

Promjena glikozilacije alfa1-kiselog glikoproteina - utjecaj na konstantu vezanja odabranih lijekova

Curiš, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:391772>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Hrvoje Curiš

**Promjena glikozilacije α 1-kiselog glikoproteina –
utjecaj na konstantu vezanja odabranih lijekova**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju za Opću kemiju sa stehiometrijom 1 i izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marija Gabričevića i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Tina Weitnera.

Zahvaljujem se svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću i doc. dr. sc. Tinu Weitneru na stručnoj pomoći i suradnji tijekom izrade ovog diplomskog rada. Izradu diplomskog rada na ovom Zavodu odabrao sam zbog svojih mentora, njihovog pristupa rješavanju problema i njihovog pogleda na znanost i rad općenito. Ugodna atmosfera s pragmatičnim rješenjima problema glavni su razlozi mog odabira.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. OPĆENITO O α 1-KISELOM GLIKOPROTEINU	2
1.1.1. STRUKTURNE ZNAČAJKE	2
1.1.2. FIZIOLOŠKA ULOGA	3
1.2. ODABRANI LIJEKOVI	4
1.2.1. IMATINIB	4
1.2.2. DIPIRIDAMOL	5
1.2.3. MORFIN	6
1.2.4. IMIPRAMIN	7
1.2.5. PROPRANOLOL	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. FLUORESCENCIJSKA SPEKTROFOTOMETRIJA	10
3.2. KONSTANTA KEMIJSKE RAVNOTEŽE	13
3.3. MATERIJALI I PRIPRAVA OTOPINA	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. IMATINIB	16
4.1.1. IMATINIB I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	17
4.1.2. IMATINIB I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	19
4.2. DIPIRIDAMOL	21
4.2.1. DIPIRIDAMOL I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	22
4.2.2. DIPIRIDAMOL I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	24
4.3. MORFIN	26
4.3.1. MORFIN I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	27
4.3.2. MORFIN I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	29
4.4. IMIPRAMIN	31
4.4.1. IMIPRAMIN I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	32
4.4.2. IMIPRAMIN I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN	34

4.5.	PROPRANOLOL	36
4.5.1.	PROPRANOLOL I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN.....	37
4.5.2.	PROPRANOLOL I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN.....	39
5.	ZAKLJUČCI.....	41
6.	LITERATURA	44
7.	SAŽETAK	46

1. UVOD

Proteini plazme imaju ključnu ulogu u vezanju i transportu endogenih tvari i lijekova u krvi. U raznim fiziološkim i patološkim stanjima dolazi do promjene njihove koncentracije i glikozilacije, s posljedičnim učinkom na promjenu konstante vezanja između proteina plazme i liganda (endogena tvar ili lijek). Najzastupljeniji protein plazme je albumin s koncentracijom do 50 g/L te se većina egzogenih tvari u ljudskoj krvi prenosi vezanjem na albumin. Ključnu ulogu u transportu bazičnih i neutralnih molekula ima α 1-kiseli glikoprotein (AGP) čija koncentracija u krvi iznosi 1 g/L (Fournier i sur. 2000).

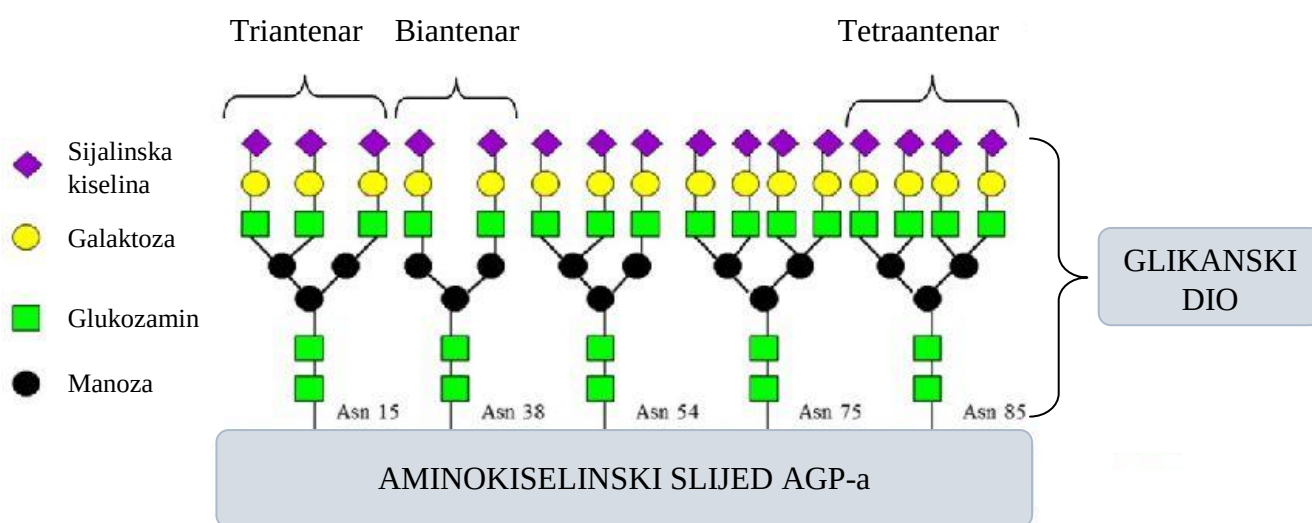
Samo slobodna, nevezana frakcija lijeka odgovorna je za terapijske ili toksične učinke. S ciljem efikasne i sigurne primjene lijeka u raznim fiziološkim i patološkim stanjima od presudne je važnosti znati kako će se mijenjati koncentracija slobodne frakcije lijeka u krvi ovisno o promjenama koncentracije ili glikozilacije plazmatskih proteina. Poznavanje razlika u konstantama vezanja između proteina i liganada posebno je važno za lijekove koji imaju veliku konstantu vezanja te za one koji imaju usku terapijsku širinu, odnosno vrlo malu razliku između terapijske i toksične koncentracije slobodnog lijeka u plazmi. Efekt promjene konstante ravnoteže između proteina i lijeka na slobodnu koncentraciju lijeka u plazmi puno je veći za lijekove s velikom konstantom ravnoteže, koji su vezani na protein primjerice 99% (samo 1% je slobodno u plazmi). Ako se uslijed promjene konstante ravnoteže samo 1% lijeka vezanog na protein otpusti s proteina u plazmu, u plazmi će doći do udvostručenja slobodne frakcije lijeka. Matematički modeli koji bi na temelju raznih faktora mogli predvidjeti promjene u slobodnoj frakciji lijeka uslijed vezanja na proteine plazme trenutačno nemaju zadovoljavajuću preciznost (Kratochwil i sur. 2004).

Imajući navedeno na umu, ovaj rad imao je za cilj ispitati postoje li razlike u konstantama vezanja između odabranih lijekova i nativnog α 1-kiselog glikoproteina, odnosno njegove desijalinizirane forme.

1.1. OPĆENITO O α 1-KISELOM GLIKOPROTEINU

1.1.1. STRUKTURNE ZNAČAJKE

Ispitivani α 1-kiseli glikoprotein spada u skupinu serumskih glikoproteina te ima molekularnu masu od 41-43 kDa (Gornik i Lauc, 2008). Oko 45% ukupne mase čini pet *N*-vezanih glikana dok se proteinski dio sastoji od jednog lanca dužine 183 aminokiseline koji je kodiran s tri različita gena. U proteinskom dijelu nalaze se i dva disulfidna mosta (Fournier i sur., 2000). Na krajevima glikanskih lanaca nalaze se sijalinske kiseline zbog kojih je α 1-kiseli glikoprotein negativno nabijen pri fiziološkom pH (Slika 1). Upravo zbog svojeg negativnog naboja α 1-kiseli glikoprotein je pogodan supstrat za vezanje bazičnih i neutralnih lipofilnih lijekova te steroidnih hormona u krvi. U literaturi se opisuje sedam veznih mjesta na koje se lijekovi mogu vezati za α 1-kiseli glikoprotein, a ionske interakcije sa sijalinskom kiselinom jedan su od mogućih mehanizama vezanja. Zbog ionskih interakcija u vezanju lijekova koje uzrokuje sijalinska kiselina vjeruje se da vezanje lijekova ovisi o glikozilaciji proteina (Gornik i Lauc, 2008).



