

Kompeticijsko određivanje konstanti vezanja dipiridamola i varfarina za humani serumski albumin polarizacijskom fluorescencijom

Radanović, Jan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:100951>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Jan Radanović

**Kompeticijsko određivanje konstanti vezanja
dipiridamola i varfarina za humani serumski
albumin polarizacijskom fluorescencijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća kemija sa stehiometrijom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marija Gabričevića i suvoditeljstvom Roberta Kerepa mag. chem. i Tina Šebe mag. chem. u sklopu projekta GlycoDrugs (HRZZ-IP-2016-06-3672).

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću, Robertu Kerepu mag. chem. i Tinu Šebi mag. chem. na strpljenju i pomoći u izradi ovog rada.

Zahvaljujem i obitelji i prijateljima na neprekidnoj podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. HUMANI SERUMSKI ALBUMIN	2
1.1.1. STRUKTURA I SINTEZA	2
1.1.2. BIOLOŠKA FUNKCIJA	3
1.2. DIPIRIDAMOL	5
1.3. VARFARIN	6
1.4. KEMIJSKA RAVNOTEŽA	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. KEMIČALIJE I PRIPREMA OTOPINA	10
3.1.2. LABORATORIJSKI PRIBOR I OPREMA	11
3.2. POLARIZACIJA FLUORESCENCIJE	12
3.3. SPEKTROFLUORIMETRIJSKE TITRACIJE	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. IZRAČUN KONSTANTI VEZANJA	18
4.1.1. PRVI MODEL	19
4.1.2. DRUGI MODEL	21
5. ZAKLJUČCI	25
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	26
7. LITERATURA	27
8. SAŽETAK	29
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Pri određivanju terapijskih doza lijekova potrebno je voditi računa o njihovom vezanju za proteine krvne plazme, među kojima je najzastupljeniji albumin. Osim albumina, koji pretežno veže kisele i neutralne lijekove, sposobnost vezanja lijekova posjeduju i drugi proteini krvne plazme. Najvažniji od njih je α 1-kiseli glikoprotein, za kojeg se također vežu lijekovi, pogotovo oni bazičnog karaktera, koji je poznat i po tome što mu se koncentracija može povećati tijekom upalnih stanja pa time i klinički značaj njegove sposobnosti vezanja lijekova. Sposobnost vezanja lijekova, iako manje klinički značajnu, također posjeduju α -globulini i lipoproteini.

Proteini krvne plazme mogu na više načina utjecati na djelovanje lijekova koji se za njih vežu. Na primjer, prilikom patoloških stanja poput nefrotskog sindroma ili zatajenja jetre dolazi do smanjenja koncentracija proteina u plazmi pa se time i smanjuje količina lijeka koja može biti vezana. Razine proteina također su smanjene kod novorođenčadi te kod starijih pacijenata, a tijekom trudnoće mogu se naglo mijenjati. Smanjenje sposobnosti vezanja lijekova može osim smanjenjem koncentracije proteina biti izazvano i povećanom koncentracijom endogenog ili egzogenog kompetitora za njegova vezna mjesta. Na primjer, kod hiperbilirubinemije zabilježene su povišene slobodne koncentracije lijekova koje je bilirubin „istisnuo“ s veznih mjesta na albuminu. Na sličan način i egzogeni toksini ili lijekovi mogu dovesti do povećanja slobodne koncentracije lijeka. Imajući na umu da je samo nevezani udio lijeka farmakološki aktivan, povećanje slobodne koncentracije lijeka dovodi do pojačanja djelovanja lijeka koje u nekim slučajevima može doseći i toksičnu razinu. Kod lijekova poput varfarina i dipiridamola koji su u terapijskim dozama preko 95% vezani na albumin, a imaju vrlo malu terapijsku širinu, ta je interakcija od kritične važnosti (Li, 2014; Trainor, 2007; Macgregor i Sardi, 1991).

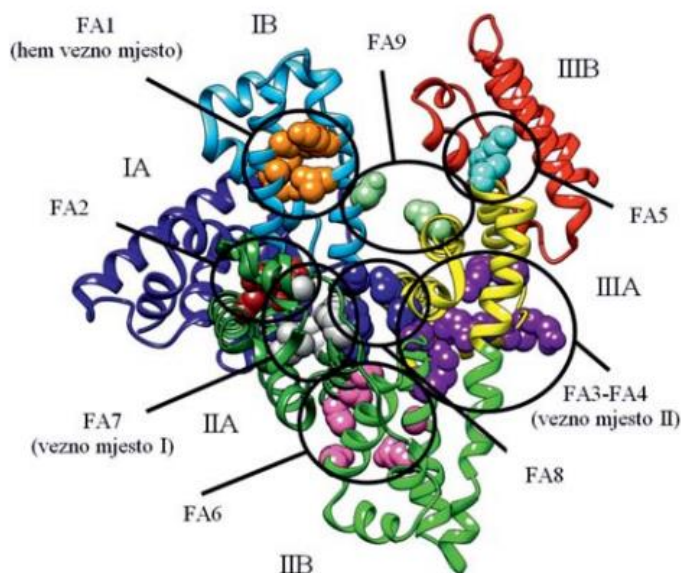
Varfarin je jedan od najšire upotrebljivanih oralnih antikoagulansa i koristi se za prevenciju tromboembolije. Važnost točnosti njegovog doziranja pokazuje činjenica da se osobama na terapiji varfarinom svakih nekoliko tjedana mjeri protrombinsko vrijeme kako bi se ispitao učinak lijeka i sukladno tome prilagodila terapijska doza. Dipiridamol se ne propisuje često kao varfarin i ima veću terapijsku širinu, ali s varfarinom je indiciran kod pacijenata s umjetnim srčanim zaliscima kojima prijeti opasnost od embolije unatoč adekvatnoj dozi varfarina. Za takve slučajeve rezultati ovog rada mogli bi biti posebno relevantni (Pouleur i Buyse, 1991; Chesebro i sur., 1983).

1.1. HUMANI SERUMSKI ALBUMIN

1.1.1. STRUKTURA I SINTEZA

Humani serumski albumin (HSA), s normalnom krvnom koncentracijom u rasponu od 35 do 50 g/l, najzastupljeniji je protein krvne plazme. Sintetizira se u jetri, prvo u obliku preproalbumina koji nastaje translacijom samo jednog gena te se u lumenu endoplazmatskog retikuluma hepatocita cijepanjem prevodi u proalbumin. Njemu se potom u trans-Golgijevom aparatu izrezuje N-terminalni oligopeptid od 6 aminokiselina čime nastaje albumin koji se konačno otpušta u intravaskularni prostor.

Primarna struktura HSA te njegovog propeptidnog oblika i signalnog slijeda otkrivena je 1975. godine dok je do razrade tercijarne strukture došlo tek dvadesetak godina kasnije kada je rendgenskom kristalografijom razjašnjeno da se taj „sroliki“, 66,5 kDa težak, globularni protein volumena $88,249 \text{ \AA}^3$ sastoji od tri homologne domene građene od alfa-uzvojnica. Svaka od tih domena sadrži deset anti-paralelnih uzvojnica i podijeljena je na A domenu koju čini šest uzvojnica te B domenu koju čine četiri uzvojnice. Stabilnosti tercijarne strukture HSA pridonosi 35 cisteinskih ostataka koji stvaraju 17 disulfidnih mostova (Rabbani i Ahn, 2019).



Slika 1. Helikalna struktura HSA s označenim poddomenama i mjestima vezanja (preuzeto i prilagođeno iz (Bojić i Rimac, 2017))

1.1.2. BIOLOŠKA FUNKCIJA

Iako ga nalazimo i na drugim mjestima u ljudskom tijelu, poput kože i sline, HSA svoje najbitnije uloge izvršava u krvi gdje je i najbrojniji te sudjeluje u očuvanju homeostaze na više načina. Za početak, HSA je zaslužan za oko 75% koloidno-osmotskog tlaka krvi što ga čini uvelike odgovornim za raspodjelu tekućine između krvi i tkiva. Također, zahvaljujući velikom broju kiselih aminokiselinskih ostataka, HSA pri fiziološkom pH posjeduje ukupni naboj od -15 . Time znatno pridonosi anionskom manjku krvnog seruma i djeluje kao svojevrstan pufer. To potvrđuje i činjenica da smanjenje koncentracije albumina u krvnoj plazmi dovodi do metaboličke acidoze.

HSA također posjeduje antitoksična svojstva i štiti organizam od štetnih učinaka, kako endogenih, tako i egzogenih molekula. Za početak, tu je njegovo antioksidativno djelovanje koje posjeduje ponajviše zahvaljujući svom Cys34 sa slobodnom tiolnom skupinom koja hvata reaktivne kisikove čestice nastale u imunom odgovoru. Antitoksičnom učinku HSA pridonosi i njegova pseudo-enzimska funkcija. Zahvaljujući rasporedu aminokiselinskih ostataka u poddomeni IIIA, HSA ima sposobnost hidrolize estera te detoksifikacije cijanida u tiocijanate. Također, HSA sa slobodnim reducirajućim šećerima ulazi u reakciju glikacije, tj. neenzimatske glikozilacije. Lizinski, argininski i cisteinski ostaci HSA vežu šećere visokim afinitetom i kod zdravih osoba od 1 do 10% ukupnog albumina u serumu je glikozilirano. Kod osoba koje boluju od šećerne bolesti, ovisno o kontroli njihove glikemije, taj broj može doseći i 90%. Glikirani HSA je stoga važan biokemijski marker u kontroli glikemije te može poslužiti u dijagnostičke svrhe (Rabbani i Ahn, 2019).

