонски дијаграм

Јаблонски дијаграм се најчешће користи као полазна основа када се дискутује о процесима који се дешавају између апсорпције и емисије светлости [124]. Постоје различите форме овог дијаграма, које се користе за илустровање различитих молекулских процеса који се могу одигравати у побуђеним стањима, а једна од њих је приказана на Слици 7.



Слика 7. Један од облика Јаблонски дијаграма.

На дијаграму (Слика 7) су приказана електронска и вибрациона стања молекула, као и прелази између њих. Генерално, молекул може бити у стању најниже енергије, односно у основном електронском енергетском нивоу (најнижа линија означена са S_0) или у побуђеном енергетском нивоу (S_1 или S_2) [125]. У сваком од ових енергетских нивоа се налазе вибрациони енергетски нивои, означени са 0, 1, 2 итд. Прелази између енергетских нивоа су означени вертикалним линијама које треба да илуструју тренутну природу апсорпције светлости. Разликују се два типа енергетских прелаза, дозвољени и недозвољени. Дозвољени су прелази електрона са вишег на нижи вибрациони ниво, као и прелази са основног вибрационог нивоа побуђеног стања на неки од вибрационих нивоа непобуђеног енергетског стања. После апсорпције светлости дешава се неколико процеса. Флуорофора обично бива побуђена на неки виши вибрациони ниво било S_1 или S_2 . Због преклапања или мале енергетске разлике између вибрационих нивоа различитих побуђених енергетских стања, може доћи до процеса интерне конверзије, тј. до прелаза из вишег у најнижи вибрациони ниво. Вероватноћа интерне конверзије зависи од енергетске разлике два нивоа и смањивањем енергетске разлике вероватноћа овог процеса расте. Овим путем се релаксирају виша побуђена синглетна стања између којих је енергетска разлика мала. Са неколико изузетака, молекули у кондензованим фазама се брзо релаксирају до најнижег вибрационог нивоа S_1 . Интерна конверзија и обично се дешава за 10^{-12} s или мање. Енергетска разлика између првог побуђеног и основног електронског енергетског нивоа је обично знатно већа, па се први побуђени ниво углавном релаксира емисијом, односно флуоресценцијом. Пошто флуоресценција траје око 10^{-8} s, интерна конверзија је у општем случају завршена пре емисије. Према томе, емисија флуоресценције потиче из термално уравнотеженог побуђеног стања, односно из најнижег вибрационог нивоа S_1 у основни електронски енергетски ниво S_0 и представља дозвољени прелаз.

Молекули у S_1 стању могу подлећи конверзији спина у прво триплетно стање T_1 . Емисија из T_1 се назива фосфоресценција и померена је ка већим таласним дужинама (нижој енергији) у односу на флуоресценцију. Овај процес је спински забрањен, што у ствари значи да му је вероватноћа мала, а то одговара веома дугом времену живота овог стања, реда 10^{-3} -1 s. Реч је о метастабилним нивоима. Молекули који садрже тешке атоме, као што су бром или јод, су често фосфоресцентни [91, 123].

На Слици 7 се може јасно видети да је енергија емисије типично мања (већа таласна дужина) од енергије апсорпције. Ову појаву је први открио Џорџ Габријел Стокс (George Gabriel Stokes) 1852. године и по њему је ово померање названо

Стоксово померање [126]. Он је на примеру кинина уочио и ефекат унутрашњег филтера [127]. Један од честих узрока Стоксовог померања је брза релаксација до најнижег вибрационог нивоа S_1 . Поред тога, флуорофоре се генерално релаксирају до виших вибрационих нивоа S_0 , што доводи до даљег губитка енергије термализацијом вишка вибрационе енергије. Као додаток овим ефектима, флуорофоре могу додатно испољавати Стоксово померање због ефекта растварача, реакција у побуђеном стању, формирања комплекса и/или енергетског трансфера [91].

1.6.1.2. Ефекат унутрашњег филтера

Ефекат унутрашњег филтера (енгл. *inner filter effect*) се јавља када на таласној дужини на којој флуорофора емитује зрачење други молекул или део макромолекула апсорбује светлост. Ефекат се објашњава реапсорпцијом емисије од стране узорка, при чему се део фотона или сви фотони које емитује флуорофора поново апсорбују. Последица овог ефекта је да интензитет ексцитоване светлости није константан кроз раствор, тако да само њен мали проценат долази до флуорофора које су видљиве у систему за детекцију. Ефекти унутрашњег филтера мењају спектар и интензитет емитоване светлости и морају се узети у обзир код анализе флуоресцентног емисионог спектра [91, 128].

Гашење флуоресценције и ефекат унутрашњег филтера се базирају на смањењу интензитета флуоресценције, па је зато неопходно утврдити узрок ове појаве како не би дошло до грешака. Без обзира на то који се „квенчер“ (енгл. *quencher*) – гасилац флуоресценције користи, мора се утврдити да ли је ефекат унутрашњег филтера значајан. Уколико је ефекат значајан, неопходно је извршити корекцију посматраног интензитета флуоресценције. Апроксимативно, кориговани интензитет флуоресценције (F_{corr}) може се израчунати из једначине (7) [91]:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \text{anti} \log \left(\frac{OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}}{2} \right) \quad (7)$$

где су F_{corr} и F_{obs} кориговани и посматрани интензитети флуоресценције, а OD_{ex} и OD_{em} (енгл. *optical density*) су оптичке густине раствора на таласној дужини ексцитације и емисије. Може се применити и другачији облик ове једначине уколико се узме у обзир и геометрија ћелије у којој се снима узорак [129, 130].

Нешто другачији облик једначине за корекцију интензитета флуоресценције је приказан релацијом (8):

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (8)$$

где су F_{corr} и F_{obs} кориговани и посматрани интензитети флуоресценције, а A_{ex} и A_{em} су апсорбанце раствора на таласној дужини ексцитације и емисије.

1.6.1.3. Механизми гашења флуоресценције

Гашење флуоресценције (енгл. *fluorescence quenching*), тј. смањење интензитета флуоресценције, може настати путем различитих механизма, који се најчешће класификују као динамичко и статичко гашење. Динамичко гашење се јавља када се лек (квенчер) судари са протеином (флуорофором), при чему квантни принос бива смањен и јачина флуоресценције ослабљена. Статичко гашење настаје као последица формирања комплекса у основном стању између лека и протеина [91].

Динамичко и статичко гашење се разликују јер показују различиту зависност од температуре и вискозности. Код статичког гашења константе гашења опадају са порастом температуре јер раст температуре често доводи до смањења стабилности комплекса, док је код динамичког гашења присутан супротан ефекат. Виша температура доводи до брже дифузије и дисоцијације слабије везаних комплекса, што доводи до веће стопе динамичког гашења и мање стопе статичког гашења [131].

Трансфер енергије између донора (флуорофоре) и акцептора (другог молекула) се може извршити нерадијативно (без апсорпције или емисије фотона) путем неколико различитих механизма, а то су:

1. динамичко гашење флуоресценције, у које се убрајају:
 - колизиони енергетски трансфер (Декстеров електронски трансфер),
 - Форстеров резонантни енергетски трансфер (ФРЕТ),
 - формирање комплекса у побуђеном стању (енгл. *excited state complex*) који се распада у основном стању [132-134], и
2. статичко (контактно) гашење флуоресценције.

За проучавање динамике флуоресценције веома је важно време живота које флуоресцентни молекули проведу у побуђеном стању и интерагују са другим молекулима у раствору.

Декстеров (Dexter) електронски трансфер (колизионо гашење флуоресценције) настаје када се флуорофора у ексцитованом (побуђеном) стању деактивира приликом контакта са неким другим молекулом у раствору (квенчером). У овом процесу молекули остају хемијски непромењени [91].

Форстеров (Förster) резонантни енергетски трансфер (ФРЕТ) је такође један важан процес који се јавља у побуђеном стању. Овај процес се дешава кад год се флуоресцентни спектар флуорофоре (донора) преклапа са апсорпционим спектром другог молекула (акцептора). ФРЕТ је динамички процес јер се енергетски трансфер дешава док је донор у побуђеном стању. ФРЕТ није резултат емисије донора која се апсорбује од стране акцептора нити постоји интермедијерни фотон, а акцептор не мора да буде флуоресцентан. Овакви процеси реапсорпције зависе од укупне концентрације акцептора и од немолекуларних фактора, као што је нпр. величина узорка. Између донора и акцептора су дипол-дипол интеракције, при чему ФРЕТ зависи и од релативне оријентације прелазних диполних момената донора и акцептора [135].

ФРЕТ теорија је комплексна и различита је за доноре и акцепторе који су ковалентно везани, слободни у раствору или су део ригидних геометрија или ДНК. Поред тога, у зависности од времена живота донора, дифузија може повећати степен енергетског трансфера.

За разлику од Форстеровог, Декстеров електронски трансфер је феномен који се јавља на мањим удаљеностима и смањује се у зависности од просторног преклапања молекулских орбитала донора и квенчера. Зајдничка особина која се односи за оба типа трансфера јесте да облик апсорпционих и флуоресцентних (емисионих) спектра остаје исти.

Статичко (контактно) гашење флуоресценције се јавља када флуорофора са квенчером формира комплекс који није флуоресцентан и који има јединствен апсорпциони спектар. Овај процес се дешава у основном стању и не заснива се на дифузионом процесу нити на сударима молекула. Формирање комплекса може бити нарушено високим температурама и додатком сурфактаната (површински активних једињења) [91, 136].

1.6.2. UV-Vis спектрофотометрија

UV-Vis спектрофотометрија је спектроскопска метода која обухвата проучавање апсорпције електромагнетног зрачења у области између 200 и 800 nm. Велики број органских једињења не апсорбује у овом делу спектра, па UV-Vis спектрофотометрија,

у поређењу са другим спектроскопским методама, има далеко мању примену у одређивању структура једињења и махом се користи као комплементарна метода за идентификацију делова молекула који апсорбују у наведеној области – хромофора. Поред тога, ова метода је незаменљива за идентификацију природних коњугованих једињења. Протеини значајно апсорбују у UV спектралној области што је од огромне практичне важности у биохемији и сродним научним областима. Осим примене у идентификацији органских једињења (у комбинацији са другим спектроскопским методама), UV-Vis спектрофотометрија се данас доста примењује у квантитативној анализи. Значајне предности над осталим методама су у великој осетљивости (обично се спектри снимају при разблажењу од 10^{-3} до 10^{-5} mol/L), релативно ниској цени и једноставном руковању инструментима.

На основу Ламбер–Беровог (Lambert–Beer) закона, изведеног из два одвојена емпиријска закона, интензитет апсорпције зрачења дефинисан је једначином (9):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (9)$$

I_0 – интензитет упадног зрака,

I – интензитет зрака по проласку кроз узорак,

c – концентрација апсорбујуће супстанце (mol/L),

l – дужина путање зрака кроз узорак (cm),

ε – моларна апсорптивност (моларни екстинкциони коефицијент),

A – апсорбанца.

Код квантитативне анализе је најбитније да се мерења апсорбанце врше са највећом могућом тачношћу и осетљивошћу. Обично се снимају спектри разблажених раствора. Колика ће концентрација узорка бити направљена зависи од интензитета апсорпције и подешава се тако да врх апсорпционог максимума буде у области највеће тачности, што одговара вредностима између 0,2 и 0,7 јединица апсорбанце. Да би се то постигло, потребно је добро познавање типа хромофоре, односно њене приближне моларне апсорптивности, а на основу једначине (9), могуће је приближно израчунавање потребне концентрације узорка. Зато је најбоље направити концентрованији раствор од кога ће се поступним разблаживањем добити раствор концентрације погодне за снимање. Сваки апсорпциони максимум је окарактерисан таласном дужином на којој се налази (λ_{\max}) и моларном апсорптивношћу (ε) на тој таласној дужини.

Израчунавање апсорбанце раствора који има више компоненти које апсорбују електромагнетно зрачење, а које међусобно не реагују, могуће је извршити помоћу формуле и она је једнака збиру појединачних апсорбанци свих компоненти (10):

$$A = \sum A_i = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad (10)$$

Ламбер–Беров закон не важи када:

- растворна супстанца постоји у више облика који су у међусобној равнотежи,
- растворна супстанца и растварач граде асоцијат,
- постоји термичка равнотежа између основног и побуђеног стања,
- једињења флуоресцирају или се хемијски мењају приликом апсорпције зрачења.

Приликом интерпретације UV-Vis спектра неопходно је да се у првој фази обрати пажња на следеће:

1. општи изглед, сложеност (фина структура) и положај спектра (у односу на видљиву област) – спектар који садржи много трака које се протежу и у видљиву област је доказ дуге коњуговане или полицикличне ароматичне хромофоре.
2. интензитет трака (ϵ) – веома важна карактеристика спектра и она такође знатно помаже у индетификацији хромофоре.

У случајевима када апсорпција одступа од Ламбер–Беровог закона, неопходна је припрема калибрационе криве $c = f(A)$, направљене од спектра стандардних раствора различитих концентрација. Када се одређују два или више једињења у смеси, преклапање њихових трака у спектру може да отежа или потпуно онемогући квантитативну анализу. Међутим, чак и у тим случајевима некада је могуће, употребом калибрационе криве, ипак урадити квантитативну анализу, под условом да се спектри компоненти које се одређују не преклапају у потпуности [123, 137-139].

1.6.3. AutoDock анализа

Рачунарска (компјутерска) хемија представља младу грану хемије у којој се хемијски проблеми решавају рачунарским методама. Она омогућава истраживање хемијских проблема помоћу рачунара у случајевима када су лабораторијска испитивања прескупа, непрактична или немогућа. Молекулско моделирање је веома важна техника која се користи у рачунарској хемији, рачунарској биологији и науци о

материјалима. Молекуласко моделирање обједињује теоријске методе и рачунарску технику, при чему дизајнира моделе хемијских интеракција и симулира понашање различитих хемијских система – молекула и хемијских реакција. Нека најједноставнија израчунавања се могу „ручно“ обавити, али су рачунари ипак неопходни за молекулско моделирање било ког система разумне величине. Молекулско моделирање смањује сложеност система, допуштајући да се у току симулација узме у обзир много више делова (атома) [140, 141].

У пољу молекулског моделирања, докинг (енгл. *docking*) је метод којим се одређује приоритетна (пожељна) орјентација једног молекула у другом када су везани један за други, при чему формирају стабилан комплекс [142]. Налажење приоритетне орјентације може бити корисно у предвиђању јачине асоцијације или афинитета везивања између два молекула. На докинг се може гледати као на проблем „кључа и браве“, при чему се протеин може сматрати „бравом“, а лиганд „кључем“. Међутим, пошто су лиганд и протеин флексибилни, аналогија „руке у рукавици“ је вероватно подеснија од кључа и браве [143]. Током овог процеса лиганд и протеин подешавају своје конформације како би постигли свеобухватно најбоље уклапање и саградили најстабилнији комплекс. Такав тип конформационог подешавања којим се остварује везивање молекула се назива индуковано уклапање (енгл. *induced-fit*) [144].

Уопштено гледано, фокус молекулског докинга је на рачунарском симулирању процеса молекулског препознавања. Ова метода има за циљ да постигне оптималну конформацију протеина и лиганда, а уједно и релативну орјентацију између протеина и лиганда, тако да слободна енергија целокупног система буде сведена на минимум.

У програмима за молекулски докинг су посебно популарна два приступа. Један приступ користи технику уклапања која описује протеин и лиганд као комплементарне површине [145]. Други приступ симулира стваран процес молекулског докинга у коме се енергије лиганд-протеин интеракција израчунавају [146]. Наведени приступи имају значајне предности и ограничења.

Симулирање докинг процеса је много компликованије. У овом приступу, протеин и лиганд су раздвојени неком физичком раздаљином, а лиганд проналази своју позицију у активном месту протеина након одређеног броја „покрета“ у свом конформационом простору. Сваки од ових појединачних покрета утиче на укупан енергетски трошак система, при чему се укупна енергија система израчунава након сваког покрета.

Број тренутно доступних софтвера за докинг је велики и у сталном је порасту у последњих десетак година. AutoDock је програмски пакет за симулирање молекулског моделирања који се састоји од аутоматизованих докинг алата. Посебно је ефикасан за лиганд-протеин докинг. Дизајниран је да предвиди како се мали молекули, као што су супстрати или потенцијални лекови, везују за рецепторе познатих тродимензионалних структура. AutoDock је један од највише цитираних докинг софтвера у научној литератури. У суштини, AutoDock се састоји из два основна програма: AutoDock који врши докинг лиганда на скуп мрежа које описују циљани протеин и AutoGrid који врши претходна израчунавања ових мрежа. Осим тога, програм може да прикаже атомске афинитете ових мрежа. Ово помаже научницима у дизајнирању што бољег лиганда (лека). Употреба AutoDock програма је довела до открића неколико лекова [147-149].

1.7. Значај истраживања и преглед литературе

Једна од најважнијих биолошких функција албумина је њихова способност да везују и транспортују лекове, као и ендogene и екзогене супстанце, при чему су до данас спроведени бројни експерименти са циљем одређивања капацитета везивања и везујућих места у албумину. Многи лекови се транспортују кроз крвоток везивањем за серумске албумине, па је неопходно проценити њихове међусобне интеракције, како би се оне предвиделе пре појаве у клиничкој пракси [53, 150, 151].

Квантитативно одређивање протеина у биолошким течностима је од изузетног значаја у биологији и медицини, а флуоресцентне пробе се успешно примењују у овим процедурама. Хидрофобни џепови, у којима су смештена два главна везућа места, омогућавају серумским албуминима да повећавају растворљивост хидрофобних лекова у плазми и модулирају њихову испоруку ка ћелијама *in vivo* и *in vitro*. Многи лекови, укључујући антикоагулансе, лекове за смирење, као и опште анестетике, се транспортују у крви у везаном облику за албумине, при чему је често више од 90% лека везано [152, 153]. Ово је стимулисало многа истраживања о природи везујућих места као и истраживања о томе да ли се масне киселине, природни метаболити и лекови међусобно такмиче за везивање на протеинима [154-161].

Све чешћа конкуренција лекова за исто везујуће место на албумину може изменити слободну фракцију лека у плазми и променити његов тераписки или токсични ефекат, па је одређивање карактеристика везивања, афинитета и везујућих места на албумину од огромног значаја. Флуоресцентна спектроскопија је веома корисна када се у експериментима употребе флуоресцентне пробе и специфични маркери везујућих

места на албумину, при чему се могу добити важне информације о природи везујућих места, као и о њиховој специфичности и афинитету према одређеним лигандима. Спектроскопске методе могу пружити важне информације о везивању малих молекула за протеине, о чему сведочи велики број научних радова у којима су оне коришћене.

На основу великог броја објављених радова, за већину познатих и регистрованих лекова у свету, у којима је испитивано њихово везивање за албумине, закључили смо да је ХСА важан модел за проучавање лек-протеин интеракција. Спектрофотометријске методе су „златни стандард“ у свим квалитативним и квантитативним испитивањима везивања лекова за албумине, уз оправдану употребу AutoDock анализе, као савремене компјутерске методе за симулирање интеракција и проверу резултата.

Интересовање за истраживања овог типа је у порасту у свету, о чему сведочи све већи број публикованих радова током неколико година уназад. Готово да не постоји лек за који није спроведена студија на ову тему. Ова чињеница може бити оправдана сталном тежњом медицинских радника и клиничких фармаколога да дођу до валидних информација у вези са везивањем лека за ХСА, пре свега због могућих интеракција са другим лековима и суплементима које би, као крајњи исход, могле да имају промену фармаколошких и токсиколошких особина првобитно примењеног лека. Поред тога, тигециклин је релативно скорије регистрован у свету, а доступан је од недавно и у нашој земљи у облику ињекција.

Резултати добијени у овом истраживању могу бити од великог значаја за даљи развој природних наука, клиничке фармакологије и медицине. С обзиром да су ранија испитивања везивања тигециклина за хумани серумски албумин оскудна, циљ нашег испитивања је да се боље објасни ово везивање и да се испита утицај јона метала и антибиотика из групе флуорохинолна на ово везивање, а због све чешће истовремене примене лекова у терапији. Ово истраживање треба да пружи додатне информације о фармакокинетици тигециклина, које су до сада биле непознате, а које треба да омогуће боље разумевање његовог фармацеутског потенцијала и побољшају његову примену у клиничкој пракси.

Свеобухватном претрагом литературе су пронађени радови који су испитивали везивање скоро свих антибиотика из групе тетрациклина (тетрациклина, доксициклина, демеклоциклина, окситетрациклина, метациклина и хлортетрациклин хидрохлорида) за хумани серумски албумин [82-85, 162-164]. На основу свих доступних информација, дошли смо до закључка да испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин до сада није спроведено.

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу података изнетих у општем делу, постављене су следеће хипотезе:

1. У симулираним *in vitro* физиолошким условима тигециклин се везује за хумани серумски албумин при чему настаје нови протеин-лек комплекс.
2. Везе које се успостављају између тигециклина и хуманог серумског албумина су: хидрофобне, електростатичке, ван дер Валсове (van der Waals), водоничне и ковалентне везе. Најдоминантније су хидрофобне везе.
3. Процес везивања тигециклина за хумани серумски албумин је статички механизам везивања и биће потврђен гашењем флуоресценције активног центра у албумину.
4. Доминантно (фаворизовано) везујуће место за тигециклин у хуманом серумском албумину је место I (Судлово место I).
5. Јони метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) утичу на везивање тигециклина за хумани серумски албумин.
6. Флуорохинолони (спарфлоксацин, левофлоксацин и ципрофлоксацин) утичу на везивање тигециклина за хумани серумски албумин.
7. Тигециклин утиче на везивање флуорохинолона (спарфлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина) за хумани серумски албумин.

Ради провере хипотеза, постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Одредити константе везивања, број везујућих места (капацитет везивања), термодинамичке параметре и природу везујућих сила између тигециклина и хуманог серумског албумина, на основу спектрофотометријских резултата и AutoDock анализе.
2. Утврдити механизам гашења флуоресценције хуманог серумског албумина тигециклином.
3. Проценити ефекат трансфера енергије и одредити растојање везивања између тигециклина и хуманог серумског албумина, обрадом спектрофотометријских резултата.
4. Идентификовати доминантно везујуће место за тигециклин у хуманом серумском албумину, на основу експеримената у којима ће се испитивати конкуренција тигециклина и специфичних маркера везујућих места (варфарина и ибупрофена), обрадом спектрофотометријских резултата и AutoDock анализе.
5. Проценити утицај јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) на везивање тигециклина за хумани серумски албумин, на основу резултата апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.
6. Проценити утицај флуорохинолона (спарфлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина) на везивање тигециклина за хумани серумски албумин, на основу резултата апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.
7. Проценити утицај тигециклина на везивање флуорохинолона (спарфлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина) за хумани серумски албумин, на основу резултата апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Дизајн студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија у којој је испитивано везивање тигециклина за хумани серумски албумин у симулираним физиолошким условима *in vitro*. Под истим експерименталним условима је испитиван утицај више различитих једињења на ово везивање. Од полазних раствора хуманог серумског албумина и лекова направљене су серије раствора унапред одређеног молског односа. За све серије раствора су снимљени флуоресцентни и апсорпциони спектри на основу којих су добијени резултати.

3.2. Хемикалије и реагенси

Супстанце које су коришћене у експериментима су: хумани серумски албумин, тигециклин, флуорохинолони (спарфлоксацин, левофлоксацин и ципрофлоксацин), специфични маркери везујућих места на албумину (варфарин и ибупрофен), соли метала (CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3), фосфатни пуфер, NaCl , HCl и двоструко дестилована вода. Хумани серумски албумин (ХСА, лиофилизован прах, слободне масне киселине $\leq 0.007\%$, чистоћа $\geq 96\%$, каталошки бр. А1887), тигециклин (ТГЦ, тигециклин хидрат, чистоћа $\geq 98\%$, каталошки бр. PZ0021), спарфлоксацин (СПФ, чистоћа $\geq 98\%$, каталошки бр. 56968), левофлоксацин (ЛВФ, чистоћа $\geq 98\%$, каталошки бр. 28266) и ципрофлоксацин (ЦПФ, чистоћа $\geq 98\%$, каталошки бр. 17850), варфарин (ВФ, аналитички стандард, каталошки бр. А2250) и ибупрофен (ИП, чистоћа $\geq 98\%$, каталошки бр. 14883) су купљени од компаније Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Остале супстанце су купљене од компаније Superlab (Београд, Србија).

Сви раствори су свеже припремани растварањем у фосфатном пуферу (0,1 mol/L, рН 7,4) који садржи 0,15 mol/L NaCl . Пуфер је коришћен у циљу одржавања константне рН вредности, а NaCl ради одржавања константне јонске јачине раствора. Остале супстанце које су коришћене у експериментима ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaCl , CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , HCl) су биле аналитичке чистоће и коришћене су без даљег пречишћавања. За припрему свих водених раствора је коришћена свежа двоструко дестилована вода (енгл. *doubly distilled water*). Сви основни и полазни раствори су чувани у фрижидеру на температури 0-4°C без излагања светлости.

3.3. Припремање фосфатног пуфера

За припремање свих серија раствора као универзални растварач је коришћен слани фосфатни пуфер (енгл. *phosphate-buffered saline*), који одговара физиолошком

раствору 0,9% *m/V* NaCl. На аналитичкој ваги су одмерене и израчунате количине следећих соли: 2,20 g натријум дихидроген фосфат монохидрата ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 11,94 g динатријум хидроген фосфата (Na_2HPO_4) и 8,766 g натријум хлорида (NaCl). Одмерене соли су пренете у нормални суд од 1000 mL који је допуњен двоструко дестилованом водом до црте. За проверу тачности израчунате масе супстанци које су ушле у састав пуфера је коришћена бесплатна верзија програма Buffer Maker (Version 1.1.0.0). pH вредност направљеног пуфера је проверена pH метром.

3.4. Апарати

Мерења pH вредности раствора су вршена на апарату Beckman Ф 72 pH meter (Beckman Coulter, USA), а одмеравања масе узорака су вршена на аналитичкој ваги Sartorius ME215S microbalance (Sartorius, Germany) са тачношћу од 0,1 mg. Сви флуоресцентни спектри су снимљени на апарату RF-1501 PC spectrofluorometer (Shimadzu, Japan), који је опремљен ксенонском лампом од 150 W, кварцном ћелијом дужине 1,0 cm и термостатским држачем кивета. Сви апсорпциони спекти су снимљени на апарату са дуплим светлосним снопом Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (PerkinElmer, USA), са кварцним киветама дужине 1,0 cm.

3.5. Снимање флуоресцентних и апсорпционих спектара

Све серије раствора за испитивање су припремане тачним одмеравањем израчунатих количина полазних раствора. Измерене количине су пренете у нормалне судове од 5 mL и нормални судови допуњени раствором пуфера. За сваку припремљену серију раствора је снимљен флуоресцентни и UV-Vis апсорпциони спектар под истим експерименталним условима (298 K; pH 7,4). Кивете за снимање су одржаване и употребљаване у прописаним условима чистоће. Ради провере исправности апарата, а пре испитивања нове серије раствора, сниман је спектар пуфера. Непосредно пре снимања, серије раствора су чуване у мраку између 12 и 18 часова на собној температури, како би се успоставила хемијска равнотежа (завршиле све реакције) испитиваних реакција.

Сви флуоресцентни спектри су снимани у опсегу од 300 до 550 nm на таласној дужини ексцитације од 295 nm. Ширина прореза за ексцитацију и емисију, у свим снимањима, износила је 10 nm. На апарату су извршена следећа подешавања параметара програма за снимање: Maintaince/-HT control: OFF, Spectrum/Measuring

mode: SPECTRUM, Spectrum type: EM, Scan speed: MEDIUM, Response: AUTO, Sensitivity: HIGH, Ordinate upper: 50,00 и Ordinate lower: 0,00.

Сви UV-Vis апсорпциони спектри су снимани у опсегу од 200 до 460 nm на температури од 298 K. На ординати је подешено детектовање вредности апсорбанце у опсегу од -0,05 до 1. Брзина скенирања је подешена на 480 nm/min, при чему је апарат уписивао вредности апсорбанце на 1 nm. Пре сваке нове серије је сниман чист раствор (енгл. *blank*) који одговара пуферу, а добијени апсорпциони спектар је чинио основну линију (енгл. *baseline*). Укључивањем опције за корекцију основне линије (енгл. *baseline correction*), програм је вршио корекцију свих снимљених спектра одузимањем вредности које одговарају основној линији.

3.6. Испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин

У првом сету експеримената је испитивано везивање ТГЦ за ХСА. Гашење флуоресценције ХСА са повећањем концентрације ТГЦ је испитивано на различитим температурама (298, 303 и 308 K). Пре снимања серије су инкубирани у мраку током 1 часа на датим температурама. Од полазних раствора ХСА (20,0 $\mu\text{mol/L}$) и ТГЦ (85,38 $\mu\text{mol/L}$) су направљене три серије у којима је концентрација ХСА била константна (2,0 $\mu\text{mol/L}$), док је концентрација ТГЦ варирана у опсегу од 0 до 10,0 $\mu\text{mol/L}$.

3.7. Испитивање компетитивног везивања тигециклина са маркерима везујућих места

У циљу утврђивања доминантног везујућег места за ТГЦ у ХСА спроведени су компетитивни експерименти са специфичним маркерима везујућих места, при чему је коришћен варфарин (ВФ), маркер везујућег места I и ибупрофен (ИП), маркер везујућег места II у ХСА. Од полазних раствора ХСА (20,0 $\mu\text{mol/L}$), ТГЦ (85,38 $\mu\text{mol/L}$) и маркера везујућих места (0,1 mmol/L) су направљене серије раствора у којима су концентрације ХСА и специфичних маркера биле константне (2,0 $\mu\text{mol/L}$), док је концентрација ТГЦ варирана у опсегу од 0 до 16,0 $\mu\text{mol/L}$. На овај начин је испитиван утицај специфичних маркера на везивање ТГЦ за ХСА.

3.8. Поступак молекулског докинга тигециклина са хуманим серумским албумином

Молекулски докинг неутралног облика тигециклина (ТГЦ), тетрациклина (ТЦ) и тироксина (ТИР) је симулиран у тродимензионалној рендгенској структури, по раду

Петитпаса (Petitpas) и сарадника [165], рекомбинантног дивљег типа хуманог серумског албумина, ПДБ код 1XK1. Нето секвенца протеина (у случају 1XK1), који се састоји од 564 аминокиселинских остатака, је настала после уклањања 4 молекула ТИР. Докинг процеси су спроведени коришћењем софтвера Autodock 4.2 [166] који је опремљен графичким корисничким интерфејсом (енгл. *graphical user interface*, GUI) AutoDockTools (ADT 1.5.6rc3) [167]. ADT је коришћен за подешавање молекула 1XK1 и лиганда: Гастајгерова (Gasteiger) наелектрисања су израчуната, вода је уклоњена и сви атоми водоника су додати, а неполарни атоми водоника су припојени атомима угљеника. Слободне торзионе везе: једанаест веза ТГЦ, седам веза ТЦ и пет веза ТИР је изабрано и дефинисано. 1XK1 је подељен на два дела: крути и флексибилни део. Флексибилни део се састојао из Trp214 (постављене су само две слободне торзионе везе) који напушта други део молекула као крута веза. ADT је коришћен за генерисање свих улазних фајлова за докинг. У свим докинг експериментима је коришћена кутија у координатној мрежи величине $40 \times 40 \times 40$ тачака у x , y и z правцима, а мапе су усмерене на места I и II 1XK1 молекула (усмерени ко-кристалисани ТИР молекули су коришћени за ову сврху). Мрежни размак од $0,375 \text{ \AA}$ (приближно једна четвртина од дужине угљеник-угљеник ковалентне везе) и функција зависна од растојања за диелектричну константу су коришћени за израчунавање енергетске мапе. Педесет обрада је генерисано помоћу Lamarckian Genetic Algorithm претраживања. Стандардна подешавања су коришћена са почетном популацијом од 150 насумично постављених индивидуа, максималним бројем од $2,5 \times 10^5$ енергетских евалуација и максималним бројем од $2,7 \times 10^4$ генерација. Изабрана је стопа мутације од 0,02 и стопа прелаза од 0,8. Из вишеструког докинга истог једињења изабран је положај (поза) са најбољим резултатом. Анализа модела 1XK1-ТГЦ комплекса је базирана на водоничним везама, ван дер Валсовим и хидрофобним интеракцијама. Вредности промене Гибсове (Gibbs) слободне енергије везивања (ΔG) и константе инхибиције (K_i) су добијене из ADT након прегледа резултата докинг израчунавања. За визуализацију докинг резултата је коришћена бесплатна верзија софтвера Discovery Studio Vizualizer 3.5.0 Accelrys Software Inc.

Доступна површина (енгл. *accessible surface area*, ASA) у ХСА (слободном) и докованим комплексима са ТГЦ је израчуната коришћењем доступне интернет верзије софтвера Accessibility Calculation for Protein (ver. 1.2) [168]. Program of Energetic Analysis of Receptor Ligand System (PEARLS) је коришћен за процену енергетике протеин-лиганд интеракције [169].

3.9. Испитивање утицаја јона метала на везивање тигециклина за хумани серумски албумин

У овом делу је испитиван утицај сваког јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) на везивање ТГЦ за ХСА. Од полазних раствора ХСА ($20,0 \mu\text{mol/L}$), ТГЦ ($85,38 \mu\text{mol/L}$) и јона метала ($20,0 \mu\text{mol/L}$) су направљене серије раствора у којима су концентрације ХСА и јона метала биле константне ($2,0 \mu\text{mol/L}$), док је концентрација ТГЦ варирана у опсегу од 0 до $10,0 \mu\text{mol/L}$.

3.10. Испитивање утицаја флуорохинолона на везивање тигециклина за хумани серумски албумин

У другом сету експеримената је испитиван утицај сваког флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) на везивање ТГЦ за ХСА. Од полазних раствора ХСА ($20,0 \mu\text{mol/L}$), ТГЦ ($85,38 \mu\text{mol/L}$) и флуорохинолона ($0,1 \text{mmol/L}$) су направљене серије раствора у којима су концентрације ХСА и флуорохинолона биле константне ($2,0 \mu\text{mol/L}$), док је концентрација ТГЦ варирана у опсегу од 0 до $16,0 \mu\text{mol/L}$.

3.11. Испитивање утицаја тигециклина на везивање флуорохинолона за хумани серумски албумин

У овом делу истраживања је испитиван и обрнут ефекат, односно утицај ТГЦ на везивање сваког флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) за ХСА. Да би се овај утицај квантификовао прво је испитивано везивање сваког флуорохинолона за ХСА. Направљене су серије раствора у којима је концентрација ХСА била константна ($2,0 \mu\text{mol/L}$), док је концентрација флуорохинолона варирана у унапред дефинисаном опсегу. Након тога су направљене нове серије раствора у којима су концентрације ХСА и ТГЦ биле константне ($2,0 \mu\text{mol/L}$), док је концентрација флуорохинолона варирана.