Slika 1: Shematski prikaz strukture α 1-kiselog glikoproteina (preuzeto iz Ferderbar, 2013)

1.1.2. FIZIOLOŠKA ULOGA

α 1-kiseli glikoprotein je uključen u brojne biološke procese, no u literaturi nisu svi dokazani. U literaturi se sa sigurnošću navodi da ima imunomodulatorni učinak te da sudjeluje u transportu lijekova i endogenih tvari. Imunomodulacijski učinak ovisi o stupnju, odnosno uzorku glikozilacije. Sintetizira se u hepatocitima i otpušta u krv kao odgovor na upalni proces u organizmu uslijed kojeg mu koncentracija naraste između 2 i 4 puta (Gornik, 2007). Iz tog razloga se svrstava u proteine akutne faze (Theilgaard-Mönch i sur., 2005). Prema novijim istraživanjima sinteza nije ograničena samo na hepatocyte već se događa i u mijelocitima nakon čega se pohranjuje u sekundarnim granulama i otpušta iz aktiviranih neutrofila kao odgovor na upalu te djeluje lokalno s imunomodulirajućim učinkom (Theilgaard-Mönch i sur., 2005). Regulacija ekspresije gena koji kodiraju α 1-kiseli glikoprotein je pod utjecajem glukokortikoida i citokina. Najvažniji citokini uključeni u regulaciju gena su interleukin-1 β (IL-1 β), faktor nekroze tumora- α (TNF- α) i interleukin-6 (IL-6) (Fournier i sur., 2000).

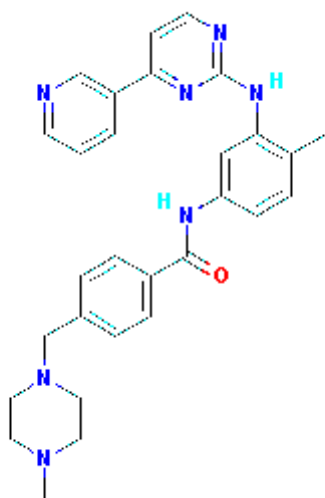
Kod brojnih fizioloških i patofizioloških stanja pokazano je da dolazi do promjene u glikozilacijskom uzorku vezanih glikana (Gornik i Lauc, 2008). Kod imunomodulatornog učinka α 1-kiselog glikoproteina dokazano je da glavnu ulogu ima glikanski, a ne proteinski dio molekule (Shiyan i Bovin, 1997). Pokusom je pokazano da je isti učinak kao i nativni AGP imala umjetna molekula koja se sastojala od sintetičkog matriksa i glikanskog dijela koji je bio jednak kao i kod nativnog AGP-a (Hochepped i sur. 2003). Kod upalnih procesa kao što je primjerice reumatoidni artritis (Elliott i sur. 1995), kod raznih tumora i kod dijabetes melitusa dolazi do porasta udjela biantenarnih glikanskih struktura vezanih na proteinsku jezgru, do porasta fukozilacije i promjena u stupnju sijalinizacije (Higai i sur., 2005). Kod trudnoće pak dolazi do porasta udjela tri i tetraantenskih glikanskih struktura i smanjene fukozilacije (Higai i sur., 2005). Promjene koje se događaju na razini glikozilacije kod patofizioloških stanja potencijalno se mogu koristiti u svrhu prognoze ishoda bolesti. Primjerice, lošiji ishod kod tumorskih bolesnika se povezuje s prisutnošću visoko fukoziliranih tri- i tetraantenskih struktura (Hashimoto i sur., 2004). Drugi primjer prognostičke uloge α 1-kiselog glikoproteina je kod pacijenata sa septičkim šokom. Kod pacijenata koju su preživjeli septički šok primijećeno je prolazno povećanje biantenskih glikana za razliku od pacijenata s fatalnim ishodom kod kojih nije došlo do povećanja biantenskih struktura (Brinkman van den Linden i sur., 1996).

1.2. ODABRANI LIJEKOVI

Za mjerenje su odabrani lijekovi koji su razmjerno dobro topljivi u vodi (Budavari i sur. 1996) i imaju relativno visoke konstante vezanja za $\alpha 1$ -kiseli glikoprotein (Israili i Dayton, 2001) te je predviđeno da bi efekt promjene konstante vezanja trebao biti najizraženiji.

1.2.1. IMATINIB

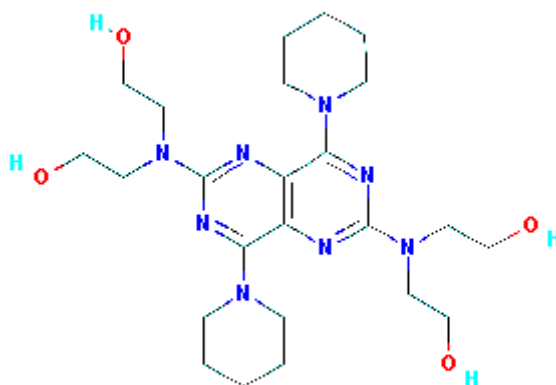
Imatinib je lijek iz skupine citostatika koji inhibiraju protein-tirozin kinazu. Indiciran je kod liječenja Philadelphija kromosom pozitivne (Ph^+) kronične mijeloične leukemije te je u tretmanu te bolesti napravio značajan iskorak u preživljenju i kvaliteti života oboljelih u posljednjih dvadesetak godina. Kod Ph^+ kronične mijeloične leukemije protein-tirozin kinaza bcr-abl je neprestano aktivna i uzrokuje neprekidnu fosforilaciju unutarstaničnih molekula. Neprekidna fosforilacija onemogućava smrt stanica apoptozom te dolazi do razvoja tumorskih stanica. Imatinib blokira spomenutu protein-tirozin kinazu bcr-abl i na taj način uzrokuje apoptozu stanice. Selektivno djelovanje ovog lijeka na tumorske stanice posljedica je ekspresije defektnog proteina bcr-abl samo na tumorskim stanicama (Fitos i sur. 2011). Imatinib hidroklorid koji je korišten u mjerenjima je dobro topljiv u vodi i ima poznatu konstantu asocijacije (K_A) vezanja na $\alpha 1$ -kiseli glikoprotein od $1,7 \times 10^6$ (Fitos i sur. 2011).



Slika 2: Imatinib

1.2.2. DIPIRIDAMOL

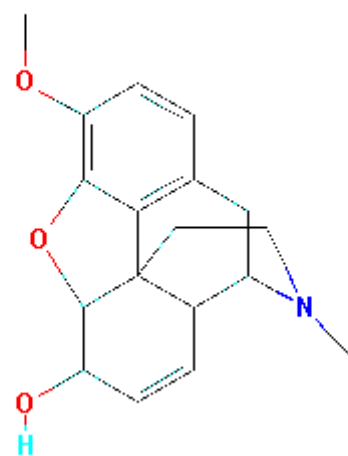
Dipiridamol spada u skupinu lijekova s antikoagulativnim djelovanjem. Mehanizam djelovanja zasniva se na inhibiciji agregacije trombocita putem inhibicije enzima fosfodiesteraza-3 (PDE3). Fosfodiesteraza-3 je odgovorna za degradaciju cikličkog AMP-a (cAMP) u AMP. Inhibicijom fosfodiesteraze-3 povećava se koncentracija cAMP-a, a posljedice povećane koncentracije cAMP-a su inhibicija agregacije trombocita i vazodilatacija (Katzung i sur. 2011). Dipiridamol hidroklorid koji je korišten za mjerenje je slabo topljiv u vodi, ali je topljiv u razrijeđenim kiselinama s pH manjim od 3,3 te u etanolu, kloroformu i metanolu. Slabije je topljiv u acetonu, benzenu i etil acetatu (Budavari i sur. 1996) Konstanta asocijacije (K_A) vezanja na α 1-kiseli glikoprotein je poznata i iznosi $8,0 \times 10^5$ (Israili i Dayton, 2001).



Slika 3: Dipiridamol

1.2.3. MORFIN

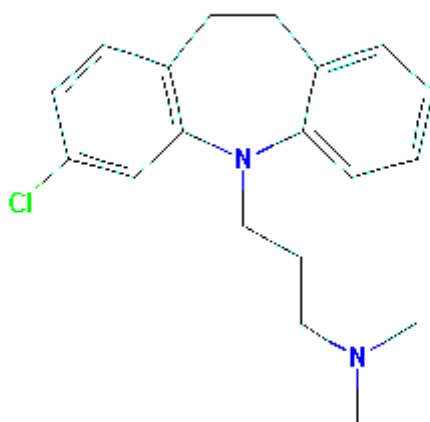
Morfin je najpoznatiji predstavnik iz skupine jakih analgetika koji djeluju putem opioidnih receptora. Mehanizam njegovog djelovanja je agonističko djelovanje na opioidne receptore, ponajprije na μ podskupinu opioidnih receptora. Djeluje i na presinaptički i na postsinaptički neuron. U presinaptičkom neuronu putem aktivacije μ opioidnih receptora inhibira otvaranje kalcijevih ionskih kanala te tako inhibira njegovu depolarizaciju i prijenos bolnog podražaja. Na postsinaptičkoj razini morfin također djeluje putem aktivacije μ opioidnih receptora, a rezultat toga je otvaranje kalijevih kanala na postsinaptičkom neuronu i njegova hiperpolarizacija koja također onemogućava prijenos bolnog podražaja (Katzung i sur. 2011). Topljivost morfin hidroklorida koji je korišten za mjerenja je 1 g u 17,5 mL vode (Budavari i sur. 1996). Konstanta asocijacije (K_A) vezanja na $\alpha 1$ -kiseli glikoprotein iznosi $3,7 \times 10^3$ (Israili i Dayton, 2001). Iako ima nešto slabiju konstantu asocijacije od ostalih odabranih lijekova, morfin je odabran kao zamjena za metadon kojem literaturni podaci navode konstantu asocijacije od $4,0 \times 10^5$ (Israili i Dayton, 2001).