Još jedna važna biološka uloga HSA je uloga skladištenja i transporta malih molekula stvaranjem nekovalentnih interakcija. Zahvaljujući svojoj strukturi, HSA ima sposobnost vezanja širokog raspona molekula različitih svojstava. Glavna vezna mjesta HSA za male molekule su Sudlowljeva mjesta I i II koja se redom nalaze na poddomenama IIA i IIIA. Na njih se tipično vežu lipofilne molekule, od kojih se većina veže na Sudlowljevo mjesto I koje je prostranije. Tipična molekula koja se na njega veže je dikarboksilna kiselina ili velika heterociklična molekula s negativnim nabojem u sredini molekule, dok je za Sudlowljevo mjesto II tipična karboksilna kiselina s negativno nabijenom kiselinskom skupinom na jednom kraju molekule te s hidrofobnim središnjim dijelom. U novijim istraživanjima pokazan je značaj trećeg veznog mjesta, smještenog na poddomeni IB, koje je za brojne lijekove i endogene spojeve primarno mjesto vezanja.

Kada se radi o endogenim molekulama poput bilirubina, hema i tiroksina, vezanjem za HSA postiže se održavanje slobodne koncentracije spomenutih molekula u normalnom rasponu te se tako sprječava toksični učinak. S druge strane, vezanjem masnih kiselina, HSA povećava njihovu topljivost u krvi koja je vodeni medij te tako posreduje njihovom transportu kroz organizam. Također, molekulama vezanim za HSA produljeno je vrijeme poluživota (Bojić i Rimac, 2017).

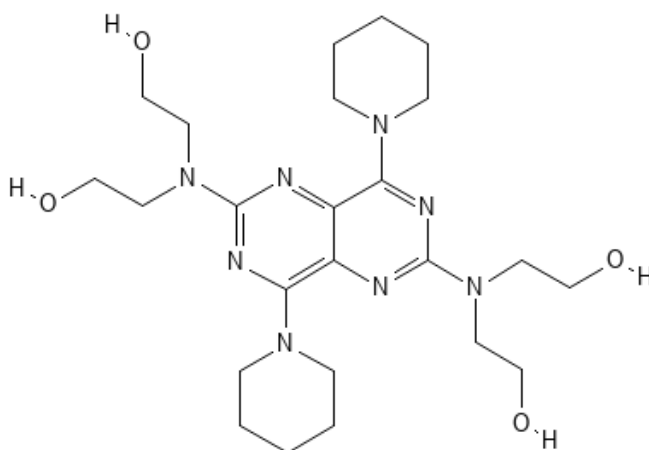
Istim učincima HSA djeluje na lijekove te je stoga bitan farmakokinetički faktor. Vezanje lijekova za HSA utječe na distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijeka pa time i na njegov učinak. U slučaju primjene više od jednog lijeka, zbog navedenih djelovanja, dolazi do njihove međusobne interakcije. Razumijevanje vezanja lijekova za HSA od iznimnog je značaja za kliničku praksu kako bi se spriječile negativne posljedice međusobne interakcije lijekova, a potencijalno otkrile i one pozitivne. Osim toga, velika sposobnost HSA u skladištenju i transportu malih molekula mogla bi poslužiti za formulaciju novih farmaceutskih oblika (Tayyab i Feroz, 2020).

1.2. DIPIRIDAMOL

Dipiridamol je antitrombotski lijek koji svoj učinak postiže zahvaljujući sinergiji više povezanih mehanizama djelovanja. Najvažniji mehanizam kojim djeluje *in vivo* je inhibicija ponovnog unosa adenzina u endotelne i krvne stanice te inhibicija njegove razgradnje čime povećava njegovu slobodnu koncentraciju u plazmi. Time se pojačava sposobnost adenzina da inhibira ADP-ovisnu agregaciju trombocita. Adenzin također, stimulirajući trombocitnu adenilat ciklazu, pojačava sintezu cAMP koji inhibitorno djeluje na agregaciju trombocita. Povećanju koncentracije cAMP-a doprinosi i inhibitorni učinak dipiridamola na fosfodiesterazu koja bi ga razgradila te stimulatивно djelovanje prostaciklina na adenilat ciklazu. Sinergističko djelovanje dipiridamola upotpunjeno je stimulacijom biosinteze i otpuštanja prostaciklina kojim, osim što inhibira agregaciju trombocita, djeluje i vazodilatatorno (Harker i Kadatz, 1983).

Dosad nisu pronađeni specifični literaturni podaci o konstanti vezanja dipiridamola za HSA, niti o točnom broju veznih mjesta. Ispitivanja na goveđem serumskom albuminu (BSA) u svojim rezultatima navode konstantu vezanja reda veličine 10^4 M^{-1} i samo jedno vezno mjesto koje se nalazi na poddomeni IB (Afrin i sur., 2019).

Unatoč visokoj homologiji s HSA i podudaranju velikog broja karakteristika, BSA se ne može u svim slučajevima koristiti kao alternativa za HSA. Posebice u slučajevima vezanja liganda na Sudlowljevo mjesto I gdje znatnu razliku u svojstvima može uzrokovati rigidnija struktura poddomene IIA kod BSA (Ketrat i sur., 2020).



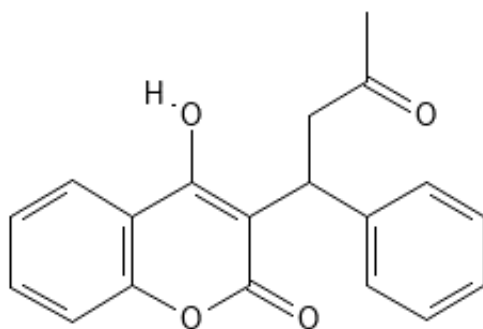
Slika 2. Struktura dipiridamola

1.3. VARFARIN

Varfarin je antikoagulans čiji mehanizam djelovanja počiva na inhibiciji o vitaminu K ovisnih faktora zgrušavanja. Vezanjem na enzim vitamin K 2,3-epoksid reduktazu i posljedičnom inhibicijom prevođenja vitamina K u aktivni oblik, on inhibira aktivaciju faktora zgrušavanja II, VII, IX i X čime dovodi do smanjenja stvaranja krvnih ugrušaka. Aktivirani faktor X i faktor II, protrombin, odgovorni su za stvaranje trombina u čijem odsustvu ne može doći do stvaranja fibrina i stabilizacije krvnog ugruška (Jacobs, 2008).

Sa svojom 4-hidroksikumarinskom strukturom varfarin se odlično otapa u vodi i apsorbira dobro i brzo putem gornjeg gastrointestinalnog trakta. Vršnu koncentraciju u plazmi postiže 60 do 90 minuta nakon oralne primjene te se veže za samo jedno mjesto na HSA i to s konstantom vezanja od oko $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ koja je približno ista za oba enantiomera (Li i sur, 2014).

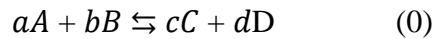
Kao jedino vezno mjesto varfarina na HSA ustanovljeno je Sudlowljevo mjesto I na poddomeni IIA koje se stoga još naziva i varfarin–azapropazonskim mjestom (Bojić i Rimac, 2017).



Slika 3. Struktura varfarina

1.4. KEMIJSKA RAVNOTEŽA

Za razumijevanje ovog rada važno je razumjeti značenje konstante ravnoteže reakcije vezanja, a za razumijevanje toga potrebno je poznavanje kemijske ravnoteže. Kod reverzibilnih kemijskih reakcija ukupna reakcija može se prikazati jednadžbom (0):



gdje a molekula reaktanta A i b molekula reaktanta B daju kao produkt c molekula C i d molekula D. U toj jednadžbi a , b , c i d predstavljaju stehiometrijske koeficijente. Brzinu polazne reakcije u tom slučaju opisuje jednadžba (1):

$$v_1 = k_1[A]^a[B]^b \quad (1)$$

dok u povratnoj reakciji c molekula tvari C s d molekula tvari D daje a molekula tvari A i b molekula tvari B. Brzina odvijanja povratne reakcije opisana je jednadžbom (2):

$$v_2 = k_2[C]^c[D]^d. \quad (2)$$

Ako se u početku u reakcijskoj smjesi nalaze samo tvari A i B, odvijat će se samo polazna reakcija kojom nastaju produkti C i D. S porastom njihovih koncentracija rasti će brzina povratne reakcije sve dok se ne izjednači s brzinom polazne reakcije. Tada nastupa dinamička ravnoteža koju opisuju jednadžbe (3), (4) i (5):

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

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

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

S obzirom na to da je omjer dviju konstanti također konstanta, jednadžbu (5) možemo pisati i kao jednadžbu (6),

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

poznatiju i kao zakon o djelovanju masa ili zakon kemijske ravnoteže. Konstanta K_{eq} je ta koja određuje omjer reaktanata i produkata u ravnotežnom stanju. Što je ona veća, to je brzina polazne reakcije veća u odnosu na povratnu te stoga u reakcijskoj smjesi prevladavaju produkti reakcije.

Njene vrijednosti mogu biti od reda veličine 10^{-50} do 10^{50} , a mjerna jedinica joj ovisi o broju molekula koje sudjeluju u reakciji.