3.12. Математичка обрада података

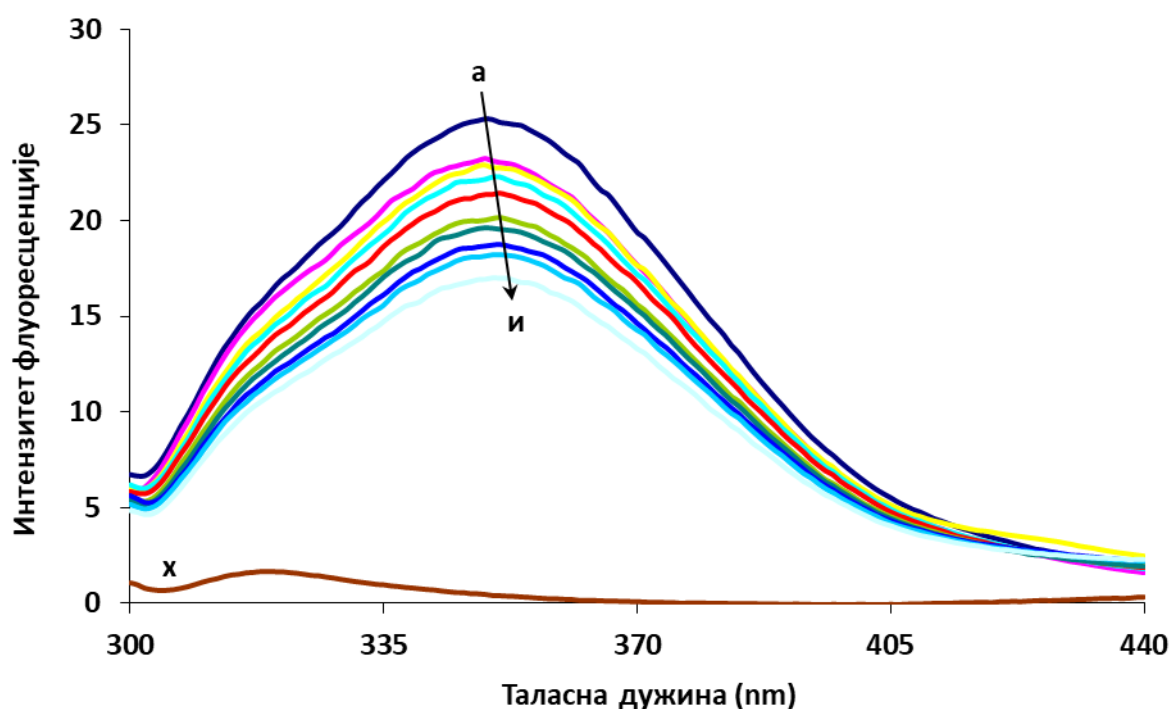
За обраду резултата истраживања су коришћени програмски пакети: Microsoft Office Excel 2003, GraphPad Prism 5, ChemDraw Ultra 8.0, UV WinLab (Version 2.85.04), PASW Statistics 18 и Adobe Photoshop 8.0.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Везивање тигециклина за хумани серумски албумин

4.1.1. Гашење флуоресценције хуманог серумског албумина тигециклином

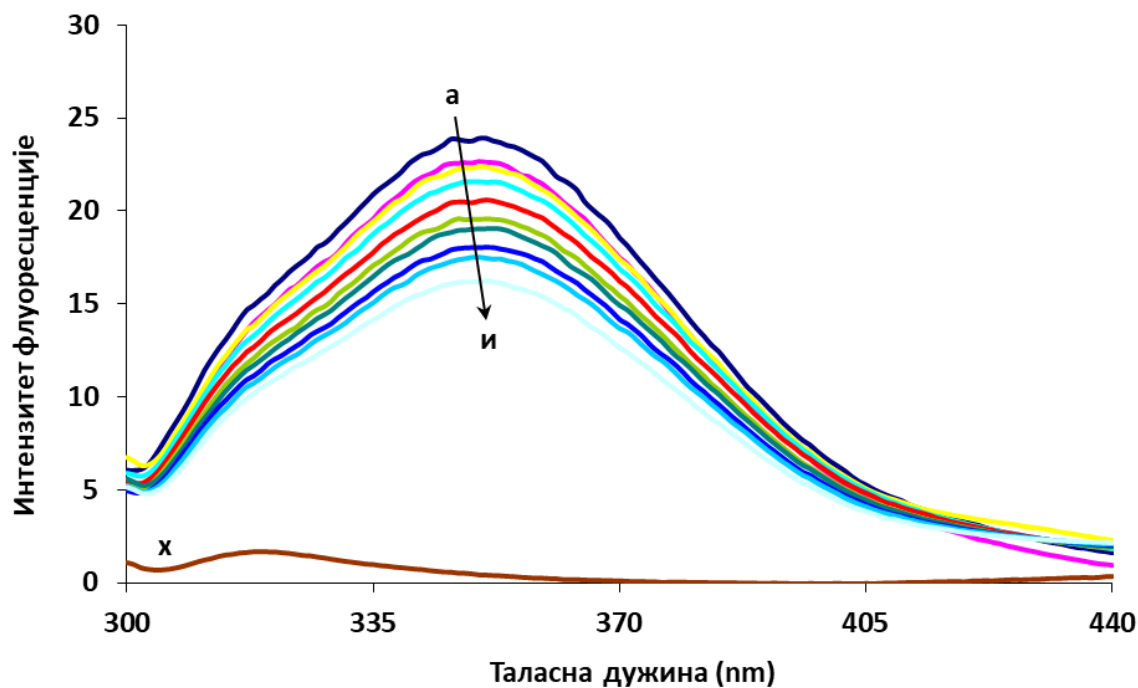
Флуоросцентни емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ су снимљени на температурама 298, 303 и 308 К и приказани на Сликама 8, 9 и 10. Ради смањења експерименталне грешке, свака серија раствора је снимљена по три пута, а просечни интензитети флуоресценције су укључени у резултате.



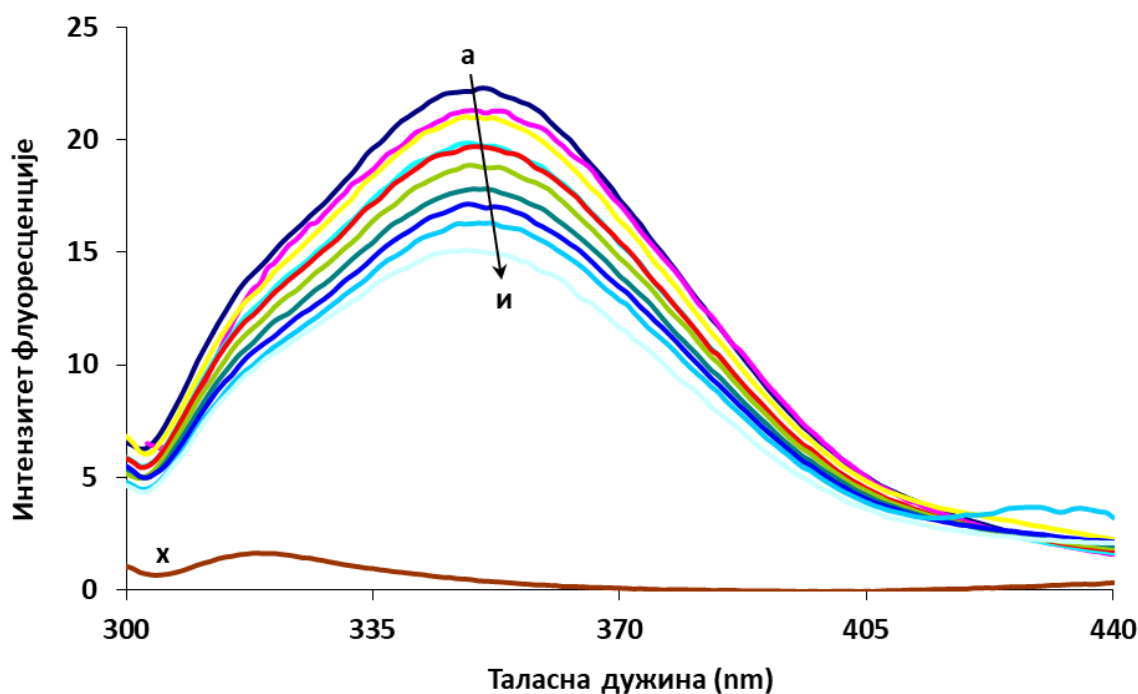
Слика 8. Емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ ($T = 298$ К; $\text{pH } 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm). $[\text{ХСА}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-u): (0; 1,7; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) $\mu\text{mol/L}$. x представља емисиони спектар само 2,0 $\mu\text{mol/L}$ ТГЦ.

Као што је приказано на Сликама 8, 9 и 10, интензитет флуоресценције ХСА се постепено смањивао са повећањем концентрације ТГЦ, што указује да ТГЦ остварује интеракцију са ХСА.

Као што се може видети, са порастом концентрације ТГЦ дошло је до померања таласне дужине максималне емисије (λ_{max}) ХСА од 348 до 350 nm. Ово благо црвено померање (ка вишим таласним дужинама) λ_{max} од 2 nm означава да је везивање ТГЦ повезано са променама у локалном окружењу ХСА [170].



Слика 9. Емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ ($T = 303$ К; $pH 7,4$; $\lambda_{ex} = 295$ nm). $[XSA] = 2,0 \mu mol/L$; $[TGC]$ ($a-u$): (0; 1,7; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) $\mu mol/L$. x представља емисиони спектар само 2,0 $\mu mol/L$ ТГЦ.



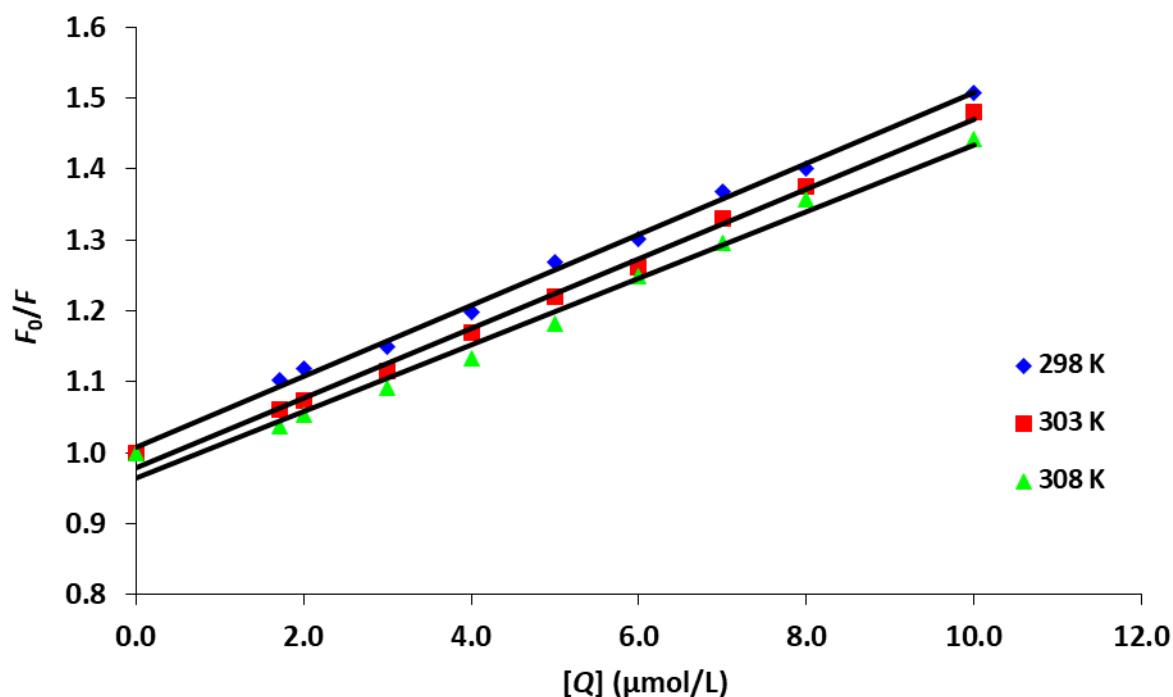
Слика 10. Емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ ($T = 308$ К; $pH 7,4$; $\lambda_{ex} = 295$ nm). $[XSA] = 2,0 \mu mol/L$; $[TGC]$ ($a-u$): (0; 1,7; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0) $\mu mol/L$. x представља емисиони спектар само 2,0 $\mu mol/L$ ТГЦ.

Да би се потврдио механизам гашења, флуоресцентни подаци добијени на различитим температурама су анализирани помоћу добро познате Стерн–Волмерове (Stern–Volmer) једначине (11) [91]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (11)$$

где су F_0 и F интензитети флуоресценције пре и после додавања квенчера флуоресценције (ТГЦ). K_q је константа биомолекуларног гашења, τ_0 је животни век флуорофоре у одсуству квенчера ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), K_{sv} је Стерн–Волмерова константа гашења и $[Q]$ је концентрација слободног квенчера. С обзиром да у нашим експериментима концентрација слободног ТГЦ није била позната, узели смо да приближно одговара укупној концентрацији ТГЦ.

На Слици 11 је приказан Стерн–Волмеров график гашења флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ на различитим експерименталним температурама (298, 303 и 308 К). Вредности K_{sv} и K_q су дате у Табели 5.



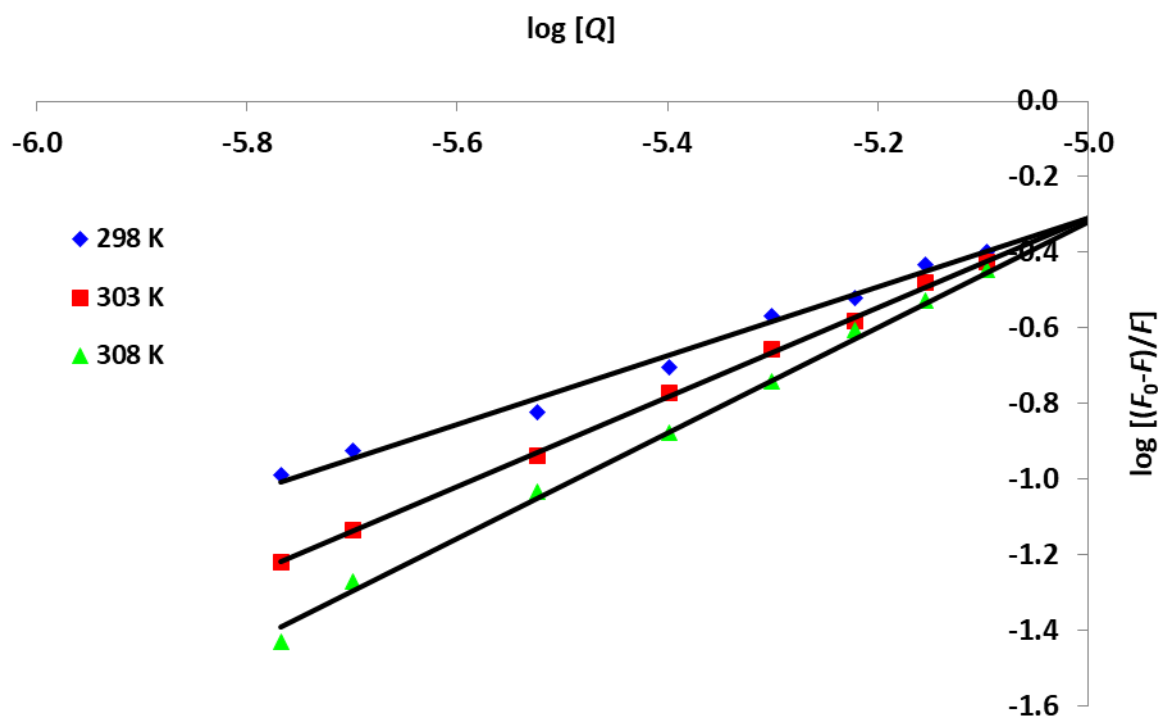
Слика 11. Стерн–Волмеров график гашења флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ на различитим температурама.

4.1.2. Константа везивања и број везујућих места

Флуоресцентни подаци се такође могу искористити за израчунавање константе везивања (K_a) и броја везујућих места (n). Када се мали молекули везују независно за скуп еквивалентних места на макромолекулу, равнотежа између слободних и везаних молекула може бити представљена једначином (12) [171]:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (12)$$

где су F_0 и F интензитети флуоресценције у одсуству и присуству квенчера, K_a је константа везивања или очигледна константа асоцијације за лек-протеин интеракцију, n је број везујућих места по молекулу ХСА и $[Q]$ је концентрација квенчера. Вредности K_a и n су добијене из пресека и нагиба графика зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (видети Сliku 12). Вредности K_a и n су дате у Табели 5.



Слика 12. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ на различитим температурама.

Израчунате вредности n износе приближно 1, што указује да је присутно једно везујуће место за ТГЦ у ХСА. Растући тренд K_a са повећањем температуре указује да је реакција везивања била ендотермна [172].

Табела 5. Константе гашења и константе везивања ХСА-ТГЦ система на различитим температурама.

<i>T</i> (К)	<i>K_{sv}</i> (L/mol)	<i>K_q</i> (L/mol·s)	<i>R^a</i>	<i>K_a</i> (L/mol)	<i>n</i>	<i>R^a</i>
298	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^{12}$	0,996	$1,8 \times 10^4$	0,9	0,991
303	$4,9 \times 10^4$	$4,9 \times 10^{12}$	0,996	$4,0 \times 10^5$	1,2	0,999
308	$4,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^{12}$	0,987	$4,5 \times 10^6$	1,4	0,996

^a *R* је коефицијент корелације.

Резултати приказани у Табели 5 указују да стабилност ХСА-ТГЦ комплекса расте са повећањем температуре и да се ТГЦ боље везује и транспортује помоћу ХСА на вишим температурама.

Табела 6. Параметри везивања тетрациклина (ТЦ) и његових деривата (298 К; рН 7,4).

Систем	<i>K_a</i> (L/mol)	<i>n</i>	ΔG^0 (kJ/mol)		
			Експериментална	Теоријска	Референца
ХСА-ТГЦ	$1,8 \times 10^4$	0,9	-24,5	-24,35	[173]
ХСА-МТЦ	$4,7 \times 10^4$	0,7	-	-	[174]
	$4,85 \times 10^4$	-	-30,29	-	[175]
ХСА-ТЦ	$4,94 \times 10^4$	1,0	-25,82	-28,62	[162]
	$9,49 \times 10^4$	0,6	-28,40	-	[163]
ХСА-ДКСТЦ	$2,73 \times 10^5$	1,1	-31,01	-	[164]
ХСА-ДМКТЦ	$7,76 \times 10^5$	1,2	-33,60	-34,87	[82]
ХСА-ХТЦ	$8,00 \times 10^5$	2,9	-33,43	-	[84]
ХСА-ОТЦ	$3,20 \times 10^6$	2,1	-36,99	-	[84]

МТЦ, метациклин;

ДКСТЦ, доксициклин;

ДМКТЦ, демеклоциклин;

ХТЦ, хлортетрациклин хидрохлорид;

ОТЦ, окситетрациклин.

Параметри везивања тетрациклина (ТЦ) и његових деривата, који су добијени под идентичним условима (298 К; рН 7,4) од других аутора [82, 84, 162-164, 174, 175], приказани су у Табели 6.

4.1.3. Термодинамички параметри и природа везујућих сила

Уопштено гледано, везујуће силе које доприносе интеракцији протеина са малим молекулским супстратима често чине ван дер Валсове, хидрофобне, електростатичке и водоничне везе [176].

Да би се идентификовала везујућа сила између ТГЦ и ХСА, испитивање везивања је спроведено на три различите температуре, 298, 303 и 308 К. На овим температурама протеин није прошао кроз било какву структуралну деградацију. Термодинамички параметри, промена Гибсове слободне енергије (ΔG^0), промена енталпије (ΔH^0) и промена ентропије (ΔS^0), су процењени помоћу ван'т Хофове (van't Hoff) (13) и Гибс–Хелмхолцове (Gibbs–Helmholtz) једначине (14):

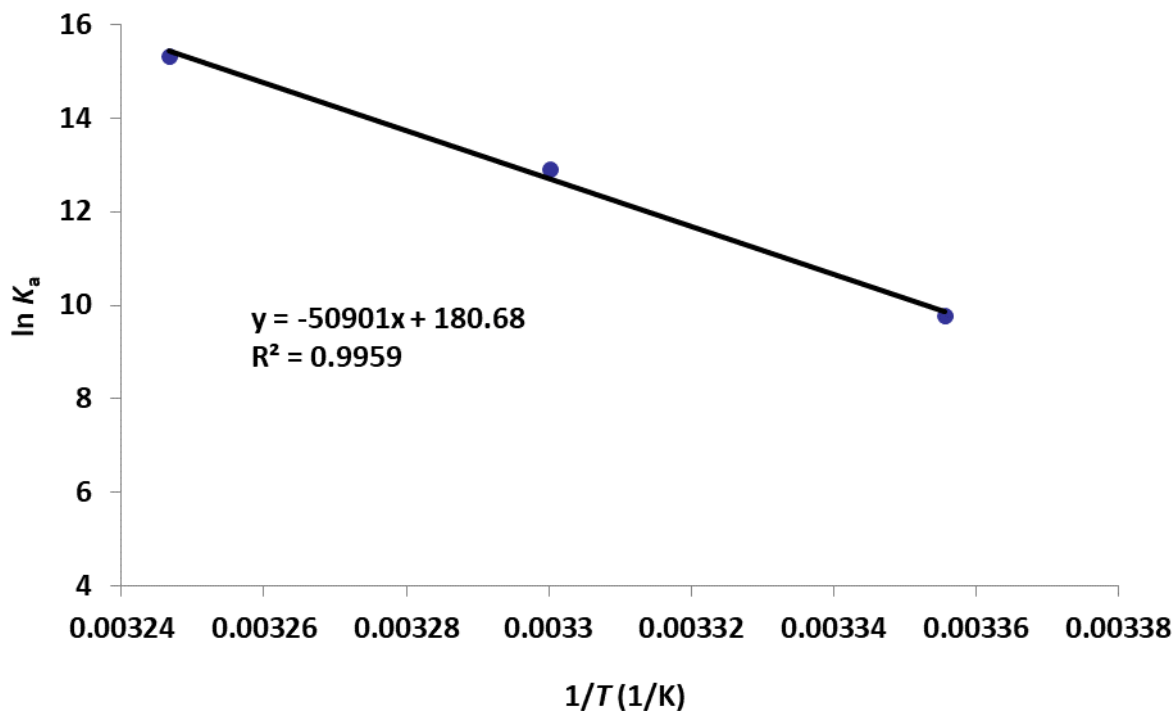
$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (13)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (14)$$

где је K_a константа везивања на одговарајућој температури, R је гасна константа и T је апсолутна температура. Вредности ΔH^0 и ΔS^0 су добијене из ван'т Хофовог графика интеракције ХСА са ТГЦ, односно из пресека и нагиба графика зависности $\ln K_a$ од $1/T$ (видети Сliku 13). Вредности ΔH^0 , ΔS^0 и ΔG^0 на различитим температурама су приказане у Табели 7.

Табела 7. Термодинамички параметри ХСА-ТГЦ система добијени на различитим температурама.

T (К)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol·K)	ΔG^0 (kJ/mol)
298			-24,5
303	423,2	1502,3	-32,0
308			-39,5



Слика 13. Ван’т Хофов график ХСА-ТГЦ интеракције.

4.1.4. Трансфер енергије са хуманог серумског албумина на тигециклин

Флуоресцентно резонантни енергетски трансфер (ФРЕТ) се већ дуго користи као „спектроскопски владар“, погодан за мерење растојања од неколико нанометара између молекула у биохемији и макромолекулским системима [177]. ФРЕТ је пренос кванта енергије са места апсорпције на место искоришћења у молекулу, или у систему молекула, без емитовања зрачења, кроз резонантну интеракцију између хромофора преко растојања које је знатно веће од интератомског, без конверзије у топлотну енергију и без доворско акцепторских кинетичких судара.

Донор (ХСА) је обично обојени молекул који почетно апсорбује енергију, док је акцептор (ТГЦ) хромофора на коју се преноси енергија. ФРЕТ се другачије назива и Форстеров енергетски трансфер, јер га је немачки научник Теодор Форстер (Theodor Förster) први уочио и математички формулисао. С обзиром да растојање између донора и акцептора мора да буде између 1 и 10 nm, односно између 10 и 100 Å, да би дошло до трансфера енергије, при чему је ефикасност трансфера зависна од растојања између флуорофора, зато је ФРЕТ поуздано средство за испитивање молекулских интеракција између протеина и малих молекула [178].

ХСА поседује унутрашњу флуоресценцију јер има Trp, Tyr и Phe у протеинској структури. У овом истраживању, таласна дужина ексцитације је постављена на 295 nm, при чему се врши ексцитација само Trp, а избегава ексцитација Tyr и Phe. Сходно томе, емисиони спектар ХСА углавном потиче од појединачних остатака Trp који се налазе у субдомену ПА [179].

Преклапање флуоресцентог емисионог спектра ХСА и UV апсорпционог спектра ТГЦ је приказано на Слици 14. Према Форстеровој теорији молекулског резонантног енергетског трансфера [180, 181], растојање везивања r између ТГЦ и ХСА и ефикасност E енергетског трансфера између донора и акцептора се може израчунати једначином (15) [91, 182]:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} \quad (15)$$

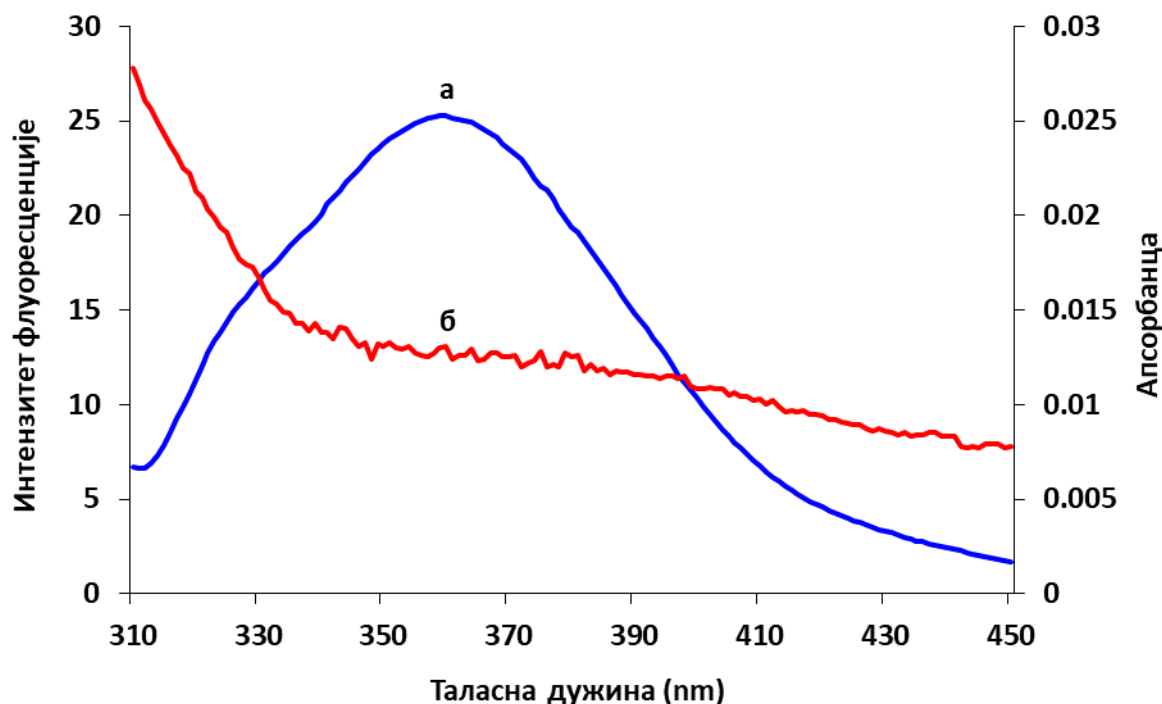
где је E ефикасност трансфера енергије између донора и акцептора, F и F_0 су интензитети флуоресценције у присуству и одсуству ТГЦ и R_0 је критично растојање када је ефикасност трансфера 50%.

$$R_0^6 = 8,79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (16)$$

где је K^2 фактор просторне оријентације дипола, N је просечан рефракторни индекс медијума у опсегу таласних дужина где је спектрално преклапање значајно, Φ је флуоресцентни квантни принос донора, J је интеграл преклапања флуоресцентног емисионог спектра донора и апсорпционог спектра акцептора (видети Слику 14), који се може израчунати једначином (17):

$$J = \frac{\sum F_\lambda \varepsilon_\lambda \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F_\lambda \Delta\lambda} \quad (17)$$

где је F_λ интензитет флуоресценције донора на таласној дужини λ (бездимензионална величина) и ε_λ моларни апсорпциони коефицијент акцептора на таласној дужини λ са јединицом $l/cm \cdot mol$.

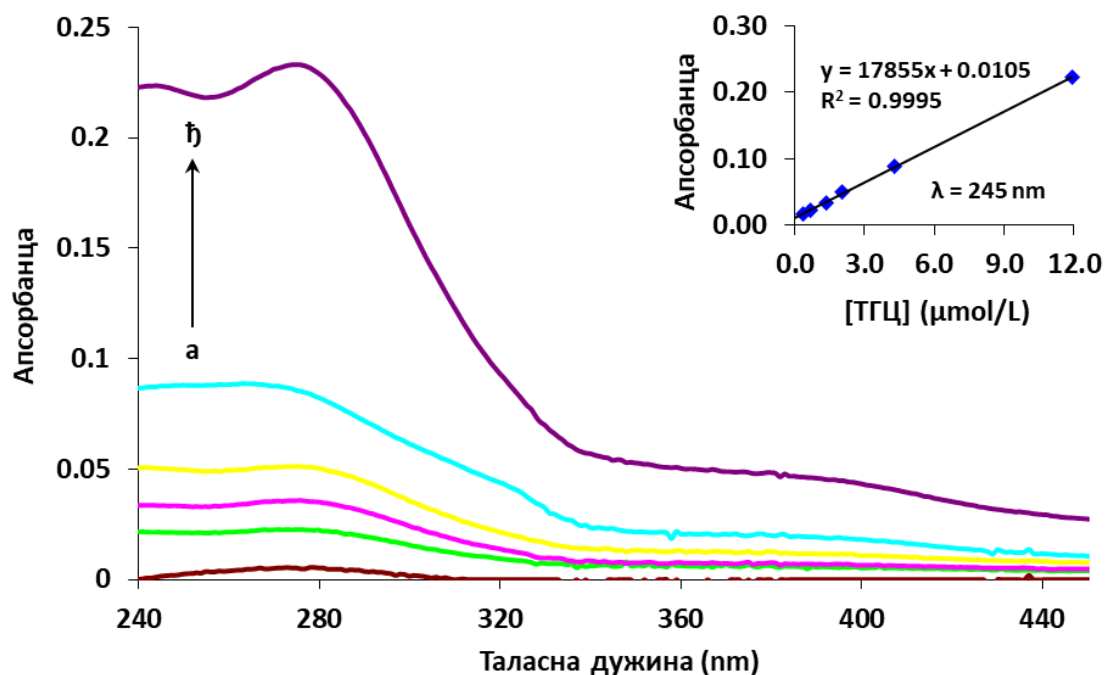


Слика 14. Преклапање флуоресцентног спектра ХСА (2,0 $\mu\text{mol/L}$) (**а**) и апсорпционог спектра ТГЦ (2,0 $\mu\text{mol/L}$) (**б**) ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$).

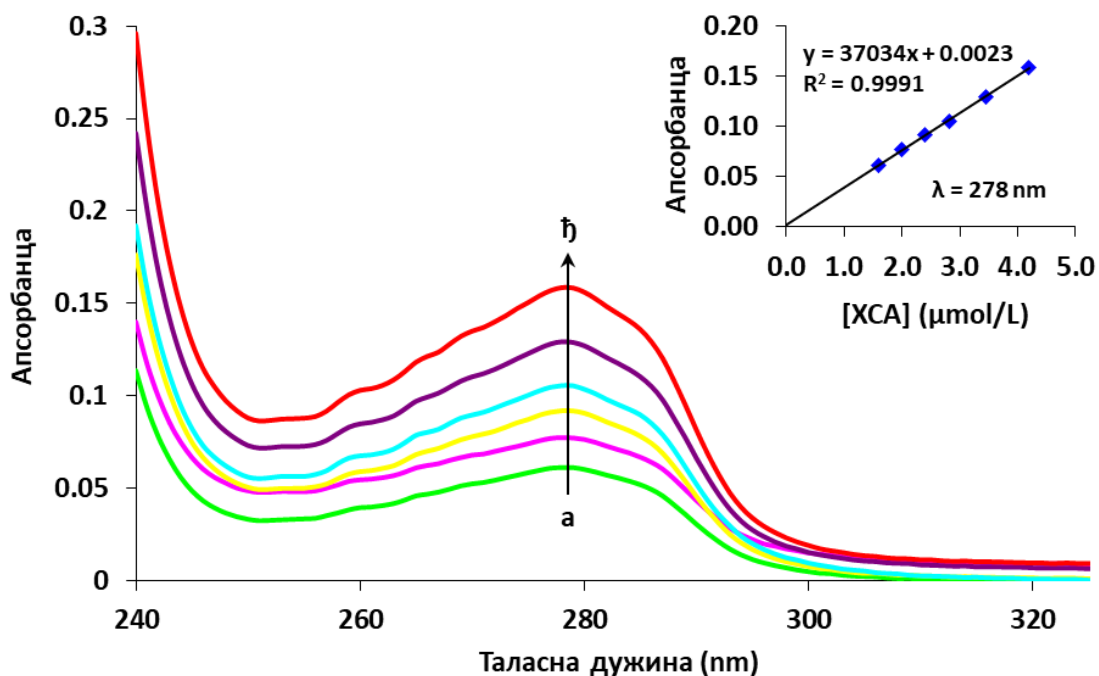
Под наведеним експерименталним условима, $K^2 = 2/3$, $N = 1,336$ и $\Phi = 0,118$ за ХСА [183], на основу једначина (15–17), добијени су следећи резултати: $J = 1,15 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$, $E = 0,098$, $R_0 = 2,51 \text{ nm}$ и $r = 3,63 \text{ nm}$ на 298 K. Утврдили смо да је просечно растојање између флуорофоре донора и флуорофоре акцептора у опсегу 2-8 nm [184], и да је $0,5R_0 < r < 1,5R_0$ [185].