Slika 4: Morfin

1.2.4. IMIPRAMIN

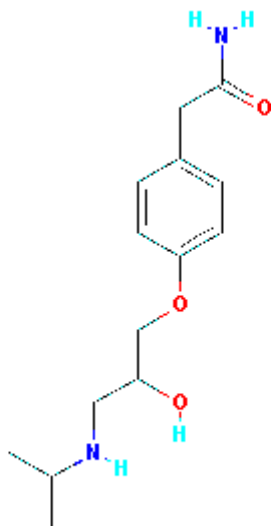
Imipramin je lijek iz skupine tricikličkih antidepresiva. Do pojave selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI) klinički se primjenjivao kao prva linija liječenja u terapiji depresije. Nakon dolaska selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina na tržište, uporaba imipramina u terapiji depresije se smanjila te su SSRI sada indicirani kao prva linija liječenja zbog povoljnijeg profila nuspojava (Katzung i sur. 2011). Dobro je topljiv u vodi (Budavari i sur. 1996), a konstanta asocijacije (K_A) vezanja na $\alpha 1$ -kiselu glikoprotein iznosi $2,4 \times 10^5$ (Israili i Dayton, 2001).



Slika 5: Imipramin

1.2.5. PROPRANOLOL

Propranolol se svrstava u skupinu antihipertenziva koji djeluju putem inhibicije β -adrenergičkih receptora. Propranolol je bio prvi β -blokator na tržištu (Black i sur. 1964) te je dio starije skupine β -blokatora koji pokazuju neselektivno djelovanje na β -adrenergičke receptore, tj. djeluju i na β_1 i na β_2 podskupinu β -adrenergičkih receptora. Noviji β -blokatori djeluju selektivno na β_1 podskupinu te zbog toga imaju manje neželjenih nuspojava od neselektivnih β -blokatora (Katzung i sur. 2011). Propranolol hidroklorid na kojem su rađena mjerenja je dobro topljiv (Budavari i sur. 1996), a konstanta asocijacije (K_A) vezanja na α_1 -kiselih glikoprotein iznosi $8,4 \times 10^5$, dok neki radovi navode nešto manju konstantu asocijacije od 1×10^5 (Israili i Dayton, 2001).



Slika 6: Propranolol

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Posljednjih godina sve se više ispituje uloga glikanskog (šećernog) dijela raznih molekula, uključujući i proteine plazme, na njihovu funkciju u organizmu. Promjena uzorka glikozilacije takvih molekula rezultira izmijenjenim interakcijama i izmijenjenim učinkom u organizmu. Štoviše, istraživanja su pokazala da je peptidni dio α 1-kiselog glikoproteina presudan za njegovo djelovanje u organizmu, te da fiziološki učinak i interakcije s drugim molekulama ovise pretežito o glikanskom dijelu (Hochepied i sur. 2003).

Vodeći se činjenicom da se glikani nalaze s vanjske strane molekule te da zauzimaju velik prostor oko molekule, pretpostavljeno je da će uslijed promjene u sastavu šećera na glikanskom dijelu doći do prostornog otkrivanja ili zakrivanja veznih mjesta na koje se vežu ligandi, pa tako i lijekovi. Pretpostavljeno je da će ta promjena rezultirati promjenom stupnja vezanja lijekova za protein, što će se očitovati kroz promjenu konstante ravnoteže. Promjena konstante kemijske ravnoteže u ovoj situaciji mogla bi imati klinički značaj u slučaju da se djelotvorna, slobodna frakcija lijeka u plazmi poveća ili smanji te je potrebna korekcija doze kako bi se izbjegli toksični učinci, odnosno nedovoljno doziranje.

U trenutku kada je ovo istraživanje rađeno nije bilo dostupnih radova koji bi opisivali promjenu konstante kemijske ravnoteže uslijed promjene glikozilacijskog uzorka α 1-kiselog glikoproteina. Relevantni radovi koji su proučavani pri pripremi istraživanja fokusirali su se na objašnjenje promjena u glikozilaciji koje se događaju uslijed raznih fizioloških (trudnoća) ili patofizioloških stanja (reumatoidni artritis) (Fournier i sur. 2000), na opisivanje fizioloških učinaka među kojima je najznačajniji imunomodulirajući učinak α 1-kiselog glikoproteina (Hochepied i sur. 2003) te na mjerenje konstanti ravnoteža između lijekova i α 1-kiselog glikoproteina, ne mjereći postoje li razlike u konstanti kod različitih glikozilacijskih uzoraka (Israili i Dayton, 2001).

U okviru ovog rada provedeno je ispitivanje u kojem su se mjerile konstante kemijske ravnoteže između α 1-kiselog glikoproteina i imatiniba, dipiridamola, morfina, imipramina te propranolola. Ti lijekovi odabrani su zbog literaturnih podataka o razmjerno dobroj topljivosti u vodi (Budavari i sur. 1996) i zbog relativno visokih poznatih vrijednosti konstanta vezanja za α 1-kiseli glikoprotein (Fitos i sur. 2011) (Israili i Dayton, 2001).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. FLUORESCENCIJSKA SPEKTROFOTOMETRIJA

U eksperimentu je za mjerenje konstante kemijske ravnoteže korištena tehnika fluorescencijske spektrofotometrije. Fluorescencijska spektrofotometrija je, uz fosforescenciju i kemiluminescenciju, jedna od tri tehnike koje se svrstavaju u grupu tehnika molekularne luminescencije. Fluorescencija i fosforescencija se prema fizikalnom načelu prema kojem djeluju razlikuju od kemiluminescencije te se stoga fluorescencija i fosforescencija još nazivaju i fotoluminescencijske tehnike.

Fizikalno načelo na kojem se zasnivaju fotoluminescencijske tehnike je apsorpcija fotona koja uzrokuje pobuđivanje elektrona u više energetske razine. Uslijed povratka elektrona u stanje niže energije dolazi do emisije elektromagnetskog zračenja koje se mjeri. Razlika između fluorescencije i fosforescencije očituje se u trajanju emisije elektromagnetnog zračenja nakon što su elektroni pobuđeni apsorpcijom fotona u stanje više energije. Nakon što su elektroni pobuđeni apsorpcijom elektromagnetnog zračenja koje traje između 10^{-15} i 10^{-14} sekundi dolazi do njihovog povratka u stanje niže energije. Kod fluorescencije, relaksacija traje između 10^{-10} i 10^{-5} sekundi dok kod fosforescencije relaksacija traje između 10^{-4} i 10 i više sekundi. Razlog različitog trajanja je taj da je relaksacija odnosno povratak elektrona iz pobuđenog tripletnog stanja u osnovno singletno stanje kod fosforescencije sporiji proces od povratka elektrona iz pobuđenog singletnog stanja u osnovno singletno stanje kao što je slučaj kod fluorescencije.

Kao što je već rečeno, temelj fluorescencijske spektrofotometrije je pobuđivanje odnosno ekscitacija elektrona u više energetske razine. Povratkom u osnovno energetsko stanje doći će do emisije zračenja koje će samo u iznimnim slučajevima imati jednaku energiju kao i pobudno zračenje. U većini slučajeva doći će do Stokesovog pomaka, odnosno emitirano zračenje će imati manju energiju, odnosno veću valnu duljinu od pobudnog zračenja. Do toga dolazi zato što se dio energije utroši na razne energetske prijelaze koji ne emitiraju zračenje, a najvažniji je vibracijska relaksacija u kojoj elektroni prelaze iz viših u niže vibracijske razine unutar istog elektronskog stanja.