Kod reakcija stvaranja kompleksa česta pojava je nastajanje višestruko supstituiranih kompleksnih vrsta. To su slučajevi kada se za metal, M, kroz više koraka veže određeni broj, n , liganda, L. Svaki od tih koraka može se opisati na sljedeći način jednadžbama (7), (8) i (9):

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (7)$$

$$K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML][L]} \quad (8)$$

$$K_3 = \frac{[ML_3]}{[ML_2][L]} \quad (9)$$

iz kojih je vidljivo da u općenitom slučaju vrijedi jednadžba (10):

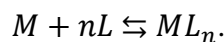
$$K_n = \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}][L]} \quad (10)$$

Konstante kemijske ravnoteže u ovim reakcijama nazivamo konstantom nastajanja ili stabilnosti kompleksa, tj. konstantom ravnoteže reakcije vezanja ili asocijacije. Množenjem tih konstanti dobivamo ukupnu konstantu stabilnosti kompleksa koju označavamo s β_n . Ona se s može opisati jednadžbama (11) i (12):

$$\beta_n = K_1 \times K_2 \times K_3 \times \dots \times K_n \quad (11)$$

$$\beta_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \quad (12)$$

za bilo koju kompleksnu ravnotežu općenitog tipa



(Filipović i Lipanović, 1987).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vežanje lijekova za proteine krvne plazme značajan je farmakokinetički faktor. O njemu ovise apsorpcija, raspodjela, metabolizam i eliminacija lijekova. S obzirom na to da samo slobodna frakcija lijeka može biti farmakološki aktivna, vežanje lijekova za proteine krvne plazme igra veliku ulogu u njihovom djelovanju. Od tih proteina najzastupljeniji je HSA s normalnim rasponom koncentracija od 0,53 do 0,75 mM za kojeg velikom broju lijekova vezana frakcija iznosi i preko 99%. Kod doziranja takvih lijekova treba obratiti pažnju na vežanje za HSA jer će djelovanje ispoljavati samo, manja, slobodna frakcija lijeka, dok će, veća, vezana frakcija, služiti kao svojevrsan „rezervoar“ spoja kojemu će onda biti produženo vrijeme poluživota, a time i trajanje učinka (Kratochwil i sur., 2002).

Za takve lijekove svaka promjena koncentracije HSA u plazmi ili samo udjela vezane frakcije, zbog kompeticije za vezno mjesto s nekim drugim spojem, može dovesti do višestrukog povećanja koncentracije slobodne frakcije lijeka. Ovisno o terapijskoj širini lijeka to može dovesti do toksičnih učinaka pa je zato posebnu pažnju potrebno obratiti na lijekove s malom terapijskom širinom, kao što je varfarin. S druge strane, kada bi se dobro poznavalo vežanje lijekova za HSA, u kliničkoj praksi to bi omogućilo racionalnije korištenje lijekova i bolje planiranje terapije. Također, u razvoju novih lijekova ili formulacija, uzimanjem u obzir utjecaj vežanja za HSA na farmakokinetičke parametre izvršio bi se kvalitetniji probir i dizajn lijekova (Scheife, 1989).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KEMIKALIJE I PRIPREMA OTOPINA

Prvo je pripravljena 25 mM otopina HEPES pufera koja je kasnije korištena za pripremu ostalih otopina tijekom eksperimenata. Priprema se sastojala od otapanja odvagane količine HEPES-a (Sigma-Aldrich, SAD) u destiliranoj vodi i podešavanja pH do ciljanih 7,4 dodatkom male količine 1 M NaOH (Gram-mol, Hrvatska). Pri tome je pH-vrijednost mjerena potenciometrijski, pri sobnoj temperaturi, te je na kraju puferska otopina profiltrirana. Nakon toga pripravljena je matična otopina HSA otapanjem odvagane količine HSA (Sigma-Aldrich, SAD) u tako svježe pripravljenoj puferskoj otopini. Kako bi se mogla spektrofotometrijski provjeriti njezina koncentracija prethodno je potrebno odrediti molarni apsorpcijski koeficijent nativnog HSA. To je učinjeno mjerenjem apsorpcije dviju otopina HSA jednake koncentracije od kojih je u jednoj HSA bio denaturiran dodatkom 6 M otopine gvanidin hidroklorida (Sigma-Aldrich, SAD). Zbog jednakih koncentracija tih otopina bilo je moguće iz poznatog molarnog apsorpcijskog koeficijenta denaturiranog HSA te omjera izmjerenih apsorpcija nativnog i denaturiranog HSA izračunati molarni apsorpcijski koeficijent nativnog HSA. Molarni apsorpcijski koeficijent denaturiranog HSA bio je izračunan iz poznatog broja i molarnih apsorpcijskih koeficijenata njegovih aminokiselinskih ostataka. Izračunani molarni apsorpcijski koeficijent nativnog HSA korišten je za spektrofotometrijsku provjeru koncentracije HSA u matičnoj otopini. Za pripremu matične otopine izvagani dipiridamol (Sigma-Aldrich, SAD) je prvo otopljen u malom volumenu dimetilsulfoksida (DMSO) (Kemika \geq 99%), Hrvatska) te razrijeđen puferskom otopinom do ciljane koncentracije. Konačnio udio DMSO-a u mjerenim otopinama bio je manji od 0,1%. Matična otopina varfarina pripravljena je otapanjem izvagane količine natrijeve soli varfarina (Sigma-Aldrich, SAD) u puferskoj otopini. Koncentracija matične otopine dipiridamola iznosila je 2 μ M, matične otopine varfarina 10 mM, a matične otopine HSA iznosile su 500 μ M i 300 μ M za prvu, odnosno drugu titraciju.

3.1.2. LABORATORIJSKI PRIBOR I OPREMA

Za vaganje kemikalija u pripremi otopina korištena je analitička vaga (Sartorius, Njemačka). Puferska otopina pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100 mL dok su matične otopine bile pripremane u Eppendorf epruветama. Za provjeru pH puferske otopine pri sobnoj temperaturi korišten je potenciometar (Mettler Toledo, SAD). Za uzimanje malih volumena puferske otopine pri pripravi matičnih otopina te za pripremu otopina u titracijskome nizu korištena je automatska pipeta proizvođača (Eppendorf, Njemačka). Za mjerenje apsorbancije matične otopine korišteni su kvarcna kiveta (Hellma, Njemačka) i spektrofotometar Cary 50 Bio (Varian, Australija). Otopine u titracijskome nizu bile su pripravljane izravno u crne mikrotitarske pločice (384 jažice) s prozirnim dnom proizvođača Greiner, a za mjerenje polarizacije fluorescencije korišten je multifunkcionalni čitač pločica (*Microplate Reader Spark M10*) proizvođača TECAN (Austrija) prikazan na Slici 4.



Slika 4. Tecan Microplate Reader Spark M10 (preuzeto i prilagođeno iz (<https://www.tecan.com/blog/spark-multimode-microplate-reader-for-high-performance-cell-based-fluorescence-assays>))

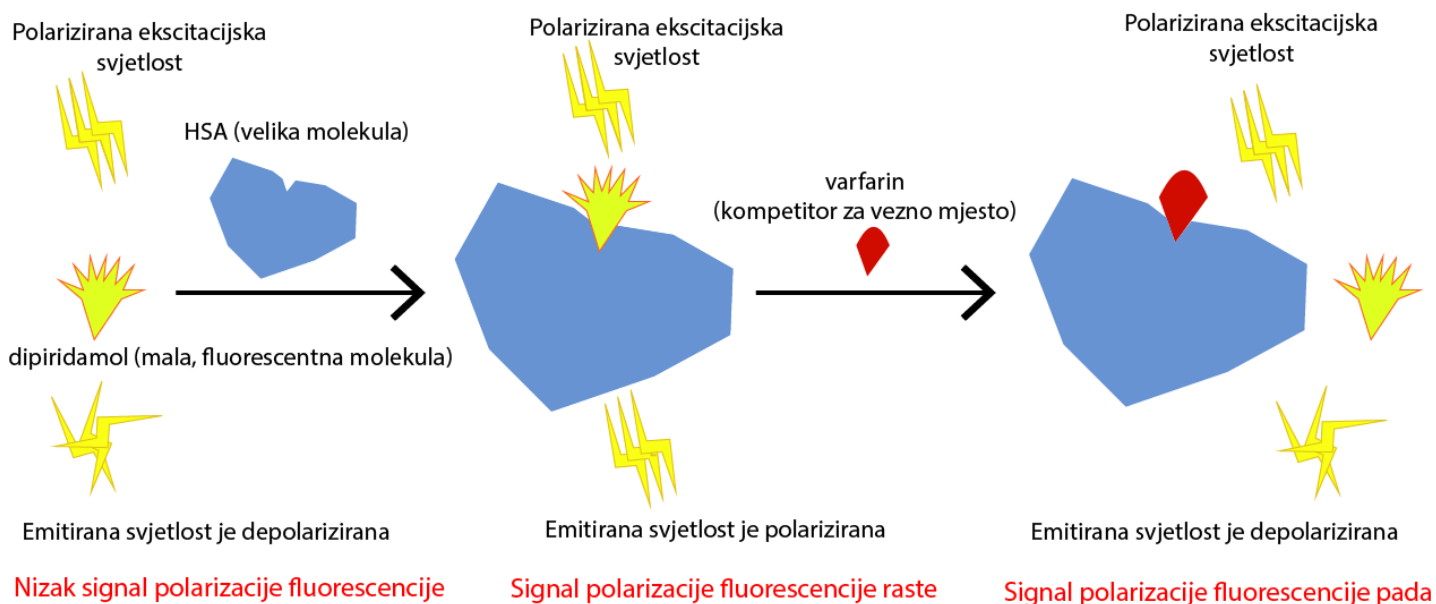
3.2. POLARIZACIJA FLUORESCENCIJE

Spontana emisija svjetlosti koja prati povratak iz pobuđenog elektronskog stanja u osnovno naziva se fluorescencija. To je vrsta fotoluminescencije, emisije svjetlosti koju pobuđuje apsorpcija svjetlosti, koja se od ostalih vrsta, fosforescencije i odgođene fluorescencije, izdvaja po najvećoj brzini povratka u osnovno stanje. Životni vijek pobuđenog stanja kod fluorescencije ima trajanje u rasponu od 10^{-10} do 10^{-7} s. Molekulska vrsta koja ima sposobnost fluorescencije naziva se fluorofor.