4.1.5. Апсорпциона спектроскопија

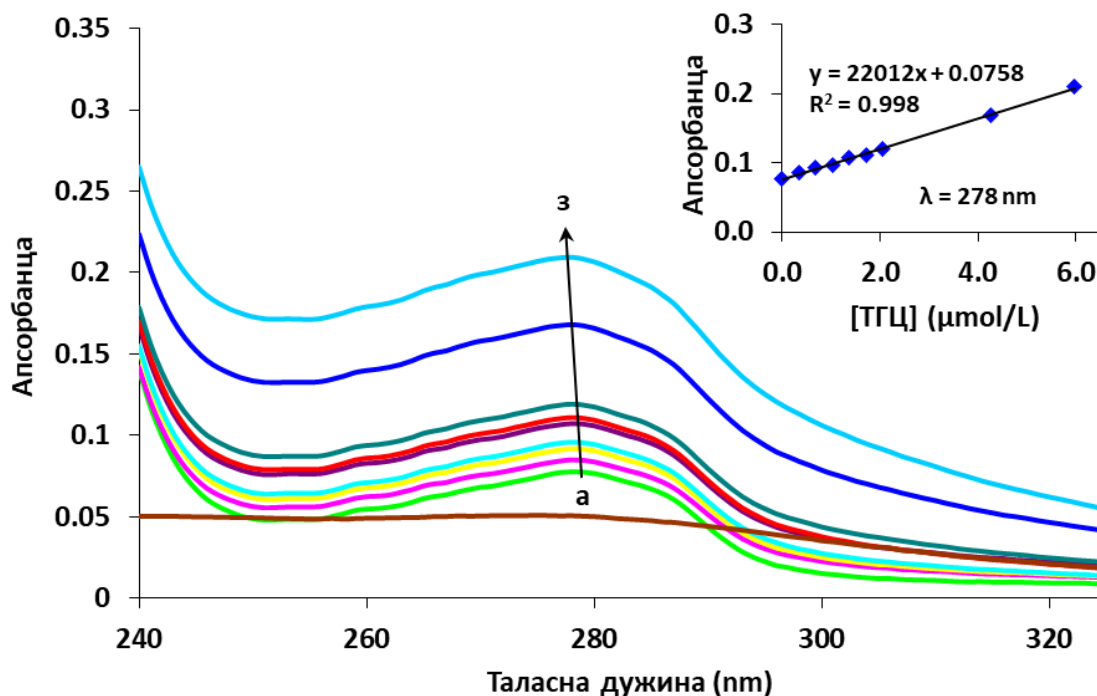
У овом делу истраживања смо проучавали промене UV апсорпционих спектра ТГЦ (Слика 15), ХСА (Слика 16) и ХСА-ТГЦ система (Слика 17). ХСА има слаб апсорпциони максимум на око 278 nm због кумулативне апсорпције три ароматична аминокиселинска остатка (Trp, Tug и Phe). Апсорпциони максимум на 278 nm се повећао (видети Слику 17), што је већим делом изазвано $\pi-\pi^*$ прелазима ароматичних аминокиселинских остатка у ХСА [186, 187]. На Слици 17 се може видети да апсорбанца ХСА расте прогресивно са повећањем концентрације ТГЦ, што указује да је дошло до формирања комплекса између ХСА и ТГЦ [188]. Положај апсорпционог максимума ХСА-ТГЦ система је благо померен ка нижим таласним дужинама.



Слика 15. Апсорпциони спектри ТГЦ ($T = 298$ К; рН 7,4). [ТГЦ] (a - $ђ$): (0,34; 0,68; 1,37; 2,0; 4,27; 11,94) $\mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је график зависности апсорбанце ТГЦ од концентрације ТГЦ на 245 nm.



Слика 16. Апсорпциони спектри ХСА ($T = 298$ К; рН 7,4). [ХСА] (a - $ђ$): (1,6; 2,0; 2,4; 2,83; 3,45; 4,2) $\mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је график зависности апсорбанце ХСА од концентрације ХСА на 278 nm.



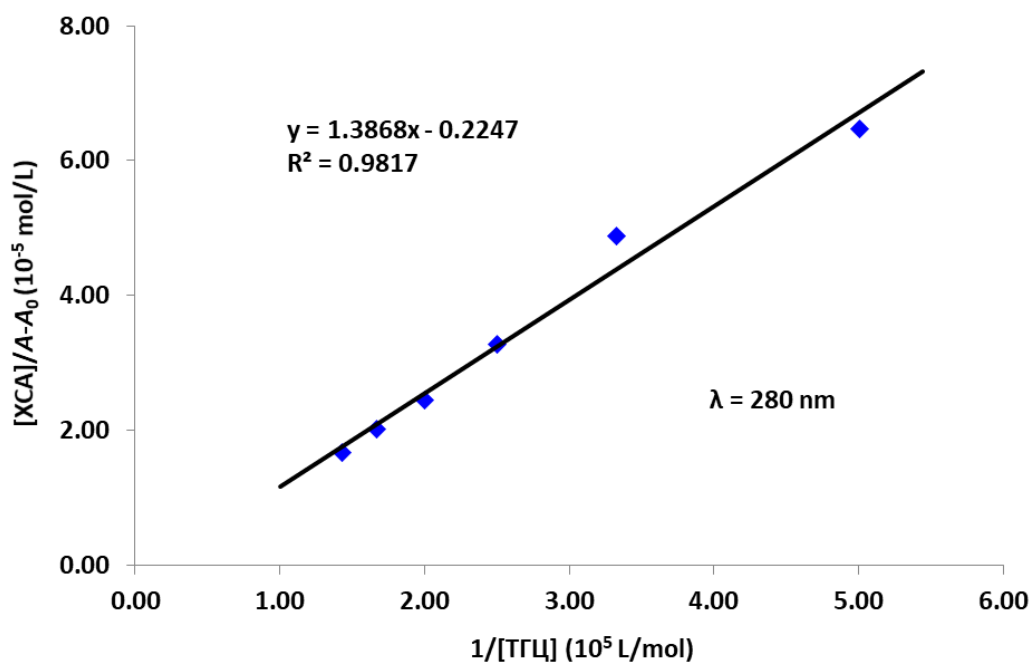
Слика 17. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ ($a-z$): (0; 0,34; 0,68; 1,02; 1,37; 1,71; 2,05; 4,27; 5,98) $\mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ТГЦ. На уметнутом делу је график зависности апсорбанце ХСА од концентрације ТГЦ на 278 nm .

4.1.6. Стехиометрија и константа стабилности

Као што се може видети на Слици 17, вредност апсорбанце је расла са порастом концентрације ТГЦ, док је концентрација ХСА била фиксна. Апсорпциони подаци указују да је дошло до формирања стабилног комплекса између ТГЦ и ХСА. Неке референце указују да се константе и остали параметри везивања од интереса могу добити и на основу апсорбанце [189-191]. Константа стабилности (K_S) се може лако израчунати из пресека и нагиба графика зависности $[\text{ХСА}]/A-A_0$ од $1/[\text{ТГЦ}]$, познатог као Бенеси–Хилдебрандов (Benesi–Hildebrand) график (видети Слику 18). Бенеси–Хилдебрандов график има линеаран однос за стехиометрију 1:1 [192, 193]. На основу хемијских структура испитиваних молекула и оправдано велике вероватноће да се ТГЦ, са неполарним делом молекула, угради у хидрофобну шупљину ХСА, претпоставили смо да ће стехиометријски однос у формираном ХСА-ТГЦ комплексу теоретски износити приближно 1:1. Наведена претпоставка је тачна уколико се добије линеаран однос реципрочног графика зависности $[\text{ХСА}]/A-A_0$ од $1/[\text{ТГЦ}]$ на основу Бенеси–Хилдебрандове једначине (18) [189]:

$$\frac{[HSA]}{A - A_0} = \left(\frac{1}{[TGC]} \right) \left(\frac{1}{\varepsilon K_s} \right) + \frac{1}{\varepsilon} \quad (18)$$

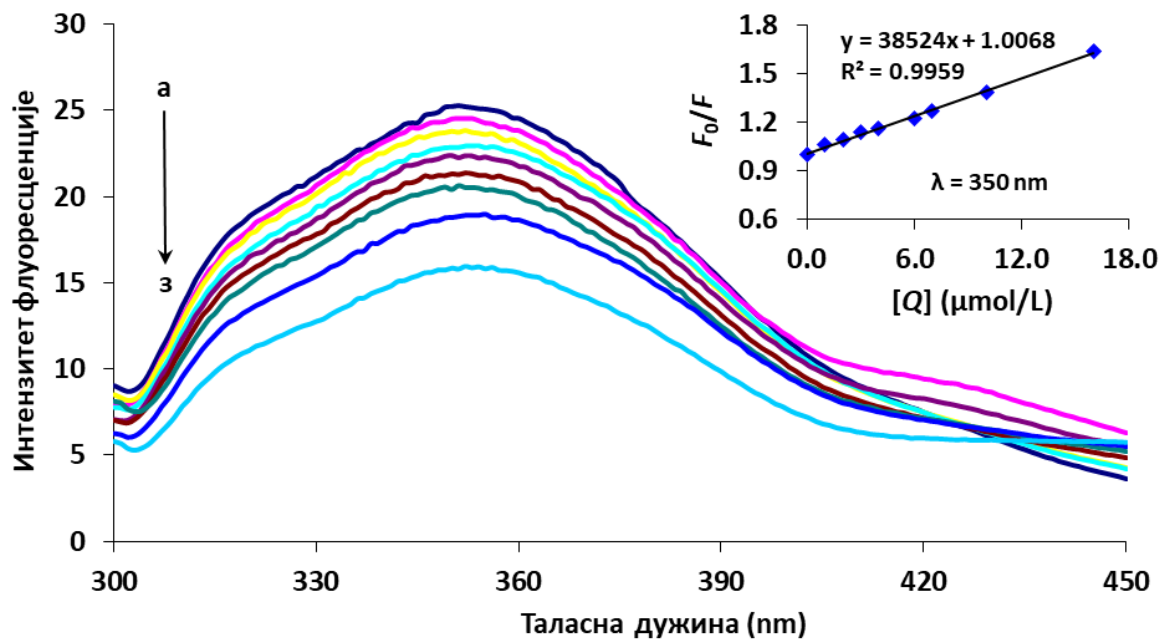
где су A и A_0 апсорбанце ХСА у присуству и одсуству ТГЦ, док су $[ХСА]$, K_s , $[ТГЦ]$ и ε , редом, иницијална концентрација ХСА, константа стабилности, концентрација ТГЦ и моларна апсорптивност. На Слици 18 је приказан Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ, добијен на 280 nm. Константа стабилности (K_s) ХСА-ТГЦ система износи $1,6 \times 10^4$ L/mol.



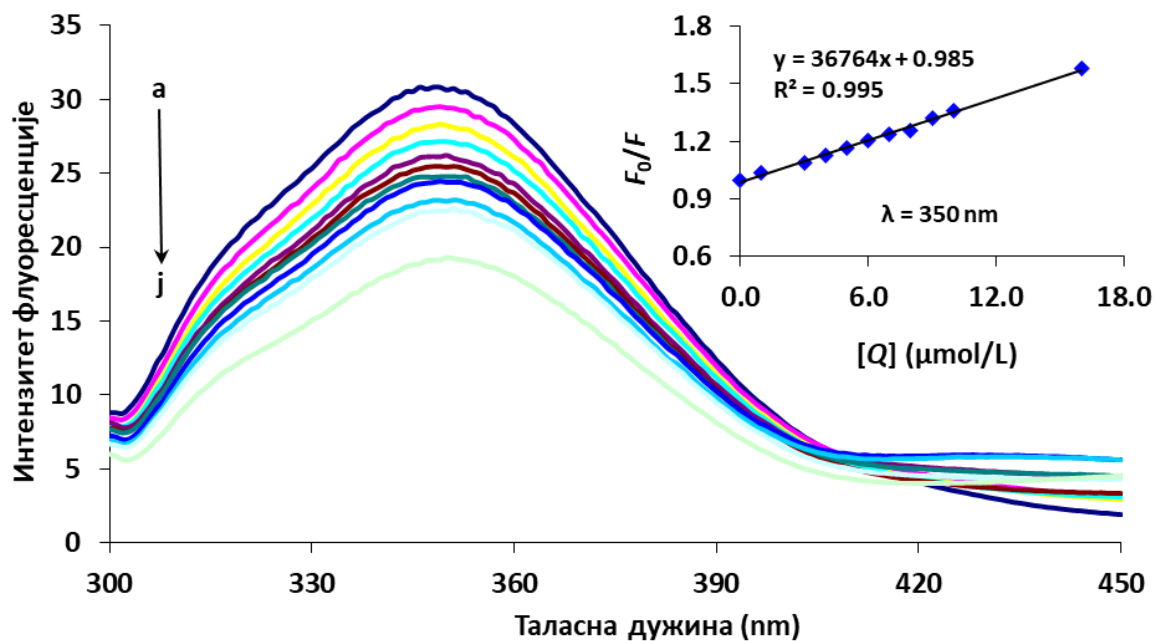
Слика 18. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ у фосфатном пуферу ($T = 298$ K; pH 7,4).

4.2. Компетитивно везивање тигециклина са маркерима везујућих места

Компетиција ТГЦ са маркерима везујућих места може да пружи прецизнији увид у регионе ХСА на којима се везује ТГЦ. У циљу одређивања доминантног везујућег места за ТГЦ у ХСА, спроведени су експерименти коришћењем варфарина (ВФ), маркера везујућег места I, и ибупрофена (ИП), маркера везујућег места II, према класификацији везујућих места Судлова и сарадника. Да бисмо одредили доминантно везујуће место за ТГЦ у ХСА, анализирали смо флуоресцентне спектре ХСА-ТГЦ система у одсуству и присуству ВФ и ИП на 298 K (видети Сlike 19 и 20). Параметри везивања су израчунати на основу једначина (12) и (18) и приказани у Табели 8.



Слика 19. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству ВФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-z): (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 7,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ВФ}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.



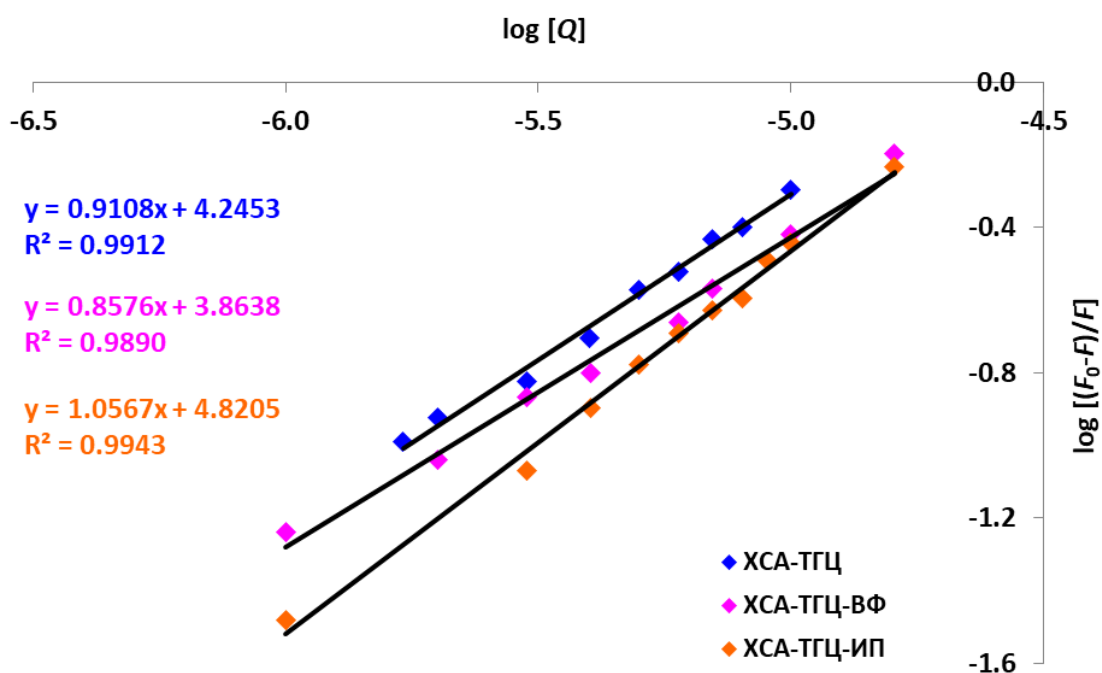
Слика 20. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству ИП ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-j): (0; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ИП}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

Табела 8. Вредности K_a , n и K_S ХСА-ТГЦ система у присуству специфичних маркера везујућих места на 298 К.

Систем	Флуоресцентни спектри			Апсорпциони спектри	
	K_a (L/mol)	n	R^a	K_S (L/mol)	R^a
ХСА-ТГЦ	$1,8 \times 10^4$	0,91	0,991	$1,6 \times 10^4$	0,982
ХСА-ТГЦ-ВФ	$7,3 \times 10^3$	0,86	0,989	$6,0 \times 10^3$	0,943
ХСА-ТГЦ-ИП	$6,6 \times 10^4$	1,06	0,994	$5,1 \times 10^4$	0,966

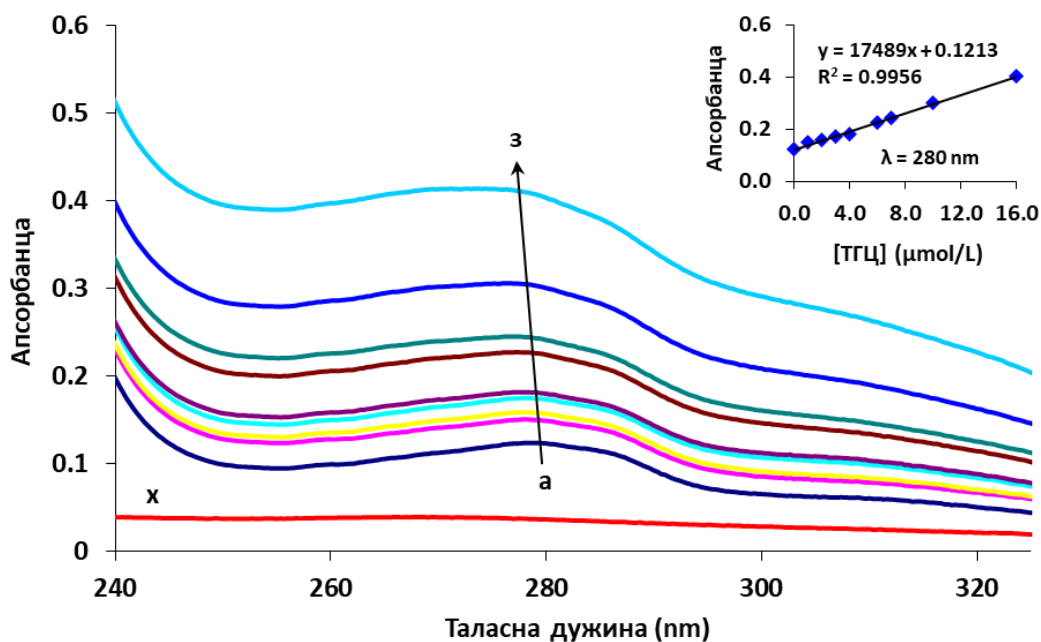
^a R је коефицијент корелације.

Вредности K_a и n ХСА-ТГЦ система у присуству маркера везујућих места су израчунате из пресека и нагиба графика зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (видети Сliku 21), а износе $7,3 \times 10^3$ и $6,6 \times 10^4$ L/mol са ВФ и ИП на 298 К. Као што се може видети у Табели 8, вредности K_a , n и K_S ХСА-ТГЦ система у присуству ВФ су смањене, док су у присуству ИП повећане.

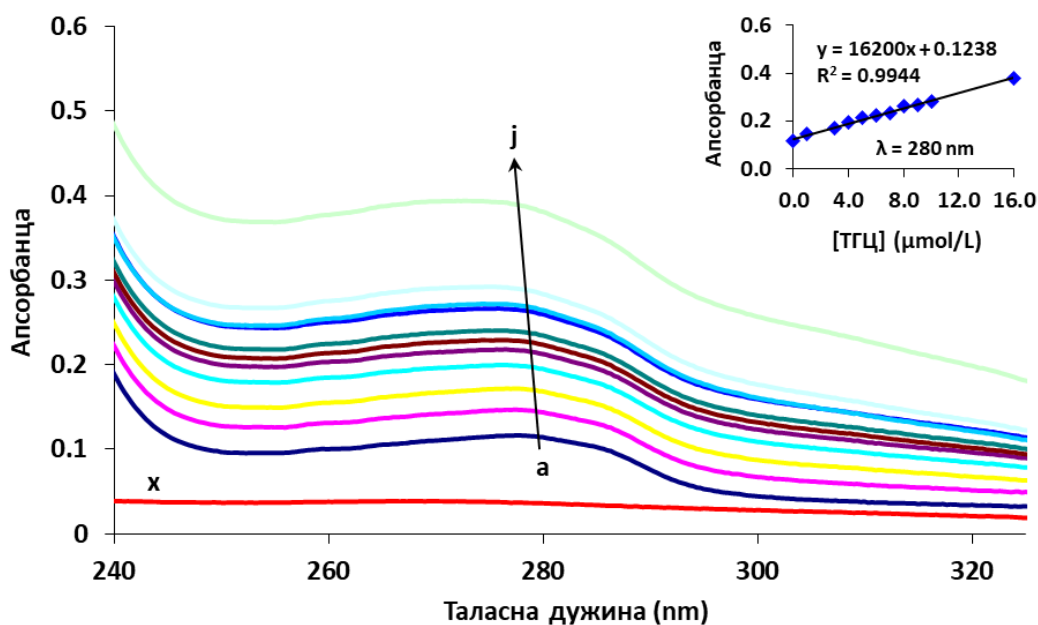


Слика 21. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ у присуству ВФ и ИП на 298 К.

Такође, анализирали смо и апсорпционе спектре ХСА-ТГЦ система у одсуству и присуству ВФ и ИП. На Сликама 22 и 23 су приказани апсорпциони спектри ХСА-ТГЦ система у присуству наведених маркера везујућих места на 298 К.

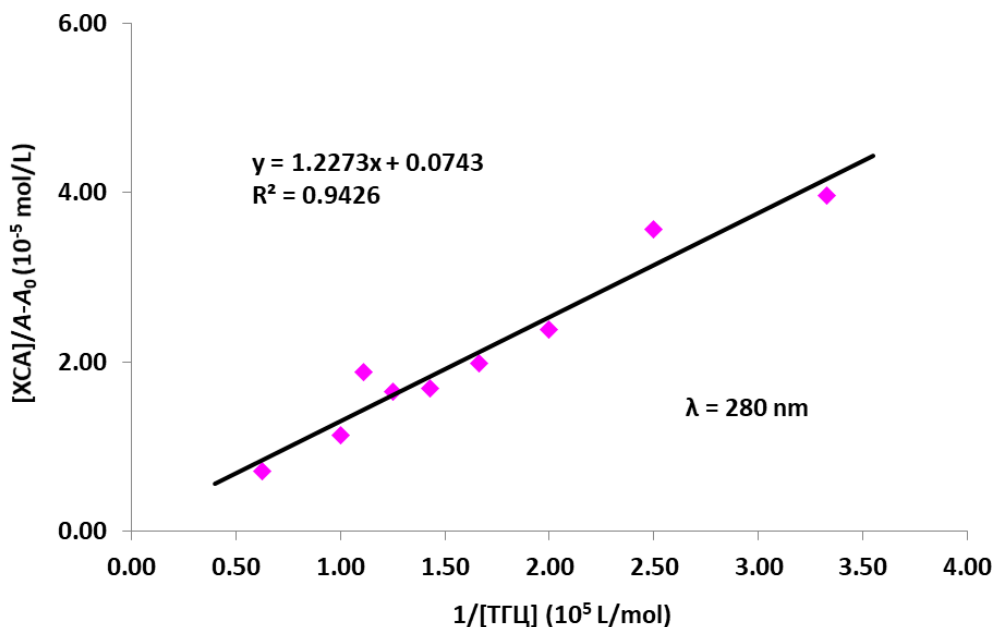


Слика 22. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ВФ ($T = 298$ К; $pH 7,4$). $[ХСА] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[ТГЦ]$ ($a-z$): (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 7,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[ВФ] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \mu\text{mol/L}$ ТГЦ.

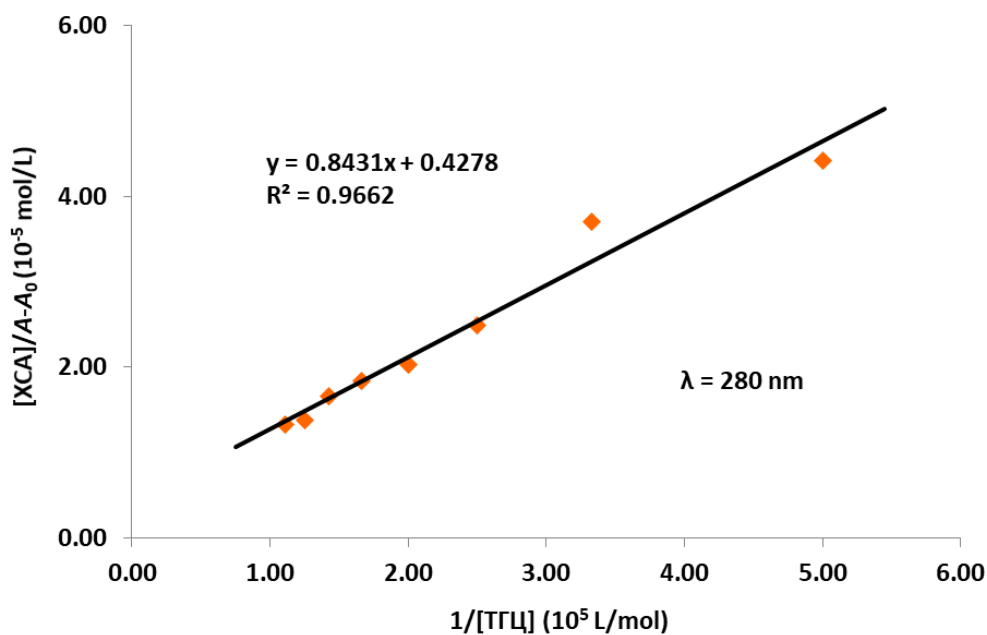


Слика 23. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ИП ($T = 298$ К; $pH 7,4$). $[ХСА] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[ТГЦ]$ ($a-j$): (0; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[ИП] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \mu\text{mol/L}$ ТГЦ.

На Сликама 24 и 25 су дати Бенеси–Хилдебрандови графици ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксних концентрација ВФ и ИП, добијени на λ_{\max} ХСА. Коefицијенти корелације изнад 0,9 указују на добар линеаран однос.



Слика 24. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ВФ у фосфатном пуферу ($T = 298$ К; pH 7,4).



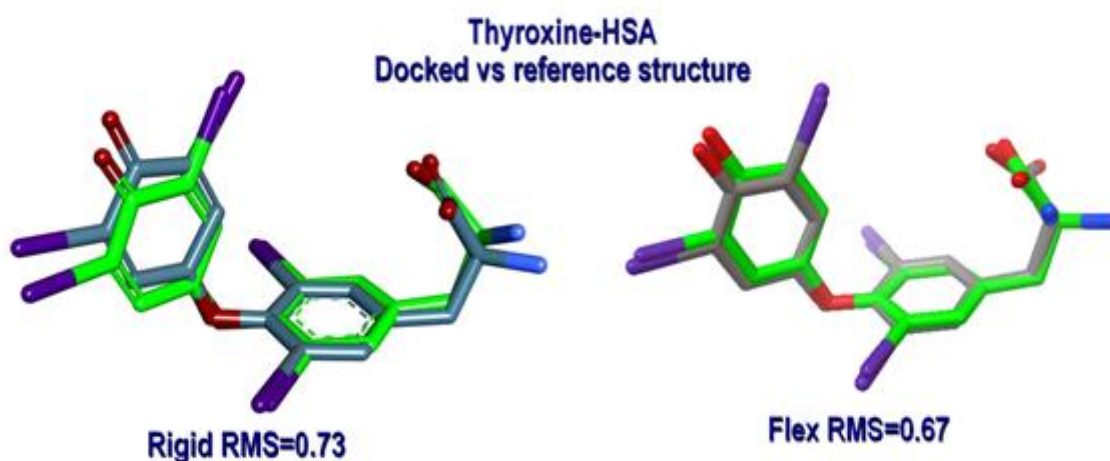
Слика 25. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ИП у фосфатном пуферу ($T = 298$ К; pH 7,4).

4.3. Молекулски докинг тигециклина са хуманим серумским албумином

Компјутерска симулација докинга је коришћена за откривање доминантног (фаворизованог) везујућег места за ТГЦ и главних интеракција између ХСА и ТГЦ. Флексибилност рецептора може да има огроман утицај на проблем доковања лиганда, а доказано је да чак и мале промене у конформацији рецептора могу бити важне за израчунавање афинитета везивања [194].

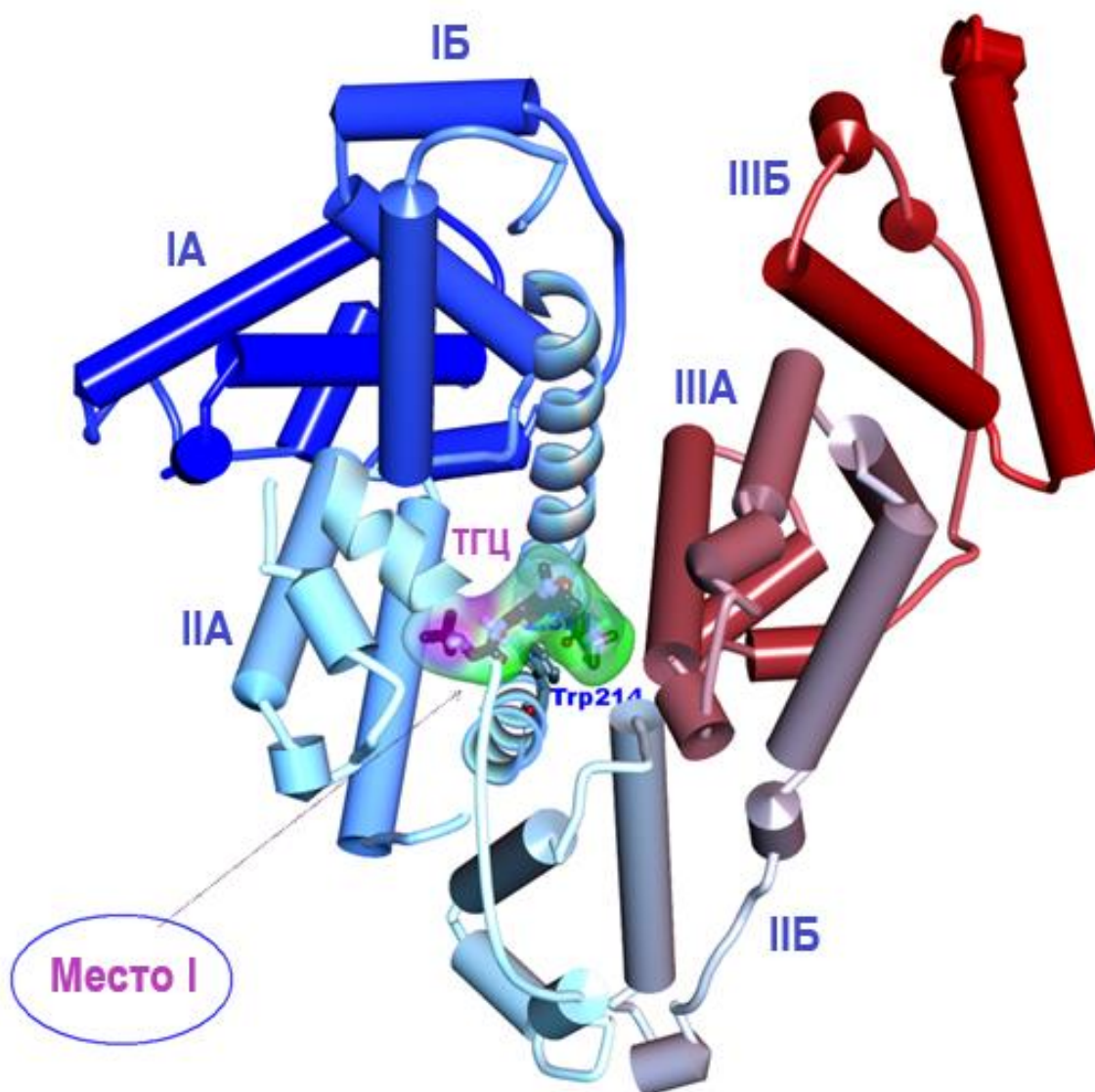
Као што је раније наведено (у поглављу апсорпциона спектроскопија), положај апсорпционог максимума ХСА-ТГЦ система је благо померен ка нижим таласним дужинама због настале промене у ланцу протеина. Из овог разлога смо применили флексибилан докинг (флексибилан лиганд са флексибилним рецептором) и пробали да репродукујемо реалну ХСА-ТГЦ интеракцију.

ХСА (1ХК1) са флексибилним Trp214 је коришћен за смештај испитиваних лиганата. Ова аминокиселина је коришћена тако да директно утиче на ХСА-ТГЦ везивање. Симулација докинга је извршена за оба везујућа места, место I (субдомен II) и место II (субдомен III), да би се утврдило доминантно (фаворизовано) везујуће место. У циљу тачности, пустили смо молекул тироксина (ТИР) (оригинално комплексиран у 1ХК1 серумском албумину) на доковање са 1ХК1. Резултати ових испитивања су приказани на Слици 26.

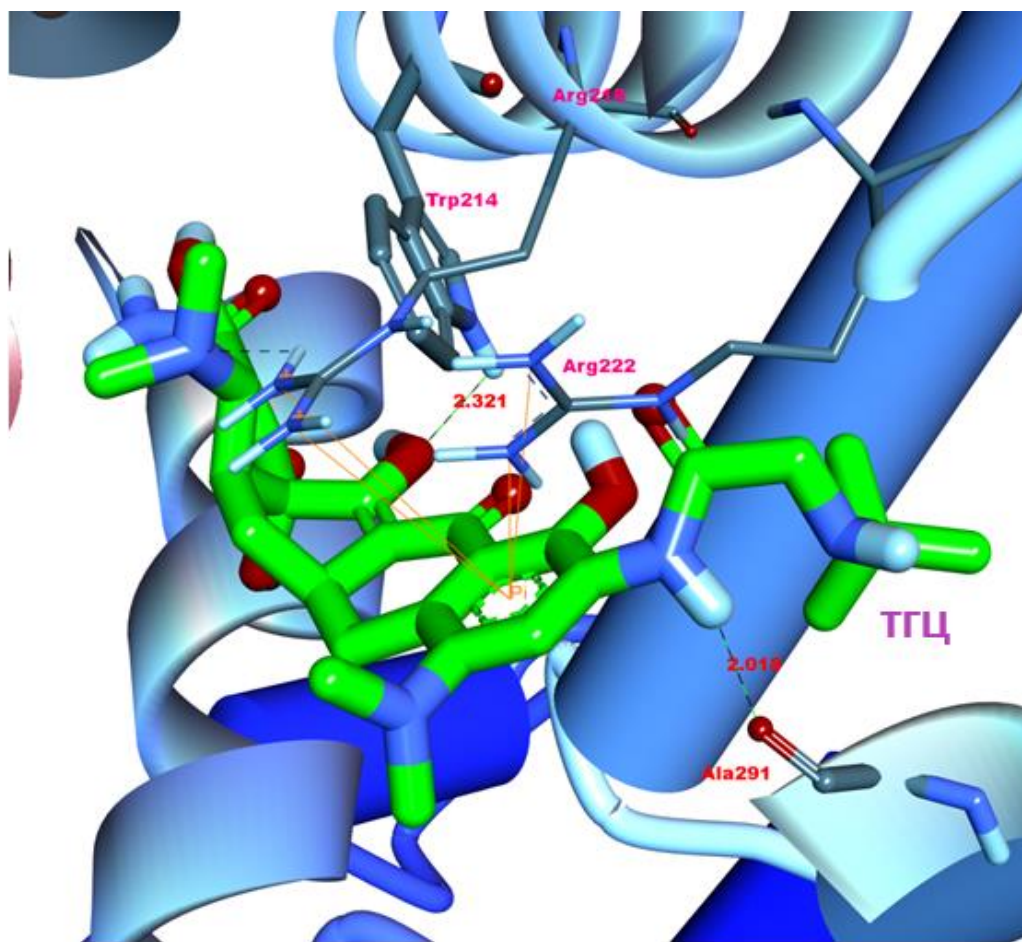


Слика 26. Преклапање докованог и кокрсталисаног тироксина (ТИР) након крутог и флексибилног докинга.