Fluorescencija se ne događa kod svih molekula, te je za njenu pojavu potrebno zadovoljiti nekoliko kriterija. Neki od njih su aromatska i rigidna struktura koja će omogućiti da se energija kod prijelaza elektrona u niža stanja emitira kroz elektromagnetsko zračenje umjesto da se utroši na rotaciju molekule oko jednostrukih veza. Zbog ta dva uvjeta aromatske

aminokiseline u proteinima odličan su izvor elektromagnetskog zračenja koje se mjeri fluorescencijskom spektrofotometrijom. Važnu ulogu imaju i sastav, temperatura, viskoznost i pH medija u kojem se vrše mjerenja. Ukoliko se u sastavu medija nalaze teški metali fluorescencija će biti oslabljena. Intenzivnijoj fluorescenciji pogoduju niža temperatura i veća viskoznost medija jer smanjuju mogućnost sudara molekula iz otapala s molekulama u otopini kojima mjerimo fluorescenciju. Sudari molekula otapala s molekulama kojima mjerimo fluorescenciju uzrokovati će gubljenje energije kroz sudare čestica, umjesto kroz željenu emisiju elektromagnetnog zračenja koju mjerimo kod fluorescencije. Kod mjerenja fluorescencije važan faktor je i pH medija zato što molekule kojima mjerimo fluorescenciju u različito nabijenim stanjima pokazuju različit intenzitet fluorescencije.

Snaga emitiranog zračenja kod fluorescencije proporcionalna je snazi pobudnog zračenja i može biti zapisana jednadžbom kao:

$$F = \Phi_f K'' (P_0 - P)$$

Gdje F predstavlja intenzitet fluorescencije, Φ_f kvantnu iskoristivost fluorescencije, K'' konstantu ovisnu o geometriji i drugim faktorima, P_0 snagu ulaznog zračenja i P snagu zračenja nakon prolaska zrake kroz sloj otopine. S obzirom da su Φ_f i K'' konstante, izraz možemo pisati uporabom nove konstante K' i kao:

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

Fluorescencija slijedi Beer Lambertov zakon kojeg možemo pisati u obliku:

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

U kojem je P_0 snaga ulaznog zračenja, P snaga zračenja nakon prolaska kroz sloj otopine duljine b , ϵ molarna apsorptivnost molekule kojoj mjerimo fluorescenciju i c koncentracija fluorescirajuće specije.

Uvrštavanjem (2) u (3) dobivamo:

$$F = K' P_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$$

Nakon raspisivanja u Maclaurinovu seriju i uz uvjet da su apsorbancije molekula koje fluoresciraju manje od 0,05 izraz (4) možemo pisati i kao:

$$F = 2,303 K' \epsilon bc P_0$$

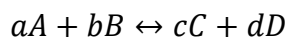
A kod konstantne snage ulaznog zračenja P_0 vrijedi:

$$F = K_c = 2,303K'\epsilon bcP_0 = 2,303\Phi_f K''\epsilon bcP_0$$

Iz gornje jednadžbe proizlazi da je kod konstantne snage ulaznog zračenja P_0 snaga emitiranog zračenja F proporcionalna koncentraciji analita pri niskim koncentracijama (zadovoljen uvjet da je apsorbancija $<0,05$) (Skoog i sur., 2007).

3.2. KONSTANTA KEMIJSKE RAVNOTEŽE

Za razumijevanje eksperimenta i njegovih rezultata važno je detaljnije objasniti pojam konstante kemijske ravnoteže. Kemijske reakcije odvijaju se u dva smjera; u smjeru nastajanja produkta iz reaktanata i u obratnom smjeru u kojem iz produkta ponovno nastaju reaktanti. Jednadžba koja opisuje reakciju u kojoj iz reaktanata A i B nastaju produkti C i D glasi:



Iz a molekula reaktanta A i b molekula reaktanta B nastaje c molekula produkta C i d molekula produkta D, gdje a , b , c i d predstavljaju broj molekula u reakciji.

Polazna reakcija u kojoj nastaju produkti C i D odvija se brzinom reakcije koju opisuje jednadžba:

$$v_1 = k_1[C]^c[D]^d$$

Istovremeno s polaznom reakcijom događa se i povratna reakcija u kojoj iz produkata C i D ponovno nastaju reaktanti A i B. Brzina odvijanja povratne reakcije opisana je jednadžbom:

$$v_2 = k_2[A]^a[B]^b$$

U početku reakcije u smjesi se nalaze samo reaktanti A i B te se odvija samo polazna reakcija u kojoj nastaju produkti C i D. Odvijanjem reakcije smanjuje se broj molekula reaktanata, a povećava broj molekula produkta C i D te se u sve većoj mjeri počinje odvijati i povratna reakcija u kojoj iz produkata C i D ponovno nastaju reaktanti A i B. U jednom trenutku u reakcijskom sustavu će se iz reaktanata A i B sintetizirati jednako onoliko molekula produkta C i D, koliko će iz produkata C i D povratnom reakcijom nastajati molekula reaktanata A i B. Tada će se polazna i povratna reakcija odvijati istim brzinama odnosno sustav će se nalaziti u kemijskoj ravnoteži. U ravnotežnom stanju vrijedi:

$$v_1 = v_2$$

Odnosno:

$$k_1[C]^c[D]^d = k_2[A]^a[B]^b$$

Ili:

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

S obzirom da je omjer dviju konstanti također konstanta, prethodni izraz možemo pisati i kao:

$$K = \frac{[A]^a[B]^b}{[C]^c[D]^d}$$

U gornjem izrazu K predstavlja konstantu kemijske ravnoteže. Konstanta kemijske ravnoteže je vrijednost koja opisuje u kojem smjeru će se odvijati kemijska reakcija odnosno hoće li u reakcijskoj smjesi nakon uspostavljanja ravnoteže prevladavati reaktanti ili produkti. Za određenu reakciju konstanta kemijske ravnoteže je nepromjenjiva sve dok se ne mijenjaju pH ili temperatura sustava. Vrijednosti konstante kemijske ravnoteže mogu biti između 10^{-50} i 10^{50} , a mjerna jedinica konstante ovisi o broju molekula koje sudjeluju u reakciji (Filipović i Lipanović, 1987).

U eksperimentu je mjerena konstanta kemijske ravnoteže K u reakciji između odabranih lijekova i $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina koju možemo predstaviti izrazom:

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

Gdje L predstavlja molekulu lijeka, AGP molekulu $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina, a $AGP+L$ kompleks između lijeka i $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina. Iz ovog odnosa vidljivo je da će se promjenom konstante kemijske ravnoteže K promijeniti omjer između kompleksa lijeka-protein i slobodnih frakcija lijeka, odnosno $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina, što može rezultirati kliničkim implikacijama u djelovanju lijeka. Izraz za konstantu kemijske ravnoteže K u kojem se u brojniku nalazi kompleks, a u nazivniku reaktanti u svom nevezanom obliku naziva se još i asocijacijska konstanta kemijske ravnoteže (K_A).

S obzirom da je provedenim eksperimentom pretpostavljeno da se morfin veže u dva koraka pokazujući dvije konsekutivne konstante ravnoteže K_A valja ukratko objasniti pojam kumulativne konstante ravnoteže (β). Kumulativna konstanta kemijske ravnoteže definirana je umnoškom pojedinačnih konstanti kemijske ravnoteže. Za morfin koji se veže u dva koraka vrijedila bi slijedeća jednačica:

$$\beta = K_1 \times K_2$$

Gdje β predstavlja kumulativnu konstantu ravnoteže, a K_1 i K_2 pojedinačne konstante vezanja.

Stehiometrijski odnos u kojem se vežu odabrani lijekovi i α 1-kiseli glikoprotein je predviđen na temelju modela vezanja u programu Specfit.

3.3. MATERIJALI I PRIPRAVA OTOPINA

Za mjerenje su korišteni komercijalno dostupni nativni α 1-kiseli glikoprotein (proizvođač Sigma), metansulfonska sol imatiniba (proizvođač LC Laboratories), dipiridamol (proizvođač Sigma), morfin hidroklorid (proizvođač Alkaloid), imipramin hidroklorid (proizvođač Sigma) i propranolol hidroklorid (proizvođač Sigma) analitičkog stupnja čistoće (p.a.). Desijalinizirana forma α 1-kiselog glikoproteina dobivena je djelovanjem enzima sijalidaze na smjesu nativnog α 1-kiselog glikoproteina (Ferderbar, 2013). Fluorescencijski spektri su snimani na uređaju Olis RSM-1000 proizvedenog od On-Line Instrument Systems, Inc. Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu pri pH 7,4. Kruti uzorci korišteni za pripravu otopina vagani su na vagi Sartorius tipa LA 310S koja ima točnost odvage od 0,1 mg.