Svjetlost je elektromagnetski val koji se sastoji od električnog i magnetskog polja koja osciliraju u fazi i okomita su međusobno te na smjer širenja vala. Kod prirodnog svjetla ta polja nemaju preferiranu orijentaciju, ali kod linearno polariziranog svjetla električno polje oscilira u isključivo u smjeru koji se tada naziva smjer polarizacije. Također je moguće postojanje djelomično polarizirane svjetlosti koja se u nejednakim udjelima sastoji od više zraka svjetlosti polariziranih u različitim smjerovima.

Za većinu fluorofora vjerojatnost apsorpcije svjetlosti maksimalna je u trenutku kada je električno polje pobuđujuće svjetlosti okomito na apsorpcijski tranzicijski moment fluorofora. Zbog toga, kod pobuđivanja populacije fluorofora polariziranim svjetlom selektivno će se pobuditi fluorofori povoljne orijentacije. Emisija koja nakon toga slijedi neovisna je o orijentaciji fluorofora, već ovisi o internim promjenama stanja. Za vrijeme životnog vijeka pobuđenog stanja fluorofor može promijeniti orijentaciju i tako dovesti do smanjenja polarizacije svjetlosti zahvaljujući nastaloj razlici u apsorpcijskom i emisijskom tranzicijskom momentu. Zahvaljujući tome, mjerenjem polarizacije fluorescencije moguće je dobiti informacije o veličini, obliku i mobilnosti molekula u mediju (Valeur i Berberan-Santos, 2012).

Metoda korištena u ovom radu temelji se na mjerenju signala polarizacije fluorescencije, to jest njegove promjene prilikom vezanja dipiridamola za HSA i kompetitivnog istiskivanja s veznog mjesta na HSA od strane varfarina. Dipiridamol, koji je mala fluorescentna molekula, u slobodnom obliku rotira velikom brzinom zbog koje tijekom pobuđenog stanja može značajno promijeniti svoju orijentaciju. Polarizacija potom emitirane svjetlosti je stoga izotropna, to jest neovisna o smjeru polarizacije apsorbirane svjetlosti. Na razini uzorka to dovodi do smanjenja signala polarizacije fluorescencije koje je razmjerno količini slobodnog dipiridamola. Vezanjem za HSA, zbog veličine kompleksa, brzina rotacije dipiridamola značajno opada pa ne dolazi do izotropije polarizacije fluorescencije, zbog čega signal polarizacije fluorescencije ostaje visok. Sukladno tome, dodatkom varfarina u otopinu koja sadrži kompleks dipiridamola i HSA kompetitivnim istiskivanjem dipiridamola s veznog mjesta doći će do porasta njegove slobodne frakcije, a time i do smanjenja signala polarizacije fluorescencije. Princip korištene metode shematski je prikazan na Slici 5. (Valeur i Berberan-Santos, 2012; Yasgar i sur., 2012).



Slika 5. Shematski prikaz principa polarizacije fluorescencije

3.3. SPEKTROFLUORIMETRIJSKE TITRACIJE

Izvedene su dvije titracije u triplikatu pri sobnoj temperaturi (25 ± 1 °C) . Najprije je provedena titracija otopine dipiridamola s otopinom HSA, a zatim titracija otopine HSA i dipiridamola s otopinom varfarina. U prvoj titraciji koncentracija dipiridamola održavana je konstantnom, a raspon koncentracija HSA postignut je metodom serijskog razrjeđenja s omjerom 1:1. U drugoj titraciji konstantnima su održavane koncentracije dipiridamola i HSA dok je varfarin bio serijski razrjeđivan u omjeru 1:1. Otopine u titracijskom nizu pripremljene su u crnoj mikrotitarskoj pločici s prozirnim dnom koja je nakon kratke inkubacije pri sobnoj temperaturi stavljena u TECAN fluorimetar pomoću kojeg je otopinama izmjerena polarizacija fluorescencije.

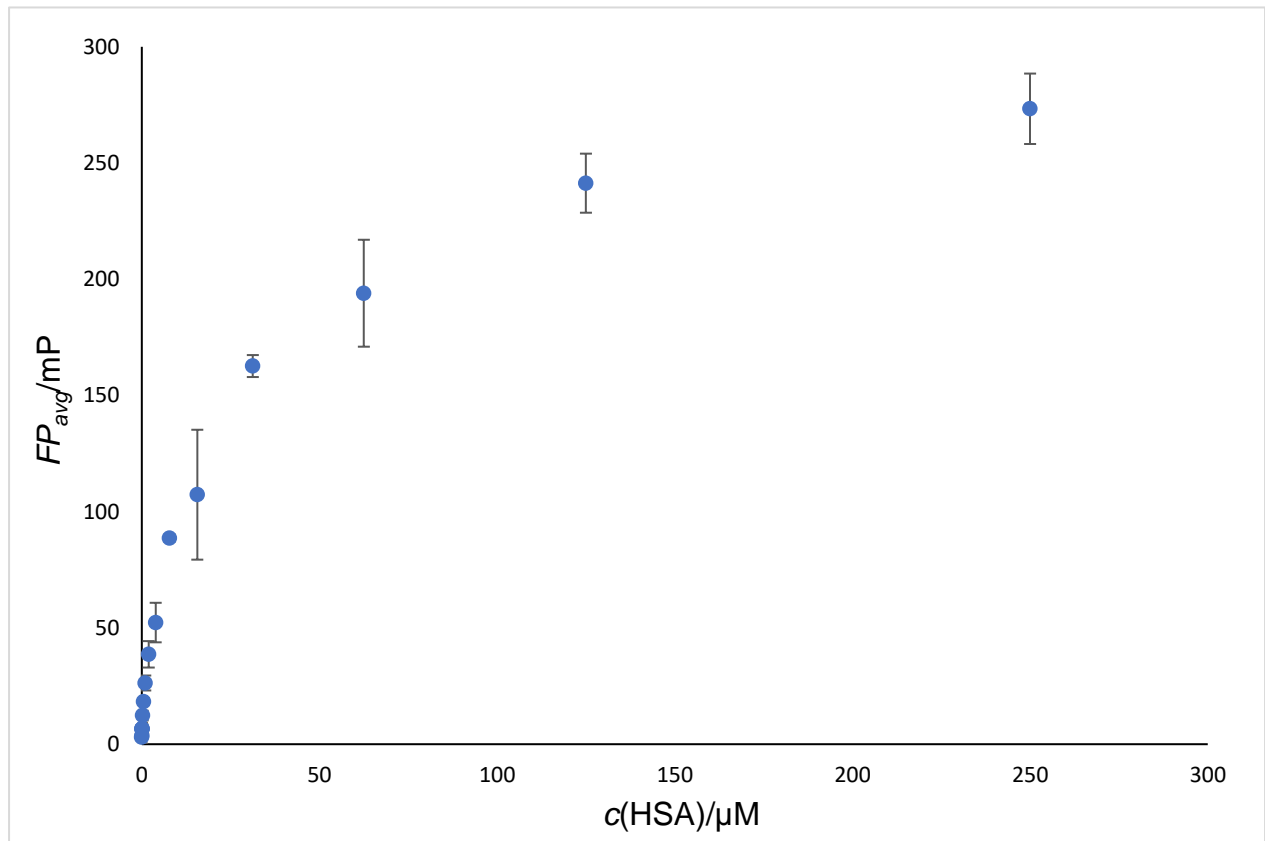
Dobiveni spektrofluorimetrijski podaci obrađeni su statistički pomoću računalnog programa Minitab (21.4.0.0). Prvo je testirana normalnost podataka Anderson-Darlingovim testom koji je za sve skupove podataka odbacio hipotezu normalnosti s izračunanim $p < 0,005$. Zbog toga su za daljnje provjere korišteni neparametarski statistički testovi. Pomoću Kruskal-Wallisovog testa ispitana je i potvrđena jednakost medijana skupova podataka unutar triplikata s $p = 0,989$ za prvu titraciju te $p = 0,943$ za drugu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvom titracijom cilj je bio izračunati konstantu ravnoteže vezanja dipiridamola za HSA. Izvedena je u triplikatu i za izračun su korištene srednje vrijednosti polarizacije fluorescencije. Mjerenja su pokazala da polarizacija fluorescencije raste s povećanjem koncentracije HSA, što se i vidi na Slici 6.