Модел пролек-протеин и главни остаци који учествују у интеракцији између ХСА и ТГЦ су приказани на Сликама 27 и 28. У Табели 8 су приказане доступне површине (ASA) различитих остатака ХСА и ХСА-ТГЦ комплекса који су укључени у ово везивање.



Слика 27. ХСА са субдоменима обојеним различитим бојама и ТГЦ смештеним у месту I.



Слика 28. Молекул ТГЦ везан за место I у субдомену ПА ХСА.

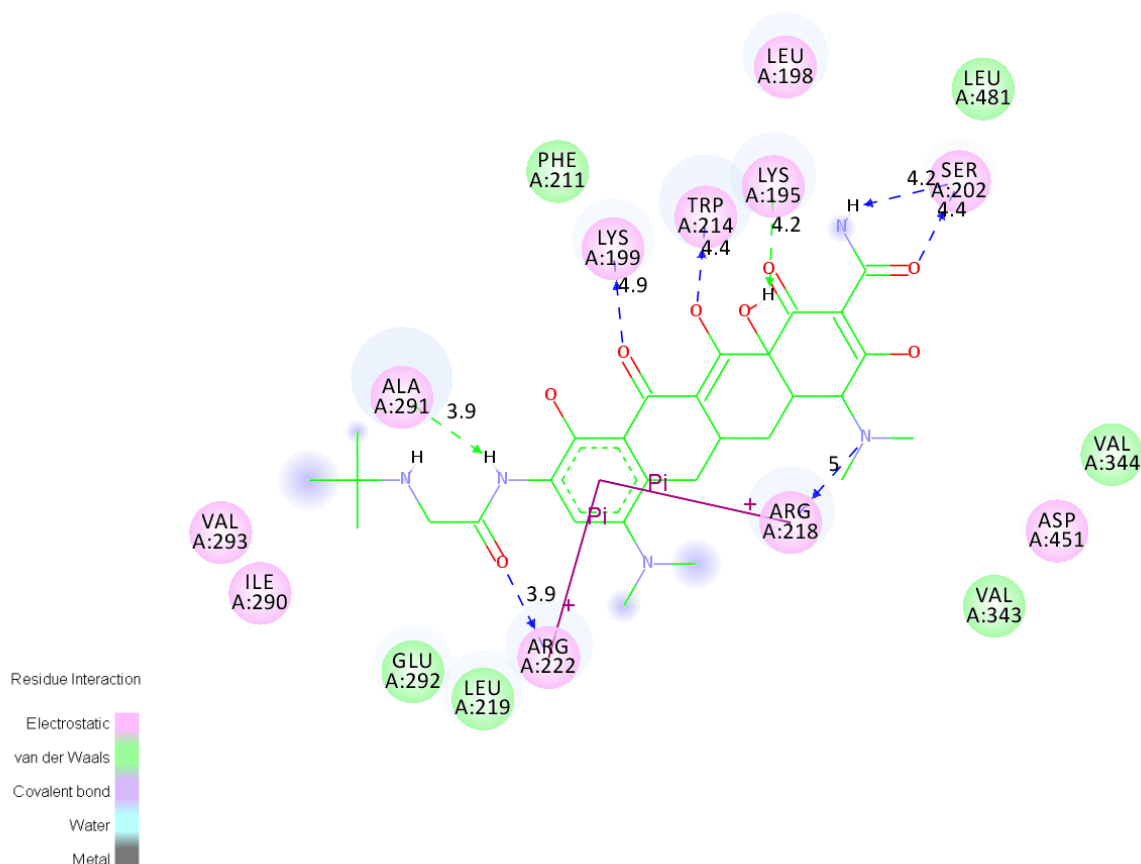
Табела 8. Доступна површина (ASA) различитих остатака ХСА и ХСА-ТГЦ комплекса.

Остатак	ХСА ASA (Å ²)	ХСА-ТГЦ ASA (Å ²)	ΔASA (Å ²)
Lys195	59,858	17,704	42,154
Leu198	14,867	0,794	14,073
Lys199	37,889	12,816	25,073
Trp214	38,377	0,165	25,561
Arg218	41,720	8,421	33,299
Leu219	25,308	1,816	23,492
Arg222	59,512	26,448	33,064
Leu238	34,841	15,208	19,633
Ile290	17,334	5,448	11,886
Ala291	66,304	17,024	49,280
Glu292	121,232	90,455	30,777
Val455	19,711	12,107	7,610

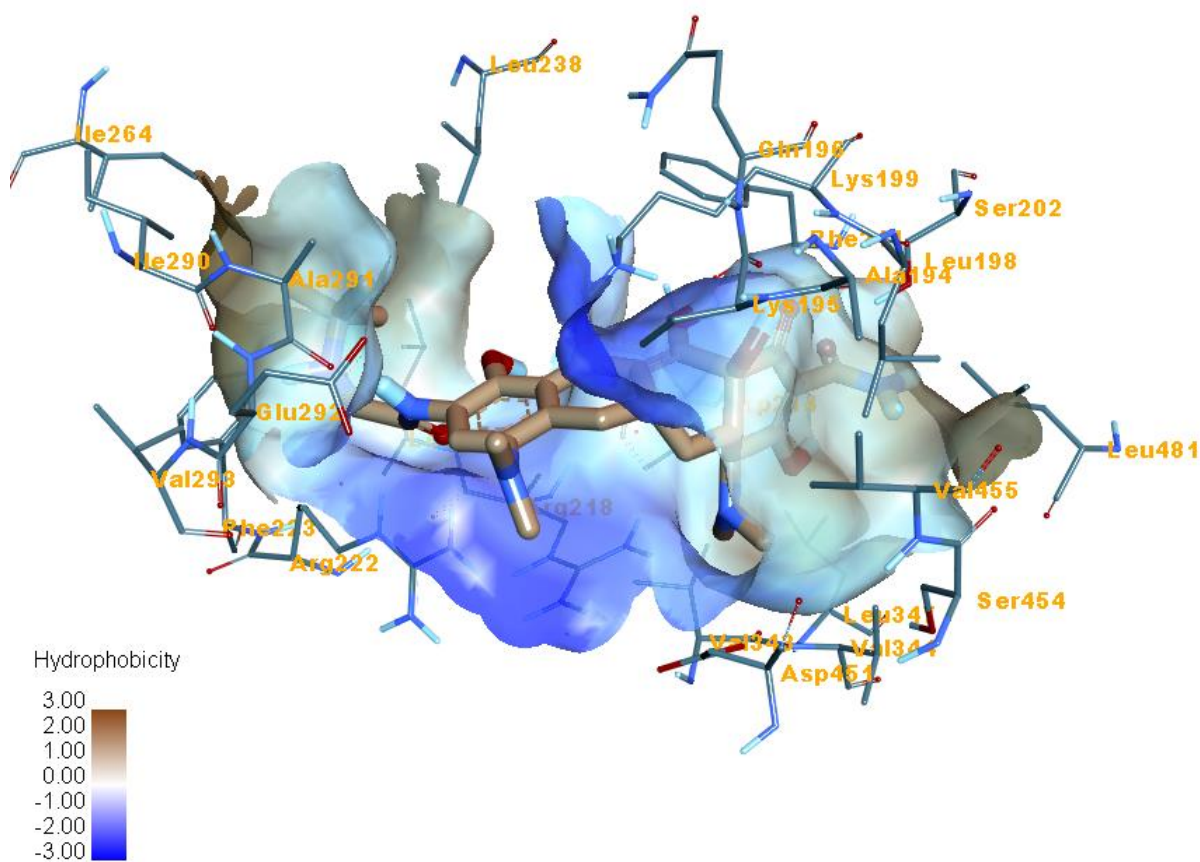
Енергетски профил ХСА-ТГЦ интеракција је приказан у Табели 9. На Слици 29 је дат шематски дијаграм најважнијих интеракција, а на Слици 30 мапа хидрофобних интеракција које су укључене у везивање ТГЦ за ХСА.

Табела 9. Енергетски профил ХСА-ТГЦ интеракција.

Интеракције	<i>E</i> (Kcal/mol)
ХСА-ТГЦ ван дер Валсова енергија	-4,73
ХСА-ТГЦ електростатичка енергија	-2,83
ХСА-ТГЦ енергија водоничне везе	-3,94
ХСА-ТГЦ слободна енергија солватације	2,08
ХСА-ТГЦ конформациона ентропија	0,37



Слика 29. Шематски дијаграм најважнијих ХСА-ТГЦ интеракција.



Слика 30. Хидрофобна површинска мапа ХСА рецептора око ТГЦ лиганда.

У Табели 10 је приказана промена слободне енергије (ΔG) ТГЦ, ТЦ и ТИР за место I и II у ХСА.

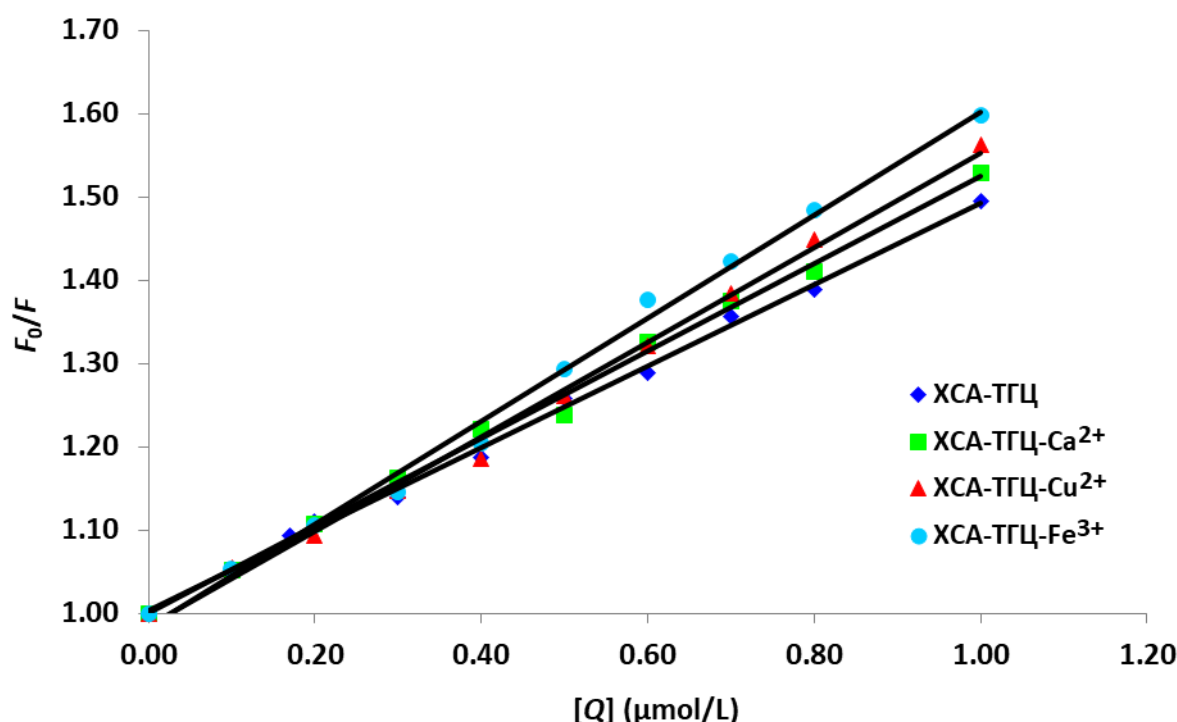
Табела 10. Промена слободне енергије ΔG (Kcal/mol) ХСА-Л комплекса (Л = ТГЦ, ТЦ или ТИР).

	ХСА-ТГЦ	ХСА-ТЦ	ХСА-ТИР
(ΔG) флекс. место I	-5,82	-7,23	-10,41
(ΔG) флекс. место II	-3,49	-5,96	-7,18

4.4. Утицај јона метала на везивање тигециклина за хумани серумски албумин

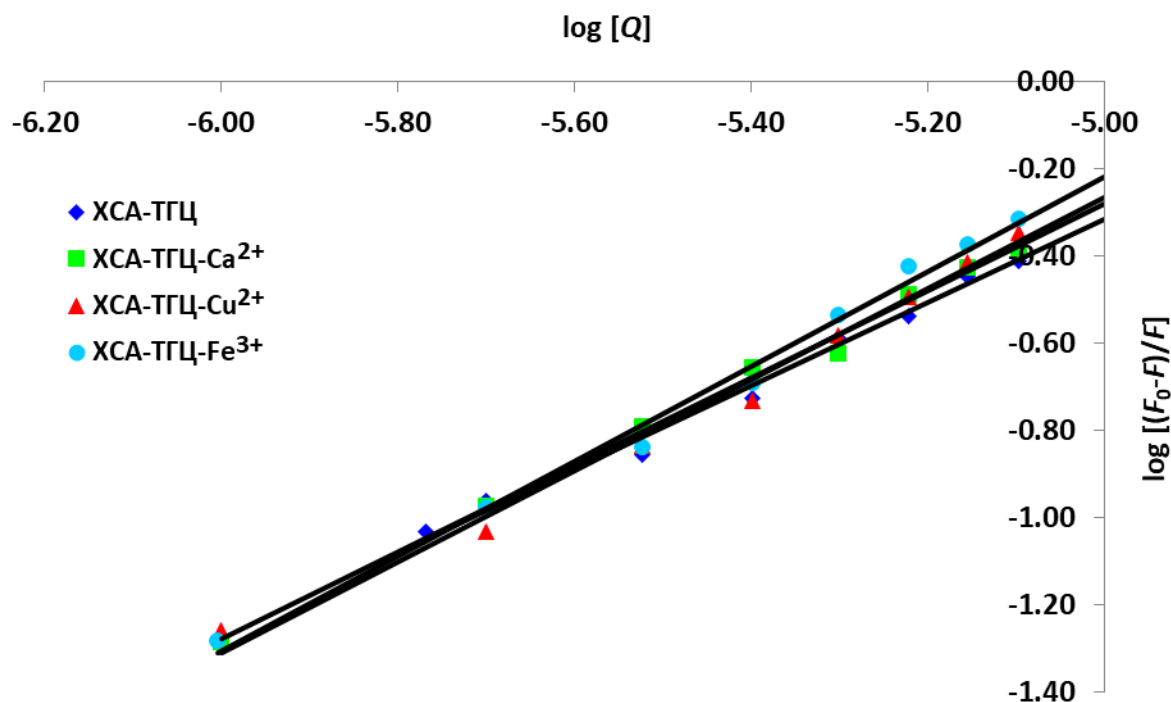
Утицај јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) на везивање ТГЦ за ХСА је испитиван у овом делу истраживања. Под датим експеименталним условима, испитивани катјони нису стварали талог у фосфатном пуферу ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$).

Стерн–Волмеров график гашења флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству различитих јона метала је приказан на Слици 31. Вредности K_{SV} и K_q за сваки јон метала су израчунате и сумиране у Табели 11.



Слика 31. Стерн–Волмеров график гашења флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству различитих јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) на 298 К.

Вредности K_a и n ХСА-ТГЦ система у присуству различитих јона метала су одређене из пресека и нагиба графика зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (Слика 32) и приказане у Табели 11. Добијени су задовољавајући коефицијенти корелације. Као што се може видети, у присуству Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} је дошло до повећања константе везивања K_a ХСА-ТГЦ комплекса, што указује да је настало јаче везивање ТГЦ за ХСА и да су формиран стабилнији комплекси.



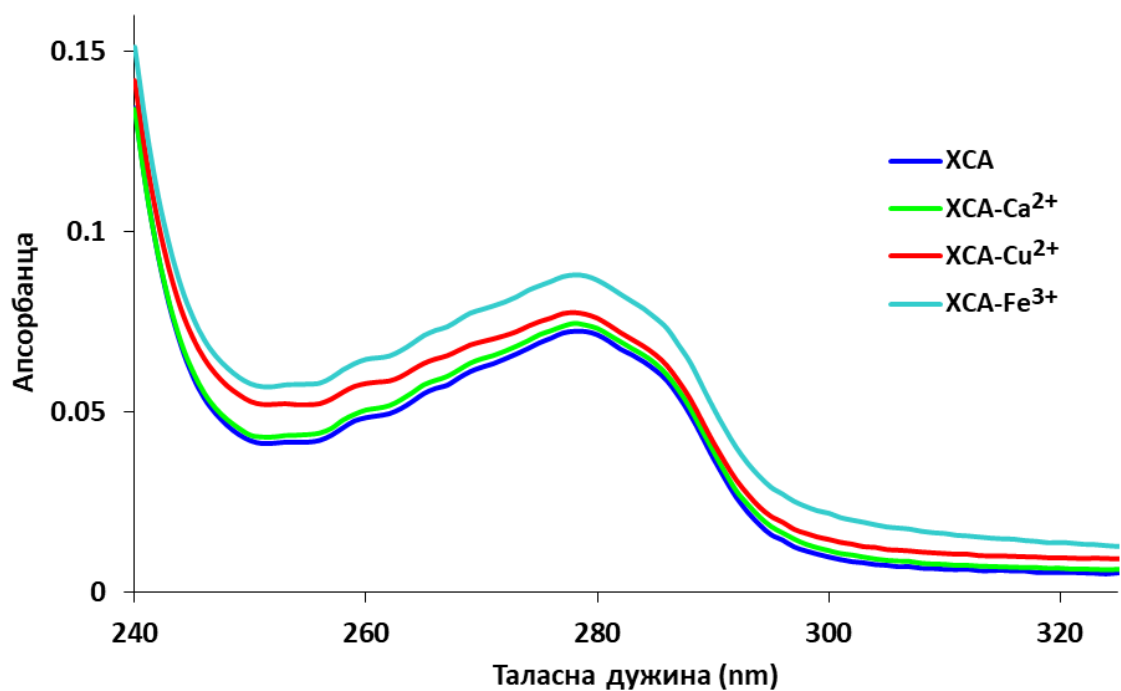
Слика 32. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ у присуству различитих јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) на 298 К.

Табела 11. Константе гашења и константе везивања ХСА-ТГЦ система у присуству различитих јона метала на 298 К.

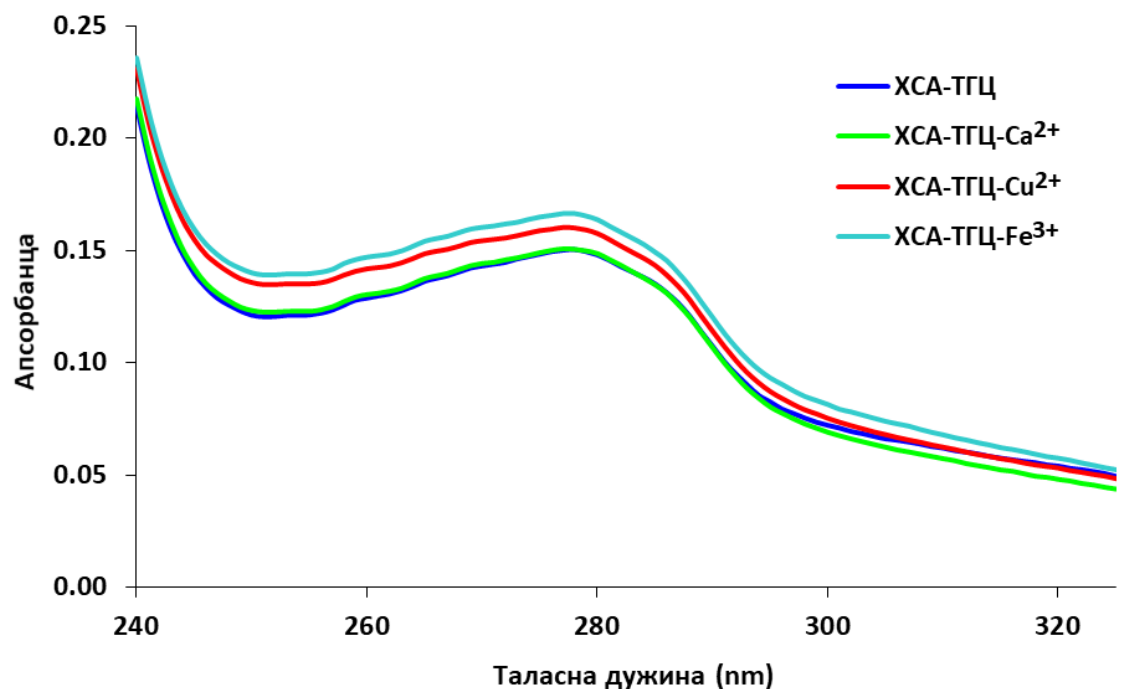
Систем	K_{sv} (L/mol)	K_q (L/mol·s)	R^a	K_a (L/mol)	n	R^a
ХСА-ТГЦ	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^{12}$	0,996	$1,8 \times 10^4$	0,91	0,991
ХСА-ТГЦ- Ca^{2+}	$5,2 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{12}$	0,996	$5,1 \times 10^4$	1,00	0,996
ХСА-ТГЦ- Cu^{2+}	$5,7 \times 10^4$	$5,7 \times 10^{12}$	0,995	$8,8 \times 10^4$	1,04	0,992
ХСА-ТГЦ- Fe^{3+}	$6,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^{12}$	0,994	$1,6 \times 10^5$	1,09	0,993

^a R је коефицијент корелације.

Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) су приказани на Слици 33. Резултати флуоресцентне спектроскопије су показали да јони метала различито повећавају K_a ХСА-ТГЦ система, у односу $\text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (видети Табелу 11). Испитивани јони метала су имали различит ефекат на повећање апсорбанце ХСА-ТГЦ система, а анализирањем добијених вредности на апсорпционом максимуму ХСА (видети Сliku 34), закључили смо да је однос остао исти.



Слика 33. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих јона метала ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{XCA}] = [\text{Ca}^{2+}] = [\text{Cu}^{2+}] = [\text{Fe}^{3+}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

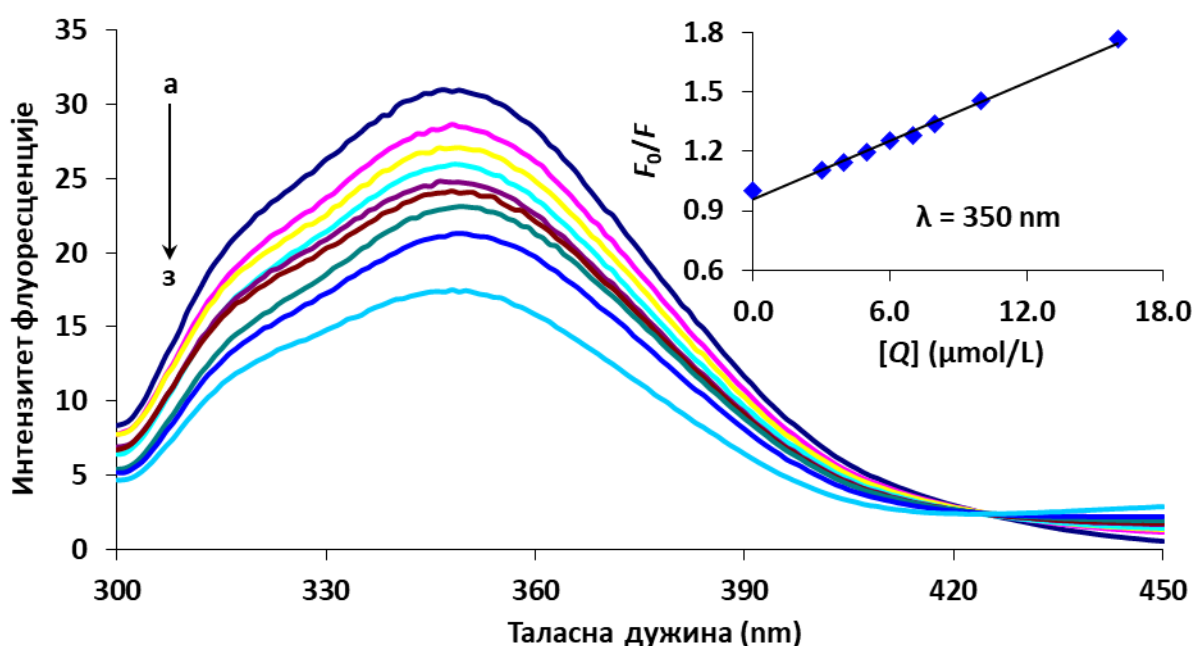


Слика 34. Апсорпциони спектри ХСА-ТГЦ система у присуству различитих јона метала ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{XCA}] = [\text{Ca}^{2+}] = [\text{Cu}^{2+}] = [\text{Fe}^{3+}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 4,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

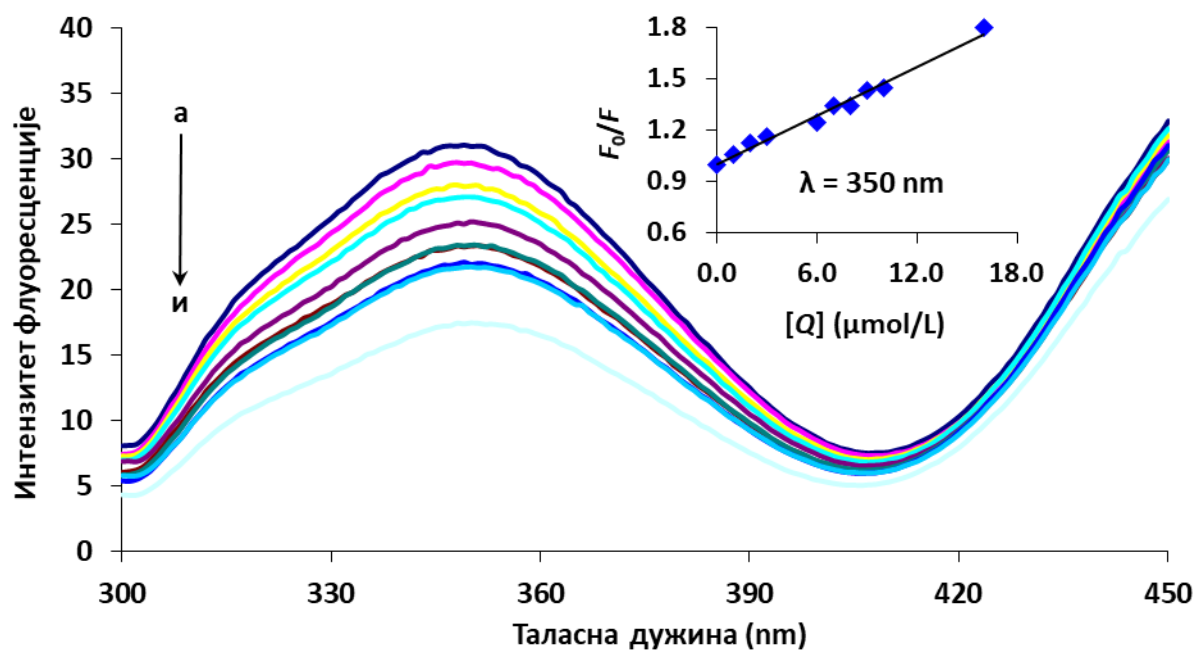
4.5. Утицај флуорохинолона на везивање тигециклина за хумани серумски албумин

У овом делу рада смо испитивали потенцијалну промену афинитета везивања ТГЦ за ХСА која настаје после додавања три флуорохинолона: спарфлоксацина (СПФ), левофлоксацина (ЛВФ) и ципрофлоксацина (ЦПФ). Претходно смо израчунали све параметре везивања ХСА-ТГЦ система. Након тога, квантификован је утицај сваког флуорохинолона на ХСА-ТГЦ интеракцију, при чему су добијени нови параметри везивања.

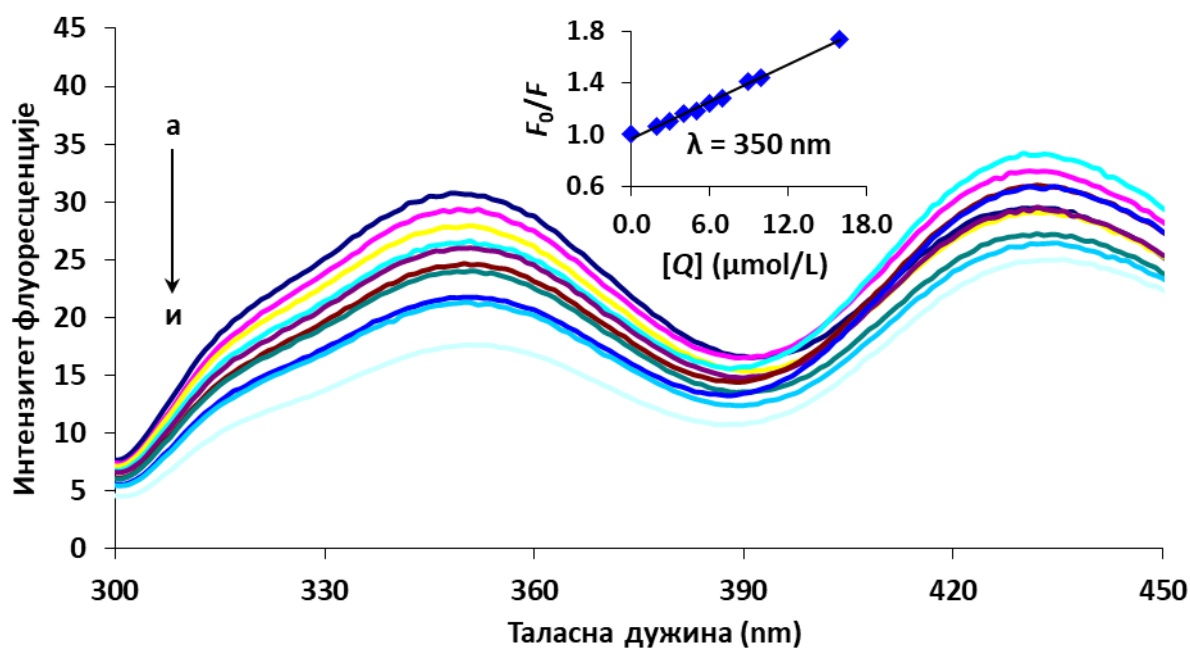
Флуоросцентни емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксних концентрација флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) су снимљени на 298 К и приказани на Сликама 35, 36 и 37. На талсаној дужини ексцитације од 295 nm, спектар ХСА има снажан емисиони максимум на око 350 nm. Вредности K_{SV} и K_q су дате у Табели 12. Стерн–Волмерови графици анализираних система: ХСА-ТГЦ-СПФ, ХСА-ТГЦ-ЛВФ и ХСА-ТГЦ-ЦПФ, показали су линеарну зависност са коефицијентима корелације изнад 0,9 и пресеком постављеним на 1.



Слика 35. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству СПФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-z): (0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{СПФ}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

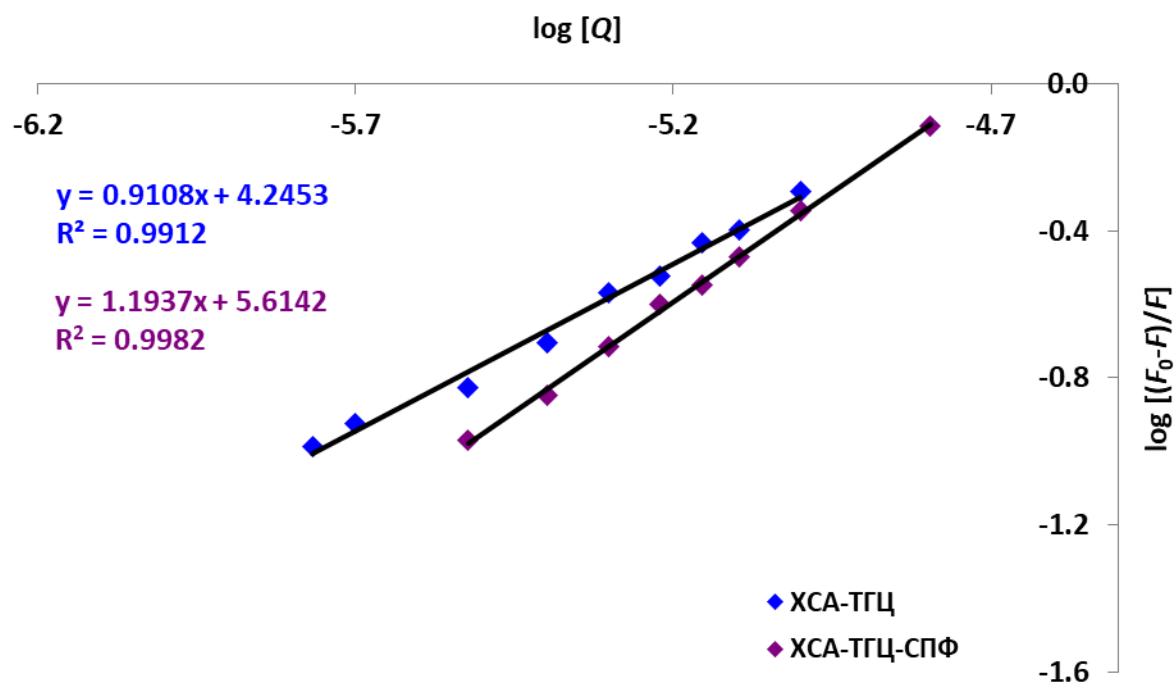


Слика 36. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству ЛВФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{XSA}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-u): (0; 1,0; 2,0; 3,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ЛВФ}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

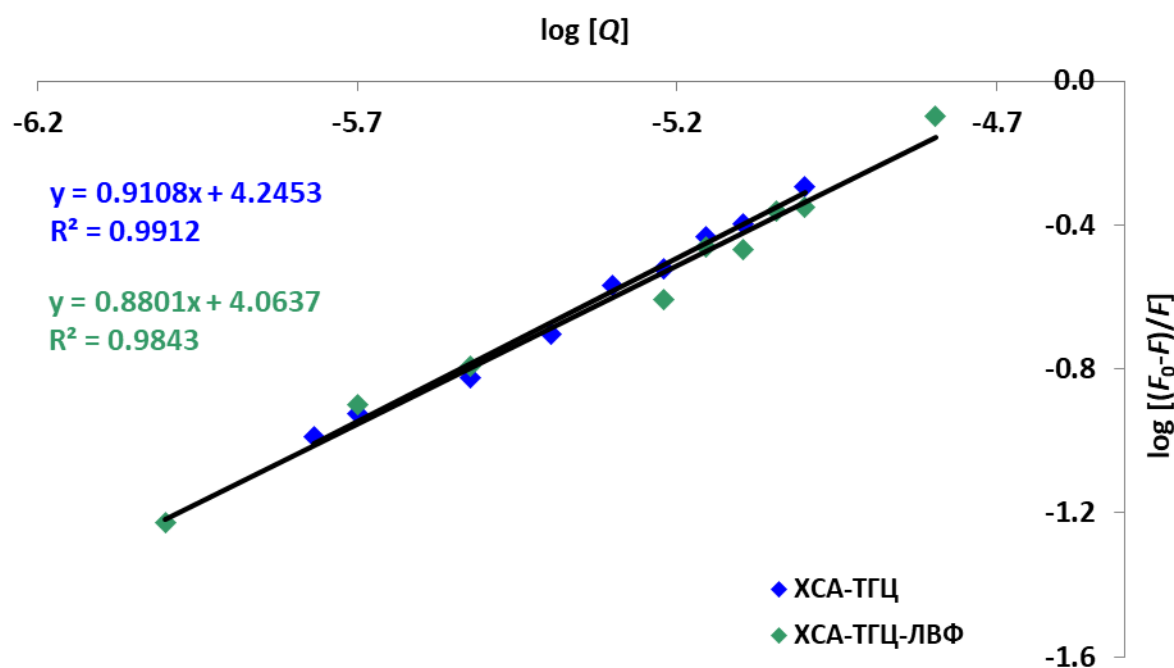


Слика 37. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ у присуству ЦПФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{XSA}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ (a-u): (0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ЦПФ}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

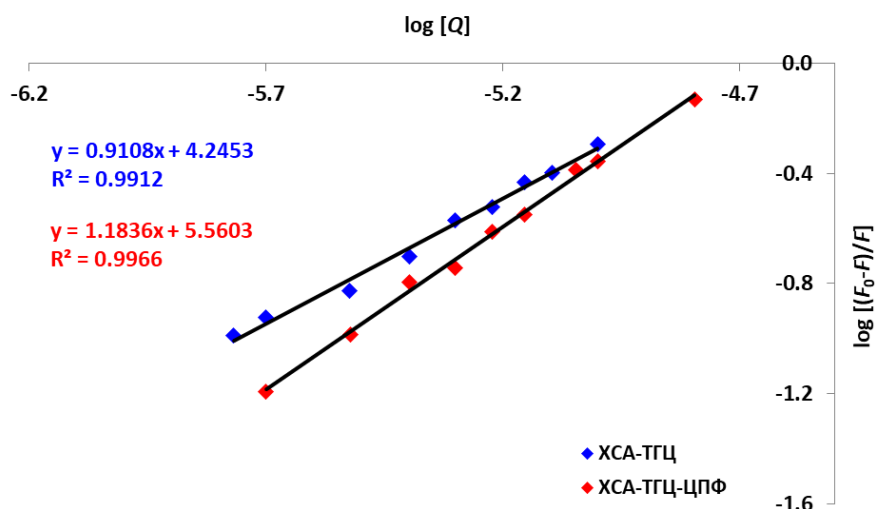
Вредности K_a и n ХСА-ТГЦ система у присуству СПФ, ЛВФ и ЦПФ су одређене из пресека и нагиба графика зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (видети Слике 38, 39 и 40) и приказане у Табели 13.



