

Kompeticijsko određivanje konstante vezanja propranolola na alfa-1 kiseli glikoprotein polarizacijskom fluorescencijom

Mustač, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:194444>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Karla Mustač

**Kompeticijsko određivanje konstante vezanja
propranolola na α -1 kiseli glikoprotein
polarizacijskom fluorescencijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća i anorganska kemija sa stehiometrijom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marija Gabričevića.

Od srca zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću na uvidu u znanstveni rad kroz zanimljivo i korisno istraživanje. Velika zahvala asistentu Tinu Šebi koji je nesebičnim savjetima i pomoći u laboratoriju olakšao pisanje ovog rada.

Hvala i svim prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje studentske dane i podržavali me u svakom trenutku.

Veliku zahvalu dugujem i članovima moje obitelji koji su od početka puni razumijevanja te su me svojom podrškom uvijek gurali naprijed.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. α -1 KISELI GLIKOPROTEIN	
a. STRUKTURA.....	2
b. SINTEZA I GLIKOZILACIJA.....	3
c. BIOLOŠKE FUNKCIJE	
i. IMUNOMODULACIJA.....	4
ii. VEZANJE LIJEKOVA.....	5
1.2. LIJEKOVI	
a. DIPIRIDAMOL.....	6
b. PROPRANOLOL.....	6
1.3. KEMIJSKA RAVNOTEŽA.....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE	
3.1. POLARIZACIJA FLUORESCENCIJE.....	13
3.2. TITRACIJE.....	15
3.3. IZRAČUN KONSTANTE VEZANJA.....	19
a. REAKCIJE VEZANJA	
i. DIREKTNO VEZANJE.....	19
ii. POTPUNO KOMPETITIVNO VEZANJE.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	32

1. UVOD

Vežanje lijekova na proteine plazme, posebice humani serumski albumin (HSA) i α -1 kiseli glikoprotein (AGP), jedan je od faktora koji utječu na raspodjelu lijeka. Samo je slobodna tj. nevezana frakcija lijeka u plazmi zaslužna za učinak lijeka. Kako bi određena terapija bila što efikasnija i sigurnija važno je znati stupanj vežanja lijeka na proteine plazme. U različitim fiziološkim i patološkim stanjima, koncentracija proteina plazme može se promijeniti, što će utjecati na koncentraciju lijeka u plazmi. Poznavanje konstante vežanja lijeka na proteine plazme osobito je važno kod lijekova koji se snažno vežu na njih i imaju usku terapijsku širinu. Kod njih će i mala promjena konstante ravnoteže uzrokovati značajnu promjenu u slobodnoj frakciji lijeka što može dovesti do subdoziranja i izostanka terapijskog učinka ili do predoziranja i posljedičnog toksičnog učinka. Primjerice, ako je lijek vežan 99% na proteine plazme (slobodna frakcija lijeka je 1%), promjena konstante ravnoteže zbog koje se samo 1% lijeka otpusti s proteina, uzrokovat će 100%-tno povećanje slobodne koncentracije lijeka, a time i moguće toksične učinke (Kratochwil i sur., 2002.).

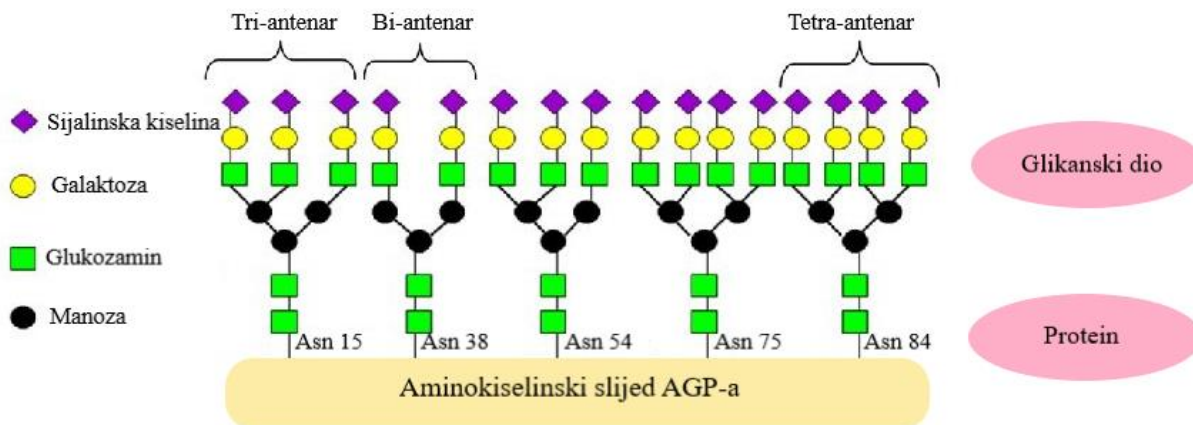
1.1. α -1 KISELI GLIKOPROTEIN

a. STRUKTURA

Ljudski α -1 kiseli glikoprotein (AGP) je protein akutne faze molekulske mase od 41 do 43 kDa. Čak 45% mase čine ugljikohidrati u obliku pet kompleksa N-vezanih glikana. Protein čini polipeptidni lanac od 183 aminokiseline i dvije disulfidne veze. Postoje različite forme AGP-a u serumu ovisno o tipu glikozilacije i aminokiselinskom slijedu.

Ugljikohidratni dio AGP-a temeljito je istražen jer je to jedan od rijetkih serumskih glikoproteina koji sadrže tetra-, tri- i di- antenarne N-vezane glikane (Fourier i sur., 2000.). Glikozilacija je najraznolikija post-translacijska modifikacija proteina koja pruža brojne mogućnosti modulacije njihove funkcije. Oligosaharidi su kovalentno vezani za protein preko atoma dušika asparagina, ili atoma kisika bočnih lanaca serina odnosno treonina, tvoreći N-vezane, odnosno O-vezane glikoproteine. Glikani mogu biti prisutni u različitim strukturnim oblicima na istom proteinu i na istom glikozilacijskom mjestu što rezultira različitim glikoformama iste molekule. Heterogenosti doprinose različita razgranatost glikana, prisutnost ili odsutnost pojedinih monosaharida kao što su sijalinska kiselina, fukoza, N-acetilglukozamin kao i tip veze između šećera. Mnoge bolesti povezane su s promjenama glikanske strukture (Gornik i Lauc, 2008.).

AGP na svojih pet glikozilacijskih mjesta (Asn-15, -38, -54, -75, -85) sadrži N-vezane glikane kompleksnog tipa prisutne kao bi-, tri- i tetra- antenarne strukture što je prikazano na Slici 1. Terminalni šećeri su velikim dijelom odgovorni za raznolikost glikana. Najčešći terminalni šećer je sijalinska kiselina koja čini najveći dio glikanske strukture AGP-a što je odgovorno za vrlo nizak pI od 2,8 do 3,8. U normalnom ljudskom serumu pojavljuje se samo 12 do 20 glikoforma AGP-a unatoč teorijski puno većim mogućnostima variranja strukture jer glikozilacijsko mjesto 1 nikad nema vezan tetraantenarni glikan, mjesto 2 nikad ne nosi glikane s fukozom, mjesto 4 nikad nema di-razgranate glikane, a samo mjesta 4 i 5 nose tetra-razgranate glikane s više od jedne fukoze (Fourier i sur., 2000.).



Slika 1. Di-, tri- i tetra- antenarni N-glikanski kompleks ljudskog AGP-a (Smith i sur., 2012.)

b. SINTEZA I GLIKOZILACIJA

AGP se sintetizira u jetri i najvećim dijelom ga izlučuju hepatociti, iako postoji i ekstrahepatička ekspresija AGP gena. Kod zdravih ljudi, koncentracija AGP-a iznosi od 0,2/mg/ml do 1 mg/ml (Shiyan i Bovin, 1997.). On spada u proteine akutne faze koji imaju ulogu u modulaciji imunog odgovora, te je tijekom izloženosti stresnim stimulusima poput fizičke traume (ozljeda, operacija), bakterijske infekcije ili nespecifičnog upalnog stimulusa, povećana njegova hepatska sinteza. Kao odgovor na upalne podražaje, osim povećanja sinteze AGP-a i ostalih proteina akutne faze u jetri, dolazi i do povećane produkcije AGP-a u ekstrahepatičkim tkivima (Fourier i sur., 2000.). Danas je poznato da se AGP sintetizira i u mijelocitima. AGP je sastojak sekundarnih granula neutrofila koji njihovom aktivacijom izlazi iz stanice i djeluje lokalno na mjestu infekcije. Taj AGP je glikoziliran više nego plazmatski AGP koji je sintetiziran u jetri. Iako nije u potpunosti razjašnjena funkcija tkivnog AGP-a, smatra se da je njegova funkcija protuupalna i imunomodulatorna. Lokalna produkcija proteina akutne faze na inicijalnom mjestu upale doprinosi homeostazi redukcijom oštećenja tkiva upalnim procesima (Theilgaard-Monch i sur., 2005.).

Upala je kompleksan biološki odgovor organizma na štetne podražaje kao što su patogeni, oštećene stanice ili iritansi. Cilj upalnog procesa je ukloniti štetan podražaj i započeti zacjeljivanje. Svaki upalni proces prate brojne promjene na mjestu upale kao i brojne sistemske fiziološke i biokemijske promjene, a značajne su i promjene u glikozilaciji.

Osim kod akutnih upalnih stanja poput opekлина ili ozljeda, koncentracija AGP-a raste i tijekom kroničnih patoloških stanja kao što je reumatoidni artritis. Uz porast koncentracije AGP-a, mijenja se i njegova glikozilacija što se očituje promjenama u grananju i stupnju sijalinizacije (Gornik i Lauc, 2008.).

Pacijenti s malignim bolestima preoperativno imaju značajno povišene razine AGP-a u odnosu na razine zdravih pojedinaca. Također, AGP glikoforme pacijenata se značajno razlikuju od zdravih pojedinaca, ali i među pojedinim pacijentima, ovisno o njihovom kliničkom statusu te se glikoforme AGP-a mogu koristiti kao markeri progresije i prognoze bolesti. Pacijenti s uznapredovalim malignim promjenama čije AGP glikoforme čine visoko fukozilirani tri- i tetraantenarni glikanski lanci će vjerojatnije imati lošiju prognozu bolesti za razliku od pacijenata koji nemaju takve promjene glikanskog dijela AGP-a (Hashimoto i sur., 2004.).