Fluorescencijski spektri kompleksa α 1-kiselog glikoproteina i lijeka mjereni su nakon što su otopine inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi. Napravljeno je ukupno deset mjerenja; najprije su određene konstante ravnoteže zasebno za svaki od pet lijekova u kombinaciji s nativnim α 1-kiselim glikoproteinom, a zatim su izmjerene konstante ravnoteže zasebno za svih pet lijekova u kombinaciji s desijaliniziranom formom α 1-kiselog glikoproteina. Kod mjerenja je za svaki lijek pripremljen niz otopina s različitom koncentracijom lijeka i konstantnom koncentracijom α 1-kiselog glikoproteina odnosno njegove desijalinizirane forme koja je bila $2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Koncentracije lijekova su pripremljene 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 kojeg su izračunate konstante ravnoteže.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. IMATINIB

Matična otopina imatiniba pripremljena je otapanjem imatiniba u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatnog razrjeđenja konačna koncentracija metanola u mjerenim otopinama je bila manja od 0,1%. Pripremljen je niz otopina imatiniba i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojem je koncentracija AGP-a bila konstantna dok je koncentracija imatiniba bila u rasponu od $5,4 \times 10^{-6}$ do $1,35 \times 10^{-4}$ M. Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se dipiridamol veže za nativni odnosno desijalinizirani AGP u omjeru 1:1. Kompleks lijeka vezanog na AGP gasi fluorescenciju.

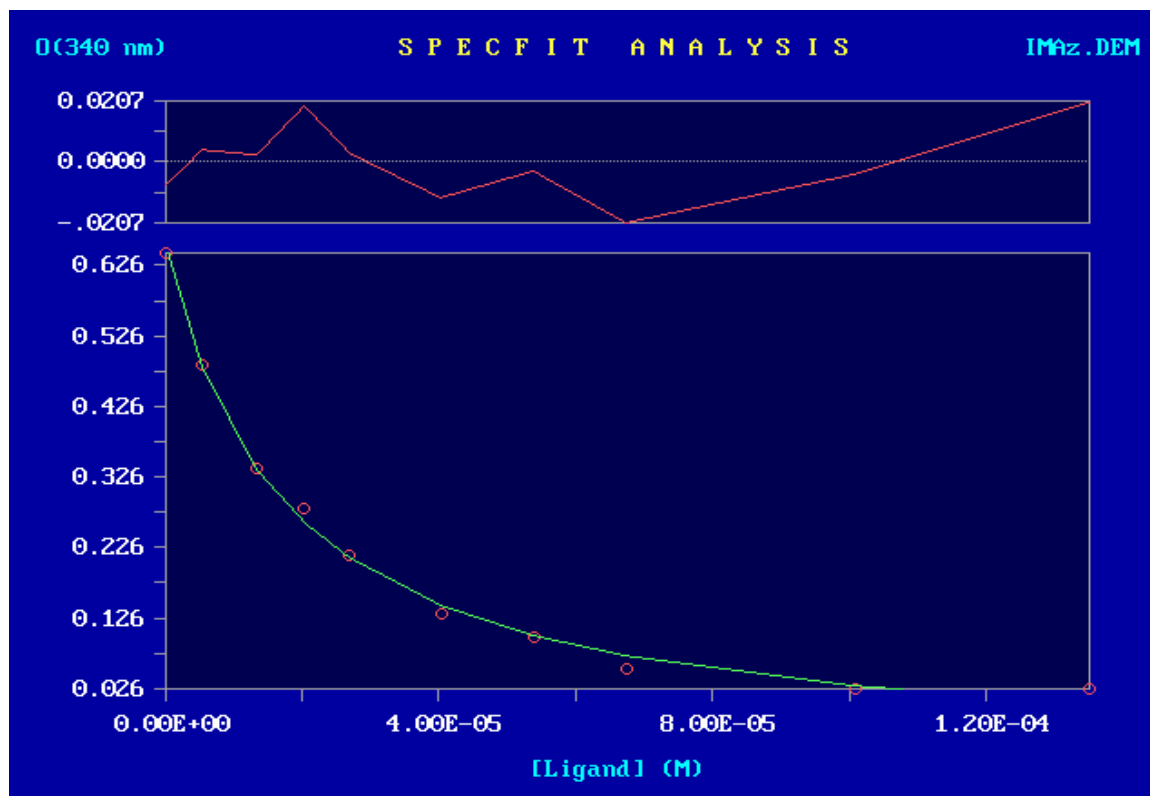
Tablica 1: Koncentracije imatiniba i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama

Broj otopine	Koncentracija AGP-a (nativnog i desijalinizirane forme) (mol dm^{-3})	Koncentracija lijeka (mol dm^{-3})
1	2×10^{-7}	0
2	2×10^{-7}	5.4×10^{-6}
3	2×10^{-7}	1.3×10^{-5}
4	2×10^{-7}	2.03×10^{-5}
5	2×10^{-7}	2.7×10^{-5}
6	2×10^{-7}	4.05×10^{-5}
7	2×10^{-7}	5.4×10^{-5}
8	2×10^{-7}	6.75×10^{-5}
9	2×10^{-7}	1.01×10^{-4}
10	2×10^{-7}	1.35×10^{-4}

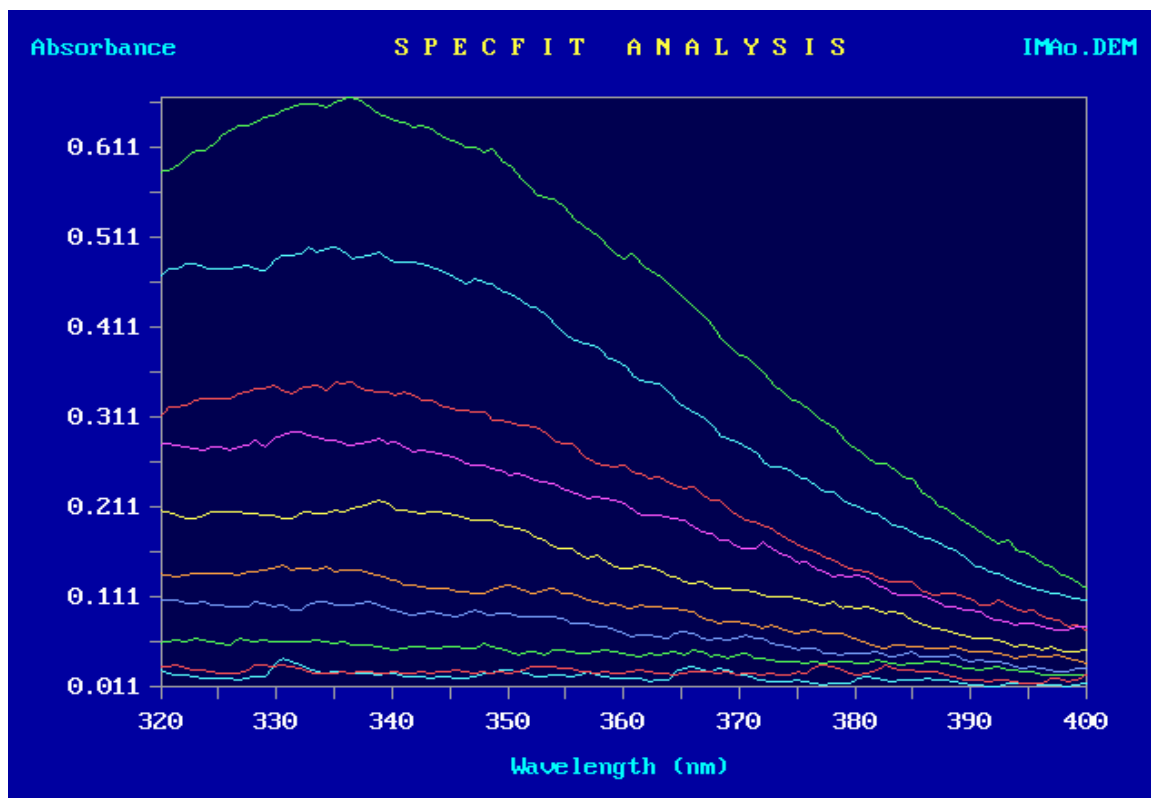
4.1.1. IMATINIB I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

IMA.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			05-15-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	4.75027D+00	2.36303D-02
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 8.691D-02$		$\sigma(\text{abs}) = 9.0164D-03$		Marq = 0.00D+00
Species	Wmax	Molar abs			
100	335.7	3.330D+06			
110	400.3	1.891D+04 >>>			

