

Utjecaj glikozilacije alfa1-kiselog glikoproteina na vezanje dipiridamola, imatiniba i azitromicina

Odobašić, Dunja

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:121774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Dunja Odobašić

**Utjecaj glikozilacije α 1-kiselog glikoproteina
na vezanje dipiridamola, imatiniba i
azitromicina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

Zahvaljujem se svome mentoru izv. prof. dr. sc. Mariu Gabričeviću koji mi je omogućio vodstvo i svu potrebnu opremu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliku zahvalnost također dugujem asistentu na Zavodu, Robertu Kerepu, mag. chem. koji me je nadzirao, savjetovao i pomagao kad god je trebalo. Hvala mu na strpljenju i izdvojenom vremenu za moje brojne upite te na ugodnoj i nadasve uvijek veseloj radnoj atmosferi. Zahvaljujem se i svim profesorima i asistentima na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na suradnji, ugodnom boravku i stečenim znanjima.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	$\alpha 1$ – KISELI GLIKOPROTEIN	2
1.1.1	BIOKEMIJSKA SVOJSTVA	2
1.1.2	FIZIOLOŠKA ULOGA	3
1.1.3	GENETIČKE VARIJANTE	4
1.1.4	FAKTORI KOJI ODREĐUJU VEZANJE LIJEKA	5
1.2	IZABRANI LIJEKOVI	6
1.2.1	DIPIRIDAMOL	6
1.2.2	IMATINIB	7
1.2.3	AZITROMICIN	8
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	9
3.	METODE I MATERIJALI	10
3.1	FLUORESCENCIJSKA SPEKTROSKOPIJA	10
3.2	KONSTANTA VEZANJA (K_a)	13
3.3	MATERIJALI I PRIPRAVA OTOPINA	15
4.	REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1	DIPIRIDAMOL	18
4.1.1	DIPIRIDAMOL I NATIVNI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN	19
4.1.2	DIPIRIDAMOL I DESIJALINIZIRANI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN ..	21
4.2	IMATINIB	23
4.2.1	IMATINIB I NATIVNI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN	24
4.2.2	IMATINIB I DESIJALINIZIRANI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN	26
4.3	AZITROMICIN	28
4.3.1	AZITROMICIN I NATIVNI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN	29
4.3.2	AZITROMICIN I DESIJALINIZIRANI $\alpha 1$ -KISELI GLIKOPROTEIN ..	31
4.4	UDIO SLOBODNE I VEZANE FRAKCIJE LIJEKOVA PREMA HySS-u	32

5.	ZAKLJUČCI	35
6.	LITERATURA	36
7.	SAŽETAK / SUMMARY	39

1. UVOD

U ljudskoj se krvi nalaze različiti proteini koji imaju brojne funkcije. Od proteina plazme najzastupljeniji je albumin, a nakon njega α 1-kiseli glikoprotein (AGP). Iako je koncentracija AGP-a u plazmi bitno manja od koncentracije albumina, on je jedan od glavnih makromolekula na koje se vežu lijekovi u plazmi. Vežanje lijekova za proteine plazme važan je korak za distribuciju, djelovanje i dispoziciju samog lijeka (Israili i Dayton, 2001).

Kada lijek uđe u cirkulaciju, veže se u određenoj mjeri za proteine plazme. Udio vezanja pri ravnotežnim uvjetima određuje koncentraciju slobodnog lijeka, a samo slobodna (nevezana) frakcija smatra se aktivnim oblikom lijeka, u skladu s „principom slobodnog lijeka“ (Trainor, 2007). Plazmatska koncentracija AGP-a može se mijenjati u različitim fiziološkim i patološkim stanjima što rezultira promjenama u vezanju različitih lijekova i drugih liganada. To može imati značajan učinak na farmakokinetiku i na farmakodinamiku lijekova, osobito onih:

1. koji su visoko vezani za AGP (vezanje ≥ 80 % i $K_a > 10^5$ L/mol),
2. koji imaju mali volumen distribucije,
3. kojima je AGP glavni protein vezanja u plazmi (Tillement i sur. 1984).

U mnogim je medicinskim stanjima i bolestima važno znati kako se mijenja koncentracija slobodne frakcije lijeka ovisno o promjeni koncentracije ili glikozilacije plazmatskih proteina. Kada koncentracija AGP-a u plazmi raste, koncentracija slobodnog lijeka, očekivano se smanjuje zbog pojačanog vezanja što rezultira smanjenom učinkovitošću lijeka *in vivo*. Osim toga, poznavanje konstanti vezanja važno je za lijek-lijek interakcije u veznom mjestu, pogotovo za lijekove uske terapijske širine. Lijek koji ima veći afinitet „istisnut“ će onaj manjeg afiniteta iz veznoga mjesta, a njegova koncentracija u plazmi će rasti čime može pojačati svoju farmakološku aktivnost (terapijsku ili toksičnu).

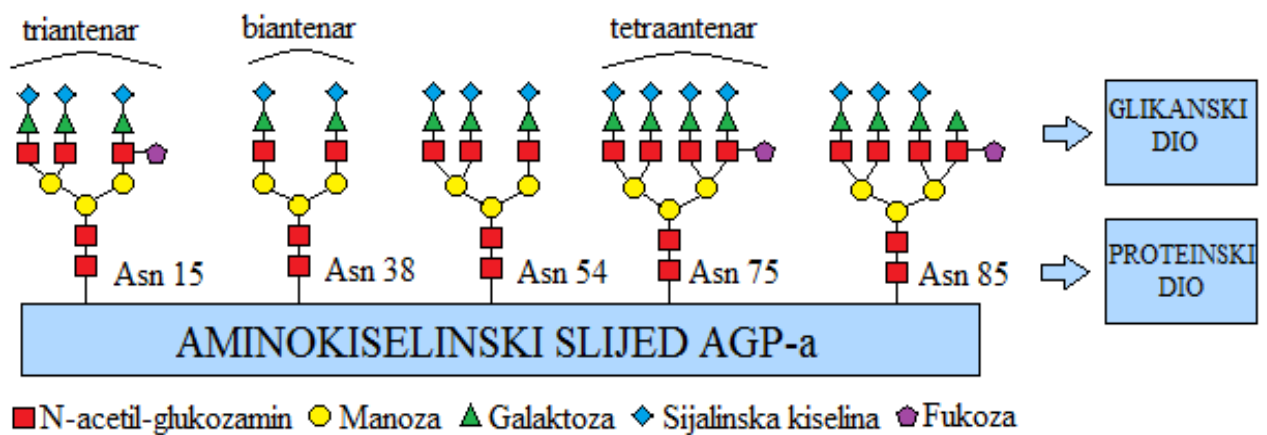
Obzirom na sve navedeno, ovaj je rad izrađen kako bismo ispitali postoje li razlike u konstantama vezanja odabranih lijekova za AGP, i to između AGP-a u njegovom nativnom obliku i AGP-a koji je desijaliniziran. Pomoću konstanti vezanja može se izračunati i udio slobodnog lijeka u plazmi, a to nam može biti pokazatelj interindividualnih razlika među pojedincima i dobar put ka personaliziranoj terapiji.

1.1 α 1 – KISELI GLIKOPROTEIN

1.1.1 BIOKEMIJSKA SVOJSTVA

AGP je kiseli ($pK_a = 2.6$; $pI = 2.7$) izrazito glikozilirani protein (38.8 – 48 kDa) koji se sastoji od 59 % proteina i 41 % ugljikohidrata. Proteinski dio čini jednostruki polipeptidni lanac koji se sastoji od 204 aminokiselinskih ostataka međusobno povezanih disulfidnim vezama, dok ugljikohidratni dio čini pet *N*-povezanih sijaliniziranih glikana zbog kojih je on negativno nabijen pri fiziološkom pH (Slika 1.). Zbog svega navedenoga, AGP je više selektivan za bazične i neutralne lijekove, no i određeni kiseli lijekovi vežu se za njega, ali s manjim afinitetom (Schmid, 1989).

AGP se sintetizira uglavnom u hepatocitima, a zatim se raspodjeljuje tjelesnim tekućinama poput plazme, mukusa, želučanog soka, cerebrospinalne tekućine i sl. Oko 60 % AGP-a u tijelu nalazi se u krvi kao centralnom odjeljku, a ostatak je raspoređen u organima koji čine periferne odjeljke. Neka druga tkiva mogu također sintetizirati AGP kao odgovor na upalu i takva je sinteza obično stimulirana citokinima, prostaglandinom E2 i cAMP-om (Koj, 1974). AGP se razgrađuje u jetri i preko stanica monocitne loze, a poluvrijeme eliminacije izotopa ^{125}I označenog AGP-a iznosi oko 5 dana (Ashwell i Steer, 1981).



Slika 1. Shematski prikaz strukture α 1-kiselog glikoproteina.

1.1.2 FIZIOLOŠKA ULOGA

α 1-kiseli glikoprotein poznat je i kao protein akutne faze, a njegova koncentracija u plazmi varira kod različitih bolesti. Povećana je kod upalnih reakcija, ozljeda i tijekom operacija, ali može biti i smanjena kod npr. tumora jetre, hepatitisa i nefrotičkog sindroma (Yokogawa et al. 2007). Kod zdravih osoba koncentracija u plazmi kreće se od 0.55 do 1.4 mg/mL (~12-31 μ M), a u određenim okolnostima može varirati i do 6 puta (Kremer i sur. 1988).

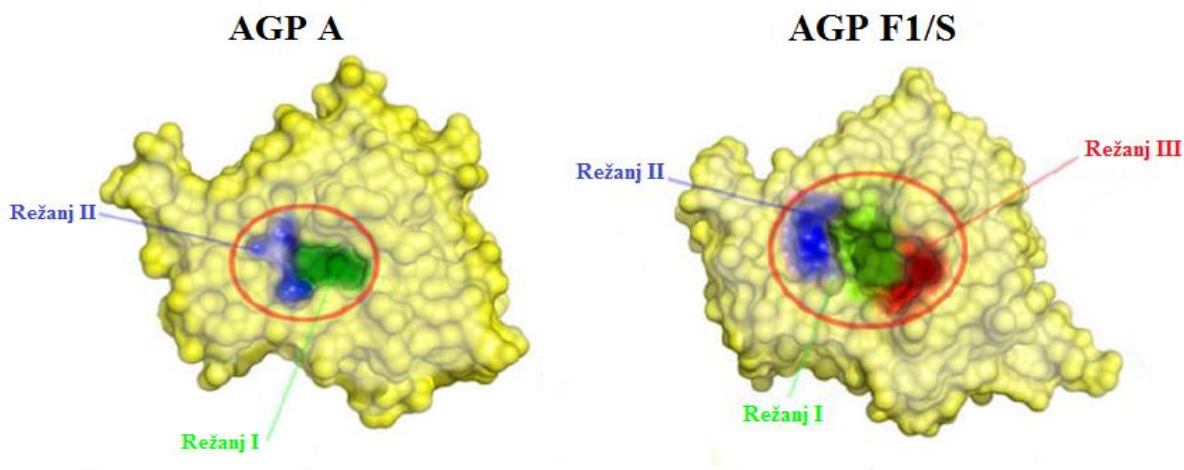
Iako je njegova precizna uloga u tijelu još uvijek nejasna, smatra se da je uključen u puno bioloških procesa premda nisu svi dokazani u literaturi. AGP je identificiran u plazmi kao jedan od glavnih proteina koji veže steroide i kateholamine te kao transportni protein za bazične lijekove poput antidepresiva, neuroleptika i β -blokatora (Herve i sur. 1992). U endotelnim stanicama važna je komponenta kapilarne barijere koja je esencijalna za kapilarnu selektivnost (Sorensson i sur. 1999). Može poslužiti i kao opći protektivni agens u infekcijama jer se veže za toksine ili inhibira vezanje određenih bakterija i virusa (Moore i sur. 1997). AGP stimulira mononuklearne stanice i makrofage na lučenje tumorskog nekrotičnog faktora (TNF- α), ali inhibira TNF-om induciranu apoptozu (mišjih) hepatocita i osigurava zaštitu protiv drugih toksičnih učinaka TNF-a (Van Molle i sur. 1997). Interakcija AGP-a s kolagenom dovodi do tvorbe dugih vlakana koji možda imaju veze sa zacjeljenjem rana (Franzblau i sur. 1976). Promovira rast na HeLa, H-6 (Maeda i sur. 1980) i živčanim stanicama (Liu i sur. 1989).

Iako je AGP jedan od proteina akutne faze, razlog zašto njegova koncentracija raste kao odgovor na upalu ili ozljedu tkiva nije u potpunosti jasan. Povećana sinteza i sekrecija AGP-a može biti odgovor tkiva na njegova biološka djelovanja: imunosupresivno djelovanje, imunomodulatornu aktivnost, inhibiciju interleukina-2, inhibiciju proliferacije limfocita, vezanje endogenih i egzogenih medijatora upale uključujući histamin, inhibiciju agregacije trombocita, inhibiciju aktivacije neutrofila (Israili i Dayton, 2001). Kod nekih pacijenata reakcija akutne faze je ili nepotpuna ili odsutna pa kod njih plazmatska koncentracija AGP-a ne raste.

1.1.3 GENETIČKE VARIJANTE

Ljudski α 1-kiseli glikoprotein postoji u tri genetičke varijante – F1, S i A koje se međusobno mogu odijeliti izoelektroforetski kao jednim od načina odijeljivanja. Ekspresija AGP-a pod kontrolom je dva susjedna gena *ORM1* (syn. *AGP-A*) i *ORM2* (syn. *AGP-B/B'*) koji se nalaze na kromosomu 9. Aktivniji je gen *ORM1* koji se inducira tijekom reakcija akutne faze i on kodira za F1 i S, a gen *ORM2* za A varijantu. F1 i S varijante razlikuju se samo u jednoj aminokiselini (Gln20 \rightarrow Arg20), stoga možemo govoriti o F1/S varijanti. A varijanta se od prethodne razlikuje u najmanje 22 aminokiseline. U ljudskoj plazmi, varijante se općenito pojavljuju u približnom omjeru 3:1 (F1/S:A), međutim taj omjer može varirati između pojedinaca i tijekom upale ili bolesti (Dente i sur. 1987).

Vezno mjesto liganda kod F1/S varijante veće je i posjeduje 3 reznja. Režanj I predstavlja veliki odjeljak i tu se smještaju hidrofobni dijelovi liganda, a postranični reznjevi, II i III manji su i imaju kiseli karakter zbog kiselinskih ostataka Glu64 (II) i Asp115 (III). A varijanta ima uže mjesto vezanja te posjeduje samo 2 reznja – glavni hidrofobni režanj I i manji postranični režanj II (Slika 2.). F1/S varijanta pokazuje širu selektivnost i manji afinitet vezanja lijekova, a za A varijantu vrijedi obratno (Schonfeld i sur. 2008). Disocijacijska konstanta lijekova vezanih za F1/S varijantu u korelaciji su s njihovom lipofilnošću, a za varijantu A nisu, što bi značilo da se vezanje lijekova za F1/S može odrediti prema lipofilnosti lijeka (Kazuhiko, 2017).



Slika 2. Razlika veznog mjesta između F1/S i A varijante (preuzeto i prilagođeno iz Huang i sur. 2012).

1.1.4 FAKTORI KOJI ODREĐUJU VEZANJE LIJEKA

In vivo vezanje lijeka za AGP pod utjecajem je brojnih faktora, a neki od njih su: koncentracija liganda, koncentracija AGP-a, pH vrijednost, prisutnost drugih liganada koji se natječu za vezanje s AGP-om, prisutnost drugih proteina (poput albumina) koji također vežu ligande, broj i priroda veznog mjesta AGP-a, različite varijante proteina i dr. (Israili i Dayton, 2001).

Vezanje lijekova može biti promijenjeno u određenim patološkim i fiziološkim stanjima zbog abnormalnog AGP-a kao rezultat:

1. promjena u sijalinizaciji ili fukozilaciji,
2. promjena u glikozilacijskom uzorku,
3. povećanoga grananja oligosaharidnih lanaca,
4. smanjenoga broja veznih mjesta po molekuli AGP-a.