Kod pacijenata s upalom, reumatoidnim artritismom, rakom i dijabetesom dolazi do povećanja biantenarnih i $\alpha_{1,3}$ -fukoziliranih N-glikanskih struktura. S druge strane, kod trudnoće i terapije estrogenom raste broj visoko razgranatih N-glikana, a broj $\alpha_{1,3}$ -fukoziliranih struktura se smanjuje. Kod upalnih stanja mijenja se razgranatost glikana na N-glikozilacijskim mjestima 1, 3, 4 i 5. U akutnoj upali ima više biantenarnih, a manje tri- i tetraantenarnih struktura te više $\alpha_{1,3}$ -fukozilacije na većini glikozilacijskih mjesta. U kroničnoj upali ima više triantenarnih $\alpha_{1,3}$ -fukozilacija na mjestima 3 i 4 te tetraantenarnih $\alpha_{1,3}$ -fukozilacija na mjestima 3, 4 i 5 (Higai i sur., 2005.).

c. BIOLOŠKE FUNKCIJE

i. IMUNOMODULACIJA

Neutrofili su ključne stanice urođene imunosti koje predstavljaju prvi odgovor organizma na infekciju. Već unutar nekoliko minuta neutrofili migriraju do mjesta infekcije i različitim mehanizmima brane organizam od mikroorganizama. Ti mehanizmi uključuju fagocitozu, oslobađanje reaktivnih kisikovih specija (ROS) te proteaza i antimikrobnih proteina iz granula. Također potiču sintezu kemokina i citokina koji privlače monocite, T limfocite i još neutrofila i tako reguliraju upalni odgovor. Proupalni citokini potiču jetru na sintezu proteina akutne faze koji su važni u koagulaciji i fibrinolizi, inhibiciji proteaza, klirensu toksičnih tvari i modulaciji imunog odgovora. Kao što je već spomenuto, jedan od proteina akutne faze je i AGP koji pripada lipokalinskoj porodici proteina što znači da ima vezno mjesto za transport hidrofobnih liganada. AGP ima ulogu u imunomodulaciji; inhibira migraciju neutrofila i stvaranje ROS-ova, inhibira

limfocitima posredovanu lizu strane stanice, potiče mononuklearne stanice na produkciju pro- i antiupalnih citokina, inhibira agregaciju trombocita i stvaranje kompleksa s lipopolisaharidom (LPS) (Theilgaard-Monch i sur., 2005.). Osim imunomodulatornog, ima i protuupalno djelovanje te ulogu u održavanju kapilarne permeabilnosti (Fourier i sur., 2000.). Najvažniju komponentu imunomodulatornog djelovanja AGP-a čine njegovi ugljikohidratni lanci (Shiyan i Bovin, 1997.).

ii. VEZANJE LIJEKOVA

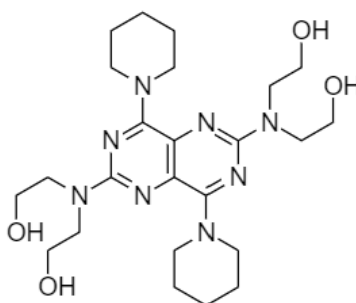
Humani serumski albumin (HSA) i AGP su najvažniji proteini plazme na koje se vežu lijekovi što ima utjecaj na njihovu farmakokinetiku. Tijekom upalnih stanja, koncentracija AGP-a u plazmi raste što utječe na frakciju slobodnog lijeka bez promjene njegove ukupne plazmatske koncentracije. Promjenom slobodne koncentracije lijeka u plazmi mijenja se i intenzitet farmakološkog učinka lijeka. AGP većinom veže bazične i neutralne lijekove. Osim egzogenih tvari (lijekova) AGP veže i endogene molekule poput endogenih steroida (kortizol), a može vezati i neke kisele lijekove poput fenobarbitala, retinoične kiseline. Kiseli lijekovi se pretežito vežu za humani serumski albumin. AGP ima jedno mjesto za vezanje kiselih lijekova, osim za fenobarbital za koji su opisana 2 vezna mjesta. Priroda vezanja lijekova jesu pretežito hidrofobne interakcije zbog hidrofobnih ostataka blizu AGP veznog mjesta. Opseg vezanja liganda na AGP ovisi o konformacijskim promjenama glikoproteina, polarnosti liganda, temperaturi, pH. Povećanjem pH povećava se i vezanje lijekova. Stupanj desijalinizacije također može utjecati na vezanje lijekova. Vezanje lijeka je i stereoselektivno. Osim hidrofobnih interakcija koje prevladavaju, važne su i elektrostatske interakcije (Fourier i sur., 2000.). Kompleks lijeka i proteina plazme također služi kao rezervoar lijeka. Kako se lijek različitim eliminacijskim procesima izbacuje iz organizma, tako se oslobađa vezani dio lijeka i osigurava produljeno djelovanje lijeka (Kratochwil i sur., 2002.).

1.2.LIJEKOVI

a. DIPIRIDAMOL

Dipiridamol (Slika 2) je vazodilatator koji inhibira agregaciju trombocita inhibirajući unos adenozina u trombocite, a inhibira i fosfodiesterazu koja razgrađuje ciklički gvanozin monofosfat (cGMP). Ne koristi se sam u terapiji zbog vrlo slabog učinka, no može se koristiti se u kombinaciji sa 100 mg acetilsalicilne kiseline u prevenciji cerebrovaskularne ishemije ili u kombinaciji s varfarinom u primarnoj profilaksi tromboembolije u bolesnika s umjetnim srčanim zaliscima (Katzung i sur., 2011.).

Određivanje konstante vezanja dipiridamola na AGP nije u fokusu ovog rada, no potrebno ju je odrediti kako bi se dobivena vrijednost iskoristila u izračunu za konstantu vezanja propranolola na AGP. Referentna vrijednost konstante asocijacije dipiridamola na AGP iznosi $1,49 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Yasgar i sur., 2012.).



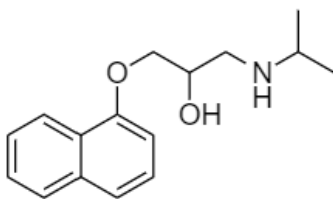
Slika 2. Struktura dipiridamola

b. PROPRANOLOL

Propranolol (Slika 3) je bio prvi β -blokator dokazane djelotvornosti u hipertenziji i ishemijskoj bolesti srca i prvi β -blokator na tržištu (Black i sur., 1964.). Danas su ga uvelike zamijenili kardioselektivni β -blokatori poput metoprolola i atenolola. β -blokatori djeluju tako da se reverzibilno vežu na β -adrenoreceptore i sprječavaju učinak katekolamina i drugih agonista β -adrenergičnih receptora. Lijekovi koji blokiraju β -receptore razlikuju se po relativnim afinitetima za β_1 (srce) i β_2 (bronhi) podtip receptora. Nijedan od klinički dostupnih β -blokatora nije potpuno specifičan za β_1 -receptore, već je selektivnost ovisna o dozi – pri višim se koncentracijama gubi. Svi su blokatori β -adrenergičnih receptora korisni za sniženje krvnog tlaka u blagoj do umjerenoj

hipertenziji, a posebice su korisni u ljudi koji su preživjeli akutni infarkt miokarda ili imaju kronično zatajenje srca.

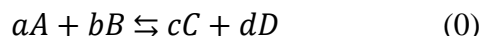
U blagoj do umjerenoj hipertenziji propranolol ostvaruje značajno sniženje krvnog tlaka bez značajnije ortostatske hipotenzije. Primjenjuje se dvaput dnevno, a postoje i pripravci s produljenim oslobađanjem. Propranolol je vrlo lipofilna molekula i opsežno se metabolizira u jetri pa je bioraspoloživost nakon oralne primjene relativno niska, varijabilna te ovisna o dozi. Eliminacija propranolola može biti usporena u jetrenih bolesnika. Trajanje farmakodinamskog učinka ovog lijeka je katkad znatno dulje nego što se može pretpostaviti na temelju poluvijeka eliminacije. Najčešća nuspojava β -blokatora je bradikardija, a javljaju se još i hladni ekstremiteti, blaga sedacija, slikoviti snovi i, rijetko, depresija. Glavni neželjeni učinci propranolola posljedica su neselektivne blokade srčanih, krvožilnih i bronhalnih β -receptora. Blokada β_2 -receptora obično pogoršava postojeću astmu i druge opstruktivne bolesti dišnih putova, dok u zdravih pojedinaca takvih učinaka nema. Ne preporučuje se uporaba β -antagonista u dijabetičara koji se liječe inzulinom, a imaju anamnezu čestih hipoglikemijskih reakcija. U nekih se bolesnika nakon prekida dugotrajne uporabe propranolola pojavljuje sindrom ustezanja karakteriziran nervozom, tahikardijom, pojačanjem anginoznih smetnji ili porastom krvnog tlaka, a u nekolicine je opisana i pojava akutnog infarkta miokarda. Iako je učestalost takvih komplikacija vjerojatno vrlo niska, liječenje propranololom ne smije se prekidati naglo. Sindrom ustezanja posljedica je povećanog broja i/ili osjetljivosti β -receptora posljedično dugotrajnoj farmakološkoj blokadi (Katzung i sur., 2011.). Referentna vrijednost konstante asocijacije propranolola na AGP iznosi $5,21 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Yasgar i sur., 2012.).



Slika 3. Struktura propranolola

1.3.KEMIJSKA RAVNOTEŽA

Za razumijevanje eksperimenta i njegovih rezultata važno je detaljnije objasniti pojam konstante kemijske ravnoteže. Kod reverzibilnih reakcija, uz polaznu reakciju istovremeno se odvija i povratna reakcija. Ukupna reakcija može se općenito prikazati jednadžbom (0).