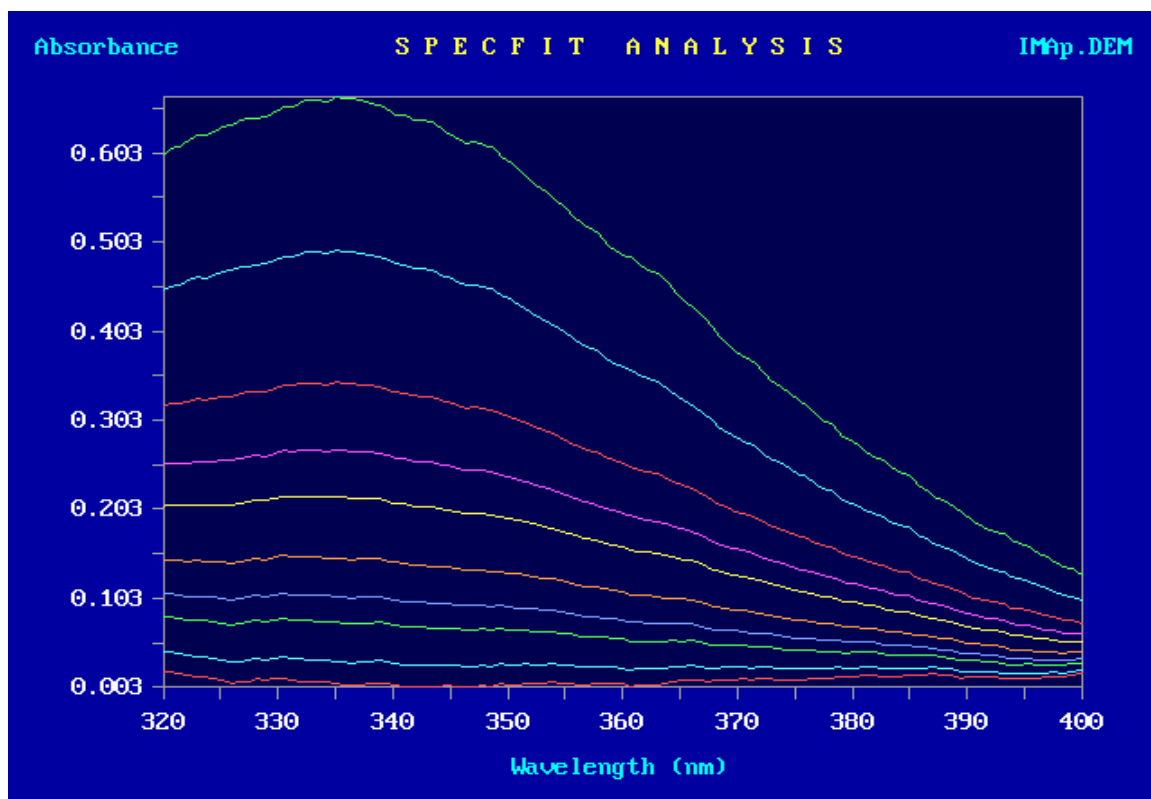
Slika 7: Model vezanja imatiniba i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 8: Fit pri 340 nm



Slika 9: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i AGP-a

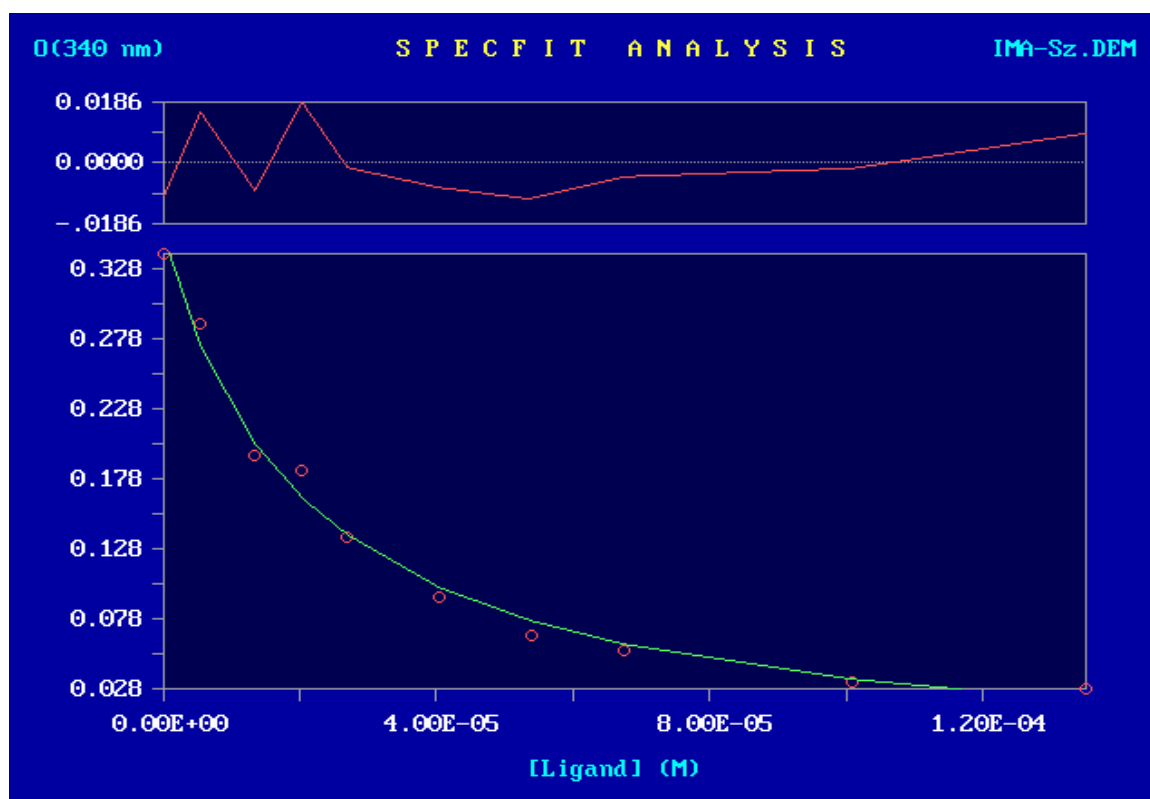


Slika 10: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i AGP-a

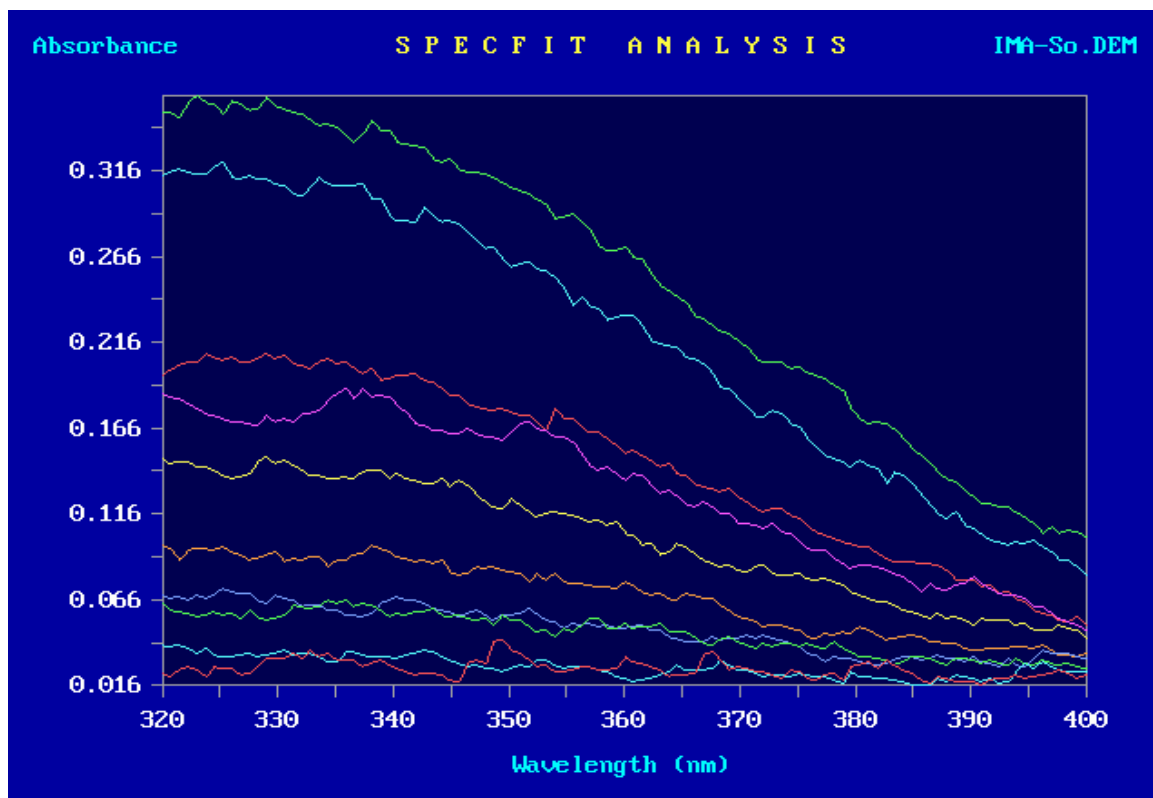
4.1.2. IMATINIB I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