Promjene u glikozilacijskom uzorku dokazane su na zdravim osobama starije životne dobi (Ballou i sur. 1996), kod žena na terapiji oralnim estrogenima i u kasnom stadiju trudnoće (Raynes, 1982). Nadalje, AGP kod žena ima puno više sijaliniziranih glikoformi nego kod muškaraca, a kapacitet vezanja lijeka obično se smanjuje kako raste broj grananja glikanskog lanca (Kishino i sur. 1997). Abnormalan AGP primijećen je kod pacijenata s različitim tumorima, dijabetesom, velikom depresijom, jetrenih bolesti, renalne insuficijencije, infekcija, posttransplantacijski i sl. (Israili i Dayton, 2001).

Isto tako, brojni nepatološki faktori mogu mijenjati koncentraciju α 1-kiselog glikoproteina. Različite su koncentraciju proteina ovisno o stadiju života (fetus, mala djeca, odrasli, stariji), spolu, reproduktivnom stadiju žene (menstruacijski ciklus, trudnoća, menopauza), rasi, tjelesnoj težini, pušenju i dr. Također, određeni lijekovi mogu snižavati koncentraciju AGP-a (npr. steroidni hormoni, estrogeni, tamoksifen) ili ju povećavati (npr. glukokortikoidi, izotretinoin, amitriptilin). Usprkos tome, takvi podaci se uglavnom nekonzistentni jer se razlikuju u različitim studijama, stoga ih ne možemo sa sigurnošću uzeti u obzir (Israili i Dayton, 2001).

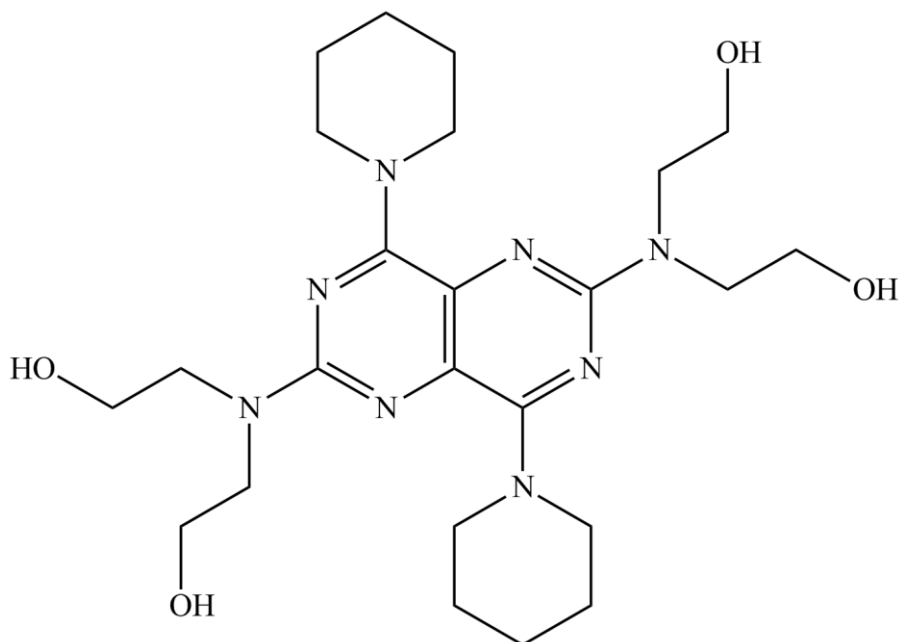
Faktori koji mijenjaju koncentraciju AGP-a u plazmi, njegovu strukturu ili imaju utjecaj na prirodu veznoga mjesta mogu značajno utjecati i na *in vivo* vezanje lijeka, a posljedično i na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova.

1.2 IZABRANI LIJEKOVI

Za ovo istraživanje odabrani su dipiridamol, imatinib i azitromicin. Dipiridamol i imatinib odabrani su zbog svoje relativno dobre topljivosti u vodi (Ph. Eur. 4.0.) i visokog afiniteta vezanja za AGP, tj. relativno velike konstante vezanja (asocijacije) (Israili i Dayton, 2001). Azitromicin je izabran radi svoga podrijetla, terapijske učinkovitosti i nedovoljno podataka u literaturi.

1.2.1 DIPIRIDAMOL

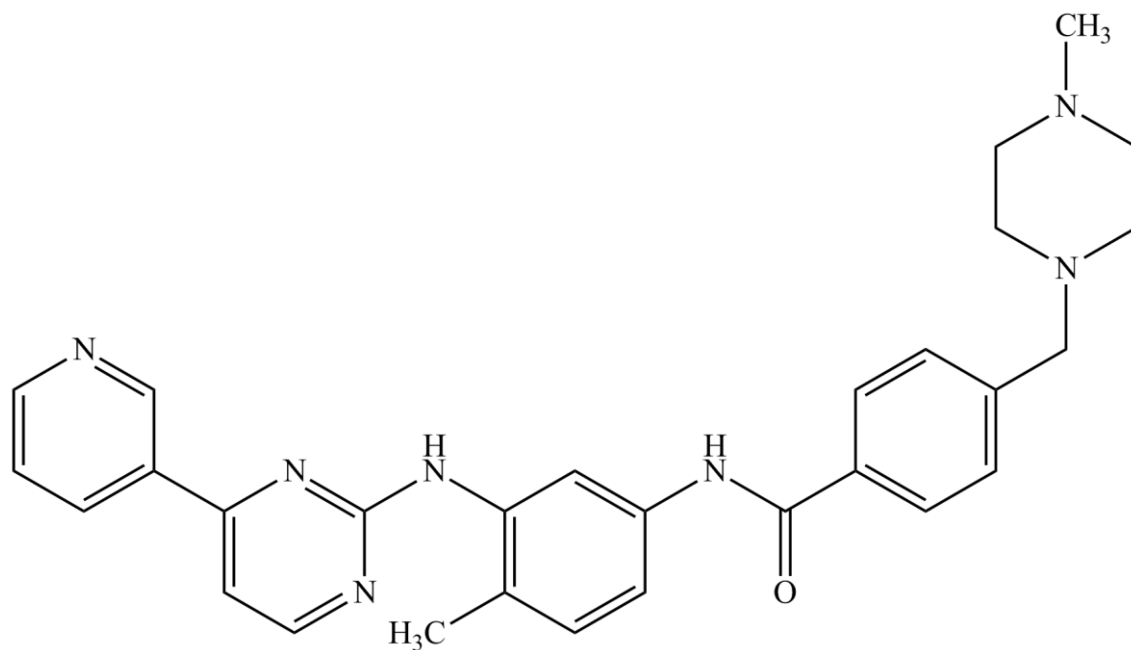
Dipiridamol pripada skupini antitrombocitnih lijekova. Njihova uloga je smanjiti agregaciju trombocita, a na taj način i smanjiti mogućnost nastanka tromba u arterijskoj cirkulaciji. Dipiridamol inhibira enzim fosfodiesterazu-3 (PDE3) te tako povećava razinu cikličkog AMP-a (cAMP) u trombocitima. Fosfodiesteraza-3 cijepa cAMP u AMP, njenom inhibicijom povećava se koncentracija cAMP-a, a upravo on inhibira agregaciju trombocita i dovodi do vazodilatacije (Katzung i sur. 2011). Dipiridamol također potiče biosintezu i oslobađanje prostaciklina iz endotela. Ovaj se lijek koristi uz oralne anitkoagulanse u profilaksi tromboze nakon ugradnje umjetnih srčanih zalistaka te u bolnici u dijagnostici koronarne ishemije (Francetić i sur. 2015). Za mjerenje je korištena sol dipiridamola zbog njegove bolje topljivosti u vodu. Konstanta vezanja ili konstanta asocijacije (K_a) za α 1-kiseli glikoprotein je poznata i iznosi 8.0×10^5 (Israili i Dayton, 2001).



Slika 3. Strukturni prikaz dipiridamola.

1.2.2 IMATINIB

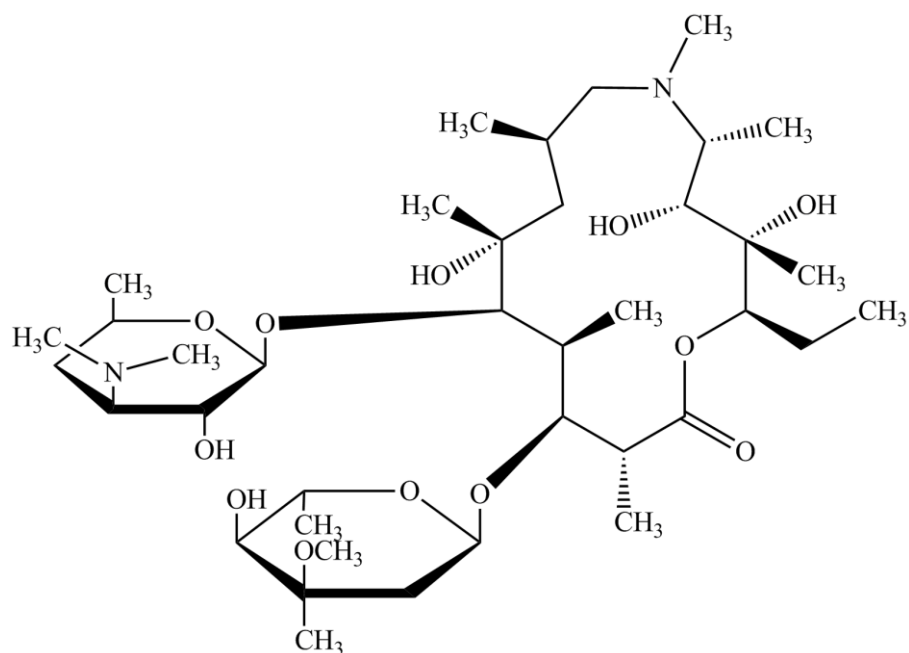
Imatinib je lijek koji spada u skupinu antineoplastika, odnosno citostatika koji inhibiraju protein-kinazu. Primjenjuje se u liječenju kronične mijeloične leukemije s pozitivnim *Philadelphia*-kromosomom jer selektivno inhibira proliferaciju i izaziva apoptozu u tumorskim stanicama. U takvoj bolesti protein-tirozin kinaza *Bcr-Abl* stalno je aktivna te time dovodi do konstantne fosforilacije unutarstaničnih molekula koje onemogućavaju staničnu smrt apoptozom i tako nastaju tumorske stanice. Imatinib kao mala molekula ostvaruje selektivnu i potentnu aktivnost upravo na tim protein-tirozin kinazama pa svojim djelovanjem poboljšava simptome i kvalitetu života pacijenata (Fitos i sur. 2011). Lijek se daje bolesnicima u prvoj kroničnoj fazi bolesti te kod bolesnika s uznapredovalom bolešću, ali i kod neoperabilnih ili metastazirajućih malignih gastrointestinalnih stromalnih tumora (GIST) i akutne limfoblastične leukemije (Francetić i sur. 2015.). Za mjerenje je također korištena sol imatiniba kako bi imao što veću topljivost u vodi, a njegova konstanta vezanja (K_a) za α 1-kiseli glikoprotein je poznata i trenutno iznosi 1.7×10^6 (Fitos i sur. 2011).



Slika 4. Strukturni prikaz imatiniba.

1.2.3 AZITROMICIN

Azitromicin pripada skupini antibiotika, odnosno lijekova za liječenje bakterijskih infekcija za sustavnu primjenu i to u makrolide. Makrolidi inhibiraju sintezu bakterijskih proteina tako što se vežu na 50S podjedinicu ribosoma bakterije te također inhibiraju translokaciju peptida. Njihov spektar djelovanja obuhvaća niz gram-pozitivnih, gram-negativnih i anaerobnih bakterija. Za razliku od ostalih makrolida, azitromicin posjeduje specifične farmakokinetičke osobine zbog kojih je njegova primjena, ali i doziranje drugačije. On se nakuplja unutar stanica gdje aktivira neutrofile i makrofage, zbog toga nalazi se u visokim koncentracijama unutar stanica i na taj način jako dobro djeluje na unutarstanične uzročnike infekcija. Njegove koncentracije u tkivima znatno premašuju (i do deset puta) koncentraciju u serumu. Zbog svoga dugog vremena polueliminacije $t_{1/2}$ (oko 70h) vrlo se sporo eliminira iz organizma pa je trajanje njegove primjene skraćeno na 3 dana s obzirom na to da će koncentracija azitromicina na mjestu infekcije biti dovoljno visoka narednih 7-10 dana. Ovaj lijek indiciran je za brojne bakterijske infekcije – liječenje infekcija dišnog sustava, kože i mekih tkiva, spolno prenosivih bolesti, kroničnog migrirajućeg eritema, ulkusne bolesti te atipičnih mikobakterioza kod HIV-pozitivnih bolesnika (Francetić i sur. 2015). Za mjerenje korištena je čista supstanca azitromicina. Azitromicin gotovo je netopljiv u vodi, lako topljiv u bezvodnom etanolu i metilenkloridu. Njegova konstanta vezanja (K_a) za α 1-kiseli glikoprotein do sada nije poznata u literaturi.



Slika 5. Strukturni prikaz azitromicina.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Važnost AGP-a opisana je u velikom broju znanstvenih radova koji pokazuju razlike u glikozilacijskom obrascu u brojnim fiziološkim i patološkim stanjima. Usprkos tome, moguće je pronaći tek vrlo malo podataka koji detaljno opisuju utjecaj glikozilacijske promjene na kapacitet vezanja lijeka.

Obzirom da postoje tri glavna čimbenika koji utječu na vezanje lijekova za AGP - koncentracija AGP-a, udio pojedinih genetskih izoformi (varijanta A naspram F1/S varijante) te promjene u glikozilacijskom uzorku AGP-a, u ovome radu će biti opisan samo utjecaj glikozilacijske promjene te procjena istoga na koncentraciju „slobodnog lijeka“. Promjena uzorka glikozilacije molekula poput proteina plazme rezultirat će izmijenjenim interakcijama i posljedično učinkom u organizmu. Zbog interakcija u vezanju lijekova koje uzrokuje sijalinska kiselina u molekuli AGP-a, smatra se da vezanje lijekova u velikoj mjeri ovisi upravo o glikozilaciji proteina što rezultira povećanjem ili smanjenjem slobodne frakcije lijeka u organizmu. Za određivanje utjecaja glikozilacijskih promjena AGP-a na vezanje lijekova u ovome radu koristit će se metoda fluorescencijske spektroskopije.

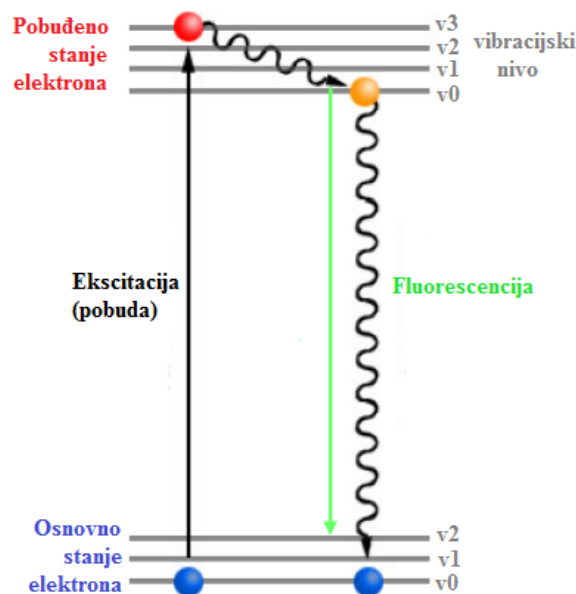
U sklopu ovoga diplomskoga rada proveden je eksperimentalni dio u kojemu su se mjerile konstante vezanja dipiridamola, imatiniba i azitromicina za α 1-kiseli glikoprotein. Dipiridamol i imatinib odabrani su zbog svoga visokog afiniteta vezanja za AGP, a azitromicin radi svoga podrijetla, terapijske učinkovitosti i nedovoljno podataka u literaturi. Lijekovi s visokim afinitetom vezanja za AGP su od posebnog interesa. Oni imaju mali udio slobodnog lijeka pa ukoliko dođe do promjene konstante vezanja, značajno će se promijeniti i količina slobodnog lijeka u organizmu. Ovim će se radom pokušati razriješiti kako različito glikozilirani oblici AGP-a utječu na konstantu vezanja te koje su terapijske posljedice ovih promjena. Promjena konstante vezanja mogla bi imati klinički značajan utjecaj u slučaju da se slobodna frakcija lijeka značajno poveća ili smanji. Tada je potrebna korekcija doze kako bi se izbjegla poddoziranost (izostanak učinka lijeka) ili predoziranost (toksičnost lijeka) pacijenta.