To jest, a molekula reaktanta A i b molekula reaktanta B daju c molekula produkta C i d molekula produkta D. Ta polazna reakcija odvija se brzinom reakcije koju opisuje jednadžba (1).

$$v_1 = k_1[C]^c[D]^d \quad (1)$$

Istovremeno, c molekula tvari C povratnom reakcijom s d tvari D daju a molekula tvari A i b molekula tvari B. Brzina odvijanja povratne reakcije opisana je jednadžbom (2)

$$v_2 = k_2[A]^a[B]^b \quad (2)$$

U početku reakcije u smjesi se nalaze samo reaktanti A i B te se odvija samo polazna reakcija u kojoj nastaju produkti C i D. Brzina polazne reakcije s vremenom se smanjuje jer opada koncentracija reaktanata. Brzina povratne reakcije s vremenom raste jer raste koncentracija produkata reakcije. Onog trena kad su te dvije brzine jednake, nastupa dinamička ravnoteža. Kemijska ravnoteža je prikazana jednadžbama (3), odnosno (4) i (5).

$$v_1 = v_2 \quad (3)$$

$$k_1[C]^c[D]^d = k_2[A]^a[B]^b \quad (4)$$

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \quad (5)$$

S obzirom da je omjer dviju konstanti također konstantan, prethodni izraz možemo pisati i u obliku jednadžbe (6).

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \quad (6)$$

Taj je izraz također poznat pod imenom *zakon o djelovanju masa* ili *zakon kemijske ravnoteže*. Konstanta K_{eq} predstavlja konstantu kemijske ravnoteže. Konstanta kemijske ravnoteže je vrijednost koja određuje položaj ravnoteže i opisuje u kojem smjeru će se odvijati kemijska

reakcija, odnosno hoće li u reakcijskoj smjesi nakon uspostavljanja ravnoteže prevladavati reaktanti ili produkti. Što je veća konstanta brzine polazne reakcije, a manja konstanta brzine povratne reakcije, to je veća konstanta ukupne reakcije, a to znači da je ravnoteža više pomaknuta na stranu stvaranja produkata reakcije. Vrijednosti konstante kemijske ravnoteže mogu biti reda veličine između 10^{-50} i 10^{50} , a mjerna jedinica konstante ovisi o broju molekula koje sudjeluju u ravnoteži (Filipović i Lipanović, 1987).

Ako se radi o reakcijama tipa protein-lijek, to se najjednostavnije može prikazati osnovnom, reverzibilnom, bimolekularnom reakcijom vezanja u kojoj se molekula A veže za molekulu B pri čemu se formira kompleks AB, što je prikazano jednačbom (7).



U ovom slučaju omjer vezanja je 1:1, a što ovisi o broju veznih mjesta na proteinu. U povratnoj reakciji jedan AB kompleks disocira na A i B. Budući da reakcija vezanja A i B uključuje dva reaktanta, radi se o reakciji drugog reda. Brzina takve reakcije izražava se jednačbom (8).

$$v_1 = k_a[A][B] \quad (8)$$

Gdje je k_a konstanta brzine vezanja za reakciju drugog reda, sa mjernom jedinicom $M^{-1} s^{-1}$, a $[A]$ i $[B]$ označuju slobodne koncentracije molekula A i B dostupne za reakciju u određenom vremenu. Konstanta brzine vezanja za molekule veličine tipičnih proteina obično su u rangu veličine 10^6 do $10^7 M^{-1} s^{-1}$. Te reakcije su ograničene brzinom sudaranja molekula, što je određeno brzinama difuzije molekula te veličinom njihovih površina interakcije. Male molekule difundiraju brže nego velike, no to se nadoknađuje manjim interakcijskim površinama što ograničava većinu konstanti vezanja proteina na ovaj relativno mali raspon (Pollard, 2010.).

Disocijacija kompleksa načinjenog od dvije molekule, AB, prikazana je jednačbom (9).



AB je u toj reakciji jedini reaktant, što ukazuje na reakciju prvog reda. Brzina reakcije prvog reda izražava se jednačbom (10).

$$v_2 = k_d[AB] \quad (10)$$

k_d označava konstantu brzine disocijacije sa mjernom jedinicom s^{-1} , a $[AB]$ označava koncentraciju kompleksa AB. Konstanta brzine disocijacije ukazuje na vjerojatnost raspada kompleksa tijekom vremena.

Konstanta ravnoteže pokazuje afinitet molekula jedne za drugu. Po definiciji, konstanta ravnoteže (K_{eq}) jednaka je omjeru konstante brzine polazne i povratne reakcije ili omjeru koncentracija produkta i slobodne koncentracije reaktanata u ravnoteži, što opisuje jednačba (11).

$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (11)$$

Definirana ovim izrazom, konstanta ravnoteže K_{eq} za reakciju vezanja ima mjernu jednicu M^{-1} . Vrijednost K_{eq} proporcionalna je afinitetu; što je K_{eq} veća, to je reakcija snažnija i reaktanti A i B su u većoj mjeri prevedeni u produkt AB. Recipročnim izrazom (12) opisuje se ravnotežna konstanta disocijacije.

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (12)$$

U ovom obliku, konstanta ravnoteže ima mjernu jednicu M. U medicini se više koristi ovaj izraz. Što je vrijednost K_d niža, reakcija je više pomaknuta prema produktima. Zbog malog raspona konstanta brzine asocijacije, afinitet često određuje konstanta brzine disocijacije. Interakcije niskog afiniteta s vrijednostima K_d u mikromolarnom rasponu imaju konstantu brzine disocijacije oko $1 s^{-1}$. Za reakciju prvog reda, to odgovara poluvremenu disocijacije od 0,7 s ($t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k}$). S druge strane, interakcije visokog afiniteta s vrijednostima K_d u nanomolarnom rasponu imaju konstantu brzine disocijacije oko $0,001 s^{-1}$ i poluvrijeme disocijacije 10 min. Konstanta ravnoteže je termodinamički parametar izravno povezan s promjenom slobodne energije (G) za reakciju u određenim uvjetima, što je opisano jednačbom (13).

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (13)$$

R označuje plinsku konstantu, a T je apsolutna temperatura. Povoljne reakcije imaju veliku K_{eq} i veliku negativnu promjenu slobodne energije, što vodi reakciju prema produktima (Pollard, 2010.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Lijekovi čine važan dio održavanja ljudskoga zdravlja. Stoga je važno, osim njihove farmakodinamike tj. farmakološkog učinka, znati i njihovu farmakokinetiku. Farmakokinetika je proučavanje vremenskog tijeka apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije (ADME) lijeka nakon njegove primjene u tijelo (Fan i de Lannoy, 2014.).

Prije ispitivanja lijekova na ljudima rade se pretklinička ispitivanja kojima se istražuju farmakodinamička, farmakokinetička i toksikološka svojstva tvari u uvjetima *in vitro* te na eksperimentalnim životinjama. Nedostatak učinkovitosti i toksičnost smatraju se glavnim razlozima neuspjeha lijekova, a oboje u velikoj mjeri ovise o farmakokinetici lijeka. Spoj s povoljnom farmakokinetikom ima veću vjerojatnost da bude djelotvoran i siguran. Zbog toga bi pretklinička farmakokinetička evaluacija trebala biti dovoljno sveobuhvatna kako bi se osiguralo da spojevi ne propadnu u kliničkim ispitivanjima. Pretklinički ADME probir omogućava rano uklanjanje slabih kandidata i usmjerava čitav fokus i ograničene financijske resurse na manji broj potencijalnijih kandidata (Singh, 2006.).

Farmakokinetički profil lijeka određuje opseg farmakodinamskog učinka. Jedan od farmakokinetičkih aspekata jest distribucija lijeka. Nakon ulaska u krvotok, lijek se raspoređuje po organizmu. Ta je raspodjela neujednačena zbog razlika u prokrvljenosti pojedinih organa, razlika u vezanju za tkiva radi nejednakog sadržaja lipida ili zbog razlika lokalnog pH. Nakon postizanja distribucijske ravnoteže, razine lijeka u tkivima i u izvanstaničnoj tekućini odražavaju se u plazmatskoj koncentraciji. Krvnom strujom se lijekovi prenose dijelom slobodni, nevezani, a dijelom vezani na sastojke krvi. Kao što je već spomenuto, kiseli se lijekovi obično više vežu na albumine, a bazični na α_1 -kisele glikoproteine ili lipoproteine. Samo nevezana frakcija lijeka može difundirati do mjesta farmakološkog odgovora. Stoga, razina slobodne frakcije u krvotoku određuje koncentraciju lijeka na mjestu djelovanja, a time i učinke lijeka (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika/distribucija>).

Budući da je samo nevezana frakcija lijeka dostupna za farmakološki učinak, važno je znati konstantu vezanja lijekova za proteine plazme. Trenutno nema pravih analiza pomoću kojih bi se u kratkom vremenu mogao analizirati veći broj molekula (eng. *high-throughput* analiza) za mjerenje interakcija lijekova i proteina (Yasgar i sur., 2012.). Ovaj rad opisuje cjeloviti proces kompeticijskog određivanja konstante vezanja propranolola na AGP metodom polarizacije

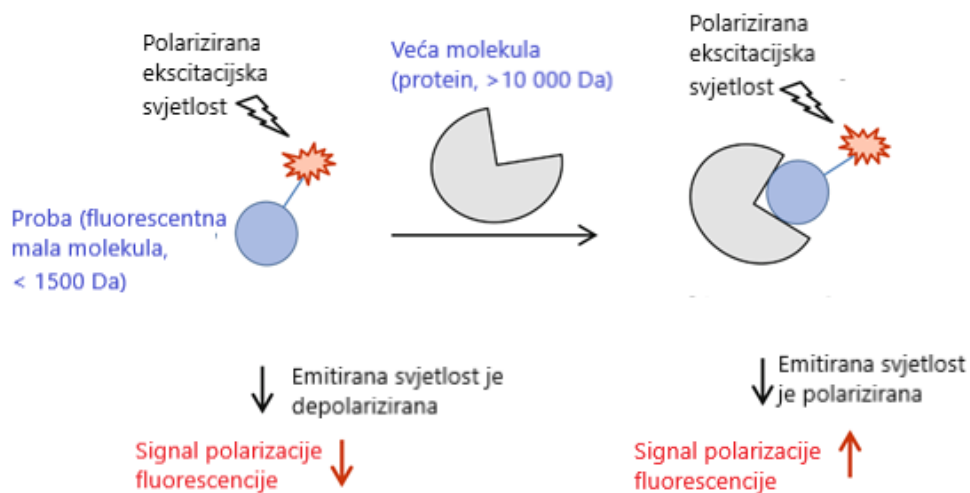
fluorescencije, od samog eksperimenta do računskog dijela. Poznavanje konstante asocijacije lijeka na proteine plazme važno je u određivanju potrebne doze lijeka te u predviđanju doziranja kod pacijenata koji se nalaze u posebnim stanjima, poput trudnoće ili boluju od nekih upalnih bolesti u kojima je koncentracija AGP-a promijenjena.