Слика 38. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ у присуству СПФ на 298 К.



Слика 39. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ у присуству ЛВФ на 298 К.



Слика 40. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ у присуству ЦПФ на 298 К.

Табела 12. Константе гашења ХСА-ТГЦ система у присуству СПФ, ЛВФ и ЦПФ на 298 К.

Систем	K_{sv} (L/mol)	K_q (L/mol·s)	R^a
ХСА-ТГЦ	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^{12}$	0,996
ХСА-ТГЦ-СПФ	$4,9 \times 10^4$	$4,9 \times 10^{12}$	0,992
ХСА-ТГЦ-ЛВФ	$4,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^{12}$	0,986
ХСА-ТГЦ-ЦПФ	$4,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^{12}$	0,994

^a R је коефицијент корелације.

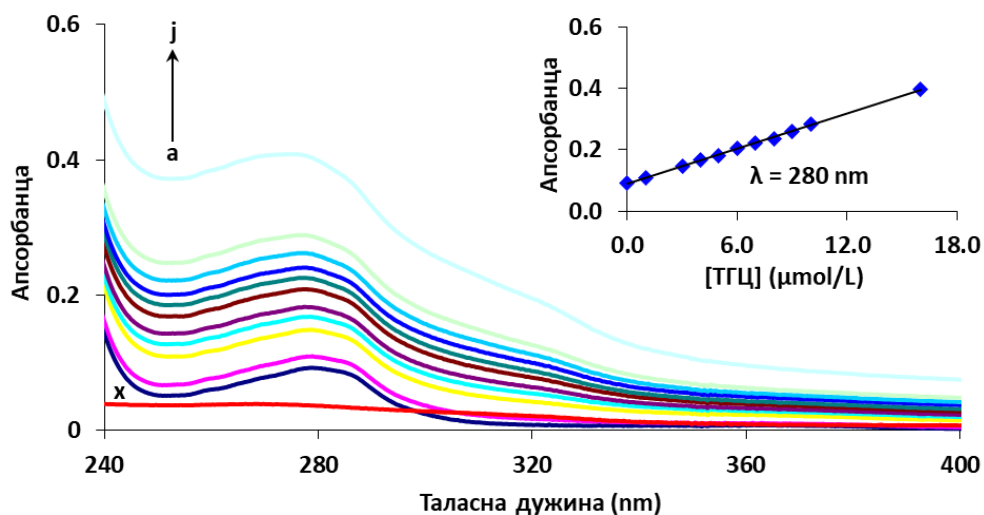
Табела 13. Вредности K_a , n и K_s ХСА-ТГЦ система у присуству флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) на 298 К.

Систем	Флуоресцентни спектри			Апсорпциони спектри	
	K_a (L/mol)	n	R^a	K_s (L/mol)	R^a
ХСА-ТГЦ	$1,8 \times 10^4$	0,91	0,991	$1,6 \times 10^4$	0,982
ХСА-ТГЦ-СПФ	$4,1 \times 10^5$	1,19	0,998	$3,1 \times 10^5$	0,940
ХСА-ТГЦ-ЛВФ	$1,2 \times 10^4$	0,88	0,984	$1,0 \times 10^4$	0,989
ХСА-ТГЦ-ЦПФ	$3,6 \times 10^5$	1,18	0,997	$2,9 \times 10^5$	0,968

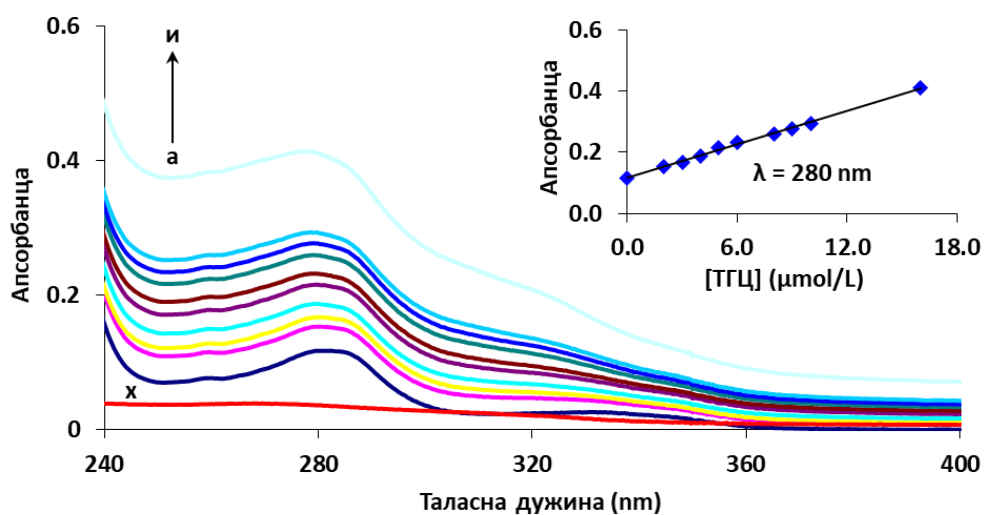
^a R је коефицијент корелације.

У овом делу истраживања смо анализирали и резултате апсорпционих спектра ХСА-ТГЦ система у одсуству и присуству сваког флуорохинолона. На Сликама 41, 42

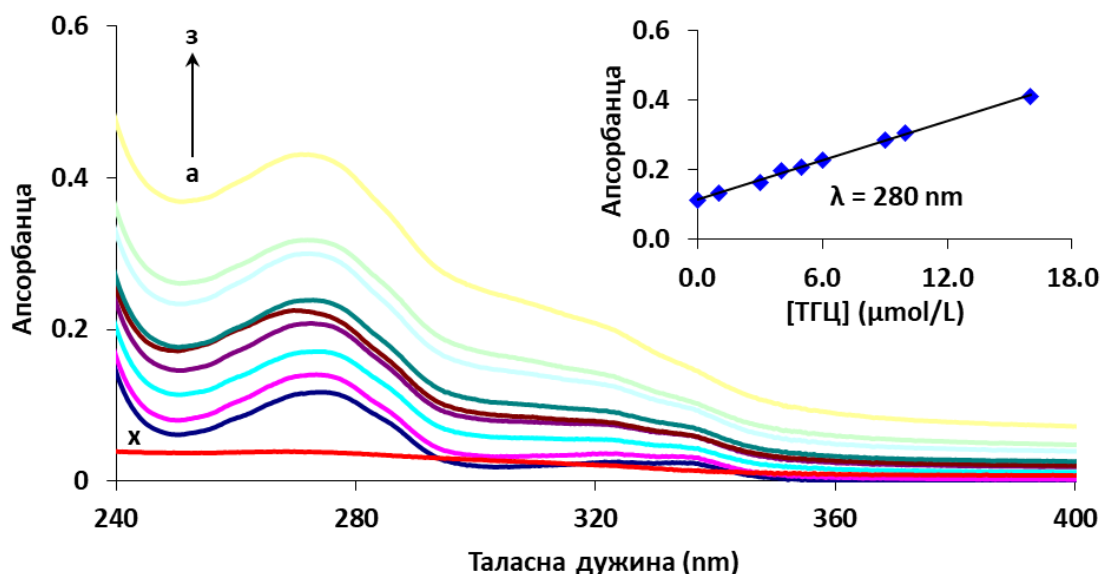
и 43 су приказани апсорпциони спектри ХСА-ТГЦ система у присуству СПФ, ЛВФ и ЦПФ на 298 К. Сви подаци су анализирани на λ_{\max} ХСА. Вредности K_S су израчунате на основу Бенеси–Хилдебрандове једначине (18), из пресека и нагиба графика зависности $[ХСА]/A-A_0$ од $1/[ТГЦ]$ и приказане у Табели 13.



Слика 41. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације СПФ ($T = 298$ К; $pH 7,4$). $[ХСА] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[ТГЦ]$ ($a-j$): (0; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[СПФ] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само 2,0 $\mu\text{mol/L}$ ТГЦ.

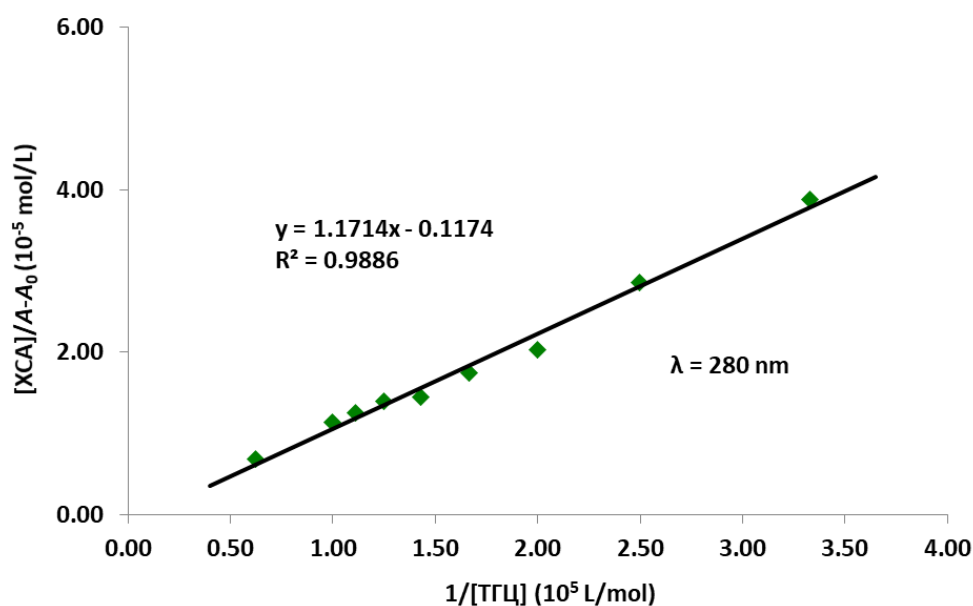


Слика 42. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ЛВФ ($T = 298$ К; $pH 7,4$). $[ХСА] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[ТГЦ]$ ($a-u$): (0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[ЛВФ] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само 2,0 $\mu\text{mol/L}$ ТГЦ.



Слика 43. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ЦПФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}]$ ($a-z$): (0; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 9,0; 10,0; 16,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ЦПФ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ТГЦ.

На Слици 44 је приказан један пример Бенеси–Хилдебрандовога графика ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ЛВФ, при чему је добијен коефицијент корелације од 0,9886 на 280 nm.



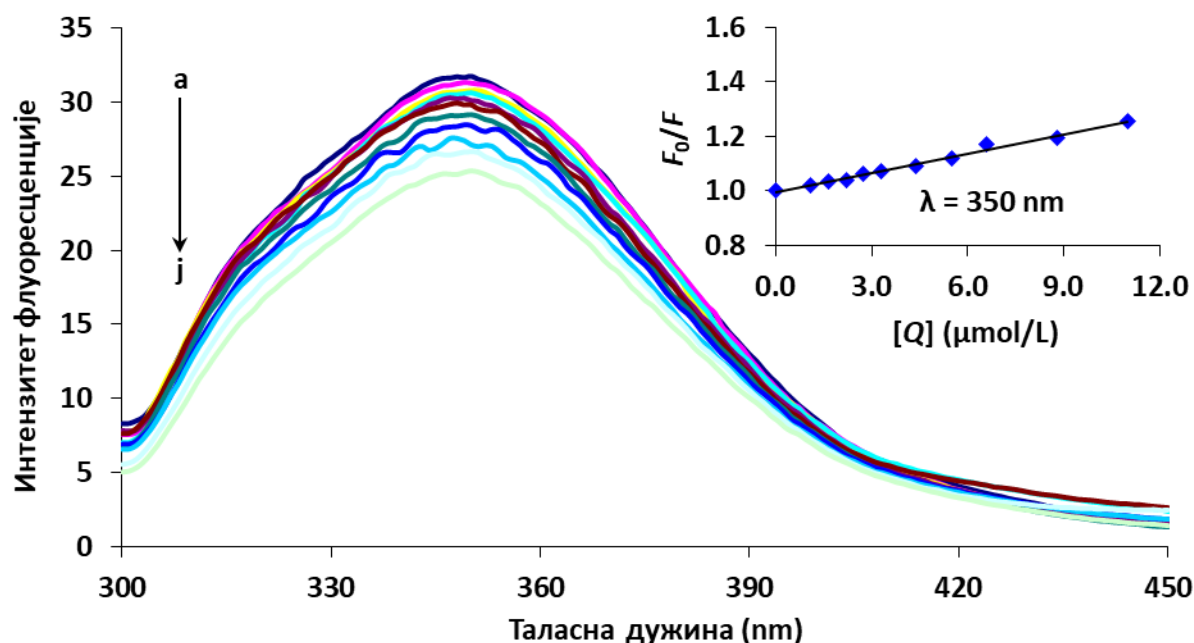
Слика 44. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ и фиксне концентрације ЛВФ у фосфатном пуферу ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$).

4.6. Утицај тигециклина на везивање флуорохинолона за хумани серумски албумин

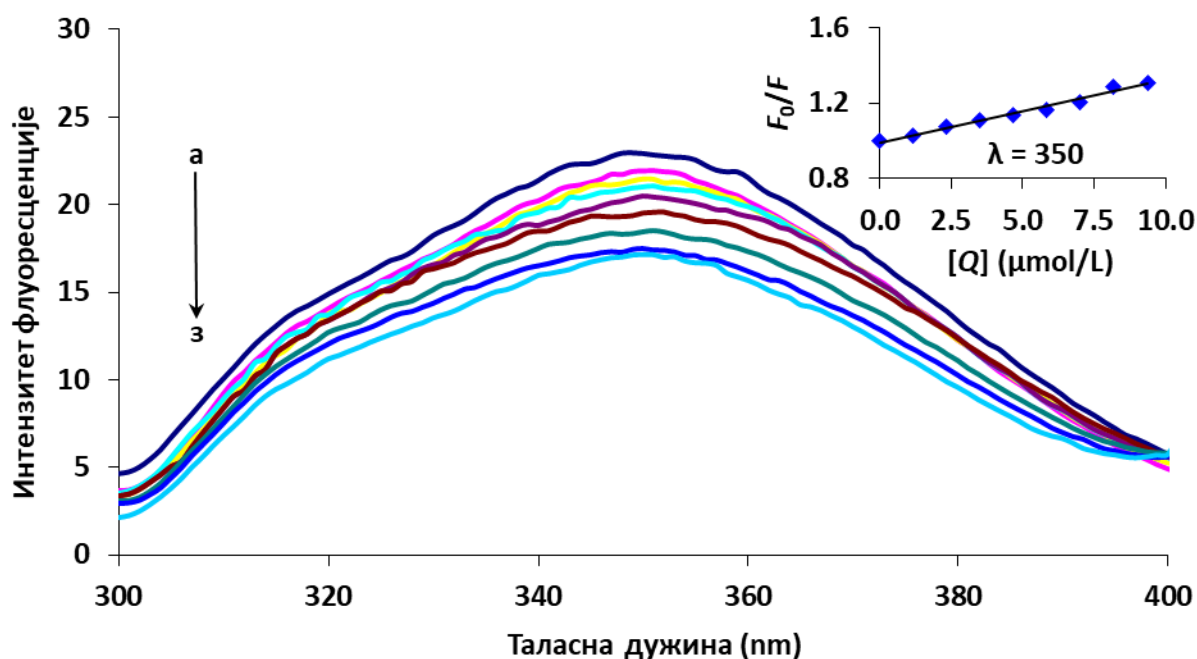
У овом делу истарживања смо испитивали потенцијалну промену афинитета везивања сваког флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) за ХСА, која настаје у присуству ТГЦ. Експерименте из претходног поглавља смо извршили обрнутим редоследом. Прво су израчунати параметри везивања ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система, а након тога је квантификован утицај ТГЦ на сваку интеракцију посебно, анализирањем промена параметара везивања.

Параметри везивања ХСА-СПФ и ХСА-ЛВФ система су добијени у овом раду, док су резултати флуоресцентне спектроскопије и параметри везивања ХСА-ЦПФ система преузети из претходно публикованих радова [76, 195, 196]. Флуоресцентни емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација СПФ и ЛВФ снимљени су на 298 К и приказани на Сликама 45 и 46.

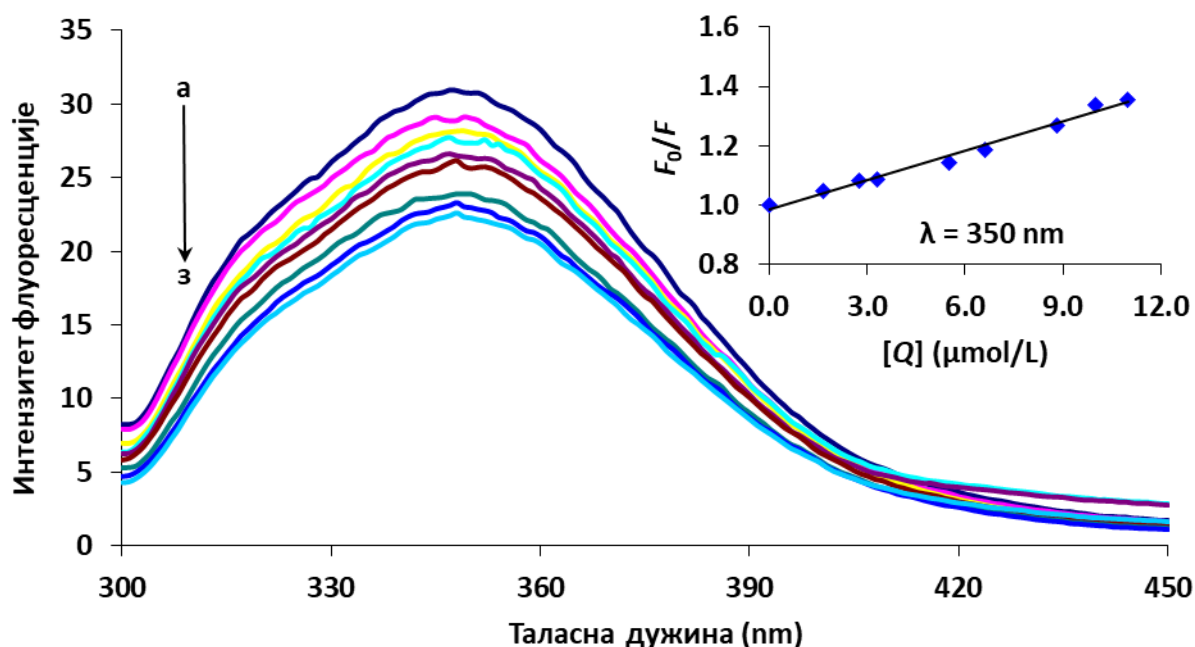
Флуоресцентни емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) и фиксне концентрације ТГЦ су снимљени на 298 К и приказани на Сликама 47, 48 и 49. Вредности K_{SV} и K_q свих испитиваних система су приказане у Табели 14.



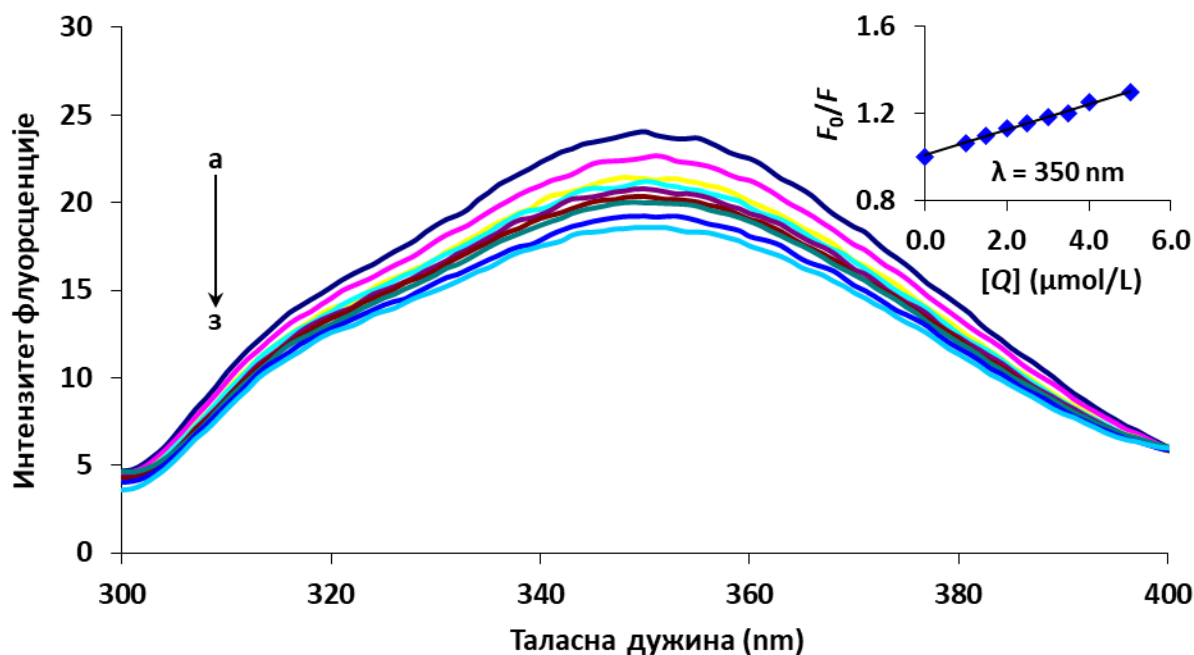
Слика 45. Гашење флуоресценције ХСА помоћу СПФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{СПФ}]$ (a-j): (0; 1,1; 1,65; 2,2; 2,75; 3,3; 4,4; 5,5; 6,6; 8,8; 11,0) $\mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.



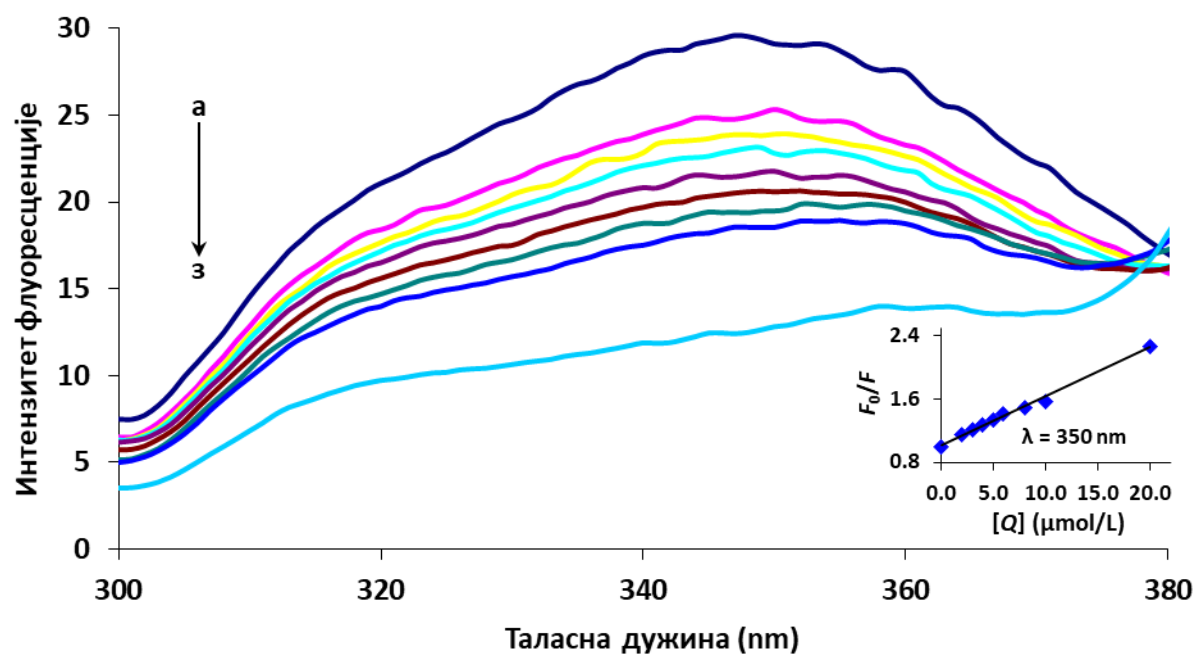
Слика 46. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ЛВФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{XSA}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЛВФ}]$ (a - $з$): (0; 1,16; 2,34; 3,52; 4,68; 5,86; 7,03; 8,2; 9,38) $\mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.



Слика 47. Гашење флуоресценције ХСА помоћу СПФ у присуству ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{XSA}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$; $[\text{СПФ}]$ (a - $з$): (0; 1,65; 2,75; 3,3; 5,5; 6,6; 8,8; 10,0; 11,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

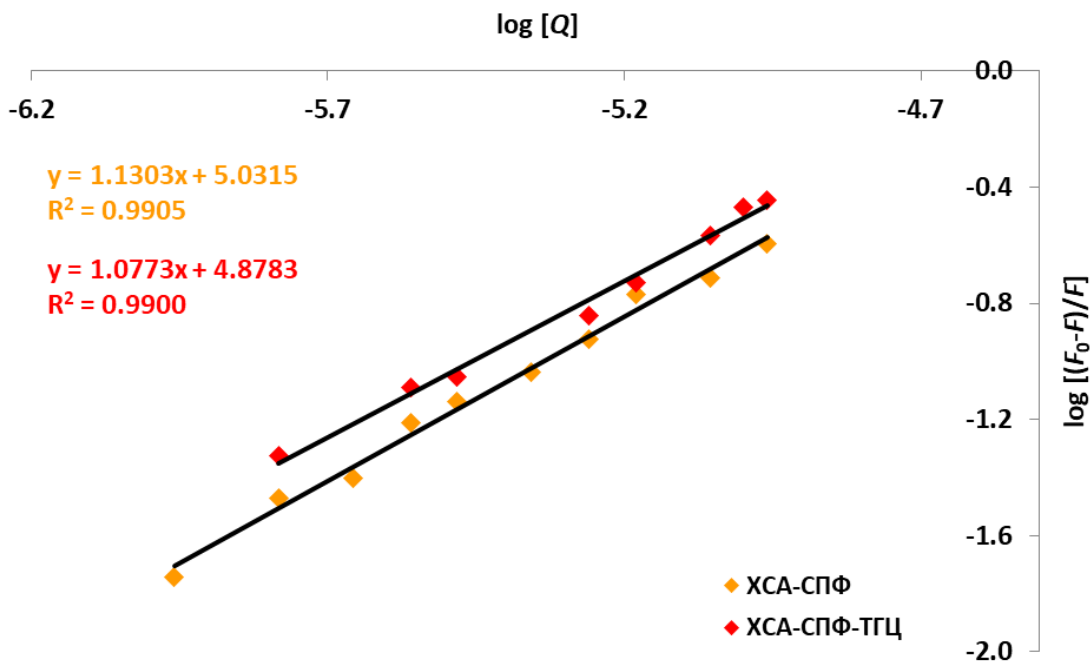


Слика 48. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ЛВФ у присуству ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЛВФ}]$ (а-з): (0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

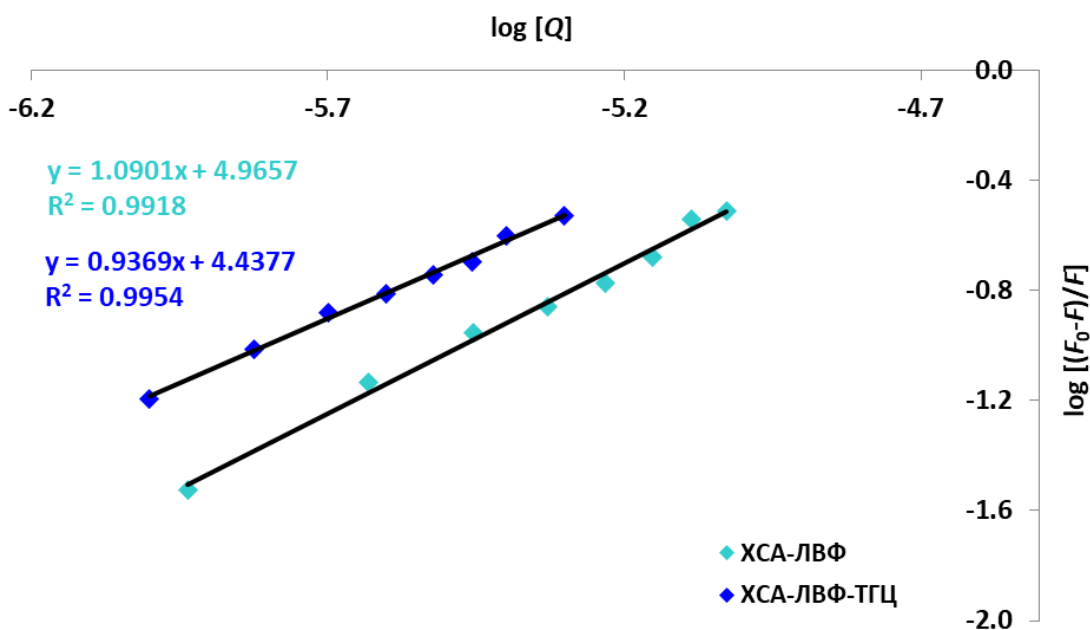


Слика 49. Гашење флуоресценције ХСА помоћу ЦПФ у присуству ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЦПФ}]$ (а-з): (0, 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 20,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. На уметнутом делу је Стерн–Волмеров график.

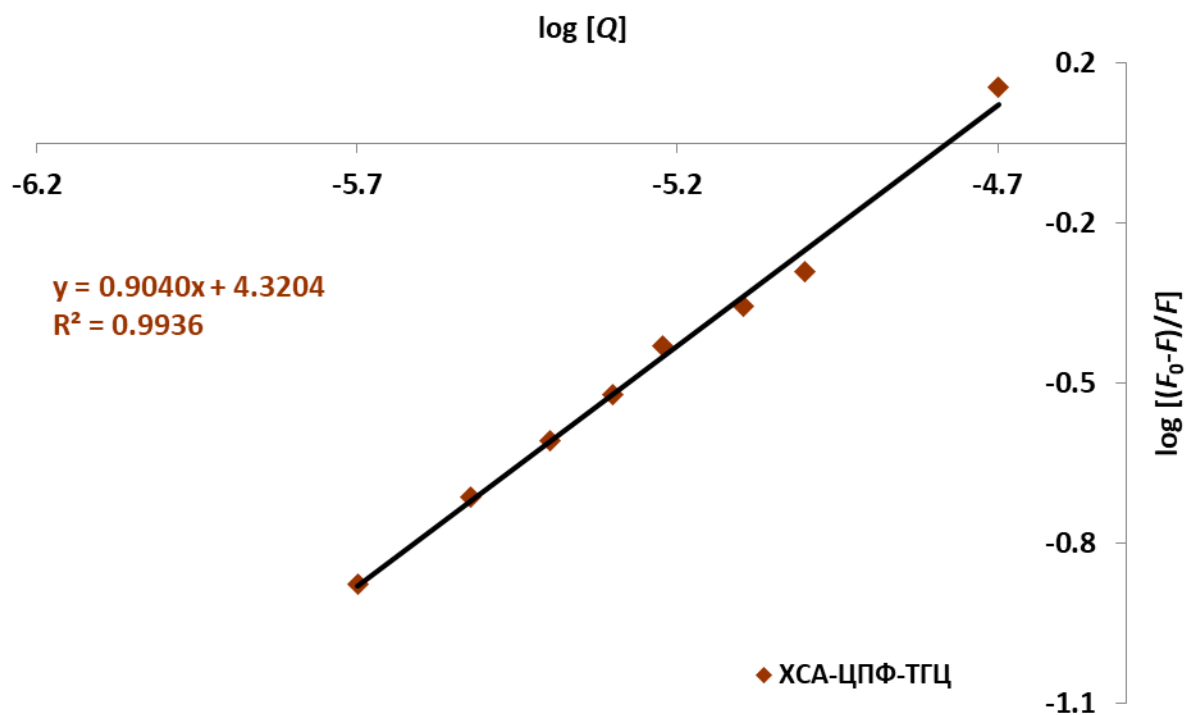
У Табели 15 су приказане вредности K_a и n ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система у одсуству и присуству ТГЦ, које су одређене из пресека и нагиба графика зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (видети Слике 50, 51 и 52).



Слика 50. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ ХСА-СПФ система у одсуству и присуству ТГЦ на 298 К.



Слика 51. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ ХСА-ЛВФ система у одсуству и присуству ТГЦ на 298 К.



Слика 52. График зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ XSA-ЦПФ система у присуству ТГЦ на 298 К.

Табела 14. Константе гашења XSA-СПФ, XSA-ЛВФ и XSA-ЦПФ система у одсуству и присуству ТГЦ на 298 К.

Систем	K_{sv} (L/mol)	K_q (L/mol·s)	R^a
XSA-СПФ	4.99	4.99	0.996
XSA-СПФ-ТГЦ	2.35	2.35	0.990
XSA-ЛВФ	3.32	3.32	0.987
XSA-ЛВФ-ТГЦ	3.31	3.31	0.986
XSA-ЦПФ ^[76, 195, 196]	5.87	5.87	0.995
XSA-ЦПФ-ТГЦ	4.97	4.97	–
XSA-СПФ	6.16	6.16	0.994

^a R је коефицијент корелације.

Табела 15. Вредности K_a , n и K_S ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система у одсуству и присуству ТГЦ на 298 К.