3. METODE I MATERIJALI

Eksperimentalni dio ovoga diplomskoga rada obuhvaća četiri dijela: pripremu svih potrebnih reagensa i otopina, desijalinizaciju nativnog α 1-kiselog glikoproteina enzimatskom metodom, mjerenje fluorescencije kompleksa koji nastaje vezanjem lijeka na protein te obrada i usporedba dobivenih rezultata.

3.1 FLUORESCENCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Kod molekula koje ne fluoresciraju kada elektron prijeđe u pobuđeno stanje, on se vraća nazad u osnovno stanje gubeći energiju koju je primio pretvorbom elektronske u vibracijsku energiju. Elektroni se pobuđuju apsorpcijom fotona. Ako molekula ima rigidnu strukturu, gubitak elektronske energije pretvorbom u vibracijsku je relativno spor i zato postoji šansa da se elektronska energija emitira kao ultraljubičasto (UV) ili vidljivo zračenje (Vis). Fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula vraća u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja (Slika 6.).



Slika 6. Promjena energije zbog apsorpcije UV/Vis zračenja koja rezultira fluorescencijom (preuzeto i prilagođeno iz predavanja, Analitika lijekova, prof. dr. sc. Biljana Nigović, 2018).

Energija emitiranog zračenja niža je od apsorbirane energije, a valna duljina emitiranog zračenja pomaknuta je za 50 – 150 nm prema većim valnim duljinama u usporedbi s valnom duljinom pobudnog zračenja. To se zove Stokesov pomak, a događa se jer se pobuđeni elektroni kreću do najnižeg vibracijskog stanja u pobuđenom stanju prije vraćanja u osnovno stanje.

Nije u potpunosti moguće predvidjeti koliko jako će neka molekula fluorescirati, ali obično su to molekule koje imaju više kromofora i rigidnu (krutu) strukturu. U kromofore ubrajamo visoko konjugirane dvostruke vezane strukture, spojeve koji sadrže aromatske prstene i cikličke karbonilne spojeve. Takva struktura onemogućava da se energija utroši na rotaciju molekule oko jednostrukih veza već da se ona emitira kao elektromagnetno zračenje kada elektron prelazi u niža stanja.

Zbog gore navedenog, aromatske aminokiseline prisutne u većini proteina – triptofan, tirozin i fenilalanin pokazuju promjenu intenziteta fluorescencije nakon pobude u UV dijelu spektra pa se nazivaju još i fluorofori. Intenzitet fluorescencije ovisi o broju fluorofora u proteinu i njihovom kvantnom iskorištenju. Kvantno iskorištenje triptofana je najveće i dominira pri fluorescenciji proteina uz pobudu zračenjem valne duljine od 280 nm. Vođeni tom činjenicom, ekscitacijom triptofanskih ostataka u α 1-kiselom glikoproteinu doći će do promjena intrizične fluorescencije triptofana, a time i do promjene fluorescencije proteina u ovisnosti o količini vezanog lijeka. Intrizična fluorescencija proteina kao metoda ima određene prednosti, a to su: jednostavnost, brzina, pouzdanost i reproducibilnost.

Važni čimbenici koji još utječu na intenzitet fluorescencije su:

1. koncentracija otopine analita – ne smije biti previsoka jer se emitirano zračenje može ponovno apsorbirati drugim nepobuđenim molekulama,
2. sastav otopine – teški metali gase fluorescenciju,
3. temperatura – njenim povećanjem povećava se vibracijska relaksacija,
4. viskoznost otapala – viskoznija otapala povećavaju fluorescenciju,
5. pH medija – ioniziranost molekule može mijenjati fluorescenciju,
6. stvaranje kompleksnih struktura s drugim molekulama u otopini.

Intenzitet fluorescencije proporcionalan je snazi pobudnog zračenja koje se apsorbira, to se može zapisati formulom kao:

$$F = K' (P_0 - P),$$

pri čemu P_0 predstavlja snagu upadnog snopa, a P snagu snopa nakon prolaza kroz otopinu, K' je konstanta ovisna o djelotvornosti fluorescencije sustava, a F intenzitet fluorescencije. Konstanta K' dobije se umnoškom dvije konstante - Φ_f koja predstavlja kvantno iskorištenje i konstante K'' koja je ovisna o geometriji i drugim faktorima.

Fluorescencija slijedi Beerov zakon pa se može zapisati i kao jednadžba:

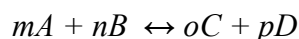
$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\varepsilon bc}$$

pri čemu ε označava molarnu apsorptivnost molekule koja fluorescira, b duljinu sloja otopine kroz koju prolazi snop zračenja i c koncentraciju fluorescirajuće otopine.

Fluorescencijska spektroskopija pronašla je svoju široku upotrebu zbog svoje velike osjetljivosti (10 - 1000 puta osjetljivija je od apsorpcijskih metoda) i strukturne specifičnosti. Metoda, kao i sve druge, ima svoje prednosti i ograničenja. Prednosti su upravo njena osjetljivost, selektivnost određivanja fluorescentnih spojeva u prisutnosti velikoga broja spojeva koji ne pokazuju fluorescenciju i mogućnost korištenja za praćenje promjena u složenim molekulama. Mana fluorescencijske spektroskopije je što se kao tehnika može primijeniti samo na ograničeni broj molekula i što postoje brojni čimbenici koji na nju utječu i mogu interferirati s fluorescencijom. Jedna od njenih brojnih primjena je i praćenje vezanja lijekova za proteine i određivanje konstanti vezanja, zbog čega je upravo ona odabrana kao metoda za eksperimentalna mjerenja (Watson, 1999).

3.2 KONSTANTA VEZANJA (K_a)

Da bismo razumjeli eksperimentalni dio ovoga rada i dobivene rezultate, bitno je objasniti što je to konstanta vezanja i kako do nje dolazimo, a da bismo to mogli, moramo se dotaknuti i pojma kemijske ravnoteže. Kod reverzibilnih kemijskih reakcija zbivaju se ukupno dvije reakcije: napredna reakcija koja se zbiva u smjeru nastajanja produkata iz reaktanata te povratna reakcija koja se zbiva u smjeru ponovnog nastanka reaktanata iz produkata. Ukupna reakcija može se prikazati jednadžbom:



pri čemu m , n , o i p označavaju broj molekula u reakciji, A i B su molekule reaktanta, a C i D molekule produkata.

Brzina napredne reakcije (v_1) kojom nastaju produkti C i D s vremenom se smanjuje jer opada koncentracija reaktanata. To se može zapisati jednadžbom:

$$v_1 = k_1 [A]^m [B]^n$$

Brzina povratne reakcije (v_2) kojom nastaju reaktanti A i B s vremenom raste jer opada koncentracija produkata reakcije. To se može također zapisati jednadžbom te ona glasi:

$$v_2 = k_2 [C]^o [D]^p$$

U onome trenutku kada su brzina napredne i brzina povratne reakcija jednake, reakcija se prestaje odvijati i nastupa stanje dinamičke ravnoteže te se svi reaktanti i produkti nalaze u kemijskoj ravnoteži. Uvjet kemijske ravnoteže je da vrijedi:

$$v_1 = v_2$$

ako uvrstimo gore navedene jednadžbe za brzine kemijskih reakcija, dobit ćemo:

$$k_1 [A]^m [B]^n = k_2 [C]^o [D]^p$$

ili:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C]^o [D]^p}{[A]^m [B]^n}$$

Pošto je omjer konstanta također stalna vrijednost, kvocijent konstante brzine napredne reakcije i konstante brzine povratne reakcije može se zapisati novom konstantom K . Prethodni izraz za ravnotežno stanje može se onda zapisati i kao:

$$K = \frac{[C]^o [D]^p}{[A]^m [B]^n}$$

Gornji izraz poznat je pod nazivom zakon o djelovanju masa ili zakon kemijske ravnoteže, a konstanta K naziva se konstantom kemijske ravnoteže. Njena brojčana vrijednost određuje položaj ravnoteže. Što je veća konstanta brzine napredne reakcije, a manja konstanta brzine povratne reakcije, to je veća konstanta ravnoteže ukupne reakcije. Što je veća konstanta ravnoteže neke kemijske reakcije, tada je ravnoteža više pomaknuta prema stvaranju produkata. Na konstantu kemijske ravnoteže mogu utjecati pH ili temperatura sustava te tako promijeniti njenu vrijednost. Red veličine brojčane vrijednosti konstante kemijske ravnoteže kreće se od oko 10^{-50} do 10^{50} , a njena mjerna jedinica ovisi o broju molekula koje sudjeluju u reakciji te je izražena jedinicama mol i dm^3 (Filipović i Lipanović, 1995).

Ovaj radi bavi se kemijskom reakcijom između $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina i izabranih lijekova pri čemu nastaje njihov kompleks. To se može prikazati i reakcijom:



pri čemu AGP predstavlja slobodnu molekulu $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina, L slobodnu molekulu izabranog lijeka, a AGP+L je novonastali kompleks između lijeka i $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina. Izraz za konstantu kemijske ravnoteže K računao bi se prema jednadžbi:

$$K = \frac{[AGP+L]}{[AGP][L]}$$

Iz gore navedenog izraza jasno je vidljivo da se promjenom konstante kemijske ravnoteže može promijeniti omjer novonastalog kompleksa i koncentracije slobodne frakcije AGP, odnosno izabranog lijeka. To može dovesti i do samih promjena u djelovanju lijeka, jer kako je rečeno u prethodnim poglavljima, samo slobodna frakcija lijeka može biti djelotvorna. Izraz za konstantu kemijske ravnoteže u kojemu se u brojniku nalazi kompleks, a u nazivniku reaktanti u svojem slobodnom, tj. nevezanom obliku naziva se još konstanta vezanja ili konstanta asocijacije (K_a).

3.3 MATERIJALI I PRIPRAVA OTOPINA

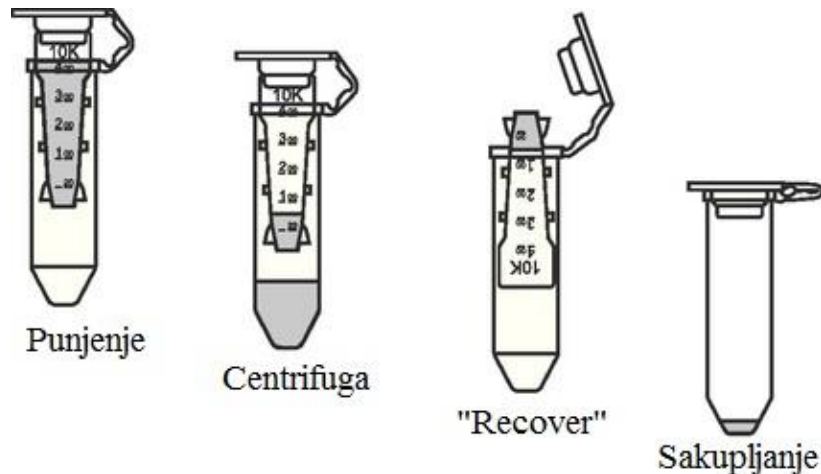
Za mjerenje su korišteni komercijalno dostupni nativni α 1-kiseli glikoprotein (Sigma), metansulfonska sol imatiniba (LC Laboratories), dipiridamol monoklorid (Sigma) i azitromicin (Pliva). Desijalinizirani oblik α 1-kiselog glikoproteina dobiven je djelovanjem enzima sijalidaze na smjesu nativnog α 1-kiselog glikoproteina. Fluorescencijski spektri snimljeni su na multifunkcijskom čitaču mikrotitarskih pločica Tecan SPARK M10 proizvedenog od Tecan Austria GmbH (Slika 7.). U mikrotitarske pločice od 96 jažica provedena je spektrofluorimetrijska titracija gdje su redom nanaseni uzorci: konstantna koncentracija AGP-a, raspon koncentracije određenog lijeka i pufer te su rađeni duplikati. Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu pH vrijednosti 7.4. Kruti uzorci koji su korišteni za pripravu otopina vagani su na vagi Sartorius tipa LA 310S koja ima točnost odvage od 0.1 mg.



Slika 7. Tecan SPARK M10, proizvođač Tecan Austria GmbH.

Matična otopina nativnog oblika α 1-kiselog glikoproteina pripremljena je otapanjem komercijalnog ljudskog AGP-a u fosfatnom puferu te provjerom i podešavanjem pH vrijednosti na 7.4. Otopina AGP-a zatim se prebaci u Amicon Ultra Filter 0.5 mL (10 K MWCO) kako bismo ukoncentrirali protein te se ispiru tri puta s fosfatnim puferom (10 min 14000 rcf; Eppendorf AG Centrifuga 5424). Prilikom svake centrifuge supernatant odbacujemo, a talog u kojemu je AGP ispiramo. Pri završenom prethodnom postupku radi se „recover“ proteina, odnosno talog se centrifugira (2 min 1000 rcf; Eppendorf AG Centrifuga 5424). Dobiveni volumen proteina precizno se izmjeri. Fosfatnim puferom podesi se bazna linija na UV-Vis

spektrofotometru (Hewlett Packard HP 8542A Diode Array Spectrophotometer, Agilent Technologies Inc.), a nakon toga u kiveti se pomiješa 1 μ L proteina i 49 μ L fosfatnog pufera pa se izmjeri apsorbanacija proteina na 280 nm i iz toga izračuna njegova dobivena koncentracija. Na isti način mjeri se i koncentracija desijaliniziranog oblika AGP-a. Sve otopine AGP-a čuvaju se u hladnjaku na +4°C do korištenja.



Slika 8. Postupak ukoncentriravanja proteina pomoću Amicon Ultra Filter 0.5 mL (10 K MWCO) (preuzeto i prilagođeno s mrežne stranice <http://www.merckmillipore.com>)

Za postupak desijalinizacije nativnog proteina pripremaju se svježi puferi. Pufer A (reakcijski pufer) dobiven je otapanjem odgovarajuće mase natrijevog acetata i kalcijevog klorida u redestiliranoj vodi. Konačna otopina sadržavala je 200 mM natrijevog acetata i 1 mM kalcijevog klorida, a pH je podešen na 5.5. Pufer B (pufer za skladištenje) dobiven je otapanjem odgovarajuće mase natrijevog acetata, kalcijevog klorida i natrijevog klorida u redestiliranoj vodi. Konačna otopina sastojala se od 50 mM natrijevog acetata, 9 mM kalcijevog klorida i 150 mM natrijevog klorida, a pH je podešen na 5.5. Oko 5.2 mg komercijalnog ljudskog AGP-a otopljeno je u 816 μ L pufera A. Pripremljena je suspenzija kuglica neuraminidaze (400 μ L suspenzije odgovara otprilike 200 μ L kuglica) i isprana četiri puta sa po 400 μ L pufera A na centrifugi (0.5 min 2000 okr/min; CompactStar CS4). U 200 μ L prethodno pripremljenih kuglica neuraminidaze dodano je 800 μ L otopine AGP-a, a zatim je provjeren pH te po potrebi prilagođen na 5.5. Smjesa se inkubira 48 sati na 37°C i rotira 10 okr/min na rotoru cijevi (Thermo Scientific Tube Revolver). Nakon inkubacije, smjesa je centrifugirana (0.5 min 2000 okr/min; CompactStar CS4), a supernatant koji sadrži AGP prebačen u Amicon Ultra Filter 0.5 mL (10 K MWCO) i ispran tri puta s puferom A (10 min 12000 rcf; Eppendorf AG Centrifuga

5424). Kuglice neuraminidaze isprane su četiri puta s 400 μ L pufera B i stavljene u hladnjak na +4°C.