3. MATERIJALI I METODE

3.1.POLARIZACIJA FLUORESCENCIJE

Metode temeljene na fluorescenciji omogućuju brzo određivanje konstante vezanja velikog broja tvari. Metoda korištena u ovom radu zasniva se na promjeni polarizacije fluorescencije dipiridamola uzrokovanoj kompetitivnim istiskivanjem dipiridamola vezanog na AGP propranololom. Dipiridamol je fluorescentna molekula za koju je poznato da se veže na jedino veliko vezno mjesto AGP-a, a propranolol je lijek čija se konstanta vezanja na AGP određuje u ovom radu. Prednost polarizacije fluorescencije nad korištenjem intenziteta fluorescencije je manja osjetljivost na interferencije fluorescentnih spojeva. Mjerenje polarizacije fluorescencije također ima prednosti i nad klasičnim, već utvrđenim metodama određivanja vezanja liganda za protein (ravnotežna dijaliza, ultracentrifuga i ultrafiltracija), a to su izvođenje u otopini, bez zahtjevne separacije vezanog i slobodnog liganda te mali korišteni volumeni. Polarizacija fluorescencije spada u analize pomoću kojih se u kratkom vremenu može odrediti velik broj tvari (eng. *high-throughput* analize) (Yasgar i sur., 2012.).

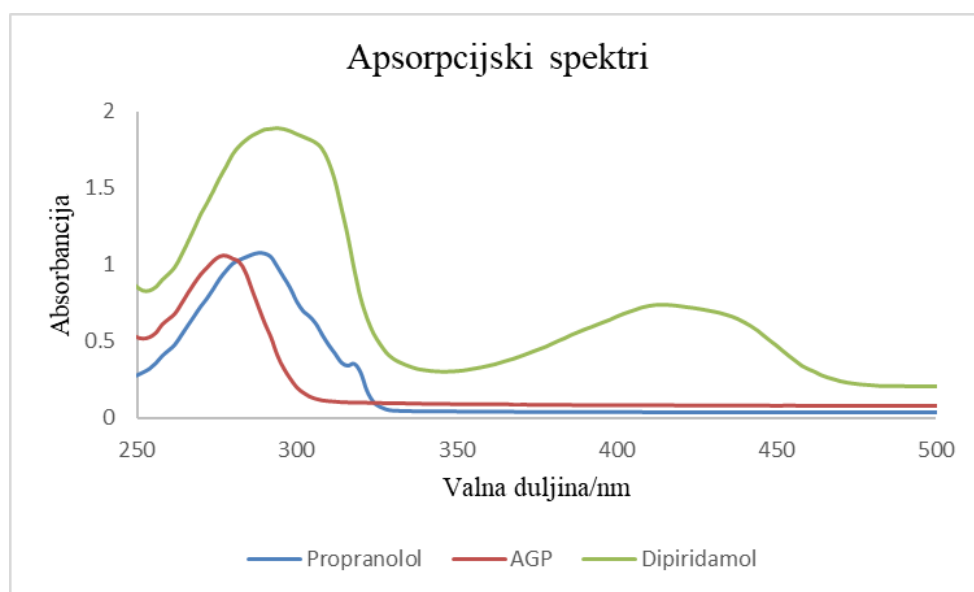
Princip polarizacije fluorescencije, prikazan na Slici 4., je sljedeći: fluorescentno obilježena molekula se ekscitira polariziranom svjetlošću određene valne duljine i emitira svjetlost sa stupnjem polarizacije obrnuto proporcionalnim brzini molekulske rotacije. To svojstvo može se koristiti u mjerenju interakcija male označene molekule s proteinom. Određene intrinzično fluorescentne male molekule vežu se za specifično mjesto na proteinu. Miješanjem proteina, u ovom eksperimentu AGP-a, i određenog fluorofora, u ovom eksperimentu dipiridamola, fluorofor stvara kompleks s proteinom pri čemu on sporije rotira u otopini jer se nalazi u kompleksu veće molekulske mase. Nakon pobuđivanja fluorofora polariziranom svjetlošću određene valne duljine, fluorofor u kompleksu s proteinom neće bitno zakretati polariziranu svjetlost te će emitirana svjetlost i dalje biti značajno polarizirana. Ako se toj otopini doda ispitivana molekula, u ovom eksperimentu propranolol, koja se veže za protein i istiskuje fluorofor iz kompleksa, povećava se slobodna koncentracija fluorofora koji sad neometano i puno brže rotira u otopini zbog manje molekulske mase, što uzrokuje nižu polarizaciju fluorescencije (Moerke, 2009.). Faktori koji utječu na vezanje proteina, poput utjecaja temperature, pH i ionske jakosti, nisu istraživani u ovom radu.



Slika 4. Shematski prikaz principa FP. Kad se mala molekula (plavi krug) s fluorescentnom oznakom (narančasti oblik) eksitira polariziranom svjetlošću na valnoj duljini fluorofora, ligand se značajno reorijentira zbog čega je emitirana zraka jako depolarizirana i signal polarizacije fluorescencije nizak. Ako je ligand vezan na protein (sivi oblik), nastali kompleks se značajno sporije rotira i emitirana zraka zadržava svoju polarizaciju (Du, 2015.).

3.2. TITRACIJE

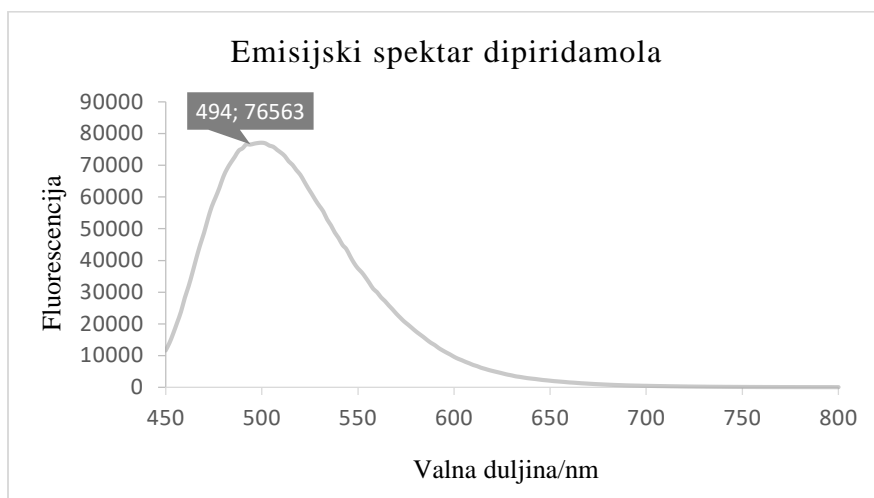
U eksperimentu su izvedene dvije titracije, najprije titracija dipiridamola AGP-om, a zatim titracija otopine dipiridamola i AGP-a pomoću propranolola kao kompetitora. Korišteni su komercijalno dostupni nativni humani AGP (proizvođač Sigma), dipiridamol (proizvođač Sigma) i propranolol hidroklorid (proizvođač Sigma) analitičkog stupnja čistoće (p.a.). Mjerenja su rađena na sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu pri pH 7,4. Koncentracije matičnih otopina AGP-a, propranolola i dipiridamola određene su spektrofotometrijski.



Slika 5. Apsorpcijski spektri AGP-a ($[AGP]=5 \cdot 10^{-5} M$) propranolola ($[propranolol]=3 \cdot 10^{-4} M$) i dipiridamola ($[dipiridamol]=5 \cdot 10^{-4} M$)

Budući da i AGP i propranolol apsorbiraju pobudom na 280 nm, direktnim mjerenjem fluorescencije dolazilo bi do učinaka unutarnjeg filtra (eng. *inner filter* efekt). Primarni učinak unutarnjeg filtra nastaje apsorpcijom ekscitirajuće svjetlosti što uzrokuje da manje svjetlosti dosegne svaki sljedeći sloj otopine kroz koji ta svjetlost prolazi. Sekundarni učinak unutarnjeg filtra je uzrokovan reapsorpcijom fluorescencije. Navedeni efekti čine značajan nedostatak metode fluorescencije jer uzrokuju nelinearnu ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji fluorescentne tvari (Fonin i sur., 2014.). Na slici 5. vidi se kako pobudom svjetlošću valne duljine od 280 nm, i AGP i propranolol apsorbiraju svjetlost što bi dovelo do značajnih primarnih učinaka unutarnjeg filtra, a time i velikih grešaka u određivanju konstante vezanja propranolola na AGP. Stoga se konstanta vezanja propranolola na AGP u ovom eksperimentu određuje mjerenjem promjene polarizacije fluorescencije istiskivanjem dipiridamola iz kompleksa s AGP-om pomoću

propranolola. Apsorpcijski spektar dipiridamola, koji se vidi na Slici 5., pokazuje kako je drugi maksimum apsorpcije izvan raspona valnih duljina na kojima apsorbiraju i AGP i propranolol.



Slika 6. Emisijski spektar dipiridamola

Za valnu duljinu na kojoj je mjerena polarizacija fluorescencije dipiridamola odabrano je 494 nm, odnosno maksimum emisije dipiridamola koji se vidi na Slici 6.