Tablica 1. Rezultati titracije HSA i dipiridamola

N	$c(\text{DP})/\mu\text{M}$	$c(\text{HSA})/\mu\text{M}$	FP_1/mP	FP_2/mP	FP_3/mP	$FP_{\text{avg}}/\text{mP}$	σ
1	1	250	256	280	284	273	15,1
2	1	125	234	256	234	241	12,7
3	1	62,5	171	217	194	194	23,0
4	1	31,3	168	161	159	163	4,73
5	1	15,6	113	132	77	107	27,9
6	1	7,81	89	90	87	89	1,53
7	1	3,91	46	49	62	52	8,50
8	1	1,95	45	37	34	39	5,69
9	1	0,977	30	25	24	26	3,21
10	1	0,488	20	18	17	18	1,53
11	1	0,244	13	14	10	12	2,08
12	1	0,122	6	9	5	7	2,08
13	1	0,061	8	5	7	7	1,53
14	1	0,031	3	-1	9	4	5,03
15	1	0,015	4	7	9	7	2,52
16	1	0,008	4	5	0	3	2,65

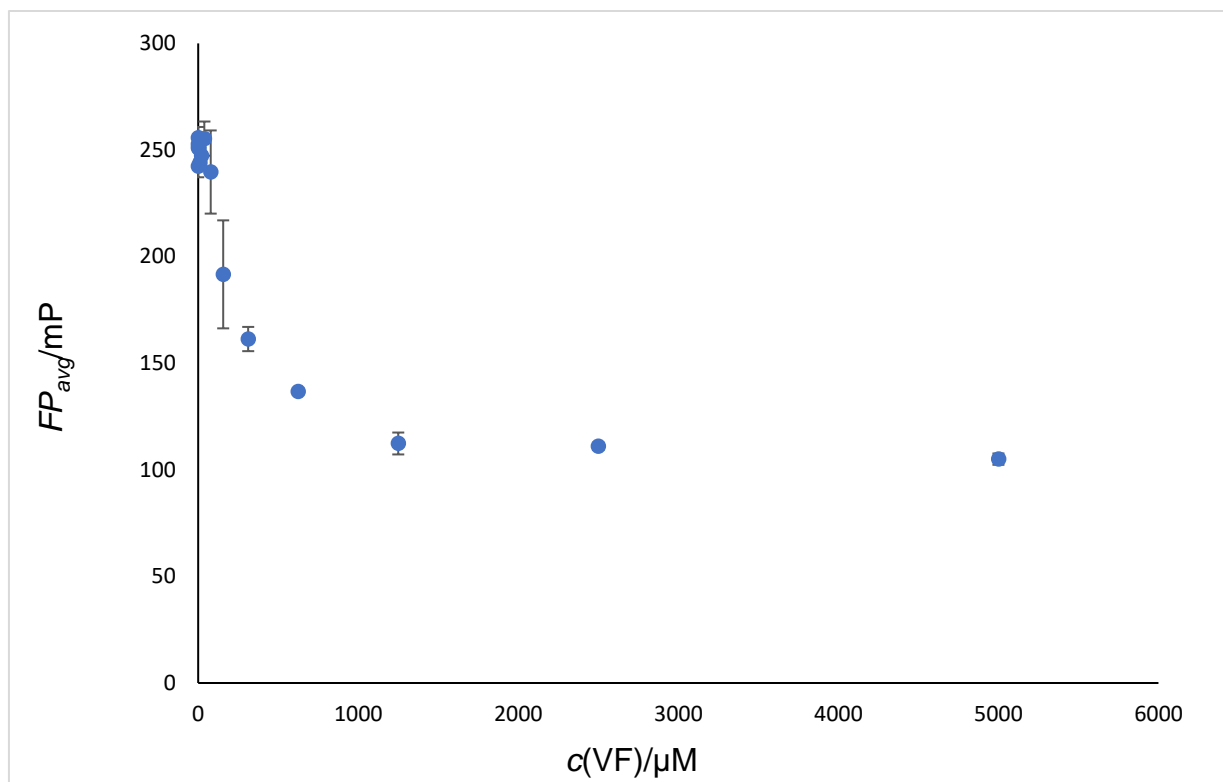


Slika 6. Ovisnost polarizacije fluorescencije o koncentraciji HSA

Drugom titracijom cilj je bio odrediti konstantu vezanja varfarina za HSA u kompeticiji s dipiridamolom čija konstanta vezanja se mogla izračunati iz prve titracije. Kao što je bilo i očekivano, s povećanjem koncentracije varfarina u otopini dolazi do smanjenja polarizacije fluorescencije, što se vidi i na Slici 7. Na Slici 7. se također vidi da polarizacija fluorescencije niti uz veliki suvišak varfarina ne doseže minimum iz prve titracije, što je bilo za očekivati u slučaju potpune kompeticije za vezno mjesto. To nam govori da je dio dipiridamola ipak ostao vezan za HSA.

Tablica 2. Rezultati titracije HSA i dipiridamola varfarinom

N	$c(\text{DP})/\mu\text{M}$	$c(\text{HSA})/\mu\text{M}$	$c(\text{VF})/\mu\text{M}$	FP_1/mP	FP_2/mP	FP_3/mP	$FP_{\text{avg}}/\text{mP}$	σ
1	1	150	5000	104	103	108	105	2,65
2	1	150	2500	112	112	109	111	1,73
3	1	150	1250	118	108	111	112	5,13
4	1	150	625	136	136	138	137	1,15
5	1	150	313	163	155	166	161	5,69
6	1	150	156	219	169	187	192	25,3
7	1	150	78,1	240	220	259	240	19,5
8	1	150	39,1	247	263	256	255	8,02
9	1	150	19,5	245	243	254	247	5,86
10	1	150	9,77	243	243	246	244	1,73
11	1	150	4,88	252	249	251	251	1,53
12	1	150	2,44	257	248	250	252	4,73
13	1	150	1,22	254	250	249	251	2,65
14	1	150	0,610	253	257	248	253	4,51
15	1	150	0,315	257	260	250	256	5,13
16	1	150	0,153	248	241	238	242	5,13



Slika 7. Ovisnost polarizacije fluorescencije o koncentraciji varfarina

4.1. IZRAČUN KONSTANTI RAVNOTEŽA

Konstante stabilnosti dipiridamola i varfarina računski su određivane pomoću softverskog programa SPECFIT(2.1.2) (Gampp i sur., 1985) te su razmotrena dva modela. U prvom modelu pretpostavljeno je da postoji samo jedno vezno mjesto na koje se dipiridamol i varfarin vežu te za njega ulaze u kompeticiju. U drugom modelu dipiridamol ima dva različita vezna mjesta na HSA dok se na samo jedno od tih mjesta može vezati varfarin.

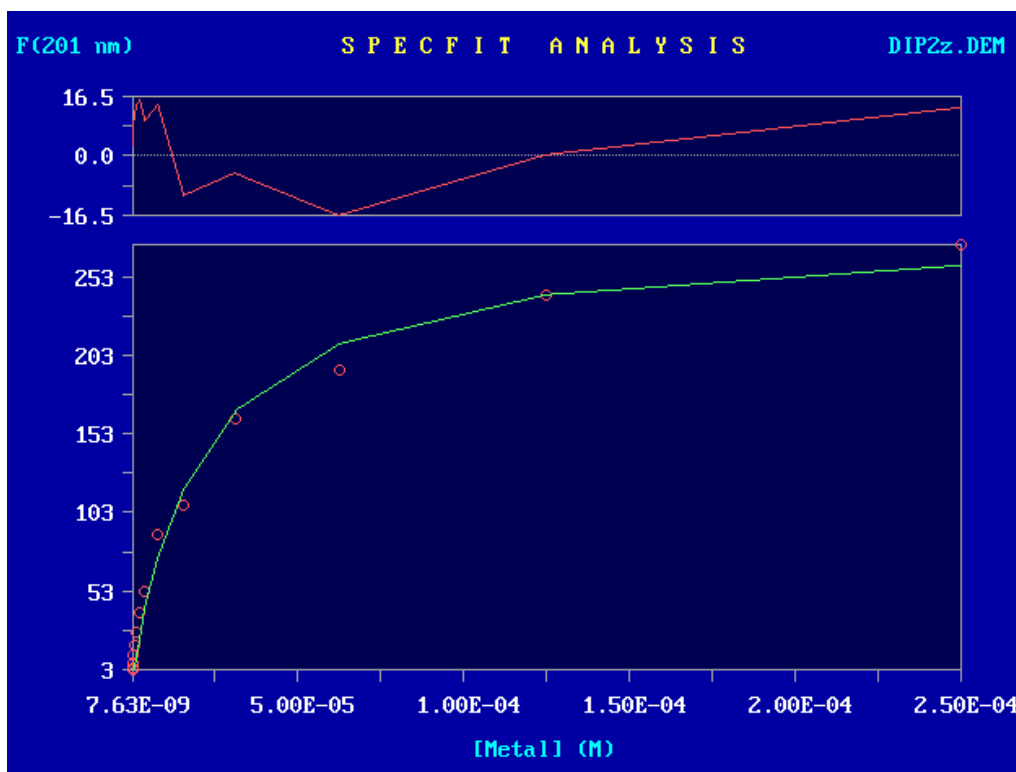
SPECFIT je računalni program koji koristeći Marquardtov algoritam za modeliranje krivulja metodom minimiziranja najmanjih kvadrata pomoću spektroskopskih podataka može izračunati konstantu stabilnosti. Kao podaci u program su uneseni nizovi koncentracija reaktanata i izmjerene vrijednosti polarizacije fluorescencije te u nekim slučajevima i poznate konstante stabilnosti koje su prethodno bile izračunane. Prije svakog izračuna u program je također bilo potrebno unijeti model kompleksacije, a rezultati su dobiveni u obliku logaritama konstanta stabilnosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

4.1.1. PRVI MODEL

U prvom je modelu prvo izračunana konstanta ravnoteže reakcije vezanja dipiridamola za samo jedno vezno mjesto na HSA i dobiven je logaritam konstante stabilnosti ($\log(\beta)$) takvog kompleksa koji iznosi 4,68. Model i izračun u programu SPECFIT prikazani su Slikom 8. Kako se radi o kompleksu koji nastaje samo jednom reakcijom vezanja, konstanta ravnoteže reakcije vezanja jednaka konstanti stabilnosti kompleksa i prema tome iznosi $4,74 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Prikaz modela vezanja i njegovog odstupanja od eksperimentalnih vrijednosti na Slici 9. govori da taj model relativno dobro opisuje vezanje dipiridamola za HSA.