IMA-S.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			05-15-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	4.65704D+00	4.12210D-02
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 7.710D-02$		$\sigma(\text{abs}) = 8.4924D-03$		Marq = 0.00D+00
Species	λ_{max}	Molar abs			
100	323.6	1.856D+06			
110	398.1	2.188D+04			

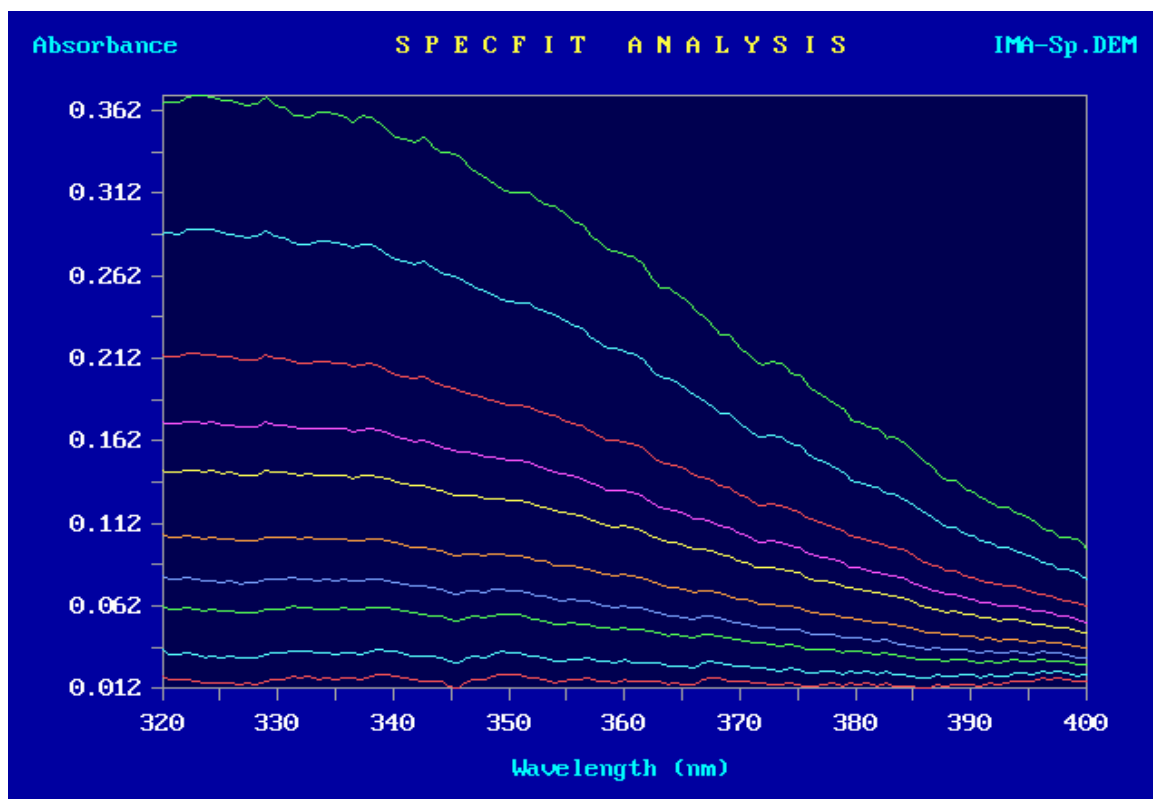
Slika 11: Model vezanja imatiniba i desijaliniziranog AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 12: Fit pri 340 nm



Slika 13: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i desijaliniziranog AGP-a



Slika 14: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina imatiniba i desijaliniziranog AGP-a

4.2. DIPIRIDAMOL

Matična otopina dipiridamola pripravljena je otapanjem dipiridamola u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatnog razrjeđenja konačna koncentracija metanola u mjerenim otopinama je bila manja od 0,1%. Pripremljen je niz otopina dipiridamola i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojem je koncentracija AGP-a bila konstantna dok je koncentracija dipiridamola bila u rasponu od 2×10^{-7} do $1,0 \times 10^{-5}$ M. Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se dipiridamol veže za nativni odnosno desijalinizirani AGP u omjeru 1:1. Kompleks lijeka vezanog na AGP gasi fluorescenciju.

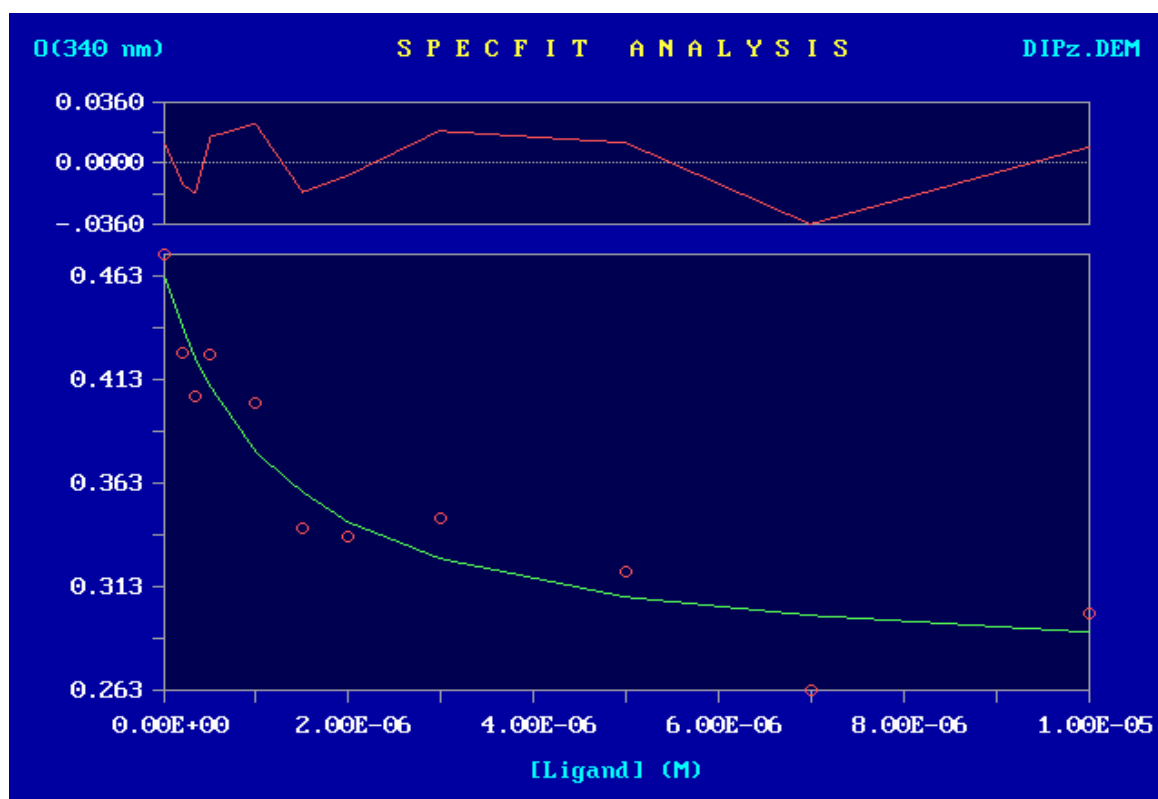
Tablica 2: Koncentracije dipiridamola i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama

Broj otopine	Koncentracija AGP-a (nativnog i desijalinizirane forme) (mol dm^{-3})	Koncentracija lijeka (mol dm^{-3})
1	2×10^{-7}	0
2	2×10^{-7}	2×10^{-7}
3	2×10^{-7}	3.5×10^{-7}
4	2×10^{-7}	5×10^{-7}
5	2×10^{-7}	1×10^{-6}
6	2×10^{-7}	1.5×10^{-6}
7	2×10^{-7}	2×10^{-6}
8	2×10^{-7}	3×10^{-6}
9	2×10^{-7}	5×10^{-6}
10	2×10^{-7}	7×10^{-6}
11	2×10^{-7}	1×10^{-5}