Za prvu titraciju pripremljene su matične otopine AGP-a koncentracije $2 \cdot 10^{-5}$ M i dipiridamola koncentracije $2 \cdot 10^{-6}$ M. U 11 Eppendorf epruveta napravljene su otopine ukupnog volumena od 300 μ L pri stalnoj koncentraciji dipiridamola ($1 \cdot 10^{-6}$ M) i variranoj koncentraciji AGP-a. Nakon sat vremena, po 200 μ L otopine je prebačeno iz Eppendorf epruveta u Tecan pločice s 96 jažica sa crnim, ravnim dnom, centrifugirano 2 minute na 2000 okretaja u minuti u uređaju PlateFuge Microplate MicroCentrifuge proizvođača Benchmark Scientific i stavljeno u Tecan Microplate Reader Spark M10 uređaj nakon čega je izmjerena polarizacija fluorescencije pripremljenih otopina. Polarizacija fluorescencije izmjerena je i nakon 2, 3 i 4 sata.

Tablica 1. Priprema otopina za titraciju AGP-a i dipiridamola

Uzorak	V(AGP)/ μL	V(dipiridamol)/ μL	V(pufer)/ μL	c(AGP)/M
1.	0	150	150	0
2.	10	150	140	$6,67 \cdot 10^{-7}$
3.	20	150	130	$1,33 \cdot 10^{-6}$
4.	30	150	120	$2,00 \cdot 10^{-6}$
5.	50	150	100	$3,33 \cdot 10^{-6}$
6.	70	150	80	$4,67 \cdot 10^{-6}$
7.	90	150	60	$6,00 \cdot 10^{-6}$
8.	110	150	40	$7,33 \cdot 10^{-6}$
9.	130	150	20	$8,67 \cdot 10^{-6}$
10.	150	150	0	$1,00 \cdot 10^{-5}$
11.	0	0	300	0

Za drugu titraciju pripremljene su matične otopine dipiridamola koncentracije $3 \cdot 10^{-6}$ M, AGP-a koncentracije $1,5 \cdot 10^{-5}$ M i propranolola koncentracije $6 \cdot 10^{-4}$ M. U 12 Eppendorf epruveta pripremljene su otopine stalne koncentracije dipiridamola ($1 \cdot 10^{-6}$ M) i AGP-a ($5 \cdot 10^{-6}$ M) uz variranje koncentracija propranolola. Nakon sat vremena, 200 μL otopine je iz Eppendorf epruveta prebačeno u Tecan pločice s 96 jažica sa crnim, ravnim dnom, centrifugirano 2 minute na 2000 okretaja u minuti u uređaju PlateFuge Microplate MicroCentrifuge proizvođača Benchmark Scientific i stavljeno u Tecan Microplate Reader Spark M10 uređaj nakon čega je izmjerena polarizacija fluorescencije pripremljenih otopina.

Tablica 2. Priprema otopina za titraciju AGP-a i dipiridamola

Uzorak	V(AGP)/ μ L	V(dipiridamol)/ μ L	V(pufer)/ μ L	V(propranolol)/ μ L	c(propranolol)/M
1.	100	100	100	0	0
2.	100	100	90	10	$2,00 \cdot 10^{-5}$
3.	100	100	80	20	$4,00 \cdot 10^{-5}$
4.	100	100	70	30	$6,00 \cdot 10^{-5}$
5.	100	100	60	40	$8,00 \cdot 10^{-5}$
6.	100	100	50	50	$1,00 \cdot 10^{-4}$
7.	100	100	40	60	$1,20 \cdot 10^{-4}$
8.	100	100	30	70	$1,40 \cdot 10^{-4}$
9.	100	100	20	80	$1,60 \cdot 10^{-4}$
10.	100	100	10	90	$1,80 \cdot 10^{-4}$
11.	100	100	0	100	$2,00 \cdot 10^{-4}$
12.	0	0	300	0	0

3.3. IZRAČUN KONSTANTE VEZANJA

Konstante vezanja propranolola i dipiridamola na AGP određivane su računski na dva načina; pomoću programa Specfit te programa Excel koristeći jednadžbe od (14) do (29) opisane u ovom odlomku.

a. REAKCIJE VEZANJA

i. DIREKTNO VEZANJE

U prvoj titraciji odvija se reakcija vezanja dipiridamola na AGP koja služi za određivanje konstante vezanja dipiridamola na AGP. Fluorescentni ligand, L_S , odnosno dipiridamol veže se za receptor, R , odnosno AGP. Ako se ne uzmu u obzir potencijalna nespecifična vezivanja, to se može prikazati jednostavnom jednadžbom (14) za koju vrijede izrazi od (15) do (18).



$$K_{D1} = \frac{[R][L_S]}{[RL_S]} \quad (15)$$

$$[R_T] = [R] + [RL_S] \quad (16)$$

$$[L_{ST}] = [L_S] + [RL_S] \quad (17)$$

$$F_{SB} = 1 - \frac{[L_S]}{[L_{ST}]} \quad (18)$$

$[R]$, $[L_S]$ i $[RL_S]$ označavaju slobodnu koncentraciju receptora (AGP-a), fluorescentno označenog liganda, odnosno u eksperimentu dipiridamola koji nije fluorescentno označen, već fluorescira sam po sebi i fluorescentni ligand-receptor kompleksa (dipiridamol-AGP kompleksa). K_{D1} je konstanta disocijacije kompleksa L_S i R , odnosno kompleksa dipiridamol-AGP. $[R_T]$ i $[L_{ST}]$ su ukupne korištene koncentracije receptora i fluorescentnog liganda, a F_{SB} prikazuje frakciju vezanog fluorescentnog liganda. Ukupna koncentracija fluorescentnog liganda održavana je konstantnom, a odnos između nezavisne varijable, odnosno $[R_T]$ i zavisne varijable, odnosno F_{SB} se mjeri kako bi se mogla procijeniti K_{D1} . Rješavanjem jednadžbi od (15) do (18) za $[R_T]$ dobiva se jednadžba (19).

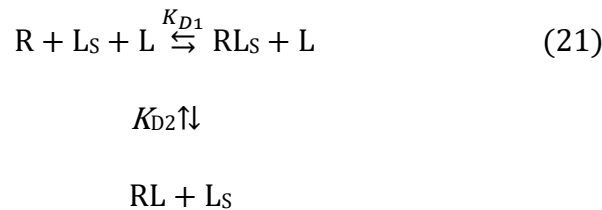
$$[R_T] = \frac{-[L_{ST}]F_{SB}^2 + (K_{D1} + [L_{ST}])F_{SB}}{1 - F_{SB}} \quad (19)$$

Rješavanjem jednadžbi od (15) do (18) za F_{SB} dobiva se jednadžba (20).

$$F_{SB} = \frac{K_{D1} + [L_{ST}] + [R_T] - \sqrt{(K_{D1} + [L_{ST}] + [R_T])^2 - 4[L_{ST}][R_T]}}{2[L_{ST}]} \quad (20)$$

ii. POTPUNO KOMPETITIVNO VEZANJE

Druga titracija prati vezanje propranolola za AGP u prisutnosti dipiridamola te služi za određivanje konstante vezanja propranolola za AGP. Dakle, u kompetitivnim FP testovima, neoznačeni ligand, L, odnosno u eksperimentu propranolol, i fluorescentno obilježeni ligand, L_S, odnosno dipiridamol, natječu se za vezanje na neobilježeni receptor, R, odnosno AGP. Potpuno kompetitivno vezivanje znači da vezanje obilježenih i neobilježenih liganda podrazumijeva međusobno isključivanje. Ne uzimajući u obzir potencijalna nespecifična vezivanja, ove interakcije mogu se prikazati shemom (21).



Za shemu vrijede jednadžbe od (15) do (18) i od (22) do (24).

$$K_{D2} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (22)$$

$$[R_T] = [R] + [RL_S] + [RL] \quad (23)$$

$$[L_T] = [L] + [RL] \quad (24)$$

[L], [RL] i [L_T] označavaju koncentraciju slobodnog neoznačenog liganda (propranolola), koncentraciju kompleksa neobilježeni ligand-receptor (kompleks propranolol-AGP) i ukupnu ulaznu koncentraciju neoznačenog liganda. K_{D2} je konstanta disocijacije interakcije između L i R, odnosno disocijacije kompleksa propranolola i AGP-a. U svim kompetitivnim vrstama eksperimenata pretpostavka je da je [R_T] > [L_{ST}]. U suprotnom, znatna količina slobodnog fluorescentnog liganda uvijek bi bila prisutna i ometala mjerenja. Eksperimentalno, [R_T] i [L_{ST}] se održavaju konstantnima, a odnos između [L_T] (nezavisne varijable) i F_{SB} (zavisne varijable) se analizira kako bi se dobila procjena K_{D2}. K_{D1} se prethodno dobije iz eksperimenta za izravno vezanje. Rješavajući jednadžbe za [L_T] i uklanjajući [R], [L_S], [RL_S], [L] i [RL], dobiva se jednadžba (24).

$$[L_T] = \frac{[(K_{D1} - K_{D2})F_{SB} + K_{D2}][[L_{ST}]F_{SB}^2 - (K_{D1} + [L_{ST}] + [R_T])F_{SB} + [R_T]]}{(1 - F_{SB})F_{SB}K_{D1}} \quad (24)$$

Rješavanjem jednadžbe za F_{SB} dobiva se jednadžba (25) (Roehrl i Wang, 2004.).

$$F_{SB} = \frac{2\sqrt{(d^2 - 3e)} \cos(\theta/3) - d}{3K_{D1} + 2\sqrt{(d^2 - 3e)} \cos(\theta/3) - d} \quad (25)$$

Parametri d , e , f i θ računaju se prema izrazima od (26) do (29).