Fluorescencijski spektri kompleksa α 1-kiselog glikoproteina i lijeka mjereni su nakon što su pripremljene otopine inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi. Najprije su određene konstante ravnoteže posebno za svaki lijek u reakciji s nativnim α 1-kiselim glikoproteinom, a zatim su izmjerene i konstante ravnoteže posebno za svaki lijek u reakciji s desijaliziranom formom α 1-kiselog glikoproteina. Kod mjerenja je za svaki lijek pripravljen niz otopina s različitom koncentracijom lijeka i konstantnom koncentracijom nativnog α 1-kiselog glikoproteina odnosno njegove desijalizirane forme koja je bila 2×10^{-6} M. Koncentracije lijekova su pripravljene u različitim koncentracijskim rasponima za svaki lijek, ovisno o predviđenoj konstanti ravnoteže na temelju literaturnih podataka. Dobiveni fluorescencijski spektri obrađeni su korištenjem računalnog programa Specfit pomoću kojega su izračunate dobivene konstante ravnoteže na temelju broja molekulskih vrsta koje sudjeluju u ravnoteži. Dobivene konstante vezanja moguće je zatim primijeniti za predviđanje količine vezanog lijeka u organizmu. Udio slobodne i vezane frakcije lijeka u terapijskom rasponu koncentracija u serumu izračunat će se u programu (HySS) (Alderighi i sur. 1999) te prikazati dijagramima raspodjele. Izračuni se odnose na ravnoteže u otopinama, bez obzira na broj molekulskih vrsta ili broj kompleksa koji mogu nastati.

U rezultatima dobivenim prethodno navedenim metodama određivanja konstante ravnoteže vezanja pojedinih lijekova za α 1-kiseli glikoprotein bit će prikazana srednja vrijednost dvaju nezavisnih mjerenja konstante vezanja sa standardnom devijacijom za pojedini lijek. U ovome diplomskom radu također će se grafički prikazati dobiveni i predviđeni spektri koncentracijskog niza pojedinog lijeka i nativnog, odnosno desijaliziranog oblika AGP-a te postotak slobodne frakcije lijeka pri najvišim terapijskim koncentracijama ovisno o koncentraciji AGP-a u plazmi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 DIPIRIDAMOL

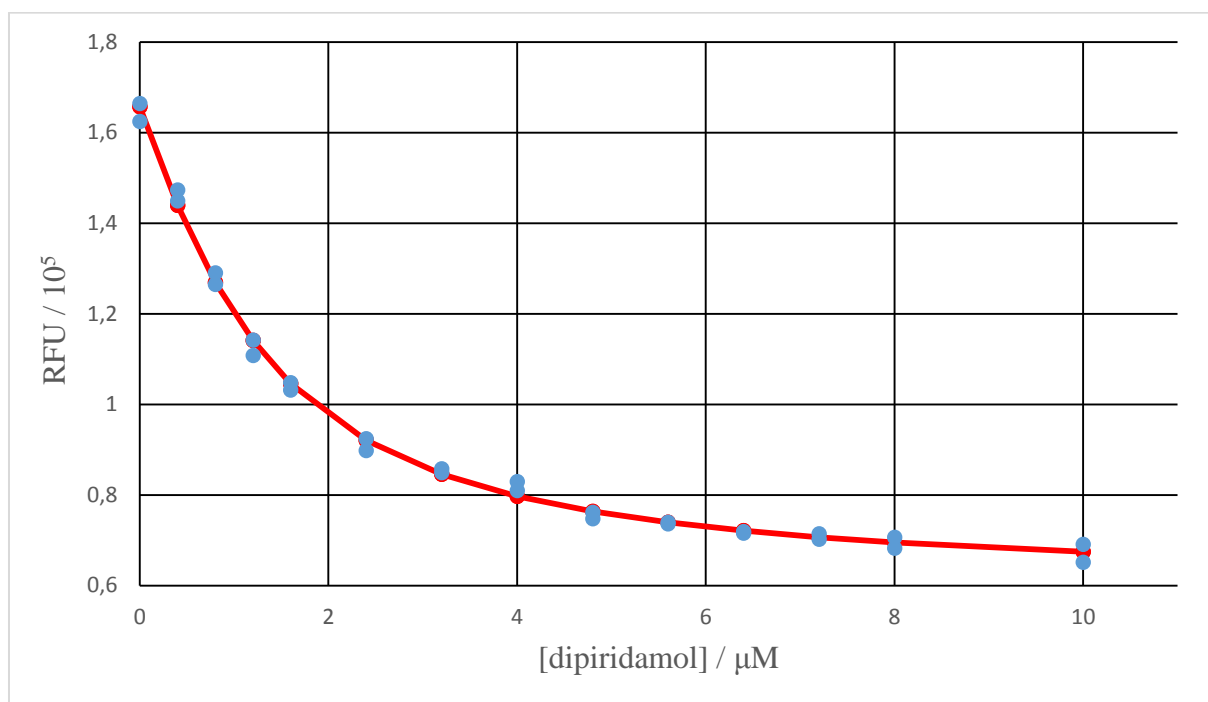
Matična otopina dipiridamola pripravljena je otapanjem dipiridamola u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatnog razrjeđenja konačna koncentracija metanola u mjerenim otopinama bila je manja od 0.1 %. Pripremljen je niz otopina dipiridamola i nativnog, odnosno desijaliniziranog oblika AGP-a u kojemu je koncentracija AGP-a bila konstanta te je iznosila 2×10^{-6} M, a koncentracija dipiridamola bila je u rasponu od 4×10^{-7} do 1×10^{-5} M. Otopinu broj 15, prikazano dolje u tablici 1, čini samo fosfatni pufer. Stehiometrijski odnos u kojemu se dipiridamol veže za nativni, odnosno desijalinizirani AGP predviđen je na temelju modela vezanja u programu Specfit te on iznosi 1:1. Kompleks dipiridamola vezanog za AGP gasi fluorescenciju.

Tablica 1. Koncentracija dipiridamola i nativnog, odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama.

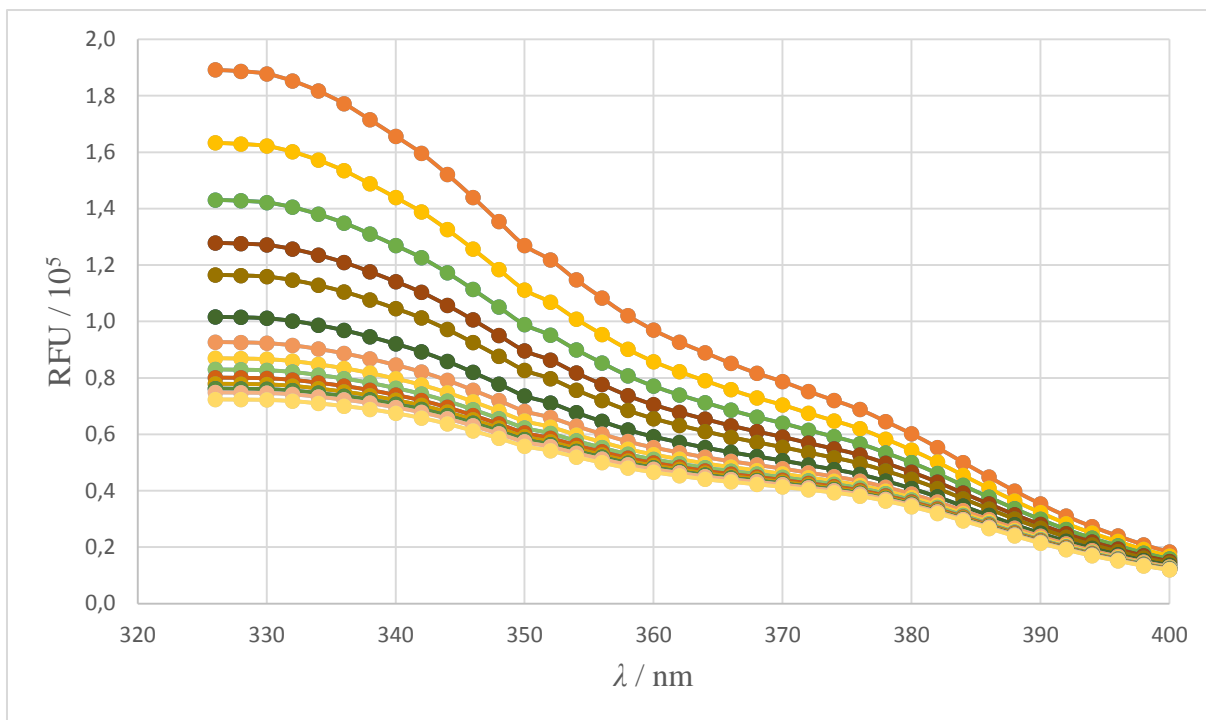
Broj otopine	Koncentracija nativnog i desijaliniziranog oblika AGP-a / M	Koncentracija dipiridamola / M
1	2×10^{-6}	0
2	2×10^{-6}	4×10^{-7}
3	2×10^{-6}	8×10^{-7}
4	2×10^{-6}	1.2×10^{-6}
5	2×10^{-6}	1.6×10^{-6}
6	2×10^{-6}	2.4×10^{-6}
7	2×10^{-6}	3.2×10^{-6}
8	2×10^{-6}	4×10^{-6}
9	2×10^{-6}	4.8×10^{-6}
10	2×10^{-6}	5.6×10^{-6}
11	2×10^{-6}	6.4×10^{-6}
12	2×10^{-6}	7.2×10^{-6}
13	2×10^{-6}	8×10^{-6}
14	2×10^{-6}	1×10^{-5}
15	0	0

4.1.1 DIPIRIDAMOL I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

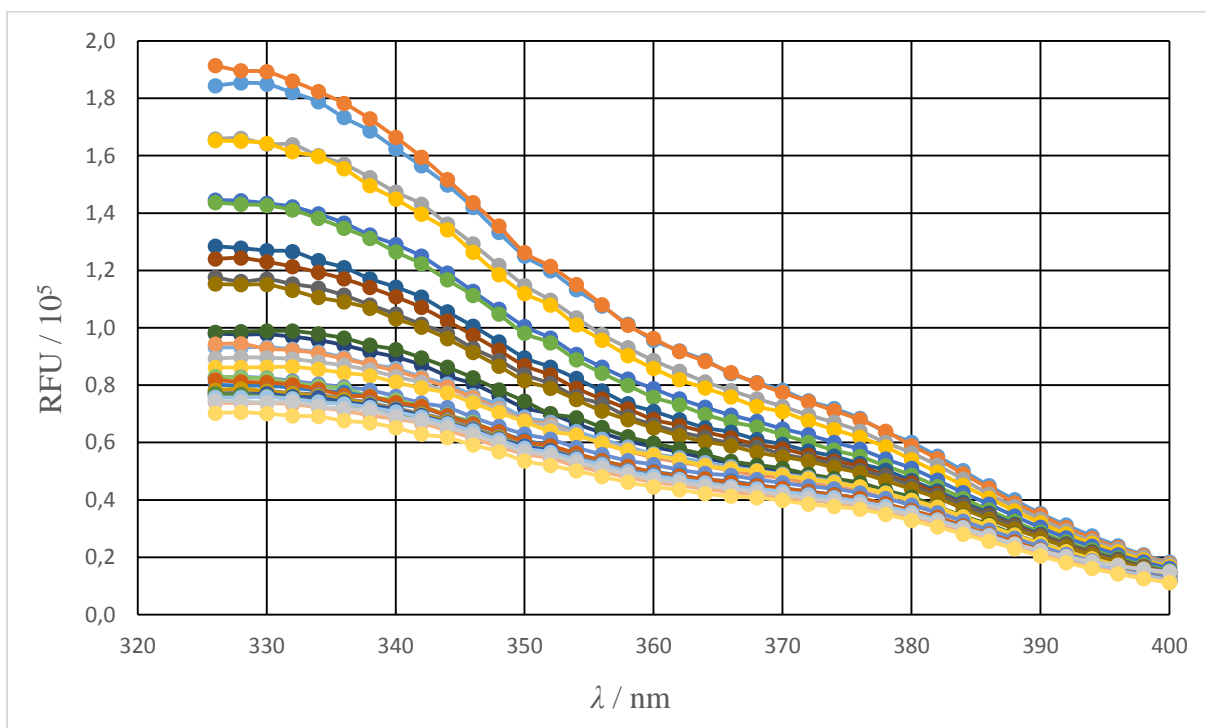
Unosom dobivenih podataka te prema pretpostavljenom modelu vezanja dipiridamola i AGP-a u programu Specfit dobivene su vrijednosti konstante vezanja u logaritamskom obliku ($\log K_a$) i pripadajuće standardne devijacije (σ). $\log K_a$ iznosi 6.12, a pripadajuća standardna devijacija 2.0445 %. Antilogaritmiranjem može se izračunati konstanta vezanja dipiridamola i nativnog α 1-kiselog glikoproteina te ona iznosi $1.31 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.



Slika 9. Graf ovisnosti fluorescencije pri 340 nm o koncentraciji dipiridamola pri čemu crvena linija predstavlja predviđenu krivulju, a plave točke dobivena mjerenja.



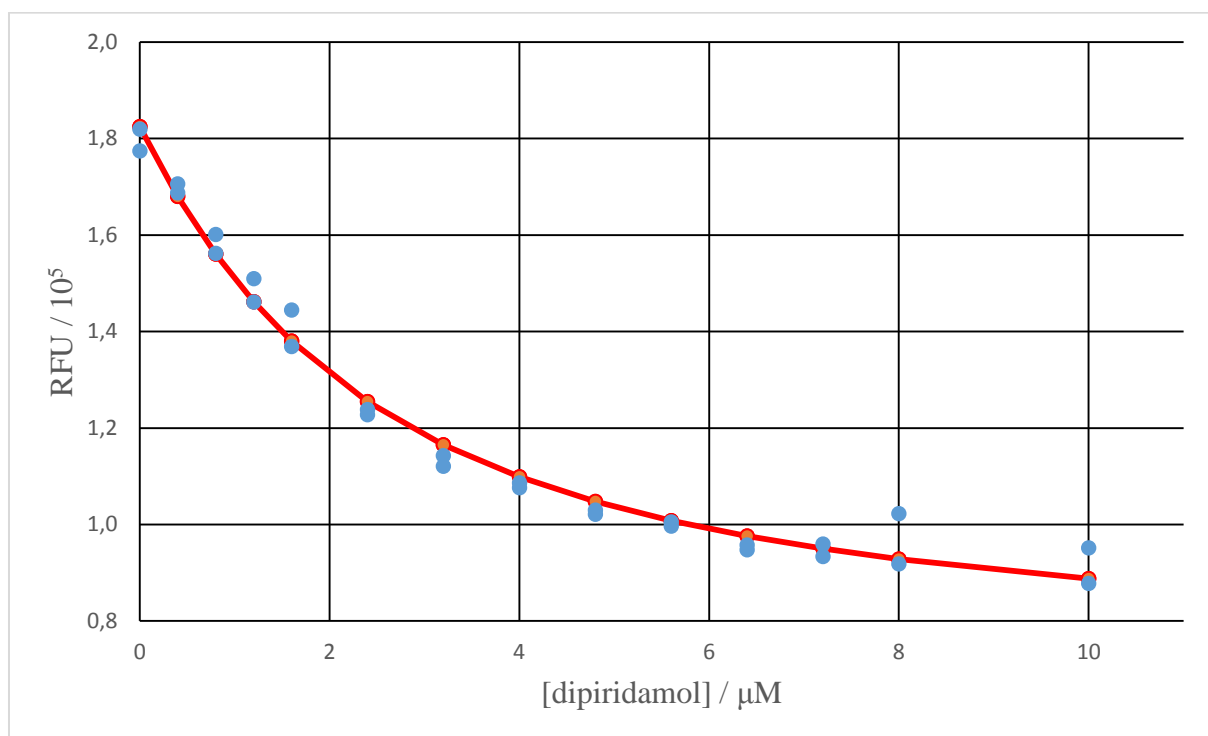
Slika 10. Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i nativnog AGP-a.