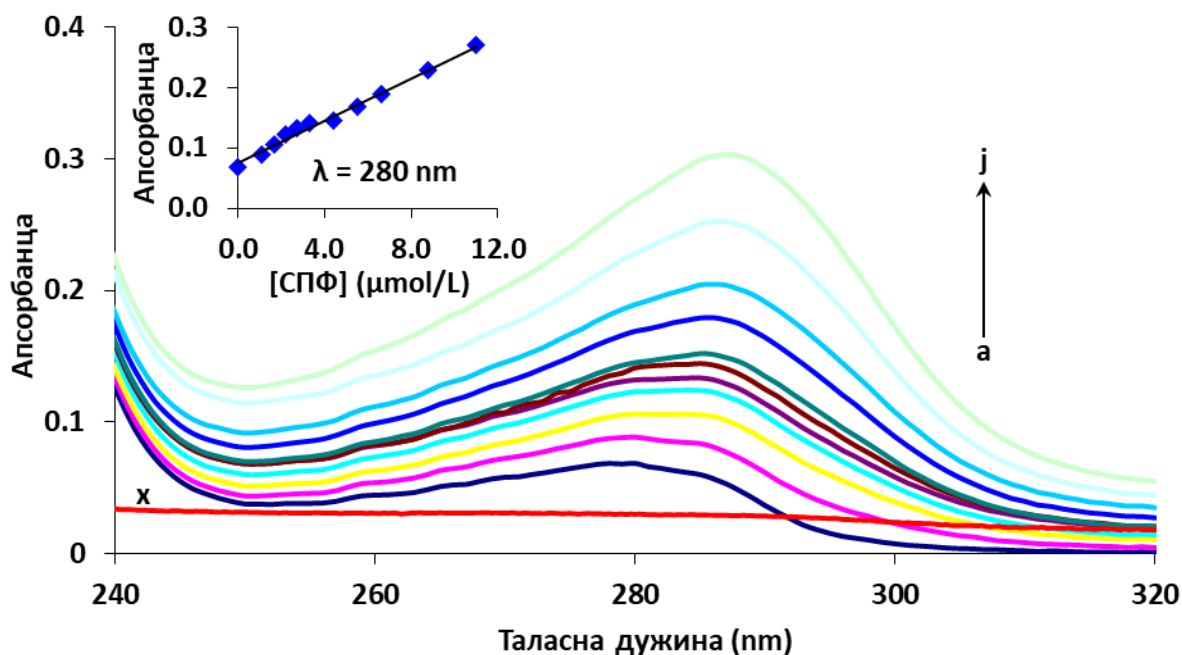
Систем	Флуоресцентни спектри			Апсорпциони спектри	
	K_a (L/mol)	n	R^a	K_S (L/mol)	R^a
ХСА-СПФ	$1,1 \times 10^5$	1,13	0,991	$1,0 \times 10^5$	0,951
ХСА-СПФ-ТГЦ	$7,6 \times 10^4$	1,08	0,990	$6,8 \times 10^4$	0,980
ХСА-ЛВФ	$9,2 \times 10^4$	1,09	0,992	$8,5 \times 10^4$	0,945
ХСА-ЛВФ-ТГЦ	$2,7 \times 10^4$	0,94	0,995	$2,5 \times 10^4$	0,939
ХСА-ЦПФ [76, 195, 196]	$5,8 \times 10^4$	~1,0	–	–	–
ХСА-ЦПФ-ТГЦ	$2,1 \times 10^4$	0,90	0,994	$2,0 \times 10^4$	0,991

^a R је коефицијент корелације.

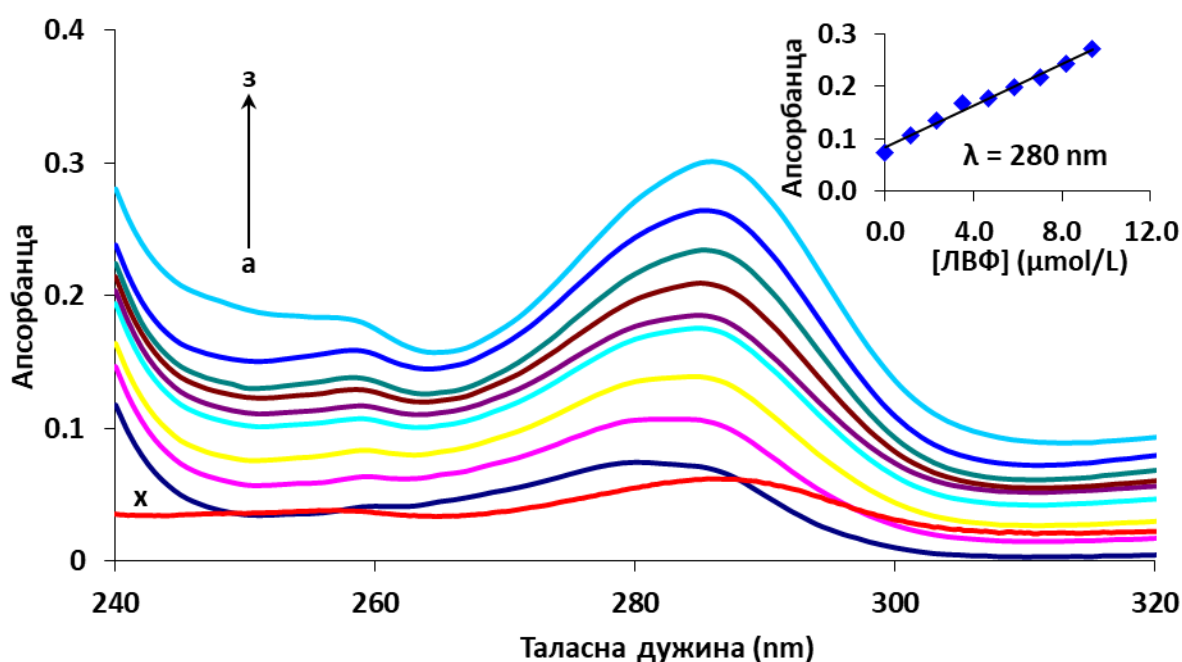
У Табели 15 се може видети да добијене вредности n ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система износе приближно 1, што указује да постоји једно везујуће место за сваки флуорохинолон у ХСА. Вредности K_a и n ХСА-СПФ и ХСА-ЛВФ система које смо добили у нашем истраживању су у доброј сагласности са претходно објављеним радовима [76, 195, 196].

У присуству ТГЦ вредности K_a , n и K_S ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система су смањене, што указује да је настало слабије везивање флуорохинолона за ХСА и да формиран ХСА-СПФ-ТГЦ, ХСА-ЛВФ-ТГЦ и ХСА-ЦПФ-ТГЦ системи имају мању стабилност у односу на првобитне системе. Присуство ТГЦ је довело до смањења вредности K_a ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система за 29,7%, 70,3% и 63,8%.

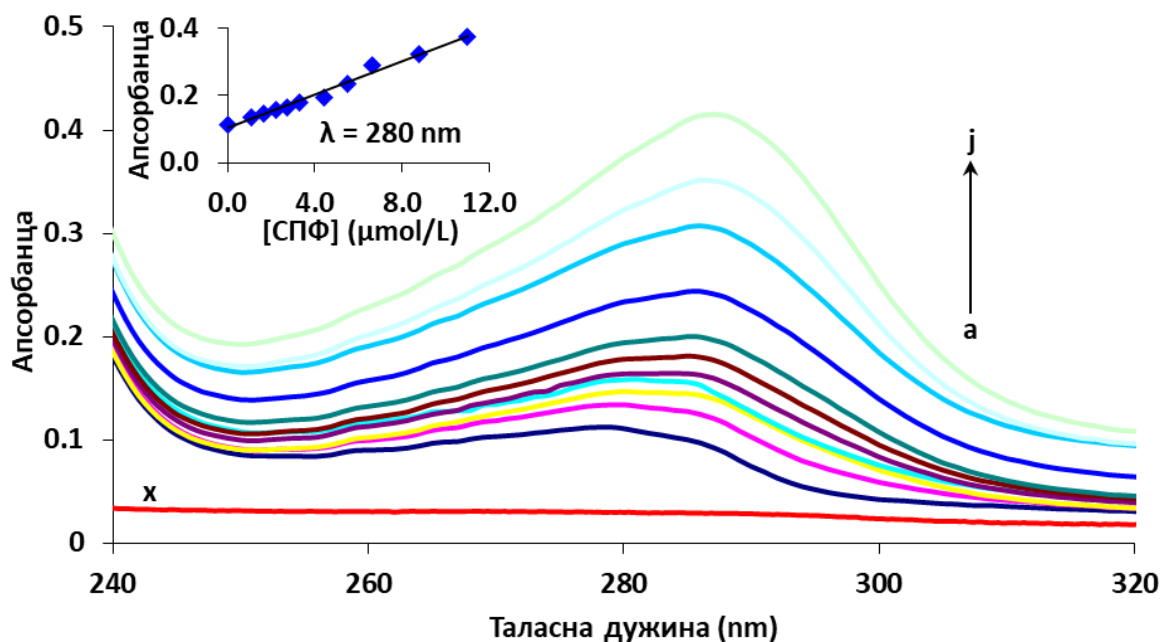
У овом делу рада смо проучавали и резултате апсорпционих спектра ХСА-СПФ (Слика 53), ХСА-ЛВФ (Слика 54) и ХСА-ЦПФ система у одсуству и присуству ТГЦ (Слике 55, 56 и 57) на 298 К. Сви резултати апсорпционе спектроскопије су анализирани на λ_{\max} ХСА. Вредности K_S су израчунате из пресека и нагиба Бенеси–Хилдебрандових графика и приказане у Табели 15.



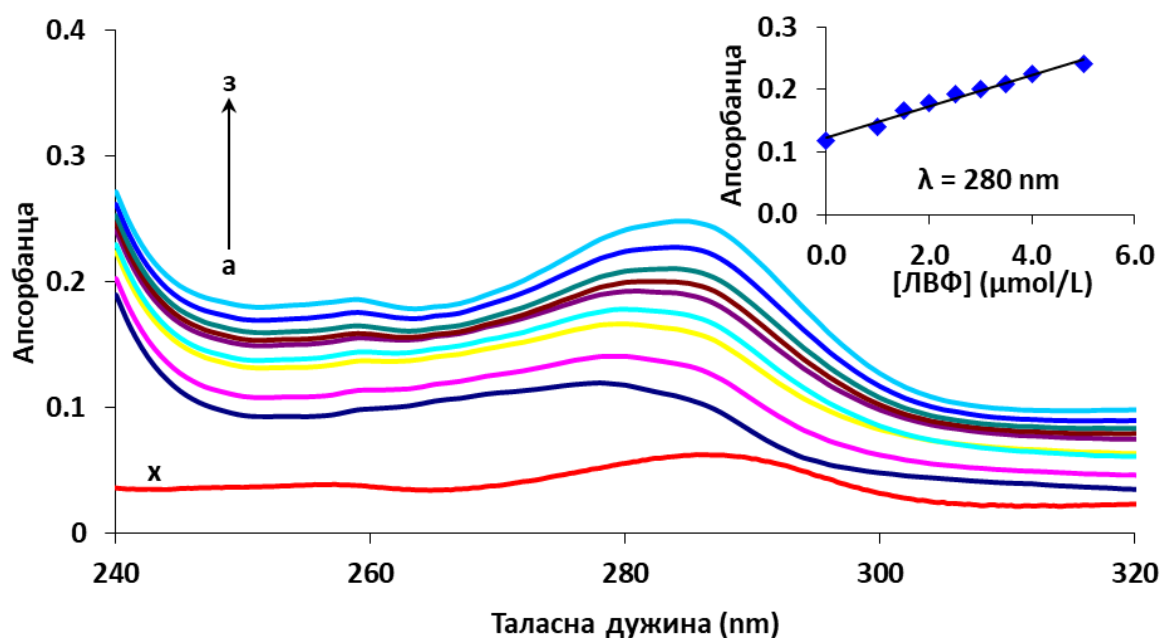
Слика 53. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација СПФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{СПФ}]$ ($a-j$): (0; 1,1; 1,65; 2,2; 2,75; 3,3; 4,4; 5,5; 6,6; 8,8; 11,0) $\mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ СПФ.



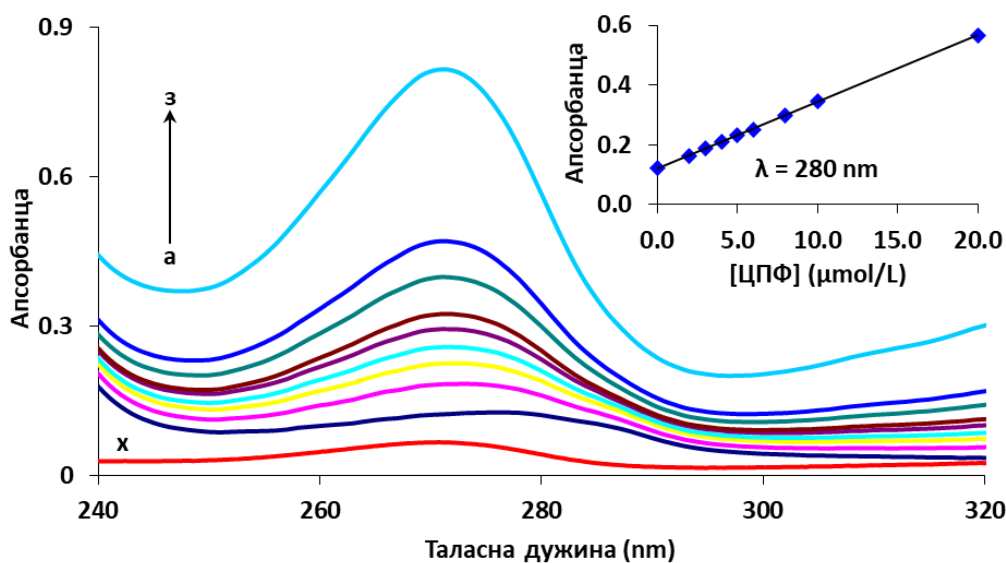
Слика 54. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ЛВФ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЛВФ}]$ ($a-z$): (0; 1,16; 2,34; 3,52; 4,68; 5,86; 7,03; 8,2; 9,38) $\mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ЛВФ.



Слика 55. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација СПФ и фиксне концентрације ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{СПФ}]$ ($a-j$): (0; 1,1; 1,65; 2,2; 2,75; 3,3; 4,4; 5,5; 6,6; 8,8; 11,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ СПФ.

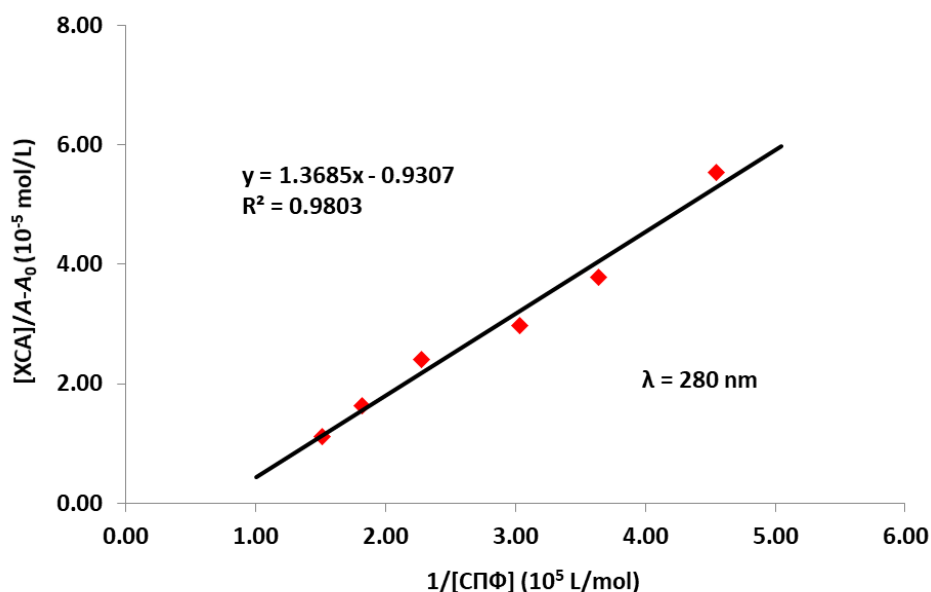


Слика 56. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ЛВФ и фиксне концентрације ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЛВФ}]$ ($a-z$): (0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ЛВФ.

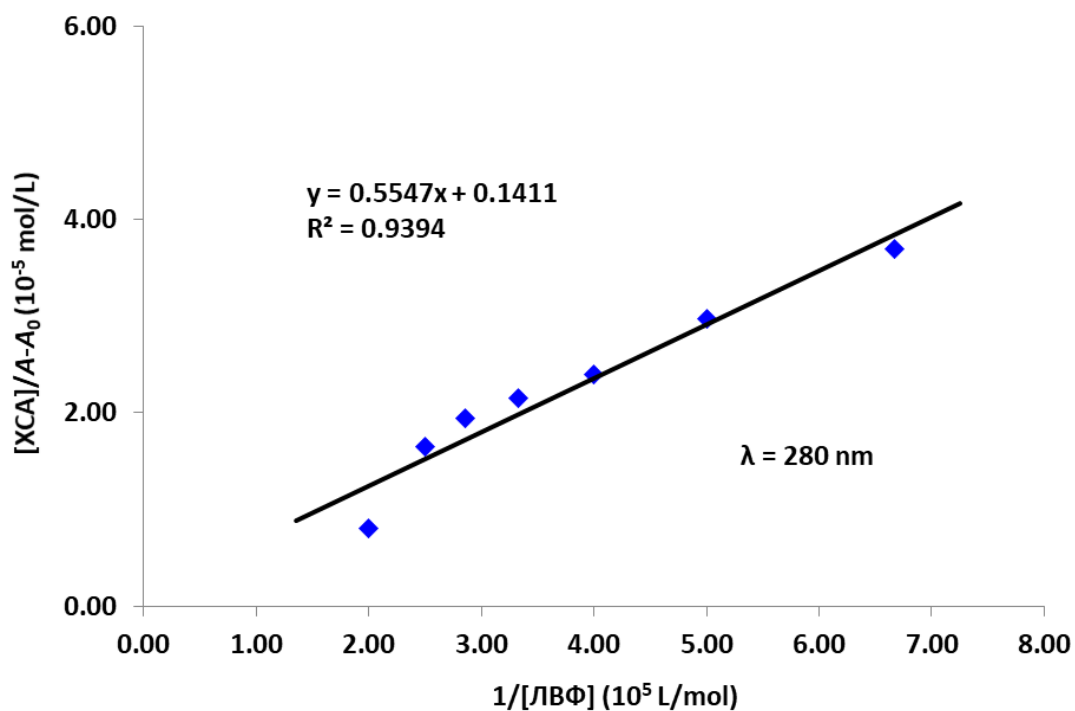


Слика 57. Апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ЦПФ и фиксне концентрације ТГЦ ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$). $[\text{ХСА}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $[\text{ЦПФ}]$ ($a-z$): (0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 20,0) $\mu\text{mol/L}$; $[\text{ТГЦ}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$. x представља апсорпциони спектар само 2,0 $\mu\text{mol/L}$ ЦПФ.

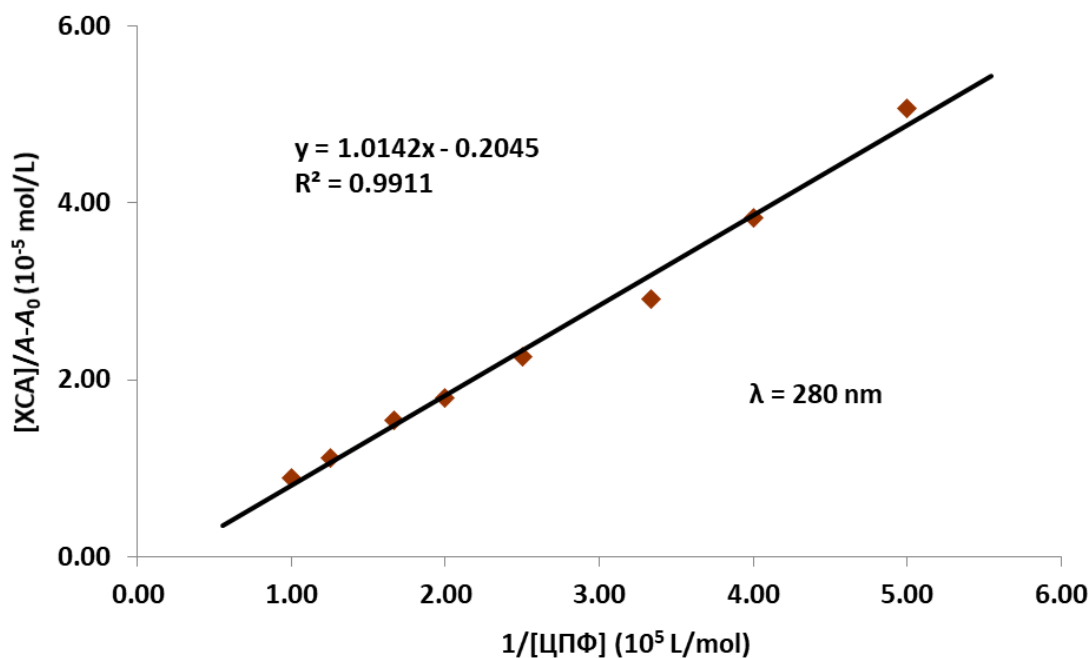
На Сликама 58, 59 и 60 су дати Бенеси–Хилдебрандови графици ХСА у присуству различитих концентрација флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) и фиксне концентрације ТГЦ, добијени на λ_{max} ХСА. Коefицијенти корелације указују на добар линеаран однос.



Слика 58. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација СПФ и фиксне концентрације ТГЦ у фосфатном пуферу ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$).



Слика 59. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ЛВФ и фиксне концентрације ТГЦ у фосфатном пуферу ($T = 298$ К; рН 7,4).



Слика 60. Бенеси–Хилдебрандов график ХСА у присуству различитих концентрација ЦПФ и фиксне концентрације ТГЦ у фосфатном пуферу ($T = 298$ К; рН 7,4).

5. ДИСКУСИЈА

Један од најважнијих феномена у биофизичким истраживањима је интеракција малих молекула (као што су лекови) са биолошким макромолекулима који поседују специфична везујућа места на својој површини [199]. Серумски албумини врло често повећавају очигледну растворљивост хидрофобних лекова у плазми и модулирају њихову испоруку ка ћелијама *in vivo* и *in vitro*. За албумине и друге компоненте серума се реверзибилно везују бројни лекови и биолошки активни мали молекули, при чему имају функцију транспортера. Хумани серумски албумин (ХСА), најраспрострањенији протеин крвне плазме, игра доминантну улогу у контроли дистрибуције, излучивања, терапијске ефикасности и токсичности лекова у организму [196]. Опште је прихваћено да степен афинитета између ХСА и лека може утицати на дистрибуцију и елиминацију лека, а последично и на његове терапијске или токсичне ефекте, биотрансформацију и биодистрибуцију, итд. Снажно везивање лека за ХСА може смањити његову слободну концентрацију у плазми која је одговорна за фармаколошку ефикасност, док слабо везивање може довести до кратког времена полуетиминације или слабе дистрибуције лека у организму [82].

Углавном, албумин-лек интеракција је динамичан и реверзибилан процес, а дисоцијација везаних молекула лека из албумин-лек комплекса се дешава веома брзо, вероватно у року од неколико милисекунди или у краћем временском периоду [199]. Поред тога, постоје докази о конформационим променама серумског албумина које су проузроковане његовим интеракцијама са бројним лековима, при чему ове промене могу утицати на секундарну и терцијарну структуру протеина [82]. Раније схватање да серумски албумини везују различите лиганде неспецифично је потпуно одбачено. Анализе кристалне структуре ХСА су доказале да се ароматични и хетероциклични лиганди везују унутар две хидрофобне шупљине у субдомену ПА и ПИА, које су познате као место I и II [42, 43]. Већина лекова који се користе код људи се везује високим афинитетом за ова два специфична везујућа места, са константама везивања у опсегу 10^4 - 10^6 L/mol [198]. У овом истраживању, ХСА је изабран као модел протеина због релативно ниске цене, сталне доступности на тржишту, лаког чувања и једноставне употребе, добрих особина за везивање лиганада и важне особине тигециклина (ТГЦ) да се у високом проценту везује за протеине плазме [100].

Током последњих неколико деценија, објављени су многобројни радови који су испитивали интеракције ХСА са широким спектром лекова [42-77]. Интеракције ХСА са скоро свим тетрациклинима су објављене у литератури [82-85, 162-164]. Интеракције ХСА са ТГЦ до сада нису потпуно испитане и нема објављених радова.

При титрацији серумских албумина са растворима лигананда (малих молекула), интензитет флуоресценције се смањује због различитих молекулских интеракција, у које спадају реакције у побуђеном стању, молекулска прераспоређивања, трансфер енергије, формирање комплекса у основном стању и колизионо гашење; при чему је такво смањење интензитета флуоресценције познато као гашење флуоресценције [199].

Флуоресцентна спектроскопија може пружити важне информације о везивању малих молекула за протеин, као што су механизам везивања, начин везивања, константе везивања, везујућа места и интермолекулско растојање. Гашење флуоресценције може настати помоћу различитих механизма, која се најчешће класификују као статичко и динамичко гашење. Динамичко гашење настаје као последица судара (колизије) између флуорофоре и квенчера, а статичко гашење као резултат формирања комплекса у основном стању између флуорофоре и квенчера [91]. Ови механизми гашења се могу издвојити на основу њихове различите зависности од температуре и вискозности. За динамичке константе гашења се очекује повећање вредности са порастом температуре, али пораст температуре често доводи до смањења стабилности комплекса, које смањује статичке констате гашења [131].

Флуоресцентни спектри остатака Trp, Phe и Tyr су различити јер поседују различите хромофоре, а реослед којим утичу на повећање интензитета флуоресценције изгледа: Trp>Tyr>>Phe. Према томе, остаци Trp и Tyr који су присутни у серумском албумину, могу деловати као најважније унутрашње (интринзичке) флуоресцентне пробе. Уколико лек, као мали молекул, може да угаси флуоресценцију на остатку Trp, онда остаци Trp морају бити смештени унутар или у непосредној близини везујућег места испитиваног лека. На основу бројних радова, можемо закључити да су остаци Trp214 главне мете за лекове у ХСА, док су остаци Trp134 и Trp214 најважније мете у ГСА [199]. При екситацији на 295 nm (која је коришћена у свим нашим *in vitro* експериментима), унутрашња флуоресценција ХСА углавном потиче само од остатака Trp [24], јер Phe има веома мали квантни принос, а флуоресценција Tyr је скоро потпуно угашена [87].

Унутрашња флуоресценција ХСА је веома осетљива на своју микроколину и биће угашена чак и ако постоји мала промена у локалном окружењу ХСА, као што су биомолекулско везивање, конформациона промена и денатурација протеина. Постепено смањивање интензитета флуоресценције ХСА са повећањем концентрације ТГЦ на температурама 298, 303 и 308 K, указује да ТГЦ може да интерагује са ХСА. На основу благог црвеног померања λ_{\max} од око 2 nm, можемо закључити да се флуорофора

протеина поставила у хидрофобнијем окружењу након додавања раствора ТГЦ. Ово је вероватно настало услед губитка компактне структуре хидрофобног субдомена ПА где је смештен Тгр [170]. Присуство црвеног или плавог померања λ_{\max} показује да је дошло до смањења или повећања хидрофобности микрооколине везујућег региона лека. Ови експериментални подаци указују да ТГЦ може да интерагује са ХСА, уз гашење његове унутрашње флуоресценције [196].

У овом раду, Стерн–Волмеров график гашења флуоресценције на различитим температурама је показао линеарну зависност у оквиру испитиваних концентрација (видети Слику 11). Познато је да ће график зависности F_0/F од $[Q]$ (Стерн–Волмеров график) бити линеаран уколико је тип гашења флуоресценције само један, статички или динамички [200], а уколико је тип гашења флуоресценције комбинован (статички и динамички) Стерн–Волмеров график ће имати узлазну закривљеност (нагоре) [201]. Међутим, линеаран график сам по себи није довољан да би се дефинисао тип флуоресцентног гашења. На основу литературе [202, 203], за динамичко гашење, максимално расипање колизионе константе гашења ($K_{q,\max}$) различитих квенчера са биополимерима износи $2,0 \times 10^{10}$ L/mol·s. Ако је $K_q > K_{q,\max}$, гашење флуоресценције сигурно не произилази из динамичког гашења. Поред тога, као што је горе наведено, динамичко и статичко гашење се могу издвојити на основу различите зависности гашења флуоресценције од температуре. По правилу, вредности K_{SV} се смањују са порастом температуре за статичко гашење, а обрнут ефекат ће бити присутан за динамичко гашење [204]. Као што се може видети из Табеле 5, вредности K_q су биле реда 10^{12} L/mol·s, што је много веће од $2,0 \times 10^{10}$ L/mol·s, а вредности K_{SV} су опадале са порастом температуре, што указује да је гашење флуоресценције резултат формирања ХСА-ТГЦ комплекса. Сходно томе, ови резултати показују да је механизам гашења статички процес.

Важна додатна спектроскопска метода за разликовање статичког и динамичког гашења је пажљиво испитивање UV апсорпционих спектра флуорофоре. Колизионо гашење утиче само на побуђена стања флуорофоре и на основу тога се не очекују промене у апсорпционим спектрима. Насупрот томе, формирање комплекса у основном стању врло често доводи до пертурбација у апсорпционим спектрима флуорофоре [82]. На Слици 17 су приказани UV апсорпциони спектри ХСА у присуству различитих концентрација ТГЦ. Апсорпциони спектар ХСА има два апсорпциона максимума, јак апсорпциони максимум на око 233 nm који одражава оквирну конформацију протеина и слаб апсорпциони максимум на око 278 nm који потиче од ароматичних аминокиселина

(Trp, Phe и Tyr) [186, 187]. Са додавањем ТГЦ раствору ХСА, интензитети наведених апсорпционих максимума на 233 nm и 278 nm су постепено расли. Ово прогресивно повећање апсорбанце са повећањем концентрације ТГЦ, сугерише да је дошло до формирања новог ХСА-ТГЦ комплекса. Од раније је познато да пептидна веза има делимичан карактер двоструке везе, при чему ово везивање ТГЦ за ХСА може да спречи ротацију око пептидне везе и да изазове промене у конформацији протеина. Ово такође указује да се пептидни ланци молекула протеина могу додатно продужити након везивања ТГЦ за ХСА и довести до промене поларности око остатака Trp, а самим тим и промене хидрофобности [199]. Резултати UV апсорпционе спектроскопије су такође потврдили да је највероватнији механизам гашења флуоресценције ХСА помоћу ТГЦ статички процес.

Резултати апсорпционе спектроскопије ХСА-ТГЦ система (видети Слику 17) су такође коришћени за израчунавање стехиометријског односа и константе стабилности (K_s), која се у многим радовима често означава и разматра као константа везивања или константа асоцијације [192, 193]. На Слици 18 је приказан Бенеси–Хилдебрандов график зависности $[ХСА]/A-A_0$ од $1/[ТГЦ]$. Раније студије су доказале да Бенеси–Хилдебрандов график има линеаран однос за стехиометрију 1:1 [189, 192, 193]. Као што се може видети, добар линеаран однос је добијен из овог графика, са коефицијентом корелације од 0,9817. Овакав резултат јасно указује да у новом комплексу формираном између ХСА и ТГЦ стехиометријски однос износи приближно 1:1. Вредност K_s ХСА-ТГЦ система, добијена из пресека и нагиба графика зависности $[ХСА]/A-A_0$ од $1/[ТГЦ]$, износи $1,6 \times 10^4$ L/mol.

На основу измерених флуоресцентних података на различитим температурама, добијен је график зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log[Q]$ и приказан на Слици 12. Из овог графика су добијене вредности K_a и n и приказане у Табели 5. Вредности K_a су веома значајне за разумевање дистрибуције лека у плазми будући да слабо везивање може довести до кратког животног века или слабе дистрибуције, док јако везивање може смањити концентрацију слободног лека у плазми. Табела 5 показује да вредности K_a расту прогресивно са повећањем температуре, што указује да је реакција везивања ТГЦ за ХСА била ендотермна [172].

На испитиваним температурама, n износи отприлике 1, што показује да ХСА и ТГЦ формирају комплексе у молском односу приближно 1:1. Поред тога, пораст температуре је довео до повећања способности (капацитета) везивања (n) ХСА за ТГЦ и добијене су вредности 0,9; 1,2 и 1,4 на 298, 303 и 308 K. Добијени коефицијенти

корелације су већи од 0,99; што јасно показује да су претпоставке које су довеле до извођења једначине (12) задовољавајуће. На основу вредности K_a , можемо закључити да постоји јака везујућа сила између ХСА и ТГЦ, што значи да ТГЦ може бити чврсто складиштен и транспортован помоћу ХСА у телу [173].

Везивање ТГЦ за ХСА смо испитивали на три различите температуре (298, 303 и 308 К). Са порастом температуре за 5 К, дошло је до повећања реда константе везивања (K_a) ХСА-ТГЦ система и добијене су вредности $1,8 \times 10^4$; $4,0 \times 10^5$ и $4,5 \times 10^6$ L/mol на 298, 303 и 308 К. Ови резултати указују да је ХСА-ТГЦ систем веома термо сензитиван. Другим речима, чак и мала промена температуре може довести до значајних промена вредности K_a . Важно је нагласити да ХСА-ТГЦ комплекс има највише експерименталне вредности K_a и n , а самим тим и највећу стабилност, на температури која је најближа физиолошкој температури тела (308 К). Значајно повећање константе везивања ТГЦ може бити узроковано проширењем (експанзијом) везујућег места у албумину, које се може прилагодити и након тога омогућити прихватање већег броја молекула ТГЦ. Ово проширење везујућег места може да обезбеди веће хидрофобно подручје за везивање ТГЦ, што доводи до повећања вредности K_a [205].

Као што је приказано у Табели 6, ТГЦ има најнижи афинитет везивања за албумин ($1,8 \times 10^4$ L/mol), затим следе вредности K_a од $4,7 \times 10^4$; $4,94 \times 10^4$; $2,73 \times 10^5$; $7,76 \times 10^5$; $8,00 \times 10^5$ и $3,20 \times 10^6$ L/mol за МТЦ, ТЦ, ДКСТЦ, ДМКТЦ, ХТЦ и ОТЦ. На сличан начин су добијене вредности капацитета везивања (n) серумског албумина за ТГЦ, МТЦ, ТЦ, ДКСТЦ, ДМКТЦ, ХТЦ и ОТЦ, које износе редом 0,9; 0,7; 1,0; 1,1; 1,2; 2,9 и 2,1 [82, 84, 162-164, 174, 175]. Као што се може видети, добијени су различити параметри везивања (K_a и n) у оквиру исте групе антибиотика, а највероватнији узрок су разлике у молекулској структури лекова. Веома често, чак и мала промена у структури лека може значајно утицати на његове параметаре везивања за серумске албумине; што је свакодневна појава у поступцима дизајнирања и синтезе нових лекова.

С обзиром на зависност константе везивања од температуре, термодинамички процес је разматран као одговоран за ову интеракцију. Термодинамички параметри зависни од температуре (ΔH^0 , ΔS^0 и ΔG^0) су анализирани у циљу одређивања природе везујућих сила између ХСА и ТГЦ [197]. Вредности термодинамичких параметара на 298, 303 и 308 К су дате у Табели 7. Негативан знак вредности ΔG^0 је подржао тврдњу да су сви процеси везивања ТГЦ за ХСА спонтани. Позитивне вредности ΔH^0 и ΔS^0 , 423,2 kJ/mol и 1502,3 J/mol·K, указују да типичне хидрофобне интеракције играју главну улогу у реакцији везивања и доприносе стабилности ХСА-ТГЦ комплекса [176].