$$d = K_{D1} + K_{D2} + [L_{ST}] + [L_T] - [R_T] \quad (26)$$

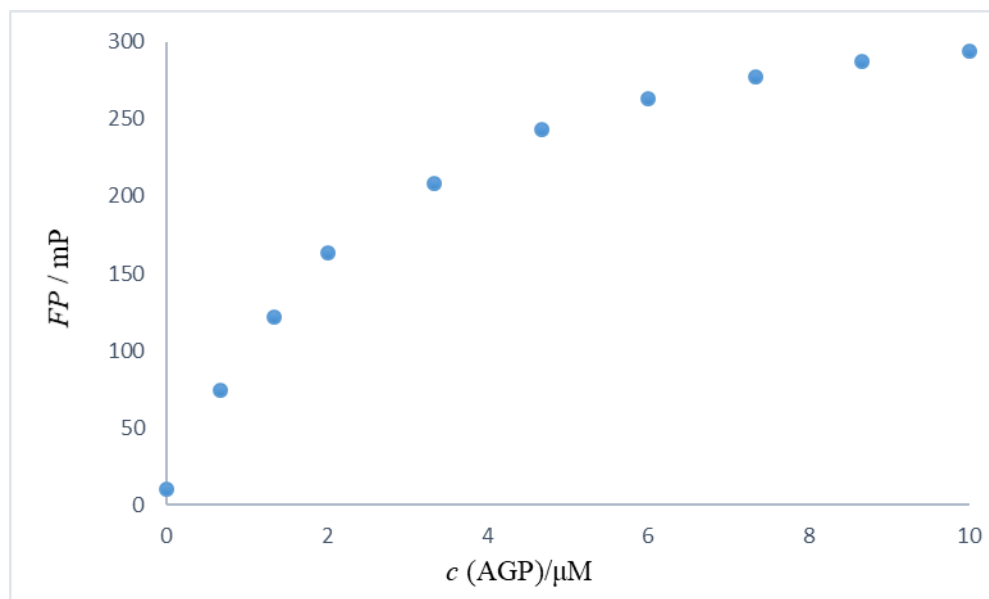
$$e = ([L_T] - [R_T])K_{D1} + ([L_{ST}] - [R_T])K_{D2} + K_{D1}K_{D2} \quad (27)$$

$$f = -K_{D1}K_{D2}[R_T] \quad (28)$$

$$\theta = \cos^{-1} \left[\frac{-2d^3 + 9de - 27f}{2\sqrt{(d^2 - 3e)^3}} \right] \quad (29)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U prvoj titraciji, mijenja se koncentracija AGP-a dok je koncentracija dipiridamola stalna. Kako se povećava koncentracija AGP-a, tako raste i frakcija dipiridamola vezanog za AGP. Time raste i signal polarizacije fluorescencije koji je proporcionalan koncentraciji kompleksa dipiridamol-AGP kao što je prikazano na Slici 7.



Slika 7. Ovisnost polarizacije fluorescencije o koncentraciji AGP-a

Frakcija vezanog dipiridamola (F_{SB1}) može se izračunati kao omjer izmjerene polarizacije fluorescencije (umanjene za $FP_{0\%}=10$, tj. vrijednost FP signala u otopini u kojoj nema AGP-a) i maksimuma polarizacije fluorescencije. Kako maksimum polarizacije fluorescencije nije poznat, njegova se vrijednost podešava, odnosno najprije pretpostavi na temelju platoa krivulje ovisnosti polarizacije fluorescencije o koncentraciji kompleksa prikazanog na Slici 7. Osim realne vrijednosti F_{SB1} , treba se odrediti i modelna vrijednost pomoću formule (20). Uvrštavanjem $K_{D1}=1/K_{A1}$ u formulu (20), dobije se jednadžba (20a).

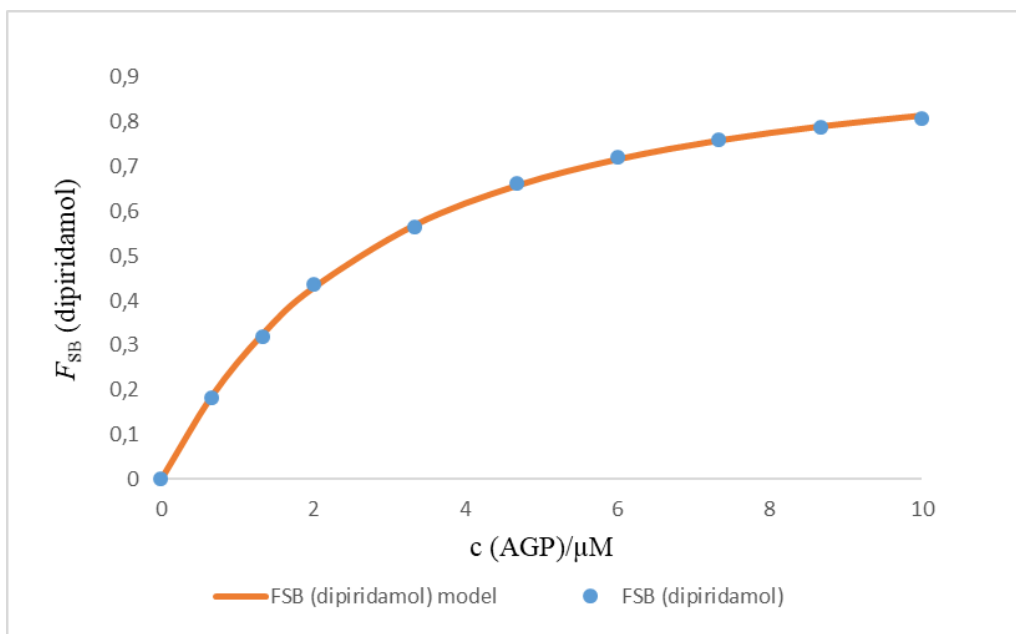
$$F_{SB} = \frac{1/K_{A1} + [L_{ST}] + [R_T] - \sqrt{(1/K_{A1} + [L_{ST}] + [R_T])^2 - 4[L_{ST}][R_T]}}{2[L_{ST}]} \quad (20a)$$

K_{A1} označuje konstantu vezanja, tj. asocijacije dipiridamola za AGP. Vrijednost $[R_T]$ je poznata i označuje ukupnu koncentraciju AGP-a u otopinama, vrijednost $[L_{ST}]$ označuje ukupnu koncentraciju dipiridamola u otopinama te je također poznata i jednaka u svim otopinama ($1 \cdot 10^{-6}$

M). K_{A1} vrijednost je nepoznata zbog čega se na početku mora podešavati. Na temelju izračunatih vrijednosti F_{SB1} i $F_{SB1 \text{ model}}$, za svaku otopinu se računa još kvadrat razlike (sq. diff.) i na kraju suma tih kvadrata (SSD). Matematička metoda koja se koristi je metoda minimalnog kvadrata. Pomoću Excel solvera traži se minimum vrijednosti SSD variranjem vrijednosti K_{A1} i maksimuma polarizacije fluorescencije ($FP_{100\%}$). Nakon što solver pronađe minimum sume kvadrata razlike (SSD), dobiju se vrijednosti $FP_{100\%}$ od 351,11 i K_{A1} od $4,78 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, odnosno $\log K_{A1}$ iznosi $5,68 \pm 0,02$. Na Slici 8. prikazana je dobivena ovisnost frakcije vezanog dipiridamola o ukupnoj koncentraciji AGP-a.

Tablica 3. Podaci za izračun vrijednosti konstante vezanja dipiridamola na AGP

Uzorak	$[R_T]/\mu\text{M}$	Polarizacija fluorescencije/mP	F_{SB1}	$F_{SB1 \text{ model}}$	sq. diff.
1.	0	10	0	0	0
2.	0,67	74	0,1823	0,1875	$2,75 \cdot 10^{-5}$
3.	1,33	122	0,3190	0,3248	$3,29 \cdot 10^{-5}$
4.	2,00	163	0,4358	0,4291	$4,51 \cdot 10^{-5}$
5.	3,33	208	0,5640	0,5691	$2,66 \cdot 10^{-5}$
6.	4,67	243	0,6637	0,6575	$3,81 \cdot 10^{-5}$
7.	6,00	263	0,7206	0,7165	$1,68 \cdot 10^{-5}$
8.	7,33	277	0,7605	0,7587	$3,35 \cdot 10^{-6}$
9.	8,67	287	0,7889	0,7904	$1,83 \cdot 10^{-6}$
10.	10,00	294	0,8089	0,8145	$3,24 \cdot 10^{-5}$
					SSD=0,000225



Slika 8. Ovisnost frakcije vezanog dipiridamola o ukupnoj koncentraciji AGP-a (graf dobiven metodom minimalnog kvadrata)

Konstanta vezanja dipiridamola na AGP, osim u Excelu, određivana je i pomoću računalnog programa Specfit (<http://www.kingkongsci.co.uk/specfitglobalanalysis.htm>). Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se dipiridamol veže za nativni AGP u omjeru 1:1.

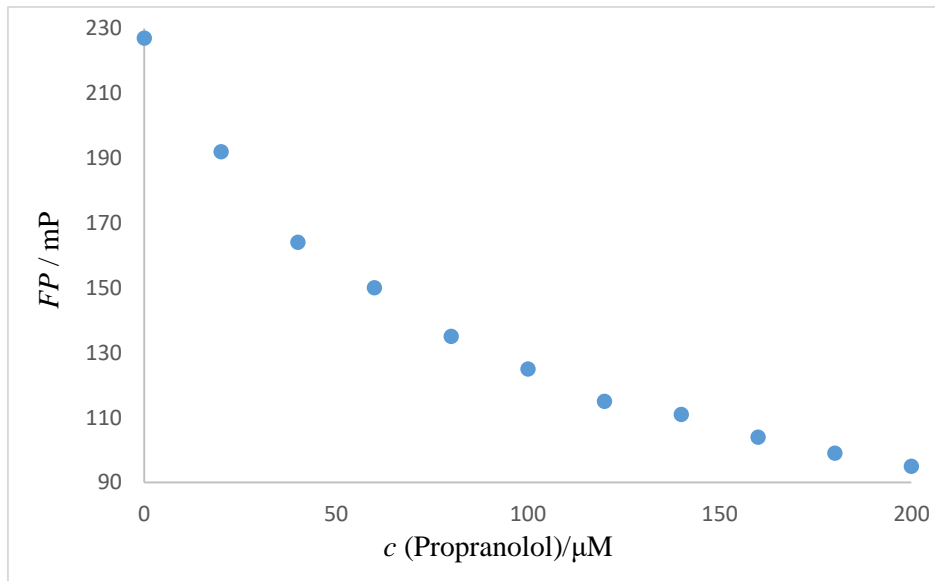
A1.DEM		SPECFIT MODEL MENU			06-20-2020	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters	
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	ñ(log B)	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B			
100	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
110	y	u	v	5.73506D+00	2.41395D-02	

Slika 9: Model vezanja dipiridamola i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija

Logaritam konstante vezanja dipiridamola za AGP iznosi $5,74 \pm 2,41 \cdot 10^{-2}$ ili $K_{A1} 5,43 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ što se vidi na Slici 9. Dobivene vrijednosti su slične onima dobivenima pomoću solvera u Excelu.