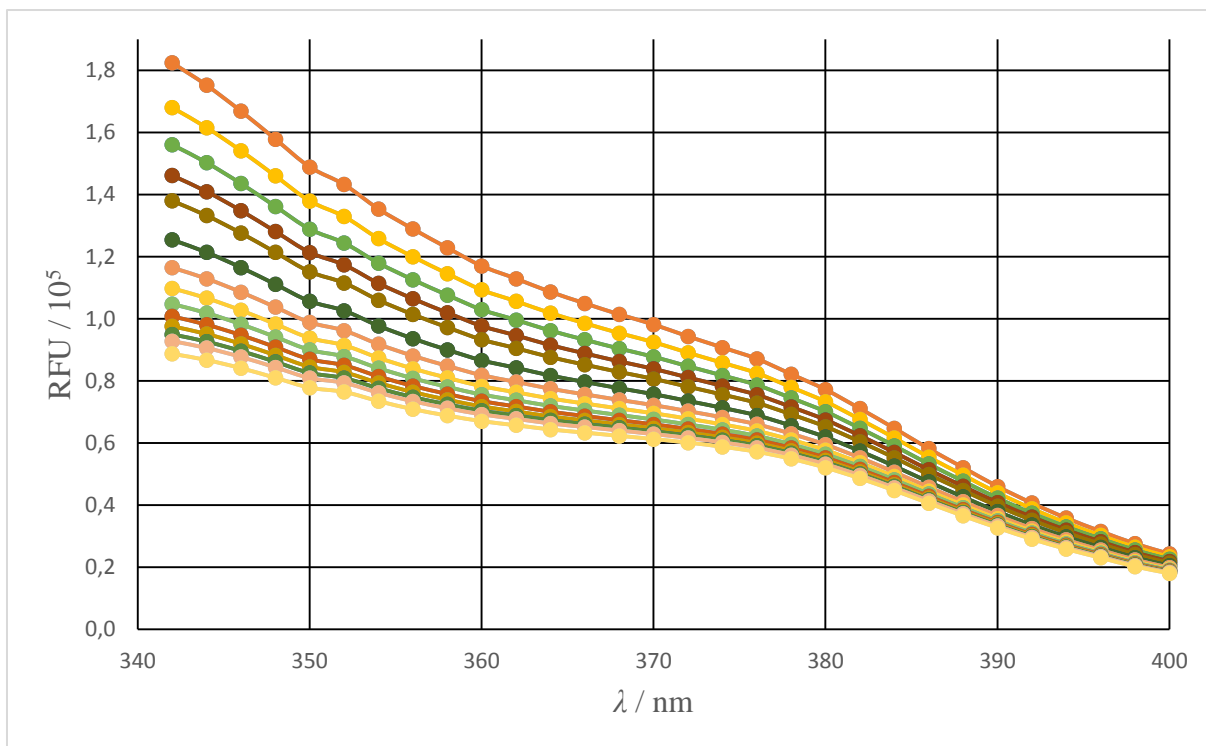
Slika 11. Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i nativnog AGP-a (u duplikatu).

4.1.2 DIPIRIDAMOL I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

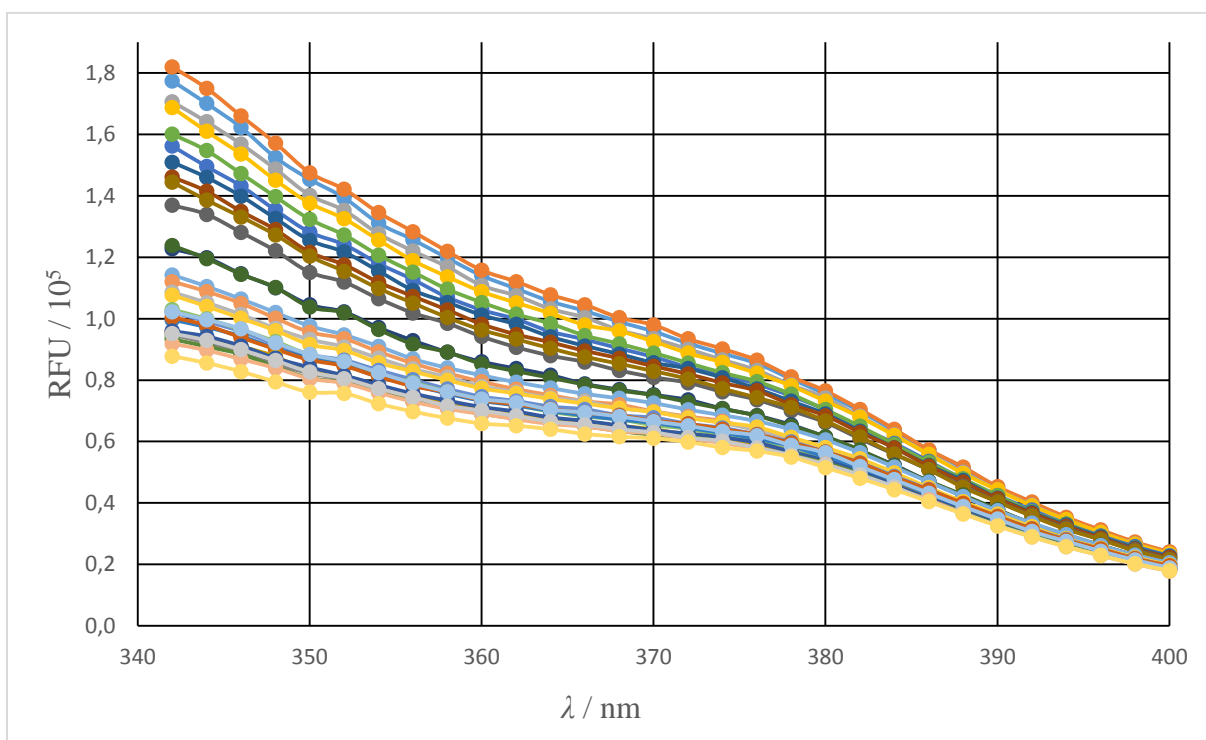
Unosom dobivenih podataka te prema pretpostavljenom modelu vezenja dipiridamola i AGP-a u programu Specfit dobivene su vrijednosti konstante vezanja u logaritamskom obliku ($\log K_a$) i pripadajuće standardne devijacije (σ). $\log K_a$ iznosi 5.73, a pripadajuća standardna devijacija 3.8398 %. Antilogaritmiranjem može se izračunati konstanta vezanja dipiridamola i desijaliniziranog α 1-kiselog glikoproteina te ona iznosi $5.41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Slika 12. Graf ovisnosti fluorescencije pri 342 nm o koncentraciji dipiridamola pri čemu crvena linija predstavlja predviđenu krivulju, a plave točke dobivena mjerenja.



Slika 13. Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i desijaliniziranog AGP-a.



Slika 14. Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i desijaliniziranog AGP-a (u duplikatu).

4.2 IMATINIB

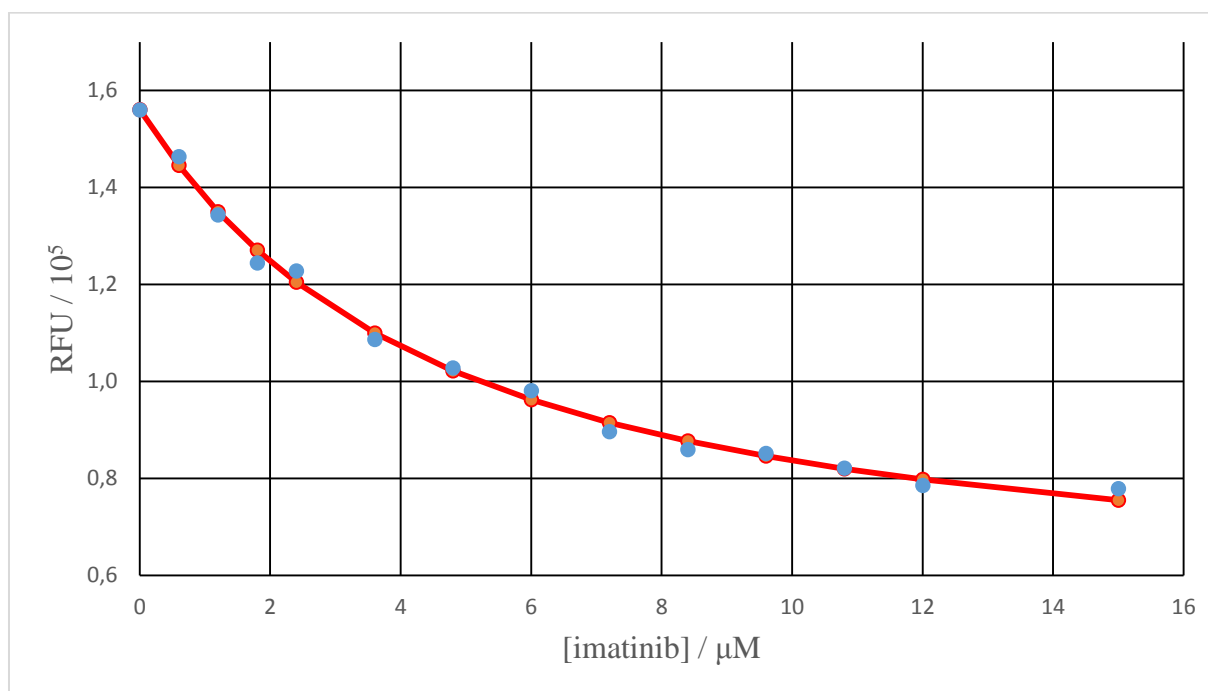
Matična otopina imatiniba pripravljena je otapanjem imatiniba u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatnog razrjeđenja konačna koncentracija metanola u mjerenim otopinama bila je manja od 0.1 %. Pripremljen je niz otopina imatiniba i nativnog, odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojemu je koncentracija AGP-a bila konstanta i iznosila 2×10^{-6} M, a koncentracija imatiniba bila je u rasponu od 6×10^{-7} do 1.5×10^{-5} M. Otopinu broj 15, prikazano dolje u tablici 2, čini samo fosfatni pufer. Modelom vezanja koji je korišten za obradu izmjerenih vrijednosti u programu Specfit pretpostavljen je stehiometrijski odnos vezanja imatiniba za nativni, odnosno desijalinizirani oblik AGP-a te on iznosi 1:1. Kompleks imatiniba vezanog za AGP gasi fluorescenciju.

Tablica 2. Koncentracija imatiniba i nativnog, odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama.

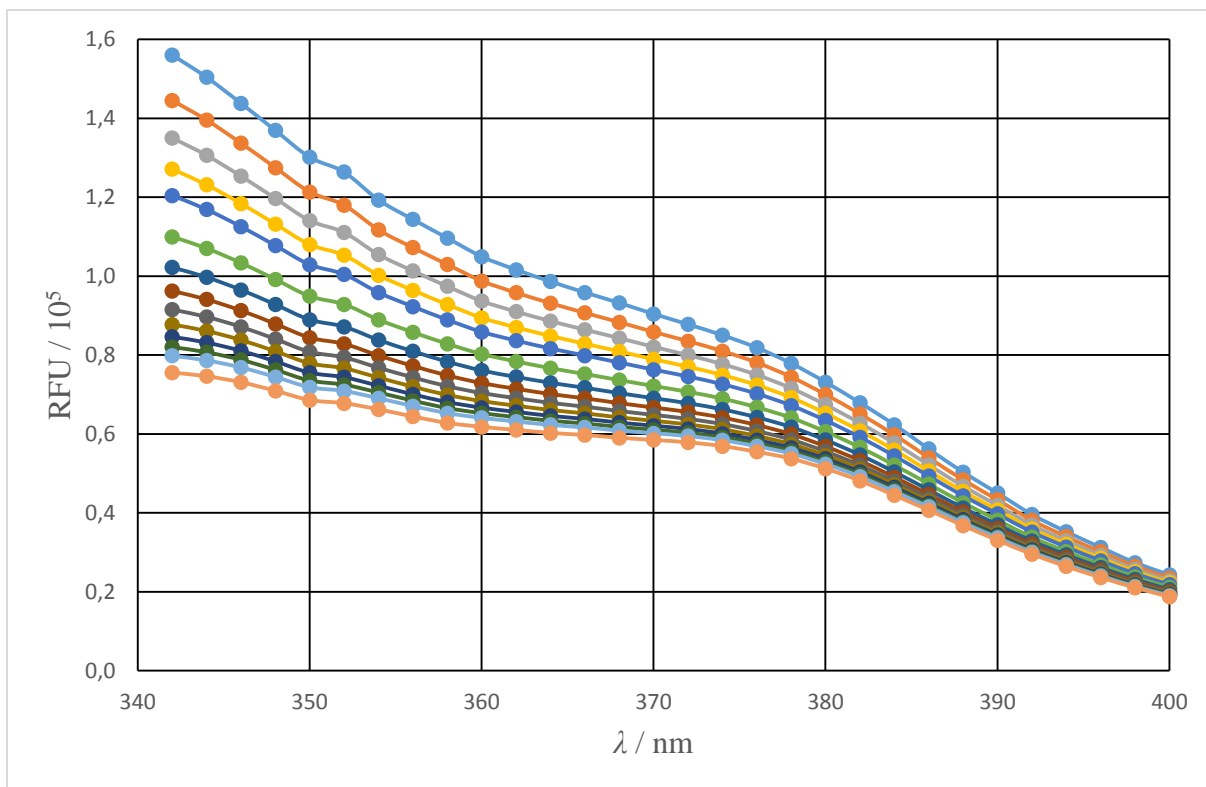
Broj otopine	Koncentracija nativnog i desijaliniziranog oblika AGP-a / M	Koncentracija imatiniba / M
1	2×10^{-6}	0
2	2×10^{-6}	6×10^{-7}
3	2×10^{-6}	1.2×10^{-6}
4	2×10^{-6}	1.8×10^{-6}
5	2×10^{-6}	2.4×10^{-6}
6	2×10^{-6}	3.6×10^{-6}
7	2×10^{-6}	4.8×10^{-6}
8	2×10^{-6}	6.0×10^{-6}
9	2×10^{-6}	7.2×10^{-6}
10	2×10^{-6}	8.4×10^{-6}
11	2×10^{-6}	9.6×10^{-6}
12	2×10^{-6}	1.08×10^{-5}
13	2×10^{-6}	1.2×10^{-5}
14	2×10^{-6}	1.5×10^{-5}
15	0	0

4.2.1 IMATINIB I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

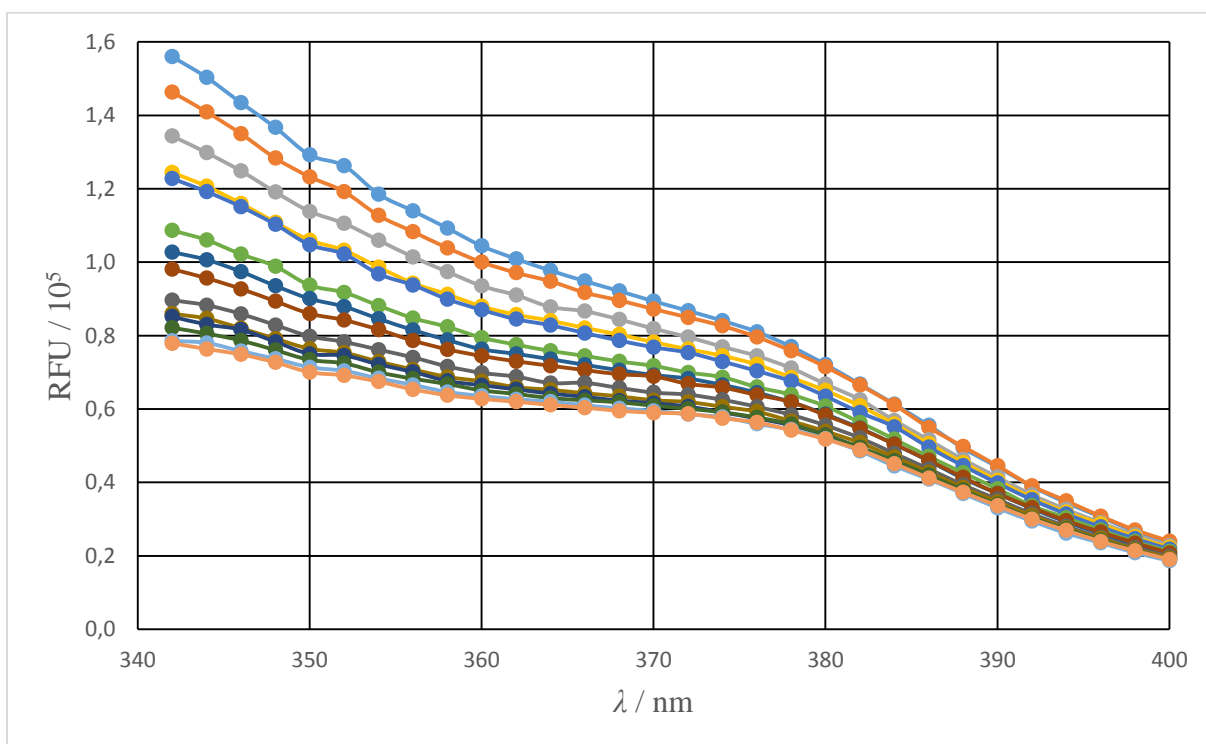
Unosom dobivenih podataka te prema pretpostavljenom modelu vezanja imatiniba i AGP-a u programu Specfit dobivene su vrijednosti konstante vezanja u logaritamskom obliku ($\log K_a$) i pripadajuće standardne devijacije (σ). $\log K_a$ iznosi 5.42, a pripadajuća standardna devijacija 3.1492 %. Antilogaritmiranjem može se izračunati konstanta vezanja imatiniba i nativnog α 1-kiselog glikoproteina te ona iznosi $2.60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Slika 15. Graf ovisnosti fluorescencije pri 342 nm o koncentraciji imatiniba pri čemu crvena linija predstavlja predviđenu krivulju, a plave točke dobivena mjerenja.