DIP2.DEM		SPECFIT PARAMETERS			05-07-2023	
Conc vs Metal		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters	
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\bar{n}(\log \beta)$	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β			
100	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
110	y	u	v	4.67742D+00	5.43874D-02	

Slika 8. Model i izračun konstante stabilnosti kompleksa HSA i jedne molekule dipiridamola

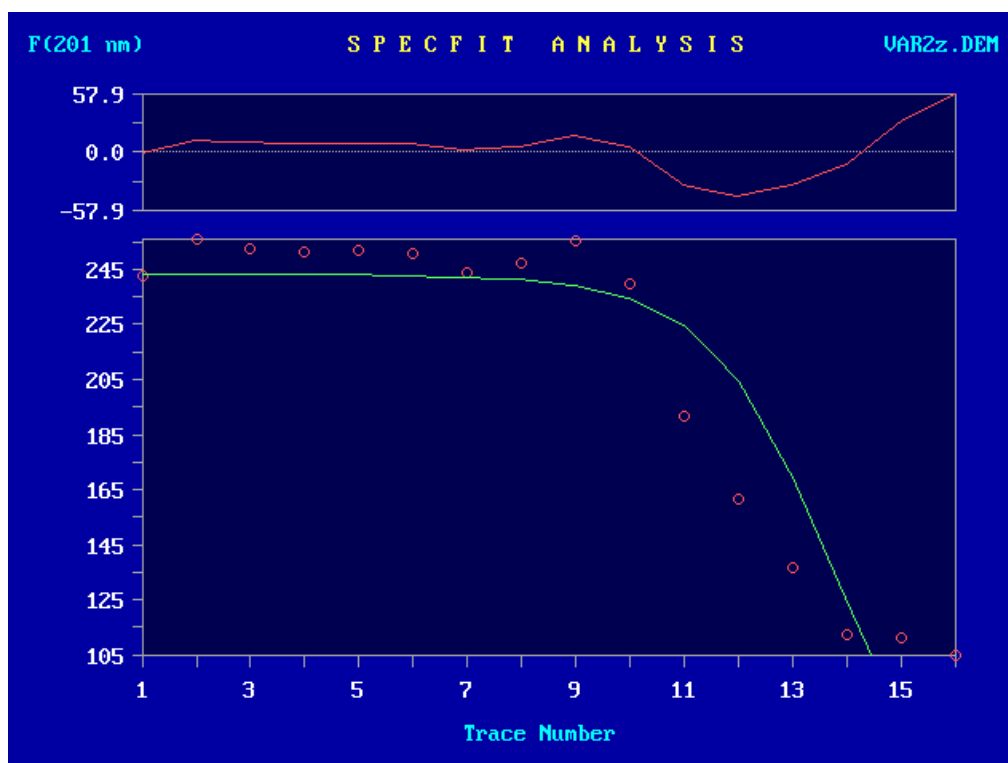


Slika 9. Prikaz modela vezanja te eksperimentalnih vrijednosti (ispod) uz prikaz mjere odstupanja (iznad)

U sljedećem koraku za izračun su korištena mjerenja iz druge titracije te prethodno izračunani $\log(\beta)$ kompleksa dipiridamola i HSA na temelju kojih je program izračunao $\log(\beta)$ za kompleks varfarina i HSA. Model i izračun su vidljivi na Slici 10. Iz dobivenog $\log(\beta)$ koji iznosi 3,84 izračunata je konstanta ravnoteže reakcije vezanja varfarina za HSA koja iznosi $6,92 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Na Slici 11. prikazan je model, tj. njegovo odstupanje od eksperimentalnih podataka na temelju kojih vidimo da ih ne opisuje dobro.

VAR2.DEM		SPECFIT PARAMETERS			05-07-2023	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			5 Parameters	
MxABHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\hat{n}(\log \beta)$	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β			
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	
110	y	u	f	4.67742D+00	0.00000D+00	
101	n	u	v	3.84375D+00	9.99054D-02	

Slika 10. Model i izračun konstante stabilnosti kompleksa HSA i jedne molekule varfarina



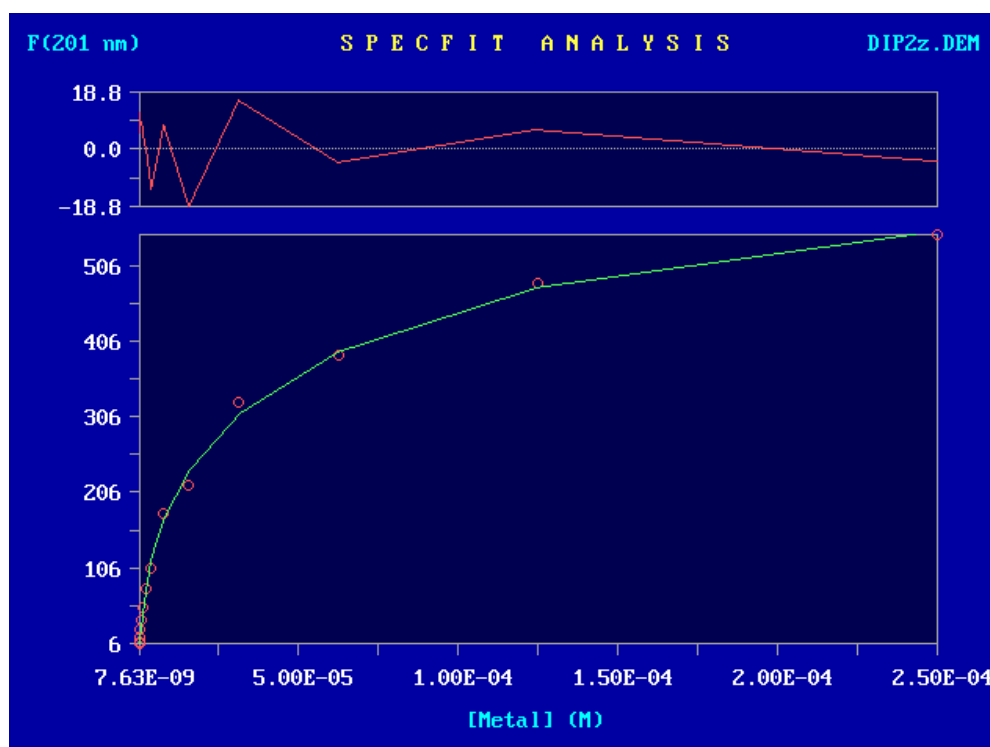
Slika 11. Prikaz modela vezanja te eksperimentalnih vrijednosti (ispod) uz prikaz mjere odstupanja (iznad)

4.1.2. DRUGI MODEL

U drugom je modelu pretpostavljeno da HSA ima dva vezna mjesta na koja se dipiridamol može vezati. Izračunom u SPECFIT-u kojeg prikazuje Slika 12. dobiveni su logaritmi konstanti stabilnosti za komplekse HSA s jednim i dva vezana dipiridamola te pripadajuće standardne devijacije. Pomoću njih i jednadžbe (11) izračunano je da konstante ravnoteže reakcije vezanja dipiridamola za ta vezna mjesta na HSA iznose redom $1,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ i $4,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Slika 13. prikazuje dobro poklapanje modela vezanja s eksperimentalnim vrijednostima

DIP2.DEM		SPECFIT PARAMETERS			05-07-2023	
Conc vs Metal		[M]/[L]/[H+]			4 Parameters	
MxLyz	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	5.09800D+00	4.76072D-01	
120	y	u	v	1.17837D+01	6.89055D-01	

Slika 12. Model i izračun konstante stabilnosti kompleksa HSA s jednom i s dvije molekule dipiridamola



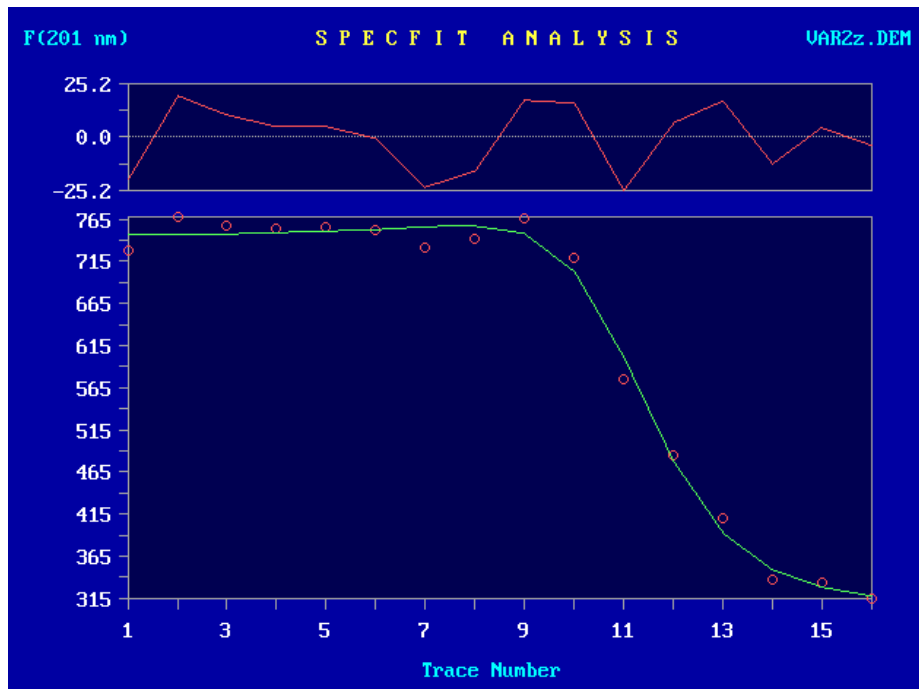
Slika 13. Prikaz modela vezanja te eksperimentalnih vrijednosti (ispod) uz prikaz mjere odstupanja (iznad)