Analizom otopina nakon 2, 3 i 4 sata nisu uočene razlike u izmjerenoj polarizaciji fluorescencije što dovodi do zaključka kako se reakcija vezanja dipiridamola na AGP događa u kraćem vremenu.

U drugoj titraciji, koncentracije dipiridamola i AGP-a su stalne ($1 \cdot 10^{-6}$ M i $5 \cdot 10^{-6}$ M), ali je koncentracija AGP-a veća kako suvišak dipiridamola ne bi ometao vezanje propranolola. Otopinama se dodaje propranolol koji istiskuje dipiridamol iz kompleksa s AGP-om. Kako frakcija propranolola vezanog za AGP raste, tako signal polarizacije fluorescencije opada, što se može uočiti na Slici 10.



Slika 10. Ovisnost polarizacije fluorescencije o koncentraciji propranolola

F_{SB2} može se izračunati kao omjer izmjerene polarizacije fluorescencije i maksimalne polarizacije fluorescencije $FP_{0\%}$, pomoću jednadžbe (30).

$$F_{SB2} = \frac{FP_x - FP_{100\%}}{FP_{max} - FP_{100\%}} \quad (30)$$

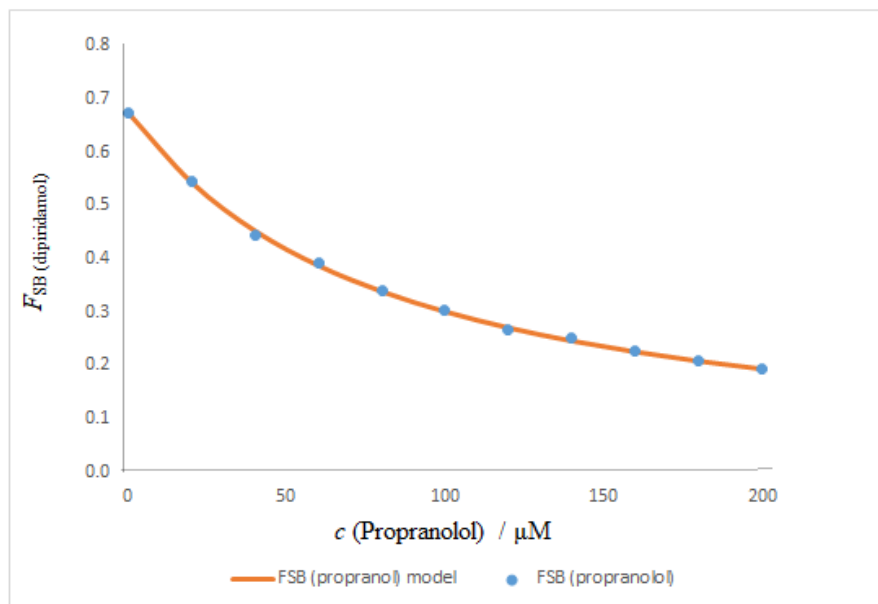
U tom se omjeru od obje vrijednosti još mora oduzeti $FP_{100\%}$, odnosno minimum polarizacije fluorescencije koji se događa u onom trenutku kad postoji veliki suvišak propranolola u otopini. Maksimum polarizacije fluorescencije ($FP_{0\%}$) je u onoj točki gdje nema propranolola u otopini, a sav dipiridamol je u kompleksu s AGP-om. F_{SB2} model računa se prema jednadžbi (25). Vrijednosti $FP_{0\%}$ i $FP_{100\%}$ su nepoznate i na početku se moraju procijeniti. Vrijednost K_{D1} označava konstantu disocijacije dipiridamola s AGP-a i dobivena je na temelju prve titracije kao recipročna vrijednost konstante asocijacije dipiridamola na AGP. Prije računanja F_{SB2} , moraju se odrediti parametri d , e , f i θ prema izrazima (26), (27), (28) i (29). Svi navedeni parametri, osim f , ovise o koncentraciji

propranolola te su različiti za svaku otopinu , dok je vrijednost f konstantna za ovu titraciju i iznosi -229,9.

Tablica 4. Podaci za izračun vrijednosti konstante vezanja propranolola na AGP

Uzorak	[L _T]/μM	Polarizacija fluorescencije/mP	d	e	θ	F_{SB}	$F_{SB \text{ model}}$	$sq. \text{ diff.}$
1.	0	227	20	-52,47	2,3944	0,7192	0,6742	0,002024
2.	20	192	40	-10,67	2,8341	0,5846	0,5399	0,001991
3.	40	164	60	31,13	2,9673	0,4769	0,4476	0,00086
4.	60	150	80	72,93	3,0247	0,4231	0,3819	0,001695
5.	80	135	100	114,73	3,0552	0,3654	0,3331	0,001045
6.	100	125	120	156,53	3,0737	0,3269	0,2953	0,000999
7.	120	115	140	198,33	3,0859	0,2885	0,2653	0,000536
8.	140	111	160	240,13	3,0947	0,2731	0,2408	0,001039
9.	160	104	180	281,93	3,1011	0,2462	0,2205	0,000656
10.	180	99	200	323,73	3,1060	0,2269	0,2034	0,000553
11.	200	95	220	365,53	3,1099	0,2115	0,1887	0,000519
								SSD=0,011918

Metoda pomoću koje se traži K_{D2} također je metoda najmanjih kvadrata. Pomoću Excel solvera traži se minimum vrijednosti SSD variranjem vrijednosti K_{D2} , $FP_{0\%}$ i $FP_{100\%}$. Nakon što solver pronađe minimum sume kvadrata razlike, dobiju se vrijednosti $FP_{0\%}$ od 300, $FP_{100\%}$ od 40 i K_{A2} od $4,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, odnosno $\log K_{A2}$ iznosi $4,66 \pm 0,02$, a dobivena ovisnost frakcije vezanog dipiridamola o ukupnoj koncentraciji propranolola prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Ovisnost frakcije vezanog dipiridamola o ukupnoj koncentraciji propranolola (graf dobiven metodom minimalnog kvadrata)

Konstanta vezanja propranolola na AGP određivana je i pomoću Specfit programa (<http://www.kingkongsci.co.uk/specfitglobalanalysis.htm>). Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se propranolol veže za nativni AGP u omjeru 1:1.

A2.DEM		SPECFIT MODEL MENU			06-20-2020	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			5 Parameters	
MxABHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	ñ(log B)	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B			
100	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
001	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
101	y	u	f	5.73506D+00	0.00000D+00	
011	n	u	v	4.44866D+00	2.07637D-02	

Slika 12: Model vezanja propranolola na AGP uz prisutnost dipiridamola, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija

Logaritam konstante vezanja propranolola na AGP iznosi $4,45 \pm 2,08 \cdot 10^{-2}$ ili $K_{A2} 2,81 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, što je prikazano na Slici 12. Dobivene vrijednosti slične su onima dobivenima pomoću solvera u Excelu.

Tablica 5. Sažeti prikaz rezultata s referentnim vrijednostima

	Specfit rezultati		Excel rezultati		Referentne vrijednosti (Yasgar i sur., 2012.)	
	K_A/M^{-1}	$\log K_A$	K_A/M^{-1}	$\log K_A$	K_A/M^{-1}	$\log K_A$
DIPIRIDAMOL	$5,43 \cdot 10^5$	5,74	$4,78 \cdot 10^5$	5,68	$1,49 \cdot 10^5$	5,17
PROPRANOLOL	$2,81 \cdot 10^4$	4,45	$4,55 \cdot 10^4$	4,66	$5,28 \cdot 10^4$	4,72

5. ZAKLJUČCI

Provedenim eksperimentom dobivena je konstanta vezanja propranolola na AGP od $4,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Excel), odnosno $2,81 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Specfit). Za bolje razumijevanje rezultata, u praksi se često izmjerena konstanta kemijske ravnoteže (K_A) između lijekova i AGP-a prikazuje kao konstanta disocijacije, $K_D = 1/K_A$, vrijednost koja prikazuje afinitet spojeva (lijekova), za vezno mjesto AGP-a. Kada je koncentracija liganda tj. lijeka jednaka vrijednosti K_D , tada je ligand vezan na 50% raspoloživih veznih mjesta.

Rezultati su dobiveni na dva načina, pomoću jednadžbi od (14) do (29) i metode najmanjeg kvadrata u Excelu, te pomoću Specfit programa. Vrijednosti dobivene rješavanjem jednadžbi u Excelu bolje koreliraju s referentnim vrijednostima ($5,21 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Dakle, dobivena konstanta vezanja propranolola na AGP iznosi $4,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, odnosno konstanta disocijacije K_D je $2,20 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Polarizacija fluorescencije je metoda pogodna za određivanje interakcija između lijekova i proteina plazme. Zbog svoje jednostavnosti, brzine, malih volumena, mogućnosti analize velikog broja lijekova u kratkom vremenu i manje interferencija nego mjerenje intenziteta fluorescencije, pruža brojne prednosti nad klasičnim metodama mjerenja interakcija lijekova i proteina (ravnotežna dijaliza, ultracentrifuga i ultrafiltracija) i nad fluorescencijom.

Provedeni eksperiment i jednadžbe opisane u poglavlju 3.3. pružaju dobar model za izračun konstante vezanja propranolola na AGP.