На основу структуре ТГЦ (видети Сliku 5), можемо претпоставити да се ароматични угљоводоници могу лако интегрисати у хидрофобни цеп ХСА. На тај начин, неполарне хидрофобне групе серумског албумина могу представљати најважнији ефекат који одређује везивање ТГЦ за ХСА. Ови подаци, заједно са израчунатим бројем везујућих места (n), сугеришу да је примарно везујуће место за ТГЦ на остатку Т_{gr}214, смештено унутар хидрофобног цепа ХСА [173, 205].

На Слици 14 је приказано преклапање флуоресцентног емисионог спектра донора (ХСА) и UV апсорпционог спектра акцептора (ТГЦ). На основу Форстерове теорије резонантног енергетског трансфера (ФРЕТ) [180, 181], трансфер енергије ће се десити под условима да донор може да произведе флуоресцентну светлост, да флуоресцентни емисиони спектар донора и UV апсорпциони спектар акцептора имају веће преклапање и да растојање између флуорофоре донора и флуорофоре акцептора буде мање од 8 nm. Као што се може видети (Слика 14), постоји значајно преклапање наведених спектара. Комбинујући податке са претходним једначинама (15–17), добили смо $J = 1,15 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$, $E = 0,098$, $R_0 = 2,51 \text{ nm}$ и $r = 3,63 \text{ nm}$. Очигледно, растојање везивања (r) између ТГЦ и остатка Т_{gr} у ХСА износи 3,63 nm, при чему је r мање од 8 nm (у опсегу 2-8 nm) и $0,5R_0 < r < 1,5R_0$. Ови резултати сугеришу да је присутан статички механизам флуоресцентног гашења и да постоји велика вероватноћа да ће се трансфер енергије са ХСА на ТГЦ десити [184, 185].

Као што је претходно наведено, истовремена примена два или више лека у терапији може довести до значајних лек-лек интеракција на нивоу везивања за серумске албумине, које могу изазвати значајне промене њихове фармаколошке и токсиколошке активности. Смањено везивање лека у присуству компетитивног лека може настати као последица немогућности лека да истисне компетитивни лек са његових везујућих места на албумину. Другим речима, специфична везујућа места за лек на молекулу протеина су већ окупирана од стране компетитивног лека, а матични лек није у стању да истисне компетитивни лек и долази до његовог смањеног везивања у присуству компетитивног лека (компетитивна интерференција). Практично, никаква промена афинитета везивања показује да се два лека независно везују на различитим местима у молекулу ХСА и не долази до било каквих конформационих промена (независно везивање). Истовремено везивање два лека такође може изазвати структурне промене молекула албумина (некомпетитивна интерференција) и довести до стварања већег броја везујућих места или повећања доступности већ постојећих везујућих места, што резултира повећањем степена везивања матичног лека [195, 196].

Промене које настају након везивања лекова за ХСА могу довести до промена фармакокинетичких особина ових лекова. Овај ризик је посебно релевантан ако два или више лекова конкуришу за исто везујуће место високог афинитета у ХСА. Међутим, у одређеним случајевима повећање концентрације невезаног лека је много мање него што се очекивало, јер велики део истиснутог лека се одбија и поново везује на другом месту. На пример, велики део карпрофена који је компетитивно истиснут са места II помоћу ибупрофена се одбија на место I; квантитативно, ефекат је стереоспецифичан. Такво истискивање са места II на место I је такође примећено за диклофенак у присуству ибупрофена [11].

Опште уверење да лек са вишом константом везивања поседује способност истискивања лека са нижом константом везивања је одбачено. Поред тога, степен истискивања лека се не може увек директно предвидети узимајући у обзир само одговарајуће константе везивања лека и једињења које се истискује. Изгледа да осим афинитета везивања лекова и други фактори могу бити укључени. Место специфичног везивања матичног и компетитивног лека у албумину може бити важан фактор у објашњењу механизма компетитивног везивања [195].

Доказано је да постоје два високо афинитетна везујућа места у ХСА, познатија као место I и II, за која се везује највећи број лекова [42, 43]. Претходно смо детаљно описали њихове карактеристике и нагласили да ова везујућа места имају високу специфичност за лекове. По аналогији, ова специфичност се може посматрати као везивање лека за рецептор. С обзиром да се за место I највишим афинитетом везује варфарин (ВФ), у литератури се ово место често назива варфарин везујуће место. Из истог разлога, место II носи назив ибупрофен (ИП) везујуће место. У бројним радовима [82, 86, 188, 196, 197, 206], управо су ВФ и ИП најчешће коришћени маркери везујућих места. Важне информације у вези доминантног везујућег места за ТГЦ у ХСА смо добили праћењем промна емисионих (Слике 19 и 20) и апсорпционих (Слике 22 и 23) спектра ХСА-ТГЦ система након додавања маркера везујућих места I и II (ВФ и ИП), под истим експерименталним условима ($T = 298 \text{ K}$; $\text{pH } 7,4$).

У Табели 8 су приказане вредности параметара везивања (K_a , n и K_S) ХСА-ТГЦ, ХСА-ТГЦ-ВФ и ХСА-ТГЦ-ИП система. Као што се може видети, вредност K_a је смањена за 59,5% у присуству ВФ (са $1,8 \times 10^4 \text{ L/mol}$ на $7,3 \times 10^3 \text{ L/mol}$), док је приближно 3,5 пута повећана у присуству ИП (са $1,8 \times 10^4 \text{ L/mol}$ на $6,6 \times 10^4 \text{ L/mol}$). Вредности K_S добијене на основу апсорпционе спектроскопије показују идентичан тренд и блиске вредности K_a . Ови резултати показују да ТГЦ и ВФ деле заједничко

везујуће место у ХСА и да се у случају њиховог истовременог присуства у раствору албумина јавља компетитивна интерференција. Међутим, ИП је индуковао значајно повећање афинитета и јаче везивање ТГЦ за ХСА (некомпетитивна интерференција). ВФ (маркер везујућег места I) је показао значајно истискивање (померање) претходно везаног ТГЦ са ХСА, што сугерише да је примарно везујуће место за ТГЦ Судлово место I смештено у хидрофобној шупљини субдомена IIА. Међутим, поред примарног није искључено постојање и секундарних везујућих места за ТГЦ у ХСА.

За проверу резултата флуоресцентне и апсорпционе спектроскопије спроведен је молекулски докинг ТГЦ са ХСА. Ова компјутерска метода је коришћена за коначно потврђивање доминантног везујућег места за ТГЦ у ХСА и најважнијих ХСА-ТГЦ интеракција. Након флексибилног и крутог докинга (ХСА је одржаван крутим током докинг процеса), ТИР се везао за 1ХК1 са веома добрим RMS вредностима: 0,67 и 0,73 за флексибилан и крути докинг (видети Слику 26).

Подаци добијени помоћу AutoDock анализе су дали десет различитих докинг резултата за ТГЦ. Најбољи резултат је преузет за даље анализе, због његовог највишег афинитета везивања (слободна енергија везивања $\Delta G = -24,35$ kJ/mol са одговарајућом константом инхибиције $K_i = 54,46$ $\mu\text{mol/L}$, $T = 298,15$ K за место I и $\Delta G = -14,60$ kJ/mol са одговарајућом константом инхибиције $K_i = 274,6$ $\mu\text{mol/L}$, $T = 298,15$ K за место II). Сходно томе, место I је изабрано јер за 10 kJ/mol чвршће везује ТГЦ од места II.

На Слици 27 су приказани сви субдомени ХСА означени различитим бојама, при чему се може јасно уочити да се ТГЦ везао за место I у субдомену IIА ХСА. Слика 28 представља увеличану слику места везивања ТГЦ за ХСА, на којој се могу видети најважнији остаци који учествују у интеракцији. У Табели 8 су приказани различити остаци ХСА који губе преко 10 \AA^2 доступне површине (ASA) након везивања са ТГЦ. Остатак се сматрао укљученим у везивање ако је изгубио више од 10 \AA^2 .

На основу енергетског профила ХСА-ТГЦ интеракција (видети Табелу 9) се може једноставно закључити да је језгро лиганда (ТГЦ) у оквиру протеина (ХСА) усидрено у везујућем месту помоћу ван дер Валсових сила, водоничних веза и катјон- π електростатичких интеракција.

Главни остаци формирају фармакофоре (у случају ТГЦ су приказане на Слици 29), што указујује да главна веза између молекула настаје због водоничних и поларних контаката. Четири водоник-акцепторска атома кисеоника ТГЦ: O24, O32, O33 и O27, формирају четири водоничне везе са Arg222 (3,9 \AA је укупна дужина везе акцептор-Н-донор), Lys199 (4,9 \AA), Trp214 (4,4 \AA) и Ser202 (4,4 \AA). Амидни N19H51 и хидроксилни

O39H75 атоми водоника ТГЦ делују као донори који граде водоничне везе са Ala291 (3,9 Å) и Lys195 (4,2 Å). На основу рецептор-лиганд анализе је нађена арен-катјон интеракција између ароматичног језгра ТГЦ и –NH₂ група Arg218 и Arg222. Посебно, неколико аминокиселинских остатака (видети Слику 30) око хидрофобног региона ХСА молекула интерагује са ТГЦ преко хидрофобних интеракција.

Пронађено је неколико студија ХСА и ГСА које су показале слично понашање потенцијалних лиганда (лекова) као што је тетрациклин [162, 207], тироксин [165] или флавоноид еупаторин [208].

Како бисмо упоредили, помоћу флексибилног докинга смо одређивали промену слободне енергије (ΔG) ТГЦ, ТЦ и ТИР за оба везујућа места ХСА, место I и II. Резултати су приказани у Табели 10. Према подацима који су овде приказани, место I има предност над местом II у сва три случаја, што значи да место I представља бар најповлашћенију (најпопуларнију) локацију за везивање сва три лиганда. Ови резултати указују да сва три лиганда имају приближно исти положај везивања и да место I у субдомену IIА ХСА представља доминантно (фаворизовано) везујуће место за ТГЦ. На крају, још једном ћемо поновити да су за релативно јако везивање између ТГЦ лиганда и ХСА рецептора одговорне водоничне везе, други поларни контакти и хидрофобне интеракције.

У нашем раду смо испитивали утицај неких јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) из соли (CaCl_2 , CuCl_2 и FeCl_3) на параметре везивања ХСА-ТГЦ система на 298 К. Концентрације испитиваних јона метала и ХСА су држане у односу 1:1 (2,0 $\mu\text{mol/L}$), а концентрација ТГЦ је варирана у раније дефинисаном опсегу. Примећено је да ТГЦ такође гаси унутрашњу флуоресценцију ХСА у присуству Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} . Резултати флуоресцентне спектроскопије су приказани у Табели 11. У присуству наведених јона метала, вредности K_q ХСА-ТГЦ система су далеко веће од максималног расипања колизионе константе гашења ($2,0 \times 10^{10} \text{ L/mol}\cdot\text{s}$), што указује да је гашење иницирано формирањем комплекса и одговара статичком механизму флуоресцентног гашења (видети Табелу 11). На основу тога, у сва три случаја интеракције се могу тумачити статичком константом везивања (K_a). Такође, UV апсорпциони спектри су показали да у сва три случаја долази до стварања нових ХСА-јон метала и ХСА-ТГЦ-јон метала комплекса (видети Слике 33 и 34), што указује на присуство статичког процеса гашења флуоресценције. Ови резултати сугеришу да Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} могу појединачно да интерагују са ХСА, али и са раствором у коме коегзистирају ХСА и ТГЦ.

У сличној студији је испитиван утицај неких јона метала (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+}) на везивање тетрациклина (тетрациклин хидрохлорида (ТТС), хлортетрациклин хидрохлорида (СТС) и окситетрацилина (ОТС)) за ХСА и ГСА. UV апсорпциони спектри ових тетрациклина у присуству Zn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} су показали да не постоје интеракције између лекова и три јона метала, али су уочене интеракције између јона метала и серумских албумина. Ово имплицира да постоји конкуренција између сваког тетрациклина и Zn^{2+} или Mg^{2+} или Ca^{2+} када су истовремено присутни у раствору серумских албумина. Међутим, на основу UV апсорпционих спектра је уочено да постоји реакција између ТТС и Cu^{2+} . Када је Cu^{2+} додат раствору овог лека, у UV апсорпционом спектру ТТС је дошло до промене у апсорпцији и значајног црвеног померања апсорпционог максимума за око 18 nm. Ово указује да се Cu^{2+} везао за ТТС и формирао нови ТТС- Cu^{2+} комплекс. Поред тога, након додавања Cu^{2+} оба апсорпциона максимума ХСА-ТТС система су имала црвено померање. Из ових података, можемо закључити да у систему у коме коегзистирају ХСА, ТТС и Cu^{2+} , Cu^{2+} може да реагује са ТТС и формира ТТС- Cu^{2+} комплекс, а затим ТТС- Cu^{2+} интерагује са ХСА и формира нови ХСА-ТТС- Cu^{2+} комплекс. Дакле, ефекат Cu^{2+} на константу везивања ХСА-ТТС система се разликује од ефеката Zn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} . Исте процедуре су спроведене за системе у којима коегзистирају ГСА, ТТС и Cu^{2+} , при чему су добијени слични резултати. Разлози због којих је дошло до повећања вредности константе везивања ХСА-ТТС система у присуству Cu^{2+} од оних у одсуству Cu^{2+} су исти и за друга два испитивана тетрациклина (СТС и ОТС) [83].

На основу добијених флуоресцентних података, сваки јон метала појединачно је у различитом степену довео до повећања константе везивања (K_a) ХСА-ТГЦ система ($Fe^{3+} > Cu^{2+} > Ca^{2+}$). Такође, у присуству Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} је дошло до повећања броја везујућих места (n) на 1,00; 1,04 и 1,09 у односу на њихово одсуство 0,91. У неколико радова је описана конкуритивна интерференција [82, 86, 175, 188, 206, 209], где је у присуству различитих јона метала дошло до смањења вредности K_a албумин-лек система. У наведеним случајевима постоји конкуренција између испитиваних лекова и јона метала за иста везујућа места на серумском албумину. Међутим, у нашим случајевима је присутна неконкуритивна интерференција [79, 83, 86, 188, 205]. Иако се јони метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) и ТГЦ вероватно везују на различитим местима у ХСА, они и поред тога могу утицати на везујућу реакцију између ТГЦ и ХСА [62, 63].

Више вредности K_a указују да су сва три јона метала појединачно индуковала повећање афинитета ТГЦ за ХСА и довела до њиховог јачег међусобног везивања

(видети Табелу 11). Због тога, ТГЦ може бити боље складиштен и транспортован помоћу ХСА у присуству Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} . Ово јаче везивање може продужити период складиштења ТГЦ у крвној плазми и променити његов максимални ефекат [9]. Степен везивања лека за серумске албумине може утицати на стопу клиренса метаболита и на њихову испоруку рецепторима у ћелијама и ткивима. На основу конвенционалног концепта, ћелијско преузимање је пропорционално невезаној фракцији лека. Према овој хипотези [78], дистрибуција ТГЦ у телу је пропорционална концентрацији невезаног ТГЦ у плазми. Ако се лек у високом степену везује за серумске албумине, фракција невезаног лека који може деловати у циљним ткивима може бити значајно смањена, што последично може довести до смањења његовог ефекта. Резултати су потврдили да у присуству јона метала долази до значајног повећања афинитета ТГЦ за ХСА, што може смањити концентрацију невезаног ТГЦ и редуковати његов фармаколошки ефекат [77]. У оваквим околностима, за постизање жељеног терапијског ефекта, дозу лека треба поново прилагодити. Теоретски, уколико се овакав лек прекомерно узима, формирање ХСА-лек-јон метала комплекса може имати улогу у детоксикацији серума од јона метала због виших вредности K_a ХСА-лек-јон метала од ХСА-лек комплекса. Међутим, ове интеракције треба испитати *in vivo* како би се проценио њихов могући значај у пракси. Више константе везивања су највероватније последица два аспекта: долази до формирања ТГЦ-јон метала комплекса преко моста јона метала, који даље интерагује са протеином, или јони метала индукују конформационе промене ХСА или ТГЦ, који се након тога лакше међусобно везују. На основу виших вредности K_a је очигледно да у нашим случајевима нема директне конкуренције између јона метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) и ТГЦ на нивоу везивања за ХСА јер се њихова везујућа места вероватно не налазе у истом домену ХСА [173].

У клиничкој пракси је понекад оправдана примена комбинација антибиотика. Индикације за примену одговарајуће комбинације антибиотика су: лечење мешовитих бактеријских инфекција, појачање антибактеријског дејства на одређеног узрочника, превенција појаве резистенције код узрочника и лечење тешких инфекција код којих узрочник није познат. Поред добрих страна, примена комбинација антибиотика може имати и своје лоше стране [4], као што су њихове међусобне интеракције, посебно оне које доводе до значајних промена фармаколошке и токсиколошке активности лекова. Последњих година се јавља све већа примена комбинација антибиотика у болничким условима, што је директна последица пораста резистенције микроорганизама на већину познатих антибиотика. У великом броју болница, инфекције које изазивају метицилин

резистентни сојеви *Staphylococcus aureus* и други мултирезистентни сојеви су постале озбиљан проблем [2]. Постоје радови са клинички релевантним лек-лек интеракцијама флуорохинолона са β -лактамским антибиотицима, нестероидним антиинфламаторним лековима, метронидазолом, кофеином и неким оралним хипогликемицима [210, 211]. Добро је познато да се лек-лек интеракције могу јавити на било ком месту у организму, на нивоу фармакокинетице (апсорпција, дистрибуција, метаболизам и елиминација) или фармакодинамике.

Према нашим досадашњим сазнањима, истраживање компетитције тигециклина и флуорохинолона на нивоу везивања за серумске албумине (на нивоу дистрибуције) до сада није спроведено и публиковано. Под идентичним експерименталним условима смо спровели истраживање како бисмо проценили утицај флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) на параметре везивања ХСА-ТГЦ система на 298 К. У сва три случаја одвојено: ХСА-ТГЦ-СПФ, ХСА-ТГЦ-ЛВФ и ХСА-ТГЦ-ЦПФ, интензитет флуоресценције ХСА се постепено смањивао са повећањем концентрације ТГЦ, док је концентрација сваког флуорохинолона била фиксна. На Сликама 35, 36 и 37 се може видети благо црвено померање емисионих максимума (λ_{\max}), док је облик пикова остао готово непромењен. Флуоресцентни подаци јасно указују да ТГЦ може да интерагује са ХСА у присуству флуорохинолона, при чему долази до гашења унутрашње флуоресценције и до промена хидрофобности везујућег региона у ХСА [170, 197].

Као што се може видети у Табели 13, у присуству СПФ и ЦПФ вредности K_a и K_S ХСА-ТГЦ система су вишеструко повећане, што указује да је настало јаче везивање ТГЦ за ХСА, при чему формиран ХСА-ТГЦ-СПФ и ХСА-ТГЦ-ЦПФ системи имају већу стабилност у односу на првобитни ХСА-ТГЦ систем. Примећено је значајно повећање капацитета везивања (n) ХСА-ТГЦ система за 30,8% и 29,7% у присуству СПФ и ЦПФ. Ови резултати указују да ТГЦ може бити боље складиштен и транспортован помоћу ХСА у присуству СПФ и ЦПФ. Међутим, у присуству ЛВФ вредности K_a , n и K_S ХСА-ТГЦ система су смањене, што сугерише да је ЛВФ довео до смањења афинитета везивања ТГЦ за ХСА. Формирани ХСА-ТГЦ-ЛВФ систем има мању стабилност у односу на ХСА-ТГЦ систем. На основу ових резултата се може закључити да је у случају СПФ и ЦПФ вероватно дошло конформационих промена у молекулу ХСА које су довеле до повећања вредности K_a и K_S ХСА-ТГЦ система (некомпетитивна интерференција). У присуству ЛВФ је дошло до смањења вредности K_a и K_S , што јасно указује да је дошло до компетитивне интерференције, односно ТГЦ и ЛВФ међусобно конкуришу за иста везујућа места у ХСА. У овом случају, ТГЦ и ЛВФ

највероватније имају један део везујућих места који им је заједнички, али је и то довољно да један другом смање афинитет везивања за ХСА.

Раније смо истакли да поред афинитета везивања и место специфичног везивања матичног и компетитивног лека у ХСА игра важну улогу у механизму компетитивног везивања [195]. С обзиром да смо за компетитивне лекове користили флуорохинолоне, било је неопходно дефинисати њихова везујућа места. Ове информације су послужиле за одређивање доминантног везујућег места за ТГЦ. У радовима су експериментално одређена специфична везујућа места за СПФ и ЛВФ коришћењем методе истискивања флуоресцентне пробе [196, 212]. Специфично везујуће место за ЦПФ је одређено помоћу методе истискивања маркера везујућих места [196]. Из добијених резултата су изведени закључци о специфичности СПФ, ЛВФ и ЦПФ за везујућа места у ХСА. Показано је да се СПФ везује за оба везујућа места у ХСА, место I и место II, али се примарна интеракција одвија на месту II. Другим речима, СПФ има већи афинитет за место II него за место I. Такође је могуће да се СПФ везује на споју између места I и места II. ЛВФ се везује приближно једнаким афинитетом за оба везујућа места, место I и место II. У присуству место II-специфичних компетитивних лекова, ЛВФ углавном заузима место I. ЦПФ је место II-специфичан лек. Сви наши резултати су показали да ТГЦ има већи афинитет за место I у односу на место II [173].

Пошто СПФ и ЦПФ углавном фаворизују место II, а ТГЦ место I у ХСА, не долази до компетитивне интерференције. Међутим, ови лекови остварују интеракције преко некомпетитивне интерференције. Везивање СПФ и ЦПФ за место II може индуковати конформационе промене у албумину, које чине место I (или његове делове) погоднијим за прихватање ТГЦ, што је довело до повећања реда величине K_a . У литератури су описана истискивања везаних лекова са места II на место I помоћу ЦПФ [195]. Таква истискивања са места II на место I су описана и за друге комбинације лекова [213, 214]. На структурном нивоу албумина, место I и место II деле заједнички спој (интерфејс) који је стабилизован помоћу мостова соли и хидрофобних интеракција. Показано је да место I (у субдомену IIА) може да комуницира са местом II (у субдомену IIIА) кроз интеракције на овом интерфејсу [215]. Ова слободна енергетска повезаност између два места може довести до конформационих промена у месту I, које га чине погоднијим за везивање истиснутог лека [213]. Овакво истискивање са једног на друго везујуће место у серумском албумину је описано током истовремене примене ЦПФ и АЦЕ инхибитора каптоприла [214]. Претходни резултати су показали да се ТГЦ и ЛВФ везују за место I. Стога, уколико су ова два лека истовремено присутна у

раствору ХСА, један другом ће конкурисати за место I које им је заједничко. Због тога је у случају ТГЦ и ЛВФ дошло до компетитивне интерференције и до смањења вредности K_a ХСА-ТГЦ система.

Да бисмо проверили тачност претходних резултата, експерименти су изведени и обрнутим редоследом. У овом делу рада смо испитивали утицај ТГЦ на параметре везивања сваког флуорохинолона (СПФ, ЛВФ и ЦПФ) за ХСА. Да бисмо искористили параметаре везивања ХСА-СПФ-ТГЦ, ХСА-ЛВФ-ТГЦ и ХСА-ЦПФ-ТГЦ система за процену утицаја ТГЦ, прво смо дошли до параметара везивања ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система и након тога извршили њихово поређење. Флуоресцентни емисиони спектри ХСА-СПФ и ХСА-ЛВФ система су показали постепено смањење интензитета флуоресценције са повећањем концентрације СПФ и ЛВФ (видети Сликe 45 и 46), што указује да је дошло до гашења унутрашње флуоресценције ХСА. Поред тога, примећено је померање емисионих максимума (λ_{\max}); ка нижим таласним дужинама (плаво померање) у случају СПФ и ка вишим таласним дужинама (црвено померање) у случају ЛВФ, док је облик пикова остао готово непромењен. У претходним радовима су описана идентична померања λ_{\max} за СПФ и ЛВФ [196], која сугеришу на промену хидрофобности микрооколине везујућег региона у ХСА [170, 197].

Резултати су показали да је у присуству ТГЦ дошло до смањења вредности K_a и K_s ХСА-СПФ, ХСА-ЛВФ и ХСА-ЦПФ система (видети Табелу 15). Такође, у присуству ТГЦ у сва три случаја капацитет везивања (n) се смањио. Као што смо и очекивали на основу претходног експеримента, у случају ЛВФ и ТГЦ је дошло до компетитивне интерференције. Супротно нашим очекивањима, у присуству ТГЦ параметри везивања ХСА-СПФ и ХСА-ЦПФ система су се смањили. Ово се може објаснити на једноставан начин који је већ пријављен у нашем претходном експерименту. Пре свега, СПФ и ЦПФ имају способност да везивањем за место II изазивају конформационе промене у месту I, након чега оно постаје погодније за прихватање ТГЦ, па је зато дошло до повећања вредности K_a ХСА-ТГЦ система [213, 215]. Међутим, можемо претпоставити да ТГЦ након везивања за место I не изазива или изазива одређене конформационе промене у месту II, након чега оно постаје непогодније за прихватање СПФ и ЦПФ, па је зато дошло до смањења вредности K_a ХСА-СПФ и ХСА-ЦПФ система. Овај феномен је вероватно последица молекуларске структуре лекова и везујућих места у ХСА.

6. ЗАКЉУЧАК

У овој Докторској дисертацији је испитивано везивање тигециклина за хумани серумски албумин и његове интеракције са специфичним маркерима везујућих места (варфарином и ибупрофеном), јонима метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) и флуорохинолонима (спарфлоксацином, левофлоксацином и ципрофлоксацином) које се јављају на нивоу везивања за хумани серумски албумин.

Везивање тигециклина за хумани серумски албумин је извршено на 298, 303 и 308 К. На овим температурама, вредности константе биомолекуларног гашења (K_q) су биле реда 10^{12} L/mol·s, што је много веће од $2,0 \times 10^{10}$ L/mol·s ($K_q > K_{q,\text{max}}$), а вредности Стерн–Волмерове константе гашења (K_{SV}) су опадале са порастом температуре, што по правилу одговара статичком гашењу флуоресценције. Све методе су потврдиле да је гашење флуоресценције активног центра хуманог серумског албумина тигециклином последица формирања новог ХСА-ТГЦ комплекса, што указује да је механизам гашења флуоресценције статички процес. Добијене константе везивања (K_a) ХСА-ТГЦ система износе $1,8 \times 10^4$; $4,0 \times 10^5$ и $4,5 \times 10^6$ L/mol на 298, 303 и 308 К, а број везујућих места (n) је око 1. Прогресиван раст вредности K_a са повећањем температуре сугерише да је реакција везивања била ендотермна. Сви резултати су показали да хумани серумски албумин и тигециклин формирају комплексе у молском односу приближно 1:1.

Термодинамички параметри зависни од температуре су анализирани да би се одредила природа везујућих сила између тигециклина и хуманог серумског албумина. Промена Гибсове слободне енергије (ΔG^0) је имала негативан знак, што показује да су сви процеси у реакцији везивања спонтани. Позитивне вредности промене енталпије (ΔH^0) и промене ентропије (ΔS^0), 423,2 kJ/mol и 1502,3 J/mol·K, указују да типичне хидрофобне интеракције играју најважнију улогу у реакцији везивања и доприносе стабилности ХСА-ТГЦ комплекса. Ароматични угљоводоници тигециклина се могу лако уградити у хидрофобни цеп хуманог серумског албумина, у коме доминирају неполарне хидрофобне групе, што сугерише да је примарно везујуће место тигециклина на остатку Trp214. Према Форстеровој теорији резонантног енергетског трансфера, растојање везивања између тигециклина и хуманог серумског албумина износи 3,63 nm.

Резултати компетиције тигециклина са специфичним маркерима везујућих места су показали да тигециклин и варфарин (маркер везујућег места I) деле заједничко везујуће место, а да се тигециклин и ибупрофен (маркер везујућег места II) везују на различитим везујућим местима. AutoDock анализа је показала добру сагласност са резултатима спектроскопских метода у погледу термодинамичких параметара, природе везујућих сила и идентификације везујућег места. Ове методе су показале да место I у

субдомену IIА хуманог серумског албумина представља доминантно (фаворизовано) везујуће место за тигециклин.

Сваки јон метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) је индуковао повећање афинитета и довео до јачег везивања тигециклина за хумани серумски албумин у односу на његово одсуство. Спарфлоксацин и ципрофлоксацин су повећали, а левофлоксацин је смањио афинитет тигециклина за хумани серумски албумин. Компетитивни експерименти тигециклина са флуорохинолонима су такође изведени обрнутим редоследом. Резултати су показали да тигециклин смањује афинитет спарфлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина за хумани серумски албумин. Пошто су везујућа места за спарфлоксацин, левофлоксацин и ципрофлоксацин од раније позната, ови компетитивни експерименти су послужили да би се још једном потврдило место I као доминантно везујуће место за тигециклин.

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Koshland DE. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1958; 44: 98-104.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. 5. izd. Beograd: Data status, 2005.
3. Srinivasan SK, Tewary HK, Iversen PL. Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. Antisense Res Dev. 1995; 5: 131-139.
4. Janković SM, Prostran M, Todorović Z. Farmakologija i toksikologija. 2. izd. Kragujevac i Beograd: Medicinski fakultet u Kragujevcu, 2007.
5. Mujović VM. Medicinska fiziologija. 1. izd. Beograd: A-Z Book, 2004.
6. Koch-Weser J, Sellers EM. Binding of drugs to serum albumin (two parts). N Engl J Med. 1976; 294: 311-316.
7. Varagić VM, Milošević MP. Farmakologija. 21. izd. Beograd: Elit-Medica, 2007.
8. Mallick A, Bera SC, Maiti S, Chattopadhyay N. Fluorometric investigation of interaction of 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H indolo-[2,3-a] quinolizine with bovine serum albumin. Biophys Chem. 2004; 112: 9-14.
9. Kandagal PB, Ashoka S, Seetharamappa J, Shaikh SM, Jadegoud Y, Ijare OB. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. J Pharm Biomed Anal. 2006; 41: 393-399.
10. Sun SF, Zhou B, Hou HN, Liu Y, Xiang GY. Studies on the interaction between Oxaprozin-E and bovine serum albumin by spectroscopic methods. Int J Biol Macromol. 2006; 39: 197-200.
11. Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biol Pharm Bull. 2002; 25: 695-704.
12. Ascoli GA, Domenici E, Bertucci C. Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. Chirality. 2006; 18: 667-679.
13. Kovač M (glavni urednik). Jugoslovenska farmakopeja 2000: prilagođeni prevod Evropske farmakopeje iz 1997. (Ph. Eur. III). 5. izd. (1. izd.) Ph. Jug. V. Beograd: Savremena administracija, 2000.
14. Redman CM. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. Biochem Biophys Res Commun. 1968; 33: 55-60.
15. Kimball SR, Horetsky RL, Jefferson LS. Hormonal regulation of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Am J Physiol. 1995; 268: E6-E14.
16. Evans TW. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16: 6-11.
17. van Oers NS, Cohen BL, Murgita RA. Isolation and characterization of a distinct immunoregulatory isoform of alpha-fetoprotein produced by the normal fetus. J Exp Med. 1989; 170: 811-825.

18. Adinolfi A, Adinolfi M, Lessof. Alpha-feto-protein during development and in disease. *J Med Genet.* 1975; 12: 138-151.
19. Peters T Jr. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996.
20. Deim K. Synopsis of plasma proteins. In: Diem K, Geigy AG Jr, eds. *Scientific tables.* 6th ed. Basel: Documenta Geigy, 1962: 345-354.
21. Schumaker VN. Lipoproteins, apolipoproteins, and lipases. In: Anfinsen CB, Edsall JT, Richards FM, Eisenberg DS, eds. *Advances in protein chemistry.* 1st ed. San Diego: Academic Press, 1994: 153-196.
22. Meloun B, Morávek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* 1975; 58: 134-137.
23. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 1992; 358: 209-215.
24. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994; 45: 153-203.
25. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engin.* 1999; 12: 439-446.
26. Honoré B. Conformational changes in human serum albumin induced by ligand binding. *Pharmacol Toxicol Suppl.* 1990; 66: 7-26.
27. Ross PD, Finlayson JS, Shrake A. Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. II. Effects of isomers of N-acetyltryptophanate and tryptophanate, pH, reheating, and dimerization. *Vox Sang.* 1984; 47: 19-27.
28. Shrake A, Finlayson JS, Ross PD. Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. I. Effects of caprylate and N-acetyltryptophanate. *Vox Sang.* 1984; 47: 7-18.
29. Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 4258-4261.
30. Evans TW. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 6-11.
31. Quinlan GJ, Margaron MP, Mumby S, Evans TW, Gutteridge JM. Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clin Sci.* 1998; 95: 459-465.
32. Peters T Jr. Metabolism: albumin in the body. In: Peters T Jr, eds. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications.* 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996: 188-250.
33. Ramirez-Vick J, Vargas FF. Albumin modulation of paracellular permeability of pig vena caval endothelium shows specificity for pig albumin. *Am J Physiol.* 1993; 264: 1382-1387.

34. Qiao R, Siflinger-Birnboim A, Lum H, Tiruppathi C, Malik AB. Albumin and Ricinus communis agglutinin decrease endothelial permeability via interactions with matrix. *Am J Physiol.* 1993; 265: C439-C446.
35. Beck R, Bertolino S, Abbot SE, Aaronson PI, Smirnov SV. Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Circ Res.* 1998; 83: 923-931.
36. Zhang S, Li H, Ma L, Trimble CE, Kuppusamy P, Hsia CJ, Carden DL. Polynitroxyl-albumin (PNA) plus tempol attenuate lung capillary leak elicited by prolonged intestinal ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 42-50.
37. Nathan C, Xie QW, Halbwachs-Mecarelli L, Jin WW. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *J Cell Biol.* 1993; 122: 243-256.
38. Engel JM Welters I, Rupp M, Langefeld T, Ruwoldt R, Menges T, Hempelmann G. Influence of colloid fluids on polymorphonuclear granulocyte function in vivo. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001; 45: 385-389.
39. King TP. On the sulfhydryl group of human plasma albumin. *J Biol Chem.* 1961; 236: PC5.
40. Cantin AM, Paquette B, Richter M, Larivée P. Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 1539-1546.
41. Marelli D, Paul A, Samson R, Edgell D, Angood P, Chiu RC. Does the addition of albumin to the prime solution in cardiopulmonary bypass affect clinical outcome? A prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 98: 751-756.
42. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1975; 11: 824-832.
43. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1976; 12:1052-1061.
44. Kragh-Hansen U. Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan, diazepam, salicylate and Phenol Red on human serum albumin. *Biochem J.* 1983; 209: 135-142.
45. Kragh-Hansen U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochem J.* 1985; 225: 629-638.
46. Kragh-Hansen U. Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands. *Mol Pharmacol.* 1988; 34: 160-171.
47. Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1295: 147-157.
48. Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Feix JB, Bhagavan NV. A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin. *J Biol Chem.* 2000; 275: 20985-20995.

49. Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J.* 2000; 349: 813-819.
50. Watanabe H, Kragh-Hansen U, Tanase S, Nakajou K, Mitarai M, Iwao Y, Maruyama T, Otagiri M. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem J.* 2001; 357: 269-274.
51. Fehske KJ, Schläfer U, Wollert U, Müller WE. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol Pharmacol.* 1982; 21: 387-393.
52. McMenemy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem.* 1958; 233: 1436-1447.
53. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev.* 1981; 33: 17-53.
54. Wanwimolruk S, Birkett DJ, Brooks PM. Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1983; 24: 458-463.
55. Wanwimolruk S, Birkett DJ, Brooks PM. Structure-activity relationships for protein binding of a series of basic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol.* 1991; 41: 148-151.
56. Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J Biol Chem.* 2000; 275: 38731-38738.
57. Eckenhoff RG, Petersen CE, Ha CE, Bhagavan NV. Inhaled anesthetic binding sites in human serum albumin. *J Biol Chem.* 2000; 275: 30439-30444.
58. Christodoulou J, Sadler PJ, Tucker A. ¹H NMR of albumin in human blood plasma: drug binding and redox reactions at Cys34. *FEBS Lett.* 1995; 376: 1-5.
59. Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello PM, Majors AK, Büdy B, Ketterer ME, Jacobsen DW. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem.* 2001; 276: 30111-30117.
60. Sokolowska M, Krezel A, Dyba M, Szewczuk Z, Bal W. Short peptides are not reliable models of thermodynamic and kinetic properties of the N-terminal metal binding site in serum albumin. *Eur J Biochem.* 2002; 269: 1323-1331.
61. Silva AM, Hider RC. Influence of non-enzymatic post-translation modifications on the ability of human serum albumin to bind iron. Implications for non-transferrin-bound iron speciation. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794: 1449-1458.
62. Bal W, Sokołowska M, Kurowska E, Faller P. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 5444-5455.
63. Lu J, Stewart AJ, Sadler PJ, Pinheiro TJ, Blindauer CA. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36: 1317-1321.

64. Takamura N, Maruyama T, Chosa E, Kawai K, Tsutsumi Y, Uryu Y, Yamasaki K, Deguchi T, Otagiri M. Bucolome, a potent binding inhibitor for furosemide, alters the pharmacokinetics and diuretic effect of furosemide: potential for use of bucolome to restore diuretic response in nephrotic syndrome. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 596-602.
65. Kawai K, Takamura N, Nishii R, Jinnouchi S, Nagamachi S, Tamura S, Arimori K, Otagiri M. Competitive Displacement of Serum Protein Binding to Regulate Pharmacokinetics. In: Otagiri M, Sugiyama Y, Testa B, Tillement JP, eds. *Proceedings of International Symposium on Serum Albumin and α_1 -Acid Glycoprotein from Basic Sciences to Clinical Applications.* Tokyo: Tokyo Print, 2001: 181-192.
66. Setoguchi N, Takamura N, Fujita K, Ogata K, Tokunaga J, Nishio T, Chosa E, Arimori K, Kawai K, Yamamoto R. A diclofenac suppository-nabumetone combination therapy for arthritic pain relief and a monitoring method for the diclofenac binding capacity of HSA site II in rheumatoid arthritis. *Biopharm Drug Dispos.* 2013; 34: 125-136.
67. Ogata K, Takamura N, Tokunaga J, Kawai K, Arimori K, Higuchi S. Dosage plan of a flurbiprofen injection product using inhibition of protein binding by lipid emulsion in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60: 15-20.
68. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol.* 1998; 5: 827-835.
69. Naik PN, Chimatadar SA, Nandibewoor ST. Interaction between a potent corticosteroid drug - dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: a fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 100: 147-159.
70. Zhou Y, Hu X, Dou C, Liu H, Wang S, Shen P. Structural studies on metal-serum albumin. IV. The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA. *Biophys Chem.* 1992; 42: 201-211.
71. Liang H, Huang J, Tu CQ, Zhang M, Zhou YQ, Shen PW. The subsequent effect of interaction between Co(2+) and human serum albumin or bovine serum albumin. *J Inorg Biochem.* 2001; 85: 167-171.
72. Sadler PJ, Viles JH. ^1H and (^{113}Cd) NMR Investigations of Cd(2+) and Zn(2+) Binding Sites on Serum Albumin: Competition with Ca(2+), Ni(2+), Cu(2+), and Zn(2+). *Inorg Chem.* 1996; 35: 4490-4496.
73. Aime S, Canton S, Crich SG, Terreno E. ^1H and ^{17}O relaxometric investigations of the binding of Mn(II) ion to human serum albumin. *Magn. Reson. Chem.* 2002; 40: 41-48.
74. Sun H, Szeto KY. Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. *J Inorg Biochem.* 2003; 94: 114-120.
75. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Sadler PJ. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 3701-3706.
76. Seedher N, Agarwal P. Effect of metal ions on some pharmacologically relevant interactions involving fluoroquinolone antibiotics. *Drug Metabol Drug Interact.* 2010; 25: 17-24.

77. He W, Li Y, Xue C, Hu Z, Chen X, Sheng F. Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13: 1837-1845.
78. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
79. Seetharamappa J, Kamat BP. Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 39: 1046-1050.
80. Tarushi A, Polatoglou E, Kljun J, Turel I, Psomas G, Kessissoglou DP. Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: structure and biological evaluation. *Dalton Trans.* 2011; 40: 9461-9473.
81. Živec P, Perdih F, Turel I, Giester G, Psomas G. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: structure, DNA- and albumin-binding. *J Inorg Biochem.* 2012; 117: 35-47.
82. Dong C, Ma S, Liu Y. Studies of the interaction between demeclocycline and human serum albumin by multi-spectroscopic and molecular docking methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013; 103:179-186.
83. Bi S, Song D, Tian Y, Zhou X, Liu Z, Zhang H. Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2005; 61: 629-636.
84. Khan MA, Muzammil S, Musarrat J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. *Int J Biol Macromol.* 2002; 30: 243-249.
85. Dong C, Lu N, Liu Y. Binding of methacycline to human serum albumin at subdomain IIA using multispectroscopic and molecular modeling methods. *Luminescence.* 2013; 28: 933-941.
86. Zhang J, Chen L, Zeng B, Kang Q, Dai L. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV-vis spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013; 105:74-79.
87. Sudhamalla B, Gokara M, Ahalawat N, Amooru DG, Subramanyam R. Molecular dynamics simulation and binding studies of beta-sitosterol with human serum albumin and its biological relevance. *J Phys Chem B.* 2010; 114: 9054-9062.
88. Cárdenas M, Schillén K, Pebalk D, Nylander T, Lindman B. Interaction between DNA and charged colloids could be hydrophobically driven. *Biomacromolecules.* 2005; 6: 832-837.
89. Haldar B, Chakrabarty A, Mallick A, Mandal MC, Das P, Chattopadhyay N. Fluorometric and isothermal titration calorimetric studies on binding interaction of a telechelic polymer with sodium alkyl sulfates of varying chain length. *Langmuir.* 2006; 22: 3514-3520.
90. Mallick A, Haldar B, Chattopadhyay N. Spectroscopic investigation on the interaction of ICT probe 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H Indolo-[2,3-a] quinolizine with serum albumins. *J Phys Chem B.* 2005; 109: 14683-14690.

91. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Plenum Press, 2006.
92. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 232-260.
93. Fuoco D. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. *Antibiotics.* 2012; 1: 1-13.
94. Kažić T. Gotovi lekovi: priručnik za farmakoterapiju. 13. izd. Beograd: Integra, 2011.
95. Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 470-480.
96. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 611-614.
97. Khardori N. Antibiotics – past, present, and future. *Med Clin North Am.* 2006; 90: 1049-1076.
98. Hoffmann M, DeMaio W, Jordan RA, Talaat R, Harper D, Speth J, Scatina J. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [14C]tigecycline, a first-in-class glycycline antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 1543-1553.
99. Stein GE, Craig WA. Tigecycline: a critical analysis. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 518-524.
100. Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, et al. The glycyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs.* 2004; 64: 63-88.
101. Zimmerman JJ, Raible DG, Harper DM, Matschke K, Speth JL. Evaluation of a potential tigecycline-warfarin drug interaction. *Pharmacotherapy.* 2008; 28: 895-905.
102. Zimmerman JJ, Harper DM, Matschke K, Speth JL, Raible DG, Fruncillo RJ. Absence of an interaction between tigecycline and digoxin in healthy men. *Pharmacotherapy.* 2007; 27: 835-844.
103. MacGowan AP. Tigecycline pharmacokinetic/pharmacodynamic update. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: i11-i16.
104. Van Wart SA, Cirincione BB, Ludwig EA, Meagher AK, Korth-Bradley JM, Owen JS. Population pharmacokinetics of tigecycline in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2007; 47: 727-737.
105. Conte JE Jr, Golden JA, Kelly MG, Zurlinden E. Steady-state serum and intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25: 523-529.
106. Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 1221-1229.
107. Rello J. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of tigecycline. *J Chemother.* 2005; 17: 12-22.

108. Doan TL, Fung HB, Mehta D, Riska PF. Tigecycline: a glycylyccline antimicrobial agent. *Clin Ther.* 2006; 28: 1079-1106.
109. Peterson LR. A review of tigecycline – the first glycylyccline. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32: S215-S222.
110. Meagher AK, Ambrose PG, Grasela TH, Ellis-Grosse EJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of tigecycline. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: S333-S340.
111. Muralidharan G, Micalizzi M, Speth J, Raible D, Troy S. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 220-229.
112. Chin TF, Lach JL. Drug diffusion and bioavailability: tetracycline metallic chelation. *Am J Hosp Pharm.* 1975; 32: 625-629.
113. Fey G, Reiss M, Kersten H. Interaction of tetracyclines with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. A fluorometric investigation. *Biochemistry.* 1973; 12: 1160-1164.
114. Gabler WL. Fluxes and accumulation of tetracyclines by human blood cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1991; 72: 39-51.
115. Shimada J, Nogita T, Ishibashi Y. Clinical pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin Pharmacokinet.* 1993; 25: 358-369.
116. Lubasch A, Erbes R, Mauch H, Lode H. Sparfloxacin in the treatment of drug resistant tuberculosis or intolerance of first line therapy. *Eur Respir J.* 2001; 17: 641-646.
117. Georgiou ME, Georgiou CA, Koupparis MA. Automated flow injection gradient technique for binding studies of micromolecules to proteins using potentiometric sensors: application to bovine serum albumin with anilinonaphthalenesulfonate probe and drugs. *Anal Chem.* 1999; 71: 2541-2550.
118. Kandagal PB, Ashoka S, Seetharamappa J, Shaikh SM, Jadegoud Y, Ijare OB. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41: 393-399.
119. Brand L, Gohlke JR. Fluorescence probes for structure. *Annu Rev Biochem.* 1972; 41: 843-868.
120. Hu YJ, Liu Y, Zhao RM, Qu SS. Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. *Int J Biol Macromol.* 2005; 37: 122-126.
121. Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC. Studies of the interaction between palmatine hydrochloride and human serum albumin by fluorescence quenching method. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41: 1041-1046.
122. Górnas P, Neunert G, Baczyński K, Polewski K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chem.* 2009; 114: 190-196.
123. Todorović M, Đurđević P, Antonijević V. *Optičke metode instrumentalne analize.* 2. izd. Beograd: Hemijski fakultet, 1997.

124. Jablonski A. Über den mechanisms des photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Z Phys.* 1935; 94: 38-46.
125. Atkins PW, De Paula J. *Atkins' physical chemistry.* Oxford: Oxford University Press, 2006.
126. Stokes GG. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc (London).* 1852; 142: 463-562.
127. O'Reilly JE. Fluorescence experiments with quinine. *J Chem Educ.* 1975; 52: 610-612.
128. Sharma A, Schulman SG. *Introduction to fluorescence spectroscopy.* New York: Wiley-Interscience, 1999.
129. Parker CA. *Photoluminescence of solutions.* New York: Elsevier, 1968.
130. Gauthier TD, Shane EC, Guerln WF, Seltz WR, Grant CL. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ Sci Technol.* 1986; 20: 1162-1166.
131. Lehrer SS. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry.* 1971; 10: 3254-3263.
132. Caldwell RA, Creed D, Ohta H. Exciplex quenching. Geometric and electronic requirements. *J Am Chem Soc.* 1975; 97: 3246-3247.
133. McMillin DR, Kirchoff JR, Goodwin KV. Exciplex quenching of photoexcited copper complexes. *Coord Chem Rev.* 1985; 64: 83-92.
134. Kuzmin MG. Exciplex mechanism of the fluorescence quenching in polar media. *Pure Appl Chem.* 1993; 65: 1653-1658.
135. Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence (Transl RS Knox). *Ann Phys (Leipzig).* 1948; 2: 55-75.
136. Sung J, Shin KJ, Lee S. Theory of diffusion-influenced fluorescence quenching. Effects of static quenching on the Stern–Volmer curve. *Chem Phys.* 1992; 167: 17-36.
137. Williams DH, Fleming I. *Spectroscopic methods in organic chemistry.* 4th ed. London: McGraw-Hill, 1989.
138. Jaffé HH, Orchin M. *Theory and applications of ultraviolet spectroscopy.* New York: Wiley, 1962.
139. Milosavljević SM. *Strukturne instrumentalne metode.* Beograd: Hemijski fakultet, 1994.
140. Leach AR. *Molecular modelling: principles and applications.* 2nd ed. Harlow: Prentice Hall, 2001.
141. Marković S, Marković Z. *Molekulsko modeliranje.* Kragujevac: Centar za naučno istraživački rad Srpske akademije nauka i umetnosti i Univerziteta u Kragujevcu, 2012.
142. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol.* 1996; 6: 402-406.

143. Jorgensen WL. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science*. 1991; 254: 954-955.
144. Wei BQ, Weaver LH, Ferrari AM, Matthews BW, Shoichet BK. Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. *J Mol Biol*. 2004; 337: 1161-1182.
145. Goldman BB, Wipke WT. QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock). *Proteins*. 2000; 38: 79-94.
146. Feig M, Onufriev A, Lee MS, Im W, Case DA, Brooks CL 3rd. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. *J Comput Chem*. 2004; 25: 265-284.
147. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009; 30: 2785-2791.
148. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit*. 1996; 9: 1-5.
149. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010; 31: 455-461.
150. Valstar A, Almgren M, Brown W, Vasilescu M. The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. *Langmuir*. 2000; 16: 922-927.
151. Foster JF. Serum albumin. In: Rosenoer VM, Oratz M, Rothschild MA, eds. *Albumin structure, function and uses*. Oxford: Pergamon, 1977: 53-84.
152. Varshney A, Sen P, Ahmad E, Rehan M, Subbarao N, Khan RH. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality*. 2010; 22: 77-87.
153. Simard JR, Zunszain PA, Ha CE, Yang JS, Bhagavan NV, Petitpas I, Curry S, Hamilton JA. Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 17958-17963.
154. Fändrich M, Forge V, Buder K, Kittler M, Dobson CM, Diekmann S. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 15463-15468.
155. Juárez J, Taboada P, Mosquera V. Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophys J*. 2009; 96: 2353-2370.
156. Foderà V, Groenning M, Vetri V, Librizzi F, Spagnolo S, Cornett C, Olsen L, van de Weert M, Leone M. Thioflavin T hydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection. *J Phys Chem B*. 2008; 112: 15174-15181.
157. González-Jiménez J, Cortijo M. Urea-induced denaturation of human serum albumin labeled with acrylodan. *J Protein Chem*. 2002; 21: 75-79.
158. Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*. 2000; 40: 29-38.

159. Tayyab S, Sharma N, Mushahid Khan M. Use of domain specific ligands to study urea-induced unfolding of bovine serum albumin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277: 83-88.
160. Tayyab S, Ahmad B, Kumar Y, Khan MM. Salt-induced refolding in different domains of partially folded bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol.* 2002; 30: 17-22.
161. Ahmad B, Khan MK, Haq SK, Khan RH. Intermediate formation at lower urea concentration in 'B' isomer of human serum albumin: a case study using domain specific ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314: 166-173.
162. Mukherjee M, Sardar PS, Ghorai SK, et al. A comparative study of interaction of tetracycline with several proteins using time resolved anisotropy, phosphorescence, docking and FRET. *PLoS One.* 2013; 8: e60940.
163. Anand U, Jash C, Boddepalli RK, Shrivastava A, Mukherjee S. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. *J Phys Chem B.* 2011; 115: 6312-6320.
164. Tao-Ying HU, Lin C, Ying L. Study on the interaction of doxycycline with human serum albumin. *Spectrosc Spect Anal.* 2014; 34: 1343-1347.
165. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 6440-6445.
166. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009; 30: 2785-2791.
167. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model.* 1999; 17: 57-61.
168. On-line version of "Accessibility Calculation for Protein (ver. 1.2)" software. Centre for Informational Biology, Ochanomizu University, Japan. Доступно на: <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Последњи пут страница посећена: 20.12.2016.
169. Han LY, Lin HH, Li ZR, et al. PEARLS: program for energetic analysis of receptor-ligand system. *J Chem Inf Model.* 2006; 46: 445-450.
170. Cao H, Liu Q. Effects of temperature and common ions on binding of puerarin to BSA. *J Solution Chem.* 2009; 38: 1071-1077.
171. Li D, Zhu M, Xu C, Ji B. Characterization of the baicalein-bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 588-599.
172. Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC, Tao WH, Tang SH. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *J Lumin.* 2007; 126: 211-218.
173. Stojanović SD, Janković SM, Matović ZD, Jakovljević IŽ, Jelić RM. Interaction between tigecycline and human serum albumin in aqueous solution. *Monatsh Chem.* 2015; 146: 399-409.

174. Takadate A, Irikura M, Ohkubo Y, Goya S, Otagiri M, Uekama K. Interaction between methacycline and human serum albumin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1984; 32: 1898-1903.
175. Dong C, Lu N, Liu Y. Binding of methacycline to human serum albumin at subdomain IIA using multispectroscopic and molecular modeling methods. *Luminescence*. 2013; 28: 933-941.
176. Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 1981; 20: 3096-3102.
177. Yang MM, Yang P, Zhang LW. Study on interaction of caffeic acid series medicine and albumin by fluorescence method. *Chin Sci Bull*. 1994; 39: 734-739.
178. Volkhard H. Fluorescence resonance energy transfer. *Principles of computational cell biology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
179. Abou-Zied OK, Al-Shihi OI. Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes. *J Am Chem Soc*. 2008; 130: 10793-10801.
180. Ran D, Wu X, Zheng J, et al. Study on the interaction between florasulam and bovine serum albumin. *J Fluoresc*. 2007; 17: 721-726.
181. Förster T, Sinanoglu O. *Modern quantum chemistry*. New York: Academic Press, 1996.
182. Sklar LA, Hudson BS, Simoni RD. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: synthetic phospholipid membrane studies. *Biochemistry*. 1977; 16: 819-828.
183. Epps DE, Raub TJ, Caiolfa V, Chiari A, Zamai M. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. *J Pharm Pharmacol*. 1999; 51: 41-48.
184. Yang JY, Yang WY. Site-specific two-color protein labeling for FRET studies using split inteins. *J Am Chem Soc*. 2009; 131: 11644-11645.
185. Valeur B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 1st ed. New York: Wiley Press, 2001.
186. Peterson FC, Anderson PJ, Berliner LJ, Brooks CL. Expression, folding, and characterization of small proteins with increasing disulfide complexity by a pT7-7-derived phagemid. *Protein Expr Purif*. 1999; 15: 16-23.
187. Wen M, Zhang X, Tian J, et al. Binding interaction of xanthoxylin with bovine serum albumin. *J Solution Chem*. 2009; 38: 391-401.
188. Guo X, Han X, Tong J, et al. The investigation of the interaction between piracetam and bovine serum albumin by spectroscopic methods, *J Mol Struct*. 2010; 966: 129-135.
189. Benesi HA, Hildebrand JH. The Benesi-Hildebrand method for determination of K_f for DA association and ϵ values for DA CT absorption. *J Am Chem Soc*. 1949, 71: 2703-2707.
190. Ncube P, Krause RW, Mamba BB. Fluorescent sensing of chlorophenols in water using an azo dye modified β -cyclodextrin polymer. *Sensors (Basel)*. 2011; 11: 4598-4608.

191. Sambasevam KP, Mohamad S, Sarih NM, Ismail NA. Synthesis and characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin and azomethine. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 3671-3682.
192. Al-Shihry SS. Spectroscopic studies of inclusion complexes of 1-naphthol-4-sulfonate with beta-cyclodextrin in aqueous solution. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2005; 61: 2439-2443.
193. Móczár I, Huszthy P, Mezei A, et al. Synthesis and optical characterization of novel aza crown ethers containing an acridinone or an N-methylacridinone unit as a potential fluorescent chemosensor. *Tetrahedron.* 2010; 66: 350-358.
194. Fischer M, Coleman RG, Fraser JS, Shoichet BK. Incorporation of protein flexibility and conformational energy penalties in docking screens to improve ligand discovery. *Nat Chem.* 2014; 6: 575-583.
195. Seedher N, Agarwal P. Competitive binding of fluoroquinolone antibiotics and some other drugs to human serum albumin: a luminescence spectroscopic study. *Luminescence.* 2013; 28: 562-568.
196. Seedher N, Agarwal P. Complexation of fluoroquinolone antibiotics with human serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Luminescence.* 2010, 130: 1841-1848.
197. B S, Hegde AH, K C R, J S. Exploring the binding mechanism of ondansetron hydrochloride to serum albumins: spectroscopic approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 86: 410-416.
198. Wang G, Li X, Ding X, Wang D, Yan C, Lu Y. Exploring the mechanism of interaction between 5-(ethoxycarbonyl)-6-methyl-4-(4-methoxyphenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one and human serum albumin: Spectroscopic, calorimetric and molecular modeling studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55: 1223-1226.
199. Khan AB, Khan JM, Ali MS, Khan RH, Kabir-Ud-Din. Interaction of amphiphilic drugs with human and bovine serum albumins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 97: 119-124.
200. Ranjan M, Diffley P, Stephen G, Price D, Walton TJ, Newton RP. Comparative study of human steroid 5 α -reductase isoforms in prostate and female breast skin tissues: sensitivity to inhibition by finasteride and epristeride. *Life Sci.* 2002; 71: 115-126.
201. Huang Y, Zhang Z, Zhang D, Lv J. Flow-injection analysis chemiluminescence detection combined with microdialysis sampling for studying protein binding of drug. *Talanta.* 2001; 53: 835-841.
202. Ware WR. Oxygen quenching of fluorescence in solution: An experimental study of the diffusion process. *J Phys Chem.* 1962; 66: 455-458.
203. Li JC, Li N, Wu QH, Wang Z, Ma JJ, Wang C, Zhang LJ. Study on the interaction between clozapine and bovine serum albumin. *J Mol Struct.* 2007; 833: 184-188.
204. Cheng ZJ, Zhang YT. Spectroscopic investigation on the interaction of salidroside with bovine serum albumin. *J Mol Struct.* 2008; 889: 20-27.
205. Wang N, Ye L, Zhao BQ, Yu JX. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41: 589-595.

206. Sun H, Wu Y, Xia X, Shi Z. Spectroscopic studies on the interaction characteristics between norethisterone and bovine serum albumin. *J Lumin.* 2013; 134: 580-587.
207. Chi Z, Liu R. Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 203-209.
208. Xu H, Yao N, Xu H, Wang T, Li G, Li Z. Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 14185-14203.
209. Chen T, Cao H, Zhu S, Lu Y, Shang Y, Wang M, Tang Y, Zhu L. Investigation of the binding of Salvianolic acid B to human serum albumin and the effect of metal ions on the binding. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011; 81: 645-652.
210. Davey PG. Overview of drug interactions with the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 1988; 22: 97-107.
211. Janknegt R. Drug interactions with quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 1990; 26: 7-29.
212. Seedher N, Bhatia S. Mechanism of interaction of non-steroidal anti-inflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 39: 257-262.
213. Yamasaki K, Rahman MH, Tsutsumi Y, et al. Circular dichroism simulation shows a site-II-to-site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen. *AAPS PharmSciTech.* 2000; 1: E12.
214. Alam SM, Akter MJ, Reza MN, Israt F, Ahmed F, Shilpi JA. Drug-drug interactions between ciprofloxacin and captopril at binding sites of bovine serum albumin. *Pak J Biol Sci.* 2004; 7: 79-81.
215. Sakai M, Hara A, Anjo S, Nakamura M. Comparison of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metal ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 18: 1057-1067.

ПРИЛОЗИ

8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор	
Име и презиме: Стефан Д. Стојановић	
Датум и место рођења: 22.11.1987. године, Крагујевац	
Садашње запослење: КРКА-ФАРМА д.о.о. Београд	
II. Докторска дисертација	
Наслов: Испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин и интеракције са јонима метала и флуорохинолонима – <i>in vitro</i> студија	
Број страница: 138	
Број слика: 60	
Број библиографских података: 215	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Фармацеутска хемија	
Ментор: Проф. др Ратомир М. Јелић	
III. Оцена и одбрана	
Датум пријаве теме: 07.05.2015.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-526/17 од 07.10.2015.	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	1. Проф. др Слободан Јанковић 2. Проф. др Зоран Матовић 3. Проф. др Гордана Поповић
Комисија за оцену докторске дисертације:	Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Зоран Матовић Проф. др Гордана Поповић
Комисија за одбрану докторске дисертације:	Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Зоран Матовић Проф. др Гордана Поповић
Датум одбране дисертације:	

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Стефан Д. Стојановић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Ратомир М. Јелић

Наслов рада:

НР

Испитивање везивања тигециклина
за хумани серумски албумин и
интеракције са јонима метала
и флуорохинолонима – *in vitro* студија

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:

ЈИ

Српски/Енглески

Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Шумадија
Година: ГО	2018.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Србија
Физичи опис рада: ФО	Дисертација садржи 7 поглавља, 138 страна, 60 слика, 15 табела, и 215 референци
Научна област: НО	Фармација
Научна дисциплина: ДИ	Фармацеутска хемија
Предметна одредница/кључне речи: ПО	тигециклин, хумани серумски албумин, флуоресцентна спектроскопија, апсорпциона спектроскопија, AutoDock анализа, јони метала, флуорохинолони
УДК	
Чува се: ЧУ	Библиотека Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Србија
Важна напомена: ВН	Нема

Извод:**ИД**

У овој докторској дисертацији је испитивано везивање тигециклина за хумани серумски албумин и интеракције тигециклина са специфичним маркерима везујућих места (варфарином и ибупрофеном), јонима метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) и флуорохинолонима (спарфлоксацином, левофлоксацином и ципрофлоксацином) које се јављају на нивоу везивања за хумани серумски албумин. Све интеракције су испитиване у симулираним физиолошким условима *in vitro*. Коришћене су спектроскопске методе (флуоресцентна и апсорпциона спектроскопија) и AutoDock анализа.

Гашење флуоресценције активног центра хуманог серумског албумина тигециклином је последица формирања новог ХСА-ТГЦ комплекса, што указује да је механизам гашења флуоресценције статички процес. Константе везивања (K_a) ХСА-ТГЦ система су биле $1,8 \times 10^4$; $4,0 \times 10^5$ и $4,5 \times 10^6$ L/mol на 298, 303 и 308 K, а број везујућих места (n) је израчунат на око 1, што указује да ХСА и ТГЦ формирају комплексе у молском односу приближно 1:1. Према ван'т Хофовој једначини, вредности промене енталпије (ΔH^0) и промене ентропије (ΔS^0) су биле 423,2 kJ/mol и 1502,3 J/mol·K, што указује да типичне хидрофобне интеракције играју најважнију улогу у реакцији везивања и стабилизацији ХСА-ТГЦ комплекса. Растојање везивања (r) између донора (ХСА) и акцептора (ТГЦ) је израчунато да износи 3,63 nm према Форстеровој теорији резонантног енергетског трансфера. Главно везујуће место за тигециклин је место I смештено у хидрофобној шупљини субдомена ПА. Место I је имало предност над местом II. Јони метала (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) су индуковали повећање афинитета тигециклина за хумани серумски албумин. Тигециклин је довео до смањења афинитета спарфлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина за хумани серумски албумин.

Ова докторска дисертација треба да пружи боље разумевање везивања тигециклина за хумани серумски албумин и побољша његову примену у клиничкој пракси. Резултати ове докторске дисертације могу бити од великог значаја за даљи развој природних наука, клиничке фармакологије и медицине.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 30.09.2015.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:
КО

Проф. др Слободан Јанковић - **председник**
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Проф. др Зоран Матовић - **члан**
Природно-математички факултет у Крагујевцу

Проф. др Гордана Поповић - **члан**
Фармацеутски факултет у Београду

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

Ph.D. Thesis

Author:

AU

Stefan D. Stojanović

Menthor/co-menthor:

MN

Prof. dr Ratomir Jelić

Title:

TI

Research of binding of tigecycline for human serum albumin and interaction with metal ions and fluoroquinolones – *in vitro* study

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Šumadija
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Reprint by author
Publication place: PP	Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
Physical description: FD	Thesis contains 7 chapters, 138 pages, 60 pictures, 15 tables, and 215 references
Scientific field: SF	Pharmacy
Scientific discipline: SD	Pharmaceutical chemistry
Subject/key words: SKW	tigecycline, human serum albumin, fluorescence spectroscopy, absorption spectroscopy, AutoDock analysis, metal ions, fluoroquinolones
UDC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
Note: N	None

Abstract:**AB**

In this doctoral thesis the binding of tigecycline for human serum albumin and interactions of tigecycline with specific markers of binding sites (warfarin and ibuprofen), metal ions (Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+}) and fluoroquinolones (sparfloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin) which occur at the level of binding for human serum albumin were investigated. All interactions were studied in simulated physiological conditions *in vitro*. The spectroscopic methods (fluorescence and absorption spectroscopy) and AutoDock analysis were used.

Fluorescence quenching of the active center of human serum albumin by tigecycline is due to the formation of a new HSA-TGC complex, indicating that the mechanism of fluorescence quenching is a static process. The binding constants (K_a) of HSA-TGC system were 1.8×10^4 , 4.0×10^5 and 4.5×10^6 L/mol at 298, 303 and 308 K, and the number of binding sites (n) was calculated at about 1, indicating that HSA and TGC formed complexes in a molar ratio of approximately 1:1. According to the van't Hof equation, the values of the enthalpy change (ΔH^0) and the entropy change (ΔS^0) were 423.2 kJ/mol and 1502.3 J/mol·K, indicating that typical hydrophobic interactions play a major role in the binding reaction and stabilization of HSA-TGC complex. The binding distance (r) between the donor (HSA) and the acceptor (TGC) was calculated to be 3.63 nm according to Förster resonance energy transfer theory. The major binding site for tigecycline is the site I located in the hydrophobic cavity of subdomain IIA. The site I had an advantage over site II. Metal ions (Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+}) induced an increase in the affinity of tigecycline for human serum albumin. Tigecycline has led to a decrease in the affinity of sparfloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin for human serum albumin.

This doctoral thesis should provide a better understanding of the binding of tigecycline for human serum albumin and improve its application in clinical practice. The results of this doctoral thesis can be of great importance for the further development of natural sciences, clinical pharmacology and medicine.

Accepted by the Scientific Board on: 30.09.2015.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board:
(Degree/name/surname/title/faculty)

Prof. dr Slobodan Janković - **chairman**
Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

Prof. dr Zoran Matović - **member**
Faculty of Science, Kragujevac

Prof. dr Gordana Popović - **member**
Faculty of Pharmacy, Belgrade

Биографија аутора

Стефан Д. Стојановић је рођен 22.11.1987. године у Крагујевцу. Након завршене основне школе у Рековцу и Прве крагујевачке гимназије, 2006. године уписао је Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету у Крагујевцу, где је 2011. године дипломирао са просечном оценом 9,06 и стекао звање магистра фармације. Школске 2011/2012. године уписао је Академске докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија. Положио је све планом и програмом предвиђене испите као и Усмени докторски испит 24.10.2014. године. Државни испит за магистра фармације положио је 29.11.2012. године у Београду.

Од 01.03.2013. године радио је као фармацеут и одговорно лице апотеке у ЗУА ОТО-Медицалпхарм у Крагујевцу, а 18.10.2013. године прешао је на место стручног сарадника у фармацеутској компанији КРКА-ФАРМА д.о.о. Београд, где се и данас налази у сталном радном односу. Од 2012. до 2014. године је био активан учесник макропројекта „Анализа фактора који доприносе настанку компликација и/или смртном исходу код политрауматизованих пацијената и пацијената са акутним панкреатитисом леченим у интензивној нези“, на основу чега је остварио умањење трошкова школарине за једну годину Академских докторских студија. Од 2013. године је активно укључен у научно-истраживачки рад на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу на коме је савладао методе у аналитичкој хемији и њихову примену у фармацији.

Тему докторске дисертације под називом „Испитивање везивања тигециклина за хумани серумски албумин и интеракције са јонима метала и флуорохинолонима – *in vitro* студија“ пријавио је 07.05.2015. године. Позитиван извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације на Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу усвојен је 30.09.2015. године. Стручно веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу дало је сагласност на тему докторске дисертације на седници одржаној 07.10.2015. године.

Стефан Д. Стојановић је аутор или коаутор седам научних радова објављених у целости у домаћим и међународним часописима на SCI листи као и радова саопштених на конференцијама домаћег и међународног значаја.

Библиографија аутора**Списак радова:**

1. Jelić RM, **Stojanović SD**, Berić JD, Odović J. The effect of tigecycline on the binding of fluoroquinolones to human serum albumin. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(1): 17-25. **(M53)**
2. Jelić R, Tomović M, **Stojanović S**, Joksović Lj, Jakovljević I, Djurdjević P. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and levofloxacin and its effect on the solution equilibria between gadolinium (III) ion and levofloxacin. *Monatsh Chem.* 2015; 146(10): 1621-1630. **(M23)**
3. **Stojanović S**, Janković S, Matović Z, Jakovljević I, Jelić R. Interaction between tigecycline and human serum albumin in aqueous solution. *Monatsh Chem.* 2015; 146(2): 399-409. **(M23)**
4. **Stojanović SD**. Razvoj aseptičnog meningitisa nakon terapije amoksicilinom. *Medicinski časopis.* 2014; 48(2): 85-92. **(M53)**
5. Boskovic M, Djokovic J, Grubor I, Guzvic V, Jakovljevic B, Jurisevic M, Ljubisic D, Mijajlovic M, Milicevic I, Milovanovic M, Nikolic L, Nikolic M, Peric S, Petrovic A, Petrovic J, Radonjic K, Simonovic L, Simovic M, **Stojanovic S**, Stojic I, Tomovic J, Vranic S, Vucicevic K, Zdravkovic A, Jankovic S. PhD Students' Awareness of Research Misconduct. *J Empir Res Hum Res Ethics.* 2013; 8(2): 163-164. **(M21)**
6. Mijajlović M, **Stojanović S**, Vučićević K, Petrović J, Nikolić M, Zdravković A, Đoković J, Simović M. ABC analiza upotrebe lekova – terminološka razjašnjenja. *Medicinski časopis.* 2013; 47(3): 161-162. **(M53)**
7. **Stojanović SD**. Analiza odnosa troškova/kliničke efikasnosti tiotropijum-bromida i salmeterola u lečenju teške hronične opstruktivne bolesti pluća. *Racionalna terapija.* 2012; 4(2): 1-12. **(M53)**

Списак саопштења са међународних и домаћих научних конференција која су штампана у изводу:

1. Jelić RM, **Stojanović SD**, Berić JD, Janković SM. Spectroscopic studies of binding of tigecycline to human serum albumin and the effects of metal ions and other drugs on binding. 13th IBN SINA International Conference on Pure and Applied Heterocyclic Chemistry – Heterocyclic Chemistry for Sustainable Future, Hurgada, Egypt 2015, Abstracts: p. 237. **(M34)**