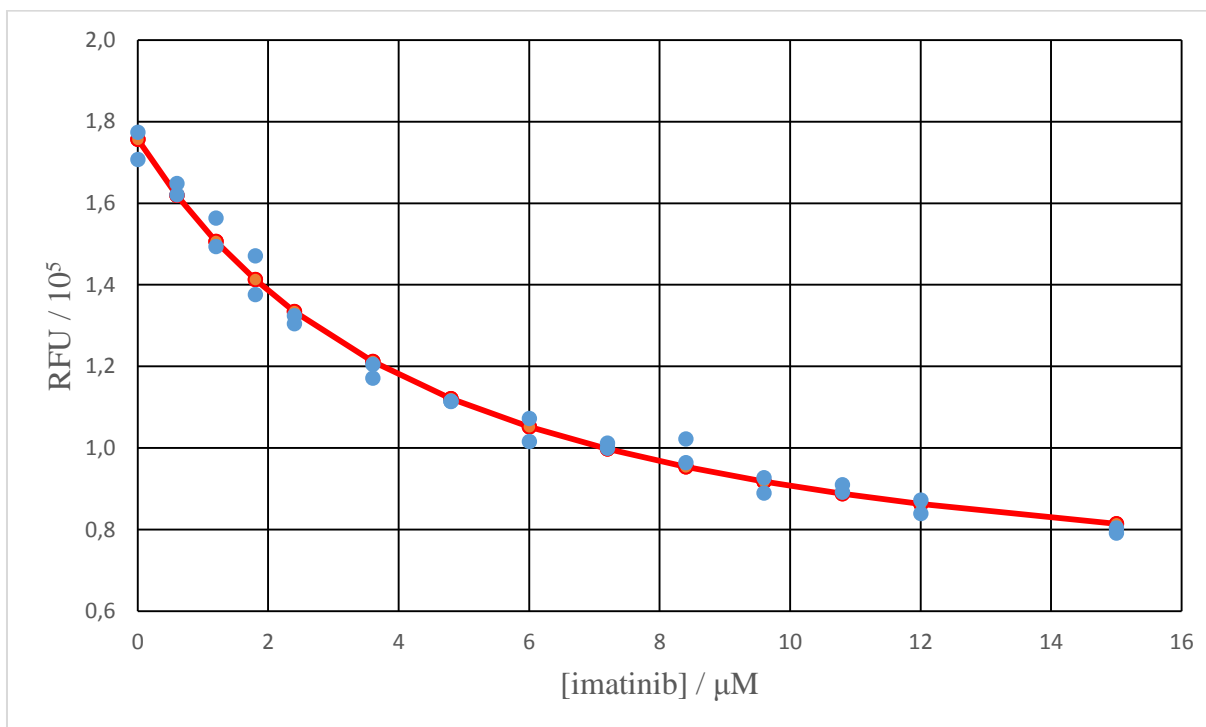
Slika 16. Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i nativnog AGP-a.



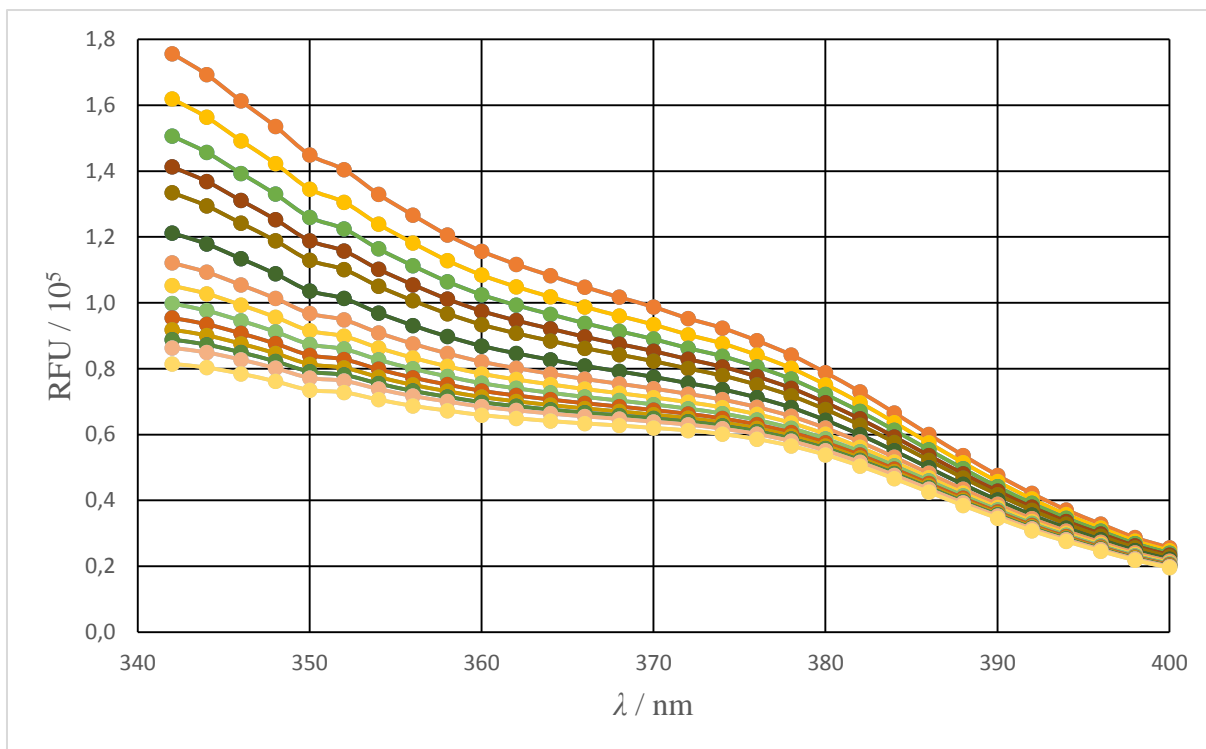
Slika 17. Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i nativnog AGP-a.

4.2.2 IMATINIB I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

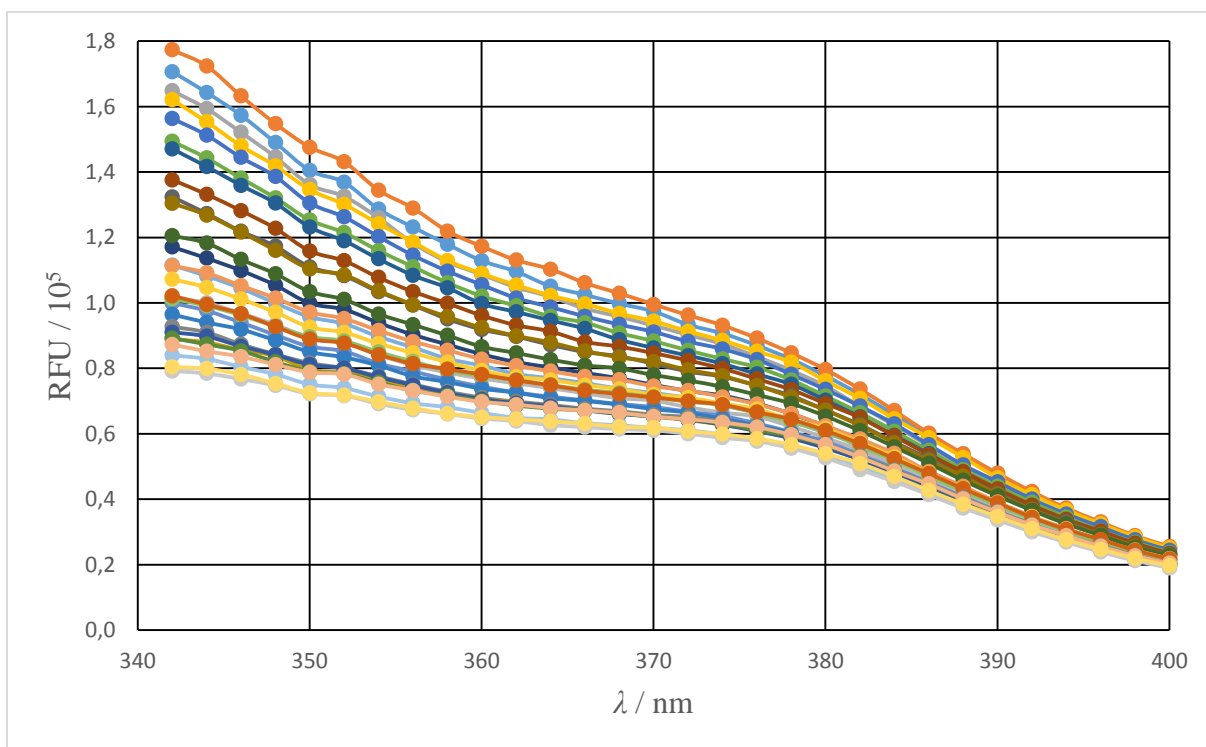
Unosom dobivenih podataka te prema pretpostavljenom modelu vezenja imatiniba i AGP-a u programu Specfit dobivene su vrijednosti konstante vezanja u logaritamskom obliku ($\log K_a$) i pripadajuće standardne devijacije (σ). $\log K_a$ iznosi 5.43, a pripadajuća standardna devijacija 3.4190 %. Antilogaritmiranjem može se izračunati konstanta vezanja imatiniba i desijaliniziranog α 1-kiselog glikoproteina te ona iznosi $2.70 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Slika 18. Graf ovisnosti fluorescencije pri 342 nm o koncentraciji imatiniba pri čemu crvena linija predstavlja predviđenu krivulju, a plave točke dobivena mjerenja.



Slika 19. Predviđeni spektri koncentracijskoga niza otopina imatiniba i desijaliniziranog AGP-a.



Slika 20. Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i desijaliniziranog AGP-a (u duplikatu).

4.3 AZITROMICIN

Matična otopina azitromicina pripravljena je otapanjem veće količine azitromicina u 96%-tnom etanolu. Potrebna je veća koncentracija otopine azitromicina jer se relativno slabo veže za AGP. Zbog mogućih interferencija etanola kao otapala, u svaku otopinu dodana je prikladna količina etanola kako bi uvjeti tijekom mjerenja bili konstantni. Pripremljen je niz otopina azitromicina i nativnog, odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojemu je koncentracija AGP-a stalna te iznosi 2×10^{-6} M, a koncentracija azitromicina bila je u rasponu od 2×10^{-6} do 1×10^{-2} M. Otopinu broj 15, prikazano dolje u tablici 3, čini samo fosfatni pufer. Modelom vezanja koji je korišten za obradu izmjerenih vrijednosti u programu Specfit, pretpostavljeno je da se azitromicin veže za nativni, odnosno desijalinizirani AGP u omjeru 1:1. Kompleks azitromicina vezanog za AGP gasi fluorescenciju.

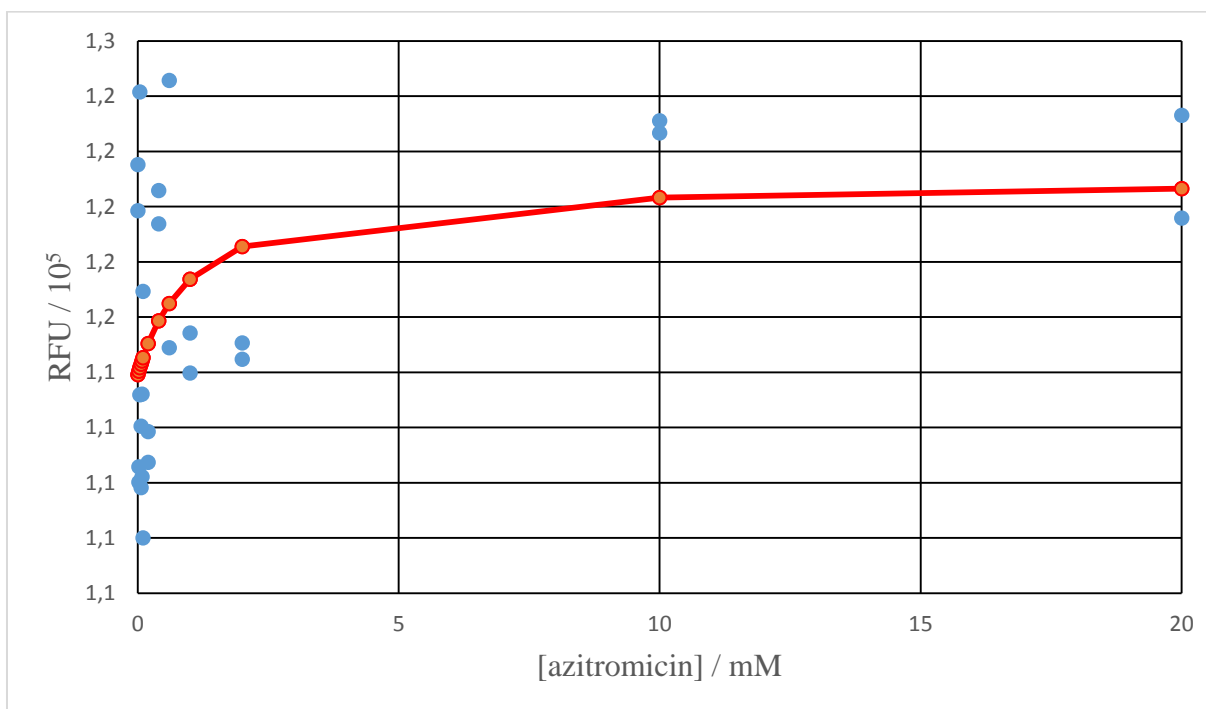
Tablica 3. Koncentracija azitromicina i nativnog, odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama.