6. LITERATURA

Black JW, Crowther AF, Shanks RG, Smith LH, Dornhorst AC. A new adrenergic betareceptor antagonist. *The Lancet*, 1964, 283, 1080-1081.

Distribucija, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika/distribucija>, pristupljeno 14.6.2020.

Du Y. Fluorescence Polarization Assay to Quantify Protein-Protein Interactions in an HTS Format. *Springer protocols*, 2015

Fan J. i AM de Lannoy I. Pharmacokinetics. *Biochemical pharmacology*, 2014, 87, 93-120.

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1987, str. 481- 505.

Fonin AV, Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. *Plos one*, 2014.

Fourier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1482, 157-171.

Gornik O. i Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease Markers*, 2008, 25, 267-278.

Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi AR, Poland DC, van Dijk W, Kuwano H, Kochibe N, Yazawa S. α 1-Acid Glycoprotein Fucosylation as a Marker of Carcinoma Progression and Prognosis. *Cancer*, 2004, 101, 2825-2836.

Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725, 128-135.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija*. Medicinska naklada, 11. izdanje, Zagreb, 2011.

Kratochwil NA, Huber W, Mueller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochemical pharmacology*, 2002, 64, 1355-1374.

Moerke NJ. Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid-Protein Binding. *Current Protocols in Chemical Biology*, 2009, 1, 1-15.

Pollard TD. MBoC technical perspective: A guide to simple and informative binding assays. *Molecular biology of the cell*, 2010, 21, 4061-4067.

Roehrl MHA, Wang JY, Wagner G. A General Framework for Development and Data Analysis of Competitive High-Throughput Screens for Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions by Fluorescence Polarization. *Biochemistry* 2004, 43, 16056-16066.

Shiyan SD i Bovin NV. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of α_1 -acid glycoprotein. *Glycoconjugate Journal*, 1997, 14, 631-638.

Singh SS. Preclinical pharmacokinetics: An approach towards safer and efficacious drugs. *Current drug metabolism*, 2006, 7, 165 – 182.

Smith KD, Behan J, Matthews-Smith G, Maglioco AM.). Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer. *IntechOpen*, 2012.

Specfit Global Analysis, 2016., <http://www.kingkongsci.co.uk/specfitglobalanalysis.htm>, pristupljeno 19.8.2020.

Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Rasmussen, Niemann CU, Udby L, Borup R, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Porse BT, Borregaard N. Highly glycosylated α_1 -acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2005, 78, 462-470.

Yasgar A, Furdas SD, Maloney DJ, Jadhav A, Jung M, Simeonov A. High-Throughput 1,536-Well Fluorescence Polarization Assays for α_1 -Acid Glycoprotein and Human Serum Albumin Binding. *Plos One*, 2012, 7, 9.

7. SAŽETAK

U ovom radu određivana je konstanta asocijacije propranolola na α -1 kiseli glikoprotein (AGP). Mjerenje interakcija između molekule lijeka i proteina plazme važno je zbog toga što o tome ovisi dostupnost lijeka za farmakološki učinak, a time i doziranje lijekova. U akutnim i nekim kroničnim upalnim stanjima koncentracija AGP-a je povećana što bi moglo zahtijevati povećanje doziranja nekih lijekova koji se vežu na AGP. Samo nevezana frakcija lijeka može iz krvotoka doći do mjesta djelovanja i pokazati učinak. Korištena metoda polarizacije fluorescencije mjeri interakcije između lijeka i proteina na način da prilikom vezanja fluorescentnog lijeka na protein dolazi do usporavanja rotacije kompleksa u odnosu na brzinu rotacije same molekule lijeka zbog čega polarizacija fluorescencije lijeka raste. U eksperimentu je najprije određena konstanta asocijacije dipiridamola na AGP. Zatim je otopina dipiridamola i AGP-a titrirana propranololom čime je dipiridamol istisnut iz kompleksa s AGP-om. Oslobođanjem dipiridamola iz kompleksa, njegova slobodna rotacija raste i smanjuje se njegova polarizacija tj. polarizacija fluorescencije opada. Uz Specfit program, odnosno jednadžbe opisane u poglavlju 3.3. i metode minimalnog kvadrata u Excelu, na temelju izmjerene ovisnosti polarizacije fluorescencije dipiridamola o koncentraciji propranolola izračunali smo konstantu asocijacije propranolola na AGP. Rezultati dobiveni pomoću Excela i metode minimalnog kvadrata nešto bolje koreliraju s referentnim vrijednostima od rezultata dobivenih u Specfitu te se zaključuje kako su jednadžbe opisane u poglavlju 3.3. dobar model za izračun konstante asocijacije propranolola na AGP te je polarizacija fluorescencije metoda izbora mjerenja vezanja na AGP kod nekih lijekova.

SUMMARY

The goal of this work was to determine association constant of propranolol binding to α -1 acid glycoprotein (AGP). Measuring the interactions between the drug molecule and plasma proteins is important because the availability of the drug for the pharmacological effect and also the dosage of the drug depends on it. In acute and some chronic inflammatory conditions, the concentration of AGP is increased, which could require increase of the dosage of the drug. Only the unbound fraction of the drug can reach the site of action and show a pharmacological effect. The fluorescence polarization method measures drug-protein interactions by measuring change in fluorescence polarization of fluorescent drug due to binding on a protein. The complex of drug and a protein has a slower rotation than free drug molecule and therefore shows increase in fluorescence polarization. In our case, adding propranolol in the solution where AGP and dipyridamole are present, displaces dipyridamol from the complex. Releasing of dipyridamole from the complex increases its rotation which diminishes his polarization, i.e. the fluorescence polarization decreases. By using the Specfit program or the equations described in chapter 3.3. and the method of least squares in Excel the association constant of propranolol binding to AGP is calculated. The results obtained using Excel method correlate little bit better with the reference values than the results obtained in Specfit and it is concluded that the equations described in chapter 3.3. provide a good model for calculating the association constant of propranolol to AGP.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za opću i anorgansku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KOMPETICIJSKO ODREĐIVANJE KONSTANTE VEZANJA PROPRANOLOLA NA α -1 KISELI GLIKOPROTEIN POLARIZACIJSKOM FLUORESCENCIJOM

Karla Mustač

SAŽETAK

U ovom radu određivana je konstanta asocijacije propranolola na α -1 kiseli glikoprotein (AGP). Mjerenje interakcija između molekule lijeka i proteina plazme važno je zbog toga što o tome ovisi dostupnost lijeka za farmakološki učinak, a time i doziranje lijekova. U akutnim i nekim kroničnim upalnim stanjima koncentracija AGP-a je povećana što bi moglo zahtijevati povećanje doziranja nekih lijekova koji se vežu na AGP. Samo nevezana frakcija lijeka može iz krvotoka doći do mjesta djelovanja i pokazati učinak. Korištena metoda polarizacije fluorescencije mjeri interakcije između lijeka i proteina na način da prilikom vezanja fluorescentnog lijeka na protein dolazi do usporavanja rotacije kompleksa u odnosu na brzinu rotacije same molekule lijeka zbog čega polarizacija fluorescencije lijeka raste. U eksperimentu je najprije određena konstanta asocijacije dipiridamola na AGP. Zatim je otopina dipiridamola i AGP-a titrirana propranololom čime je dipiridamol istisnut iz kompleksa s AGP-om. Oslobođanjem dipiridamola iz kompleksa, njegova slobodna rotacija raste i smanjuje se njegova polarizacija tj. polarizacija fluorescencije opada. Uz Specfit program, odnosno jednadžbe opisane u poglavlju 3.3. i metode minimalnog kvadrata u Excelu, na temelju izmjerene ovisnosti polarizacije fluorescencije dipiridamola o koncentraciji propranolola izračunali smo konstantu asocijacije propranolola na AGP. Rezultati dobiveni pomoću Excela i metode minimalnog kvadrata nešto bolje koreliraju s referentnim vrijednostima od rezultata dobivenih u Specfitu te se zaključuje kako su jednadžbe opisane u poglavlju 3.3. dobar model za izračun konstante asocijacije propranolola na AGP te je polarizacija fluorescencije metoda izbora mjerenja vezanja na AGP kod nekih lijekova.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 33 stranica, 12 grafičkih prikaza, 5 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: α 1-kiseli glikoprotein, polarizacija fluorescencije, konstanta ravnoteže, konstanta asocijacije, propranolol, dipiridamol, proteini plazme

Mentor: **Dr. sc. Mario Gabričević**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tin Weitner**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Davor Šakić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of General and Inorganic Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

COMPETITIVE BINDING FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAY FOR DETERMINATION OF ASSOCIATION CONSTANT OF PROPRANOLOL BINDING TO α -1 ACID GLYCOPROTEIN

Karla Mustač

SUMMARY

The goal of this work was to determine association constant of propranolol binding to α -1 acid glycoprotein (AGP). Measuring the interactions between the drug molecule and plasma proteins is important because the availability of the drug for the pharmacological effect and also the dosage of the drug depends on it. In acute and some chronic inflammatory conditions, the concentration of AGP is increased, which could require increase of the dosage of the drug. Only the unbound fraction of the drug can reach the site of action and show a pharmacological effect. The fluorescence polarization method measures drug-protein interactions by measuring change in fluorescence polarization of fluorescent drug due to binding on a protein. The complex of drug and a protein has a slower rotation than free drug molecule and therefore shows increase in fluorescence polarization. In our case, adding propranolol in the solution where AGP and dipyridamole are present, displaces dipyridamol from the complex. Releasing of dipyridamole from the complex increases its rotation which diminishes his polarization, i.e. the fluorescence polarization decreases. By using the Specfit program or the equations described in chapter 3.3. and the method of least squares in Excel the association constant of propranolol binding to AGP is calculated. The results obtained using Excel method correlate little bit better with the reference values than the results obtained in Specfit and it is concluded that the equations described in chapter 3.3. provide a good model for calculating the association constant of propranolol to AGP.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 33 pages, 12 figures, 5 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: α 1-acid glycoprotein, fluorescence polarization, equilibrium constant, association constant, propranolol, dipyridamole, plasma proteins

Mentor: **Mario Gabričević, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Tin Weitner, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Davor Šakić, Ph.D. Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2020.