U sljedećem koraku računane su konstante ravnoteže reakcije vezanja varfarina za HSA. U otopini na kojoj su vršena mjerenja mogla su nastati dva različita kompleksa varfarina i HSA. Prvi nastaje vezanjem varfarina za HSA koji na sebi nema prethodno vezani dipiridamol, a u drugom nastaje kompleks varfarin-HSA-dipiridamol. Pretpostavljeno je da prvi kompleks postoji u otopini zbog suviška HSA nad dipiridamolom, a drugi pak zbog suviška varfarina nad HSA u nekim otopinama u titracijskom nizu. Za te komplekse računane su konstante stabilnosti, a za komplekse dipiridamola i HSA unesene su prethodno izračunane konstante. Model i izračun prikazani su Slikom 14.

VAR2.DEM		SPECFIT PARAMETERS			05-07-2023	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			7 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	
110	y	u	f	5.09800D+00	0.00000D+00	
120	y	u	f	1.17837D+01	0.00000D+00	
101	n	u	v	3.95333D+00	1.76534D-01	
111	y	u	v	9.60258D+00	5.09557D-02	

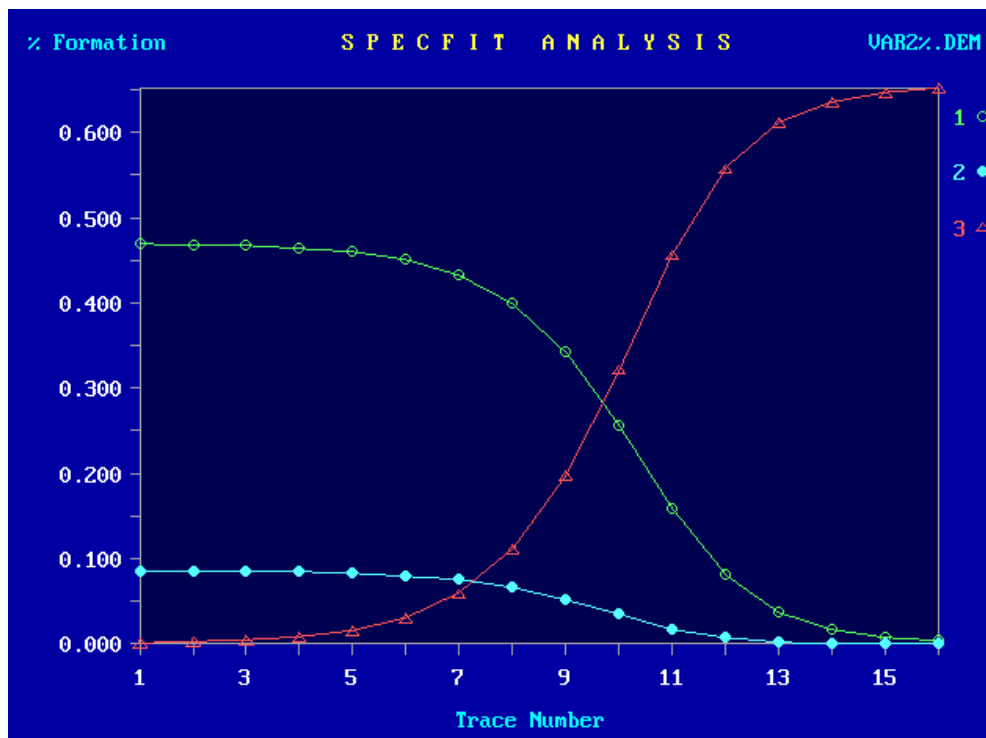
Slika 14. Model i izračun konstante stabilnosti kompleksa HSA i varfarina

Kao rezultat dobiven je logaritam konstante stabilnosti kompleksa varfarin-HSA koji iznosi 3,95 iz čega se može izračunati konstanta ravnoteže reakcije vezanja varfarina za slobodni HSA koja iznosi $8,91 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Također je dobiven i logaritam ukupne konstante stabilnosti kompleksa varfarin-HSA-dipiridamol koji iznosi 9,60 i iz kojeg se pomoću jednadžbe (11) i prethodno izračunate konstante ravnoteže reakcije vezanja dipiridamola za HSA može izračunati da konstanta ravnoteže reakcije vezanja varfarina u kompleks varfarin-HSA-dipiridamol iznosi $3,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Na Slici 15. vidimo da taj model vezanja relativno dobro opisuje eksperimentalne podatke.



Slika 15. Prikaz modela vezanja te eksperimentalnih vrijednosti (ispod)
uz prikaz mjere odstupanja (iznad)

Na Slici 16. prikazana je promjena udjela kompleksa HSA i dipiridamola kroz titraciju. U početku najzastupljeniji je kompleks HSA s jednom molekulom dipiridamola te u manjem udjelu kompleks HSA s dvije molekule dipiridamola. S dodatkom varfarina povećava se i udio kompleksa varfarin-HSA-dipiridamol sve do maksimuma od 65%. U toj točki kompleksa dipiridamol-HSA više nema, dakle preostali dipiridamol koji nije vezan u kompleks varfarin-HSA-dipiridamol ostaje slobodan u otopini.



Slika 16. Prikaz udjela kompleksa HSA i dipiridamola kroz titraciju. Krivulja broj 1 prikazuje udio kompleksa HSA s dvije molekule dipiridamola, krivulja broj 2 udio kompleksa HSA s jednom molekulom dipiridamola, a krivulja broj 3 udio kompleksa HSA s dipiridamolom i varfarinom

5. ZAKLJUČCI

Provedenim eksperimentom pokazano je da vezanje dipiridamola za HSA bolje opisuje model s dva vezna mjesta od kojih za samo jedno ulazi u kompeticiju s varfarinom. U SPECFIT-u izračunane konstante ravnoteže reakcije vezanja dipiridamola za HSA u tom modelu iznose $1,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ i $4,85 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Konstanta ravnoteže reakcije vezanja varfarina za slobodni HSA u tom modelu iznosi $8,91 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, a za vezanje u kompleks varfarin-HSA-dipiridamol iznosi $3,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Prema tim vrijednostima dipiridamol se za HSA veže otprilike 4 do 544 puta jače nego varfarin. Ako se uz to uzme u obzir da dipiridamol ima na HSA jedno vezno mjesto više od varfarina, može se izvući zaključak da bi se pacijentima koji su na terapiji s oba lijeka trebalo preporučiti da prvo uzimaju dipiridamol, a zatim varfarin kako bi se minimizirale nagle promjene u slobodnoj koncentraciji lijeka. Daljnjim istraživanjima mogao bi se ispitati utjecaj različitih čimbenika, poput pH i temperature na vezanje ovih lijekova za HSA.

Polarizacija fluorescencije pokazala se kao relativno pogodna i praktična metoda za određivanje interakcija između HSA i lijekova. Zahvaljujući njenoj jednostavnosti i brzini omogućuje velik broj mjerenja u malom vremenu, što joj daje prednost nad klasičnim metodama, a pozitivno je i što zahtijeva male volumene uzoraka pa se njome troši manje kemikalija. Osim visoke cijene uređaja za mjerenje polarizacije fluorescencije, nedostatak ove metode je što pri visokim koncentracijama proteina otopina postaje viskozija što otežava njezino prebacivanje u mikrotitarsku pločicu za mjerenje te može dovesti do interferencije u mjerenju zbog smanjenja pokretljivosti fluorofora u viskoznom mediju.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ADP – adenzin difosfat

BSA – goveđi serumski albumin

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

DP - dipiridamol

FP – polarizacija fluorescencije

HSA – humani serumski albumin

K – konstanta ravnoteže reakcije vezanja

VF – varfarin

β – ukupna konstanta stabilnosti kompleksa

σ – standardna devijacija

7. LITERATURA

Afrin S, Rahman Y, Alhaji Isa M, Ahmed S, Tabish M. Biophysical insights into the binding characteristics of bovine serum albumin with dipyridamole and the influence of molecular interaction with β cyclodextrin. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 38, 3046-3058.

Chesebro JH, Fuster V, Elveback LR, et al. Trial of Combined Warfarin Plus Dipyridamole or Aspirin Therapy in Prosthetic Heart Valve Replacement: Danger of Aspirin Compared With Dipyridamole. *Am J Cardiol*, 1983, 51, 1537-1541.

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

Gampp H, Maeder M, Meyer CJ, Zuberbühler AD. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data--II: SPECFIT: two user-friendly programs in basic and standard FORTRAN 77. *Talanta*, 1985, 32, 257-264.

Harker LA, Kadatz Karl RA. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb Res Suppl*, 1983, 4, 39-36.