Broj otopine	Koncentracija nativnog i desijaliniziranog oblika AGP-a / M	Koncentracija azitromicina / M
1	2×10^{-6}	0
2	2×10^{-6}	2×10^{-6}
3	2×10^{-6}	4×10^{-6}
4	2×10^{-6}	6×10^{-6}
5	2×10^{-6}	8×10^{-6}
6	2×10^{-6}	1×10^{-5}
7	2×10^{-6}	2×10^{-5}
8	2×10^{-6}	4×10^{-5}
9	2×10^{-6}	6×10^{-5}
10	2×10^{-6}	1×10^{-4}
11	2×10^{-6}	2×10^{-4}
12	2×10^{-6}	1×10^{-3}
13	2×10^{-6}	2×10^{-3}
14	2×10^{-6}	1×10^{-2}
15	0	0

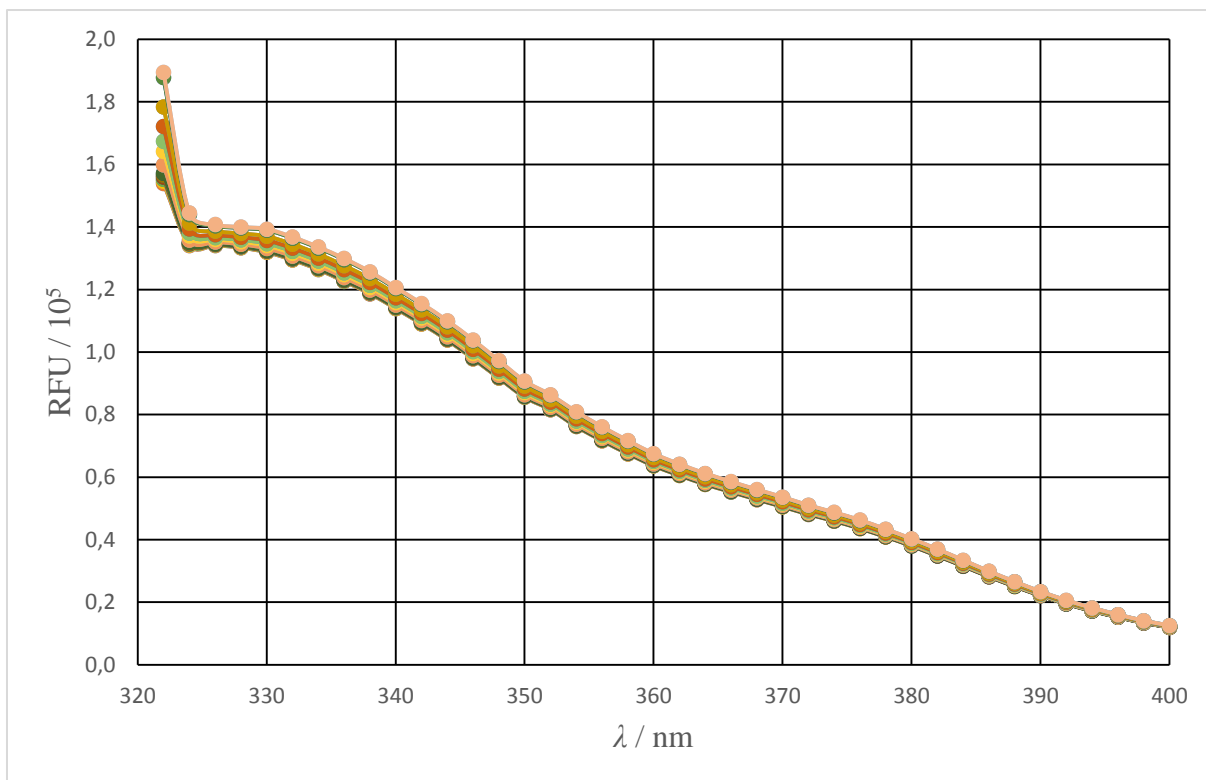
4.3.1 AZITROMICIN I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

Unosom dobivenih podataka te prema pretpostavljenom modelu vezanja azitromicina i AGP-a u programu Specfit dobivene su vrijednosti konstante vezanja u logaritamskom obliku ($\log K_a$) i pripadajuće standardne devijacije (σ). $\log K_a$ iznosi 3.98, a pripadajuća standardna devijacija 34.309 %. Antilogaritmiranjem može se izračunati konstanta vezanja azitromicina i nativnog α 1-kiselog glikoproteina te ona iznosi $9.52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

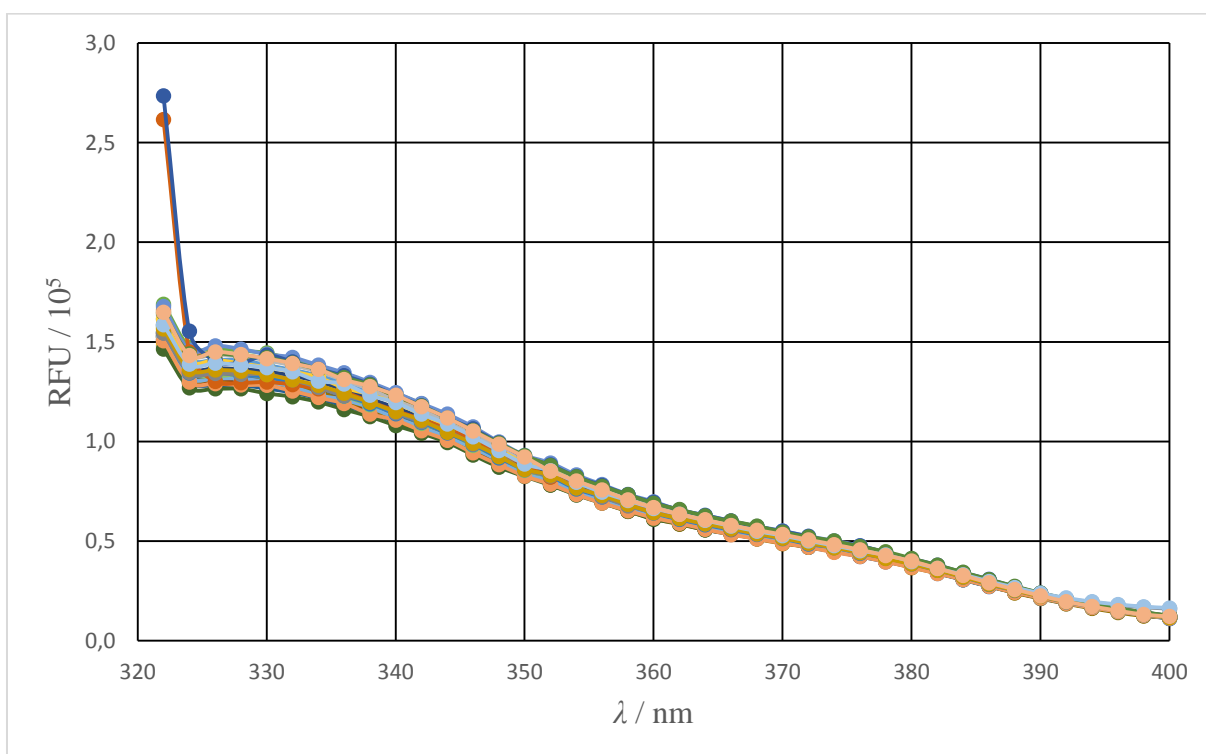
Iz same standardne devijacije jasno je vidljivo da nije uzet dobar raspon koncentracija azitromicina te da je njegova K_a za nativni AGP-a mala. U ovakvim uvjetima azitromicin se dosta slabo veže za protein, stoga ga možemo izuzeti iz daljnjih mjerenja.



Slika 21. Graf ovisnosti fluorescencije pri 340 nm o koncentraciji azitromicina pri čemu crvena linija predstavlja predviđenu krivulju, a plave točke dobivena mjerenja.



Slika 22. Predviđeni spektri koncentracijskog niza azitromicina i nativnog AGP-a.



Slika 23. Izmjereni spektri koncentracijskog niza azitromicina i nativnog AGP-a (u duplikatu).

4.3.2 AZITROMICIN I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

Zbog loše uzetog raspona koncentracija lijeka, njegove male konstante vezanja za AGP, slabog vezanja tijekom mjerenja s nativnim oblikom α 1-kiselog glikoproteina, mjerenja s njegovim desijaliniziranim oblikom nisu provedena.

4.4 UDIO SLOBODNE I VEZANE FRAKCIJE LIJEKOVA PREMA HySS-u

Tablica 4. Postotak slobodne frakcije dipiridamola izračunat prema programu HySS pri najvišim terapijskim koncentracijama ovisno o koncentraciji nativnog AGP-a u plazmi.

AGP+		$\log K_a = 6.118$					
	Točka	$C_{uk.lijek}$ /M	$C_{uk.AGP}$ /M	$C_{slob.lijek}$ /M	$C_{slob.AGP}$ /M	$C_{lijek-AGP}$ /M	% slobodnog lijeka
C_{trough}	1	1.59×10^{-6}	1.2×10^{-5}	1.07×10^{-7}	1.05×10^{-5}	1.48×10^{-6}	6.8
	2	1.59×10^{-6}	2.2×10^{-5}	5.71×10^{-8}	2.05×10^{-5}	1.53×10^{-6}	3.6
	3	1.59×10^{-6}	3.1×10^{-5}	4.01×10^{-8}	2.95×10^{-5}	1.55×10^{-6}	2.5
	4	1.59×10^{-6}	6.9×10^{-5}	1.78×10^{-8}	6.74×10^{-5}	1.57×10^{-6}	1.1
C_{max}	5	2.77×10^{-6}	1.2×10^{-5}	2.07×10^{-7}	9.44×10^{-6}	2.56×10^{-6}	7.5
	6	2.77×10^{-6}	2.2×10^{-5}	1.05×10^{-7}	1.93×10^{-5}	2.67×10^{-6}	3.8
	7	2.77×10^{-6}	3.1×10^{-5}	7.26×10^{-8}	2.83×10^{-5}	2.67×10^{-6}	2.6
	8	2.77×10^{-6}	6.9×10^{-5}	3.15×10^{-8}	6.63×10^{-5}	2.74×10^{-6}	1.1

Tablica 5. Postotak slobodne frakcije dipiridamola izračunat prema programu HySS pri najvišim terapijskim koncentracijama ovisno o koncentraciji desijaliniziranog AGP-a u plazmi.

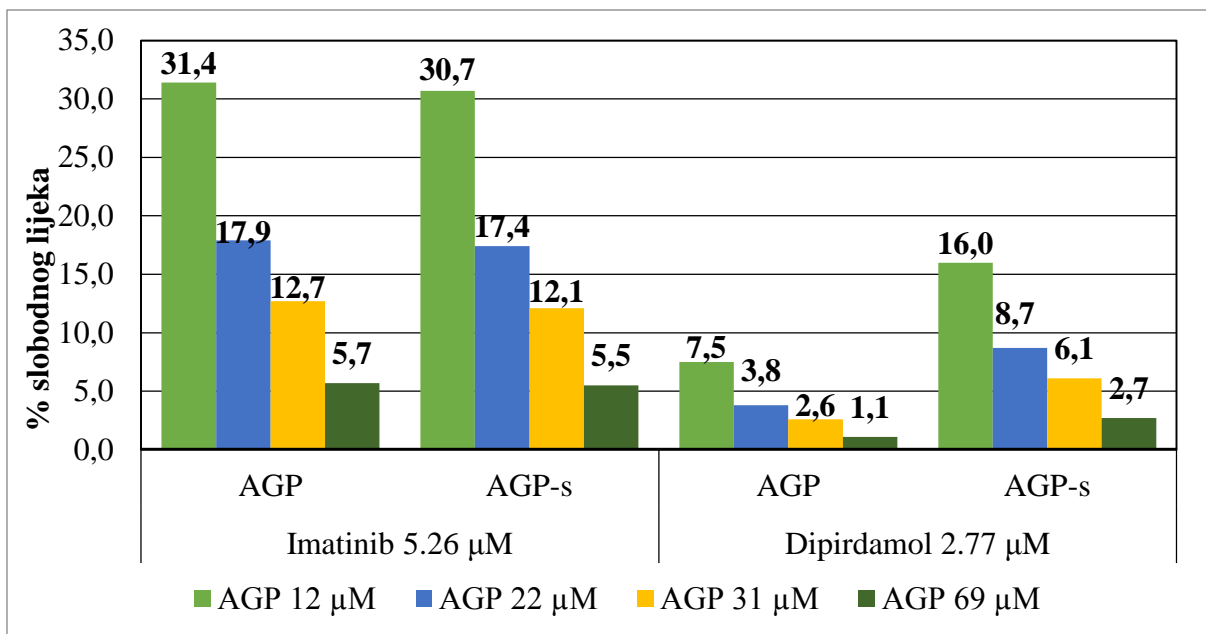
AGP-		$\log K_a = 5.7334$					
	Točka	$C_{uk.lijek}$ /M	$C_{uk.AGP}$ /M	$C_{slob.lijek}$ /M	$C_{slob.AGP}$ /M	$C_{lijek-AGP}$ /M	% slobodnog lijeka
C_{trough}	1	1.59×10^{-6}	1.2×10^{-5}	2.35×10^{-7}	1.07×10^{-5}	1.36×10^{-6}	14.8
	2	1.59×10^{-6}	2.2×10^{-5}	1.31×10^{-7}	2.05×10^{-5}	1.46×10^{-6}	8.3
	3	1.59×10^{-6}	3.1×10^{-5}	9.37×10^{-8}	2.95×10^{-5}	1.50×10^{-6}	5.9
	4	1.59×10^{-6}	6.9×10^{-5}	4.24×10^{-8}	6.75×10^{-5}	1.55×10^{-6}	2.7
C_{max}	5	2.77×10^{-6}	1.2×10^{-5}	4.44×10^{-7}	9.67×10^{-6}	2.33×10^{-6}	16.0
	6	2.77×10^{-6}	2.2×10^{-5}	2.40×10^{-7}	1.95×10^{-5}	2.53×10^{-6}	8.7
	7	2.77×10^{-6}	3.1×10^{-5}	1.69×10^{-7}	2.84×10^{-5}	2.60×10^{-6}	6.1
	8	2.77×10^{-6}	6.9×10^{-5}	7.51×10^{-8}	6.63×10^{-5}	2.70×10^{-6}	2.7

Tablica 6. Postotak slobodne frakcije imatiniba izračunat prema programu HySS pri najvišim terapijskim koncentracijama ovisno o koncentraciji nativnog AGP-a u plazmi.

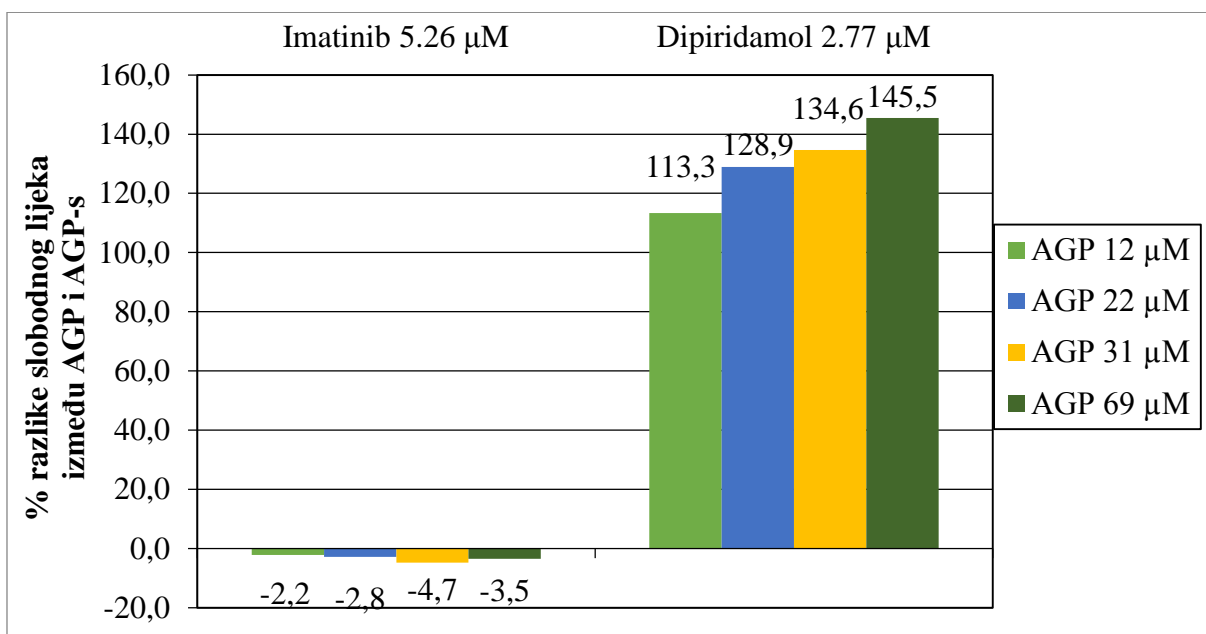
AGP+	$\log K_a = 5.4153$						
	Točka	$C_{uk.lijek}$ /M	$C_{uk.AGP}$ /M	$C_{slob.lijek}$ /M	$C_{slob.AGP}$ /M	$C_{lijek-AGP}$ /M	% slobodnog lijeka
C_{trough}	1	2.47×10^{-6}	1.2×10^{-5}	6.76×10^{-7}	1.02×10^{-5}	1.79×10^{-6}	27.4
	2	2.47×10^{-6}	2.2×10^{-5}	3.99×10^{-7}	1.99×10^{-5}	2.07×10^{-6}	16.2
	3	2.47×10^{-6}	3.1×10^{-5}	2.91×10^{-7}	2.88×10^{-5}	2.18×10^{-6}	11.8
	4	2.47×10^{-6}	6.9×10^{-5}	1.35×10^{-7}	6.67×10^{-5}	2.34×10^{-6}	5.4
C_{max}	5	5.26×10^{-6}	1.2×10^{-5}	1.65×10^{-6}	8.39×10^{-6}	3.61×10^{-6}	31.4
	6	5.26×10^{-6}	2.2×10^{-5}	9.39×10^{-7}	1.77×10^{-5}	4.32×10^{-6}	17.9
	7	5.26×10^{-6}	3.1×10^{-5}	6.68×10^{-7}	2.64×10^{-5}	4.59×10^{-6}	12.7
	8	5.26×10^{-6}	6.9×10^{-5}	2.98×10^{-7}	6.40×10^{-5}	4.96×10^{-6}	5.7

Tablica 7. Postotak slobodne frakcije imatiniba izračunat prema programu HySS pri najvišim terapijskim koncentracijama ovisno o koncentraciji desijaliniziranog AGP-a u plazmi.