Jacobs LG. Warfarin Pharmacology, Clinical Management, and Evaluation of Hemorrhagic Risk for the Elderly. *Cardiol Clin*, 2008, 26, 157-167.

Ketrat S, Japrun D, Pongprayoon P. Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin. *J Mol Graph Model*, 2020, 98

Kratochwil NA, Huber W, Èller FM, Kansy M, Gerber PR. Predicting Plasma Protein Binding of Drugs: A New Approach. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64, 1355-1374.

Li Q, Yang WY, Qu LL, Qi HY, Huang Y, Zhang Z. Interaction of warfarin with human serum albumin and effect of ferulic acid on the binding. *J Spectro*, 2014, 2014.

Macgregor TR, Sardi ED. In vitro protein binding behavior of dipyridamole. *J Pharm Sci*, 1991, 80, 119-120.

Pouleur H, Buyse M. Effects of dipyridamole in combination with anticoagulant therapy on survival and thromboembolic events in patients with prosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 100(2), 463-472.

Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol*. 2019, 123, 979-990.

Rimac H, Bojić M. Humani Serumski Albumin-Najvažniji Transportni Protein u Krvi. *Farmaceutski glasnik*, 2017, 73, 793-808.

Scheife RT. Protein binding: what does it mean? *Ann Pharmacother*, 1989, 23, 527-531.

Spark® multimode microplate reader for high performance cell-based fluorescence assays, <https://www.tecan.com/blog/spark-multimode-microplate-reader-for-high-performance-cell-based-fluorescence-assays>, pristupljeno 24.6.2023.

Tayyab S, Feroz SR. Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021, 123, 193-218.

Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence Principles and Applications. Wienheim, Wiley-WCH, 2012, str. 1, 53-57, 181-210.

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)

8. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odrediti konstante ravnoteže reakcija vezanja dipiridamola i varfarina na humani serumski albumin (HSA). Dobro poznavanje vezanja lijekova za proteine krvne plazme, posebice za HSA koji je među njima najzastupljeniji, od velike je važnosti za predviđanje farmakokinetičkih svojstava lijekova koji se za njega vežu. S obzirom na to da je samo nevezani udio lijeka farmakološki aktivan, učinak lijeka uvelike ovisi o svojstvima vezanja pa stoga kompeticija za vezna mjesta na proteinu može biti uzrok interakcija među lijekovima. Metoda korištena u ovom radu za proučavanje afiniteta vezanja lijekova za HSA naziva se polarizacija fluorescencije. Zasniva se na svojstvu malih fluorescentnih molekula, među koje spada dipiridamol, da u slobodnom obliku rotiraju velikom brzinom i zahvaljujući tome smanjuju polarizaciju fluorescencije. Prilikom vezanja u kompleks s velikom molekulom, u ovom slučaju HSA, brzina rotacije se značajno smanjuje što dovodi do veće polarizacije fluorescencije. Dodatkom varfarina koji s dipiridamolom ulazi u kompeticiju za vezno mjesto dipiridamol se iz kompleksa oslobađa u otopinu gdje ponovno rotira velikom brzinom i smanjuje polarizaciju fluorescencije. Mjereći polarizaciju fluorescencije bilo je moguće kvantificirati udio vezanog dipiridamola i izračunati konstante ravnoteže reakcija dipiridamola i varfarina za HSA na temelju mjerenja dobivenim prvo titracijom otopine dipiridamola otopinom HSA, a zatim otopine HSA i dipiridamola otopinom varfarina. Izračun je izveden u programu SPECFIT i razmotrena su dva modela vezanja. Pokazalo se da model s dva vezna mjesta za dipiridamol na HSA bolje opisuje eksperimentalne podatke te da je polarizacija fluorescencije pogodna metoda za proučavanje afiniteta vezanja lijekova za HSA.

SUMMARY

The main goal of this work was to determine the binding equilibrium constants of dipyridamole and warfarin to human serum albumin (HSA). A good understanding of blood plasma protein's drug binding properties, especially of HSA's which is the most abundant among them, is of great importance for the prediction of the pharmacokinetic properties of drugs bound by it. Since only the free fraction of the drug can be pharmacologically active, the drug's effect is greatly dependent on its binding properties and because of that the drug's competition for the protein's binding sites can be a cause of drug interactions. The method used in this work to study HSA's drug binding is called fluorescence polarization. It is based upon the property of small fluorescent molecules, such as dipyridamole, to rotate at great speed when unbound and because of that to reduce fluorescence polarization. By binding to a larger molecule, in this case HSA, dipyridamole's rotation speed is greatly reduced, and fluorescence polarization is increased. With the addition of warfarin, dipyridamole's binding site competitor, dipyridamole is released from HSA allowing it to rotate at great speed once again and reduce fluorescence polarization. By measuring fluorescence polarization, it was possible to quantify the bound fraction of dipyridamole and to calculate the binding equilibrium constants based on the measurements obtained first by a titration of a dipyridamole solution with a HSA solution and then by a titration of both dipyridamole and HSA solution with a warfarin solution. The calculations were performed in SPECFIT and two binding models were considered. It was shown that the model in which HSA has two binding sites for dipyridamole better describes the experimental data and that fluorescence polarization is a convenient method for studying HSA's drug binding properties.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KOMPETICIJSKO ODREĐIVANJE KONSTANTI VEZANJA DIPIRIDAMOLA I VARFARINA ZA HUMANI SERUMSKI ALBUMIN POLARIZACIJSKOM FLUORESCENCIJOM

Jan Radanović

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odrediti konstante ravnoteže reakcija vezanja dipiridamola i varfarina na humani serumski albumin (HSA). Dobro poznavanje vezanja lijekova za proteine krvne plazme, posebice za HSA koji je među njima najzastupljeniji, od velike je važnosti za predviđanje farmakokinetičkih svojstava lijekova koji se za njega vežu. S obzirom na to da je samo nevezani udio lijeka farmakološki aktivan, učinak lijeka uvelike ovisi o svojstvima vezanja pa stoga kompeticija za vezna mjesta na proteinu može biti uzrok interakcija među lijekovima. Metoda korištena u ovom radu za proučavanje afiniteta vezanja lijekova za HSA naziva se polarizacija fluorescencije. Zasniva se na svojstvu malih fluorescentnih molekula, među koje spada dipiridamol, da u slobodnom obliku rotiraju velikom brzinom i zahvaljujući tome smanjuju polarizaciju fluorescencije. Prilikom vezanja u kompleks s velikom molekulom, u ovom slučaju HSA, brzina rotacije se značajno smanjuje što dovodi do veće polarizacije fluorescencije. Dodatkom varfarina koji s dipiridamolom ulazi u kompeticiju za vezno mjesto dipiridamol se iz kompleksa oslobađa u otopinu gdje ponovno rotira velikom brzinom i smanjuje polarizaciju fluorescencije. Mjereći polarizaciju fluorescencije bilo je moguće kvantificirati udio vezanog dipiridamola i izračunati konstante ravnoteže reakcija dipiridamola i varfarina za HSA na temelju mjerenja dobivenim prvo titracijom otopine dipiridamola otopinom HSA, a zatim otopine HSA i dipiridamola otopinom varfarina. Izračun je izveden u programu SPECFIT i razmotrena su dva modela vezanja. Pokazalo se da model s dva vezna mjesta za dipiridamol na HSA bolje opisuje eksperimentalne podatke te da je polarizacija fluorescencije pogodna metoda za proučavanje afiniteta vezanja lijekova za HSA.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 16 grafičkih prikaza, 2 tablice i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: polarizacija fluorescencije, konstanta ravnoteže, humani serumski albumin, dipiridamol, varfarin

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Erim Bešić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Tin Weitner, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

COMPETITIVE BINDING FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAY FOR DETERMINATION OF ASSOCIATION CONSTANTS OF DIPYRIDAMOLE AND WARFARIN TO HUMAN SERUM ALBUMIN

Jan Radanović

SUMMARY

The main goal of this work was to determine the binding equilibrium constants of dipyridamole and warfarin to human serum albumin (HSA). A good understanding of blood plasma protein's drug binding properties, especially of HSA's which is the most abundant among them, is of great importance for the prediction of the pharmacokinetic properties of drugs bound by it. Since only the free fraction of the drug can be pharmacologically active, the drug's effect is greatly dependent on its binding properties and because of that the drug's competition for the protein's binding sites can be a cause of drug interactions. The method used in this work to study HSA's drug binding is called fluorescence polarization. It is based upon the property of small fluorescent molecules, such as dipyridamole, to rotate at great speed when unbound and because of that to reduce fluorescence polarization. By binding to a larger molecule, in this case HSA, dipyridamole's rotation speed is greatly reduced, and fluorescence polarization is increased. With the addition of warfarin, dipyridamole's binding site competitor, dipyridamole is released from HSA allowing it to rotate at great speed once again and reduce fluorescence polarization. By measuring fluorescence polarization, it was possible to quantify the bound fraction of dipyridamole and to calculate the binding equilibrium constants based on the measurements obtained first by a titration of a dipyridamole solution with a HSA solution and then by a titration of both dipyridamole and HSA solution with a warfarin solution. The calculations were performed in SPECFIT and two binding models were considered. It was shown that the model in which HSA has two binding sites for dipyridamole better describes the experimental data and that fluorescence polarization is a convenient method for studying HSA's drug binding properties.

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

Thesis includes: 30 pages, 16 figures, 2 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: fluorescence polarization, equilibrium constant, human serum albumin, dipyridamole, warfarin

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

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

Tin Weitner, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.