AGP-	$\log K_a = 5.4307$						
	Točka	$C_{uk.lijek}$ /M	$C_{uk.AGP}$ /M	$C_{slob.lijek}$ /M	$C_{slob.AGP}$ /M	$C_{lijek-AGP}$ /M	% slobodnog lijeka
C_{trough}	1	2.47×10^{-6}	1.2×10^{-5}	6.59×10^{-7}	1.02×10^{-5}	1.81×10^{-6}	26.7
	2	2.47×10^{-6}	2.2×10^{-5}	3.78×10^{-7}	1.99×10^{-5}	2.08×10^{-6}	15.3
	3	2.47×10^{-6}	3.1×10^{-5}	2.82×10^{-7}	2.88×10^{-5}	2.19×10^{-6}	11.4
	4	2.47×10^{-6}	6.9×10^{-5}	1.30×10^{-7}	6.67×10^{-5}	2.34×10^{-6}	5.3
C_{max}	5	5.26×10^{-6}	1.2×10^{-5}	1.62×10^{-6}	8.36×10^{-6}	3.64×10^{-6}	30.7
	6	5.26×10^{-6}	2.2×10^{-5}	9.13×10^{-7}	1.77×10^{-5}	4.35×10^{-6}	17.4
	7	5.26×10^{-6}	3.1×10^{-5}	6.36×10^{-7}	2.64×10^{-5}	4.61×10^{-6}	12.1
	8	5.26×10^{-6}	6.9×10^{-5}	2.88×10^{-7}	6.40×10^{-5}	4.97×10^{-6}	5.5



Slika 24. Prikaz postotaka slobodnog lijeka pri maksimalnoj koncentraciji lijekova kod različitih koncentracija AGP-a u krvnoj plazmi izračunato prema programu HySS.



Slika 25. Prikaz postotaka razlike slobodnog lijeka pri maksimalnoj koncentraciji između nativnog i desijaliniziranog oblika AGP-a.

5. ZAKLJUČCI

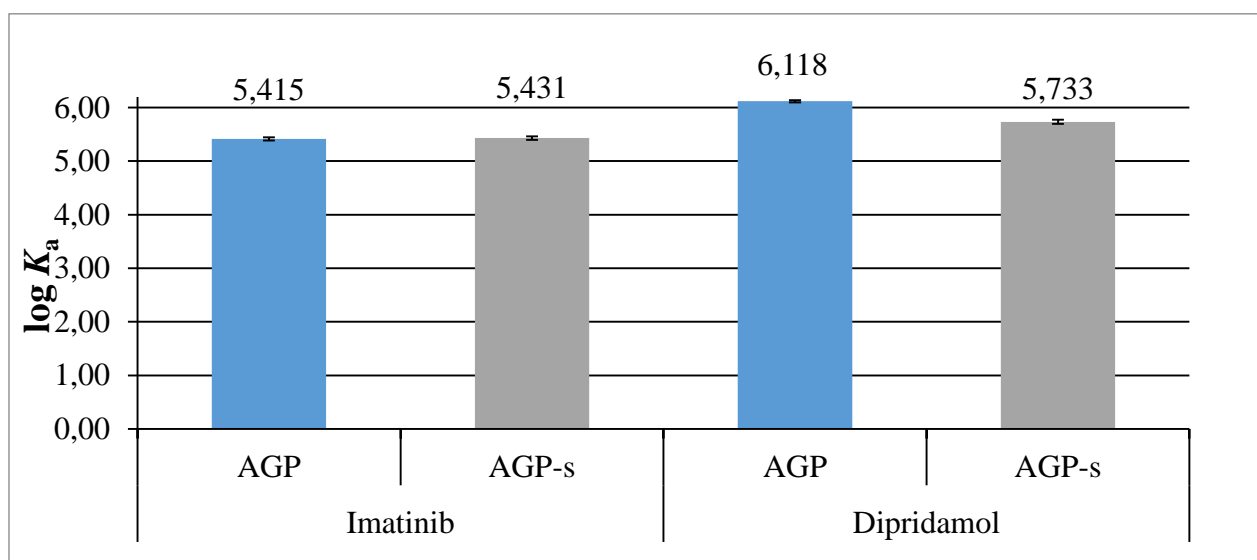
Provedenim eksperimentima dokazano je da promjena u glikozilaciji AGP-a (desijalinizacija) dovodi do promjene konstante vezanje kod izabranih lijekova.

Nakon desijalinizacije α 1-kiselog glikoproteina imatinib ima nešto veću konstantu vezanja nego za nativni oblik, što znači da se za desijalinizirani oblik AGP-a jače veže. Dobiveni podaci razlikuju se od literaturnih, dobivene konstante vezanja oko 10 puta su manje od navedene literaturne.

Kod dipiridamola desijalinizacija AGP-a ima suprotan učinak. Nakon desijalinizacije konstanta vezanja je otprilike 2.5 puta manja što znači da se dipiridamol jače veže za nativni oblik α 1-kiselog glikoproteina. Dobiveni podaci se također razlikuju od navedenih literaturnih.

Tablica 8. Sažeti prikaz izmjerenih konstanti vezanja ($\log K_a$ i K_a) između izabranih lijekova i nativnog, odnosno desijaliniziranog oblika AGP-a uz pripadajuću standardnu devijaciju.

Lijek	Protein	Log K_a	K_a / M^{-1}
Imatinib	AGP	5.415 ± 0.031	$(2.60 \pm 0.08) \times 10^5$
	AGP-s	5.431 ± 0.034	$(2.70 \pm 0.09) \times 10^5$
Dipiridamol	AGP	6.118 ± 0.020	$(1.31 \pm 0.03) \times 10^6$
	AGP-s	5.733 ± 0.038	$(5.41 \pm 0.21) \times 10^5$



Slika 26. Grafički prikaz konstanti vezanja (K_a) s pripadajućim standardnim devijacijama izabranih lijekova i nativnog, odnosno desijaliniziranog oblika AGP-a.

6. LITERATURA

Agencija za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED). Hrvatska farmakopeja 2007. s komentarima. Zagreb, Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2007, str. 29-32

Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination chemistry reviews*, 1999, 184, 311-318

Amicon Ultra – 0.5 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration, <http://www.merckmillipore.com>, pristupljeno 26. ožujka 2020.

Ashwell GJ, Steer CJ. Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *J. Am. Med. Assoc.*, 1981, 246, 2358-2364

Ballou SP, Lozanski FB, Hodder S, Rzewnicki DL, Mion LC, Sipe JD, Ford AB, Kushner I. Quantitative and qualitative alternation of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing*, 1996, 25, 224-230

Dente L, Ciliberto G, Cortese R. Structure of the human alpha 1-acid glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes. *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13, 3941-3952

European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). European Pharmacopoeia 4th edition. London, The Stationery Office, 2003, str. 1066-1067

Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 481-492

Fitos I, Simona A, Zsilaa F, Madya G, Bencsuraa A, Vargab Z, Orfib L, Kerib G, Visy J. Characterization of binding mode of imatinib to human α 1-acid glycoprotein. *Int J Biol Macromolec*, 2012, 50, 788-795

Francetić I. i suradnici. Farmakoterapijski priručnik 7. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 155, 411-412, 513-516

Franzblau C, Schmid K, Faris B, Beldekas J, Garvin P, Kagan HM, Baum BJ. The interaction of collagen with alpha 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 427, 302-314

Herve F, Duche JC, Barre J, Millot MC, Tillement JP. Ph Titration Curves of the Desialylated Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Variants by Combined Isoelectrofocusing Electrophoresis - Utilization in the Development of a Fractionation Method for the Protein Variants by

Chromatography on Immobilized Metal Affinity Adsorbent. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1992, 577, 43-59

Huang JX, Cooper MA, Baker MA, Azad MAK, Nation RL, Li J, Velkov T. Drug-binding energetics of human α -1-acid glycoprotein assessed by isothermal titration calorimetry and molecular docking simulations. *J Mol Recognit*, 2012, 25, 642-656

Ishizaki J, Fukaishi A, Fukuwa C, Yamazaki S, Tabata M, Ishida T, Suga Y, Arai K, Yokogawa K, Miyamoto K. Evaluation of selective competitive binding of basic drugs to α 1-acid glycoprotein variants. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33, 95-99

Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metabolism Reviews*, 2001, 33, 161-235

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija 11. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 599-602

Kazuhiko H. Lipophilicity influences drug binding to α 1-acid glycoprotein F1/S variants but not to the A variant. *Drugs R D*, 2017, 17, 475-480

Kishino S, Nomura A, Saitoh M, Sugawara M, Iseki K, Kitabatake A, Miyazaki K. Single-step isolation method for six glycoforms of human alpha 1-acid glycoprotein by hydroxylapatite chromatography and study of their binding capacities for disopyramide. *J. Chromatogr. B:Biomed. Sci. Appl.*, 1997, 703, 1-6

Koj A. Acute phase reactants. Their synthesis, turnover, and biological significance. U: Structure and function of plasma proteins. Allison AC, urednik, London, Plenum, 1974, 73-125

Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug-Binding to Human Alpha-1-Acid Glycoprotein in Health and Disease, *Pharmacological Reviews*, 1988, 40, 1-47

Liu HM, Brossmer R, Schmid K. Alpha 1-acid glycoprotein promotes nerve growth in vitro. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 300, 239-242

Maeda H, Murukami O, Kann M, Yamane J. The growth-stimulating effect of alpha-1-acid glycoprotein in cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1980, 163, 223-227

Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha-1-acid glycoprotein (AAG, orosomucoid) glycoprotein: Interactions with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation*, 1997, 21, 69-82

Raynes J. Variations in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease. *Biomedicine*, 1982, 36, 77-86

Schmid K. Human alpha 1-acid glycoprotein – Biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 300, 7-22

Schonfeld DL, Ravelli RB, Mueller U, Skerra A. The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J Mol Biol.*, 2008, 40, 767-770

Sorensson J, Matejha GL, Ohlson M, Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier, *Am J. Physiol.*, 1999, 276, H530-H534

Tillement JP, Houin G, Zini R, Urien S, Albengres E, Barre J, Lecomte M, d'Athis P, Sebille B. The binding of drugs to blood plasma macromolecules: Recent advances and therapeutic significance. U: In advances in drug research. Testa B, urednik, London, Academic Press, 1984, Vol. 13, 59-94

Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2, 51-64

Van Molle W, Libert C, Fiers W, Brouckaert P. Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-Induced but not anti-fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J. Immunol.*, 1997, 59, 515-523

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis*. Edinburgh, Harcourt Publishers Limited, 1999, str 133-139

Yokogawa K, Shimomura S, Ishizaki J, Shimada T, Fukuwa C, Kawada M, Tsubokawa T, Yamamoto K, Miyamoto K. Involvement of α 1-acid glycoprotein in inter-individual variation of disposition kinetics of ropivacaine following epidural infusion in off-pump coronary artery bypass. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, 59, 67-73

7. SAŽETAK / SUMMARY

U sklopu ovoga diplomskoga rada provedeno je ispitivanje kako promjena glikozilacijskog uzorka α 1-kiselog glikoproteina utječe na konstantu vezanja dipiridamola, imatiniba i azitromicina. Tehnika korištena u ispitivanju bila je fluorescencijska spektroskopija. Rezultati ispitivanja ukazuju na to da desijalinizacija α 1-kiselog glikoproteina uzrokuje promjene u konstantama vezanja izabranih lijekova i α 1-kiselog glikoproteina. Desijalinizacija navedenog proteina kod imatiniba uzrokuje blago povećanje konstante vezanja za razliku od dipiridamola gdje je učinak suprotan, odnosno nakon desijalinizacije α 1-kiselog glikoproteina dipiridamol se slabije veže za takav oblik te je manja i konstanta vezanja. Zbog male konstante vezanje i premalog raspona koncentracija, mjerenja provedena za azitromicin nisu relevantna.

Within the scope of this diploma thesis, the effect of the binding constant of dipyrindamole, imatinib and azithromycin on the α 1-acid glycoprotein due to a change in the pattern of it's glycosylation was examined by fluorescence spectroscopy. Result indicates effect of desialylation of α 1-acid glycoprotein on binding constants of selected drugs. Desialylation of α 1-acid glycoprotein will slightly increase the binding constant for imatinib. On the other hand, desialylation of the same protein will reduce the binding constant for dipyrindamole. Due to small binding constant and narrow range of used concentrations, measurements of azithromycin binding was not succesfull.

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

UTJECAJ GLIKOZILACIJE α 1-KISELOG GLIKOPROTEINA NA VEZANJE DIPIRIDAMOLA, IMATINIBA I AZITROMICINA

Dunja Odobašić

SAŽETAK

U sklopu ovoga diplomskoga rada provedeno je ispitivanje kako promjena glikozilacijskog uzorka α 1-kiselog glikoproteina utječe na konstantu vezanja dipiridamola, imatiniba i azitromicina. Tehnika korištena u ispitivanju bila je fluorescencijska spektroskopija. Rezultati ispitivanja ukazuju na to da desijalinizacija α 1-kiselog glikoproteina uzrokuje promjene u konstantama vezanja izabranih lijekova i α 1-kiselog glikoproteina. Desijalinizacija navedenog proteina kod imatiniba uzrokuje blago povećanje konstante vezanja za razliku od dipiridamola gdje je učinak suprotan, odnosno nakon desijalinizacije α 1-kiselog glikoproteina dipiridamol se slabije veže za takav oblik te je manja i konstanta vezanja. Zbog male konstante vezanje i premalog raspona koncentracija, mjerenja provedena za azitromicin nisu relevantna.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 26 grafičkih prikaza, 8 tablica i 32 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: α 1-kiseli glikoprotein, glikozilacija, desijalinizacija, konstanta vezanja, imatinib, dipiridamol, azitromicin

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

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

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

Dr. sc. Sanja Dabelić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

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

INFLUENCE OF GLYCOSYLATION OF α 1-ACID GLYCOPROTEIN ON THE BINDING OF DIPYRIDAMOLE, IMATINIB AND AZITHROMYCIN

Dunja Odobašić

SUMMARY

Within the scope of this diploma thesis, the effect of the binding constant of dipyridamole, imatinib and azithromycin on the α 1-acid glycoprotein due to a change in the pattern of its glycosylation was examined by fluorescence spectroscopy. Result indicates effect of desialylation of α 1-acid glycoprotein on binding constants of selected drugs. Desialylation of α 1-acid glycoprotein will slightly increase the binding constant for imatinib. On the other hand, desialylation of the same protein will reduce the binding constant for dipyridamole. Due to small binding constant and narrow range of used concentrations, measurements of azithromycin binding was not successful.

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

Thesis includes: 39 pages, 26 figures, 8 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: α 1-acid glycoprotein, glycoylation, desialylation, binding constant, imatinib, dipyridamole, azithromycin

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

Reviewers: **Mario Gabričević, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tin Weitner, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sanja Dabelić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.