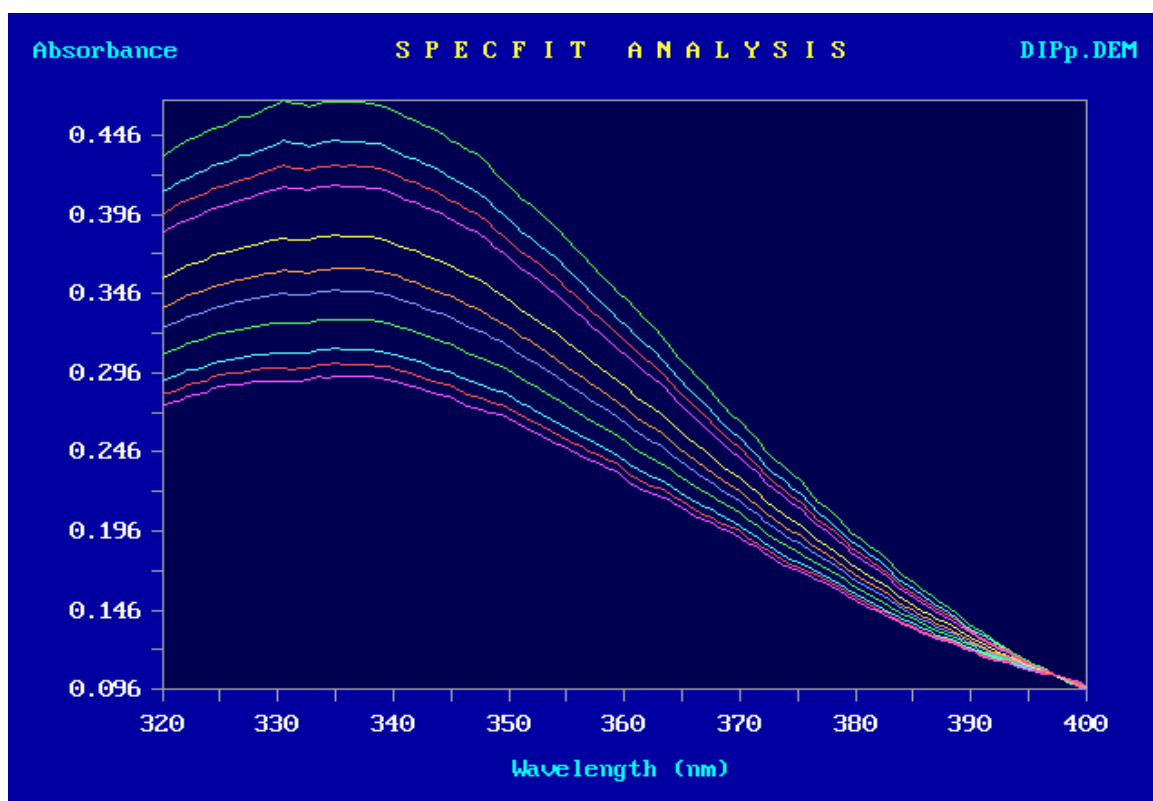
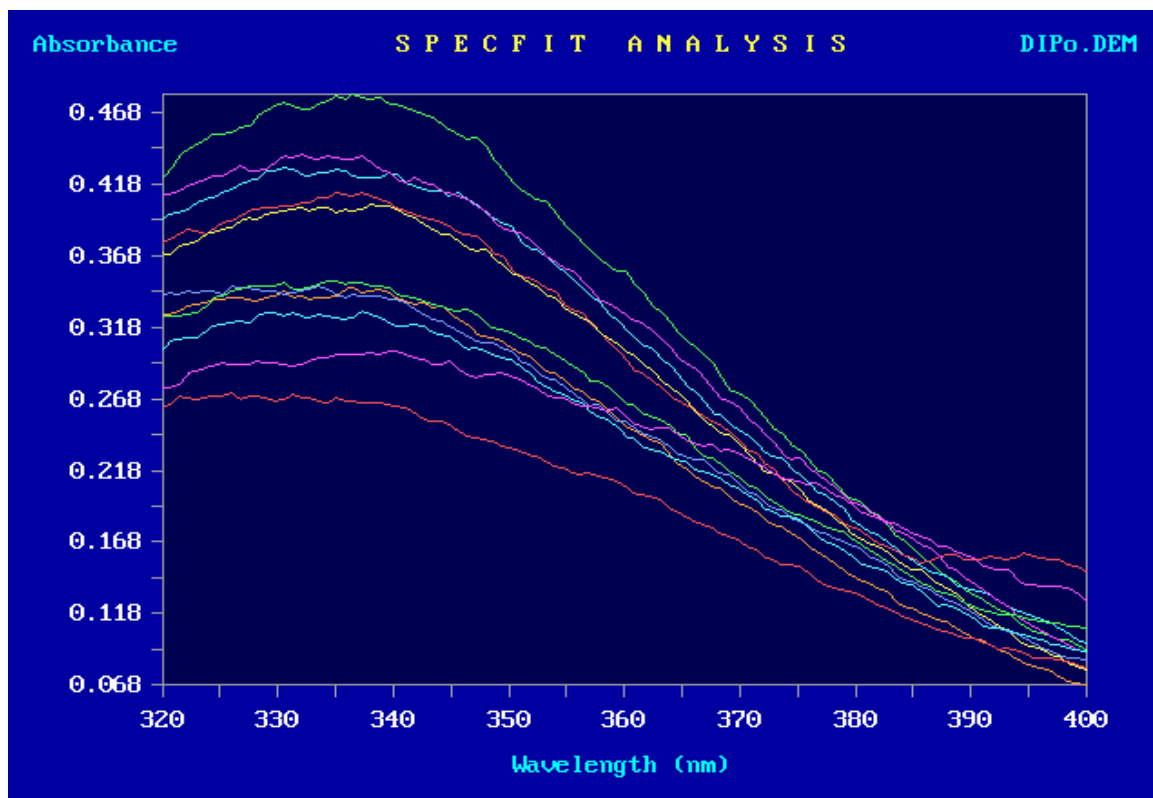
4.2.1. DIPIRIDAMOL I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

DIP.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			05-15-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.000000+00	0.000000+00
010	n	u	f	0.000000+00	0.000000+00
110	y	u	v	5.930290+00	1.561550-01
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 3.4370-01$		$\sigma(\text{abs}) = 1.70960-02$		Marq = 0.000+00
Species	Wmax	Molar abs			
100	331.0	2.3380+06			
110	337.9	1.3650+06			

Slika 15: Model vezanja dipiridamola i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



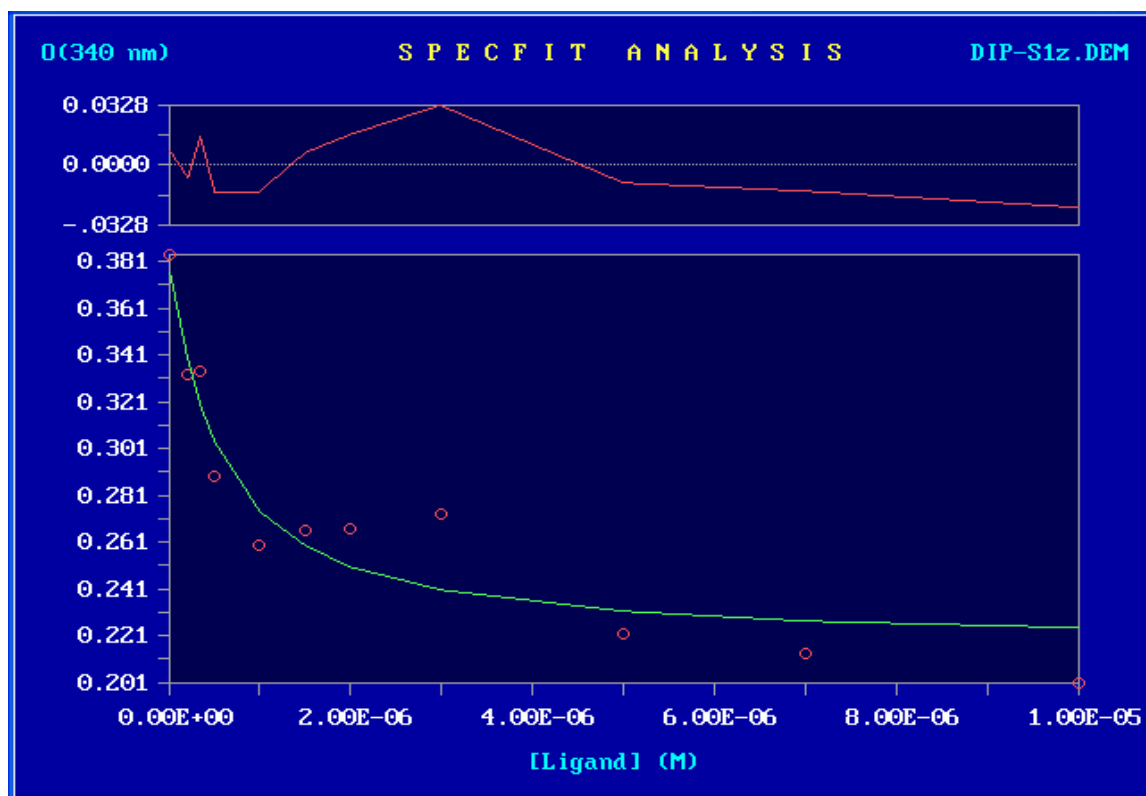
Slika 16: Fit pri 340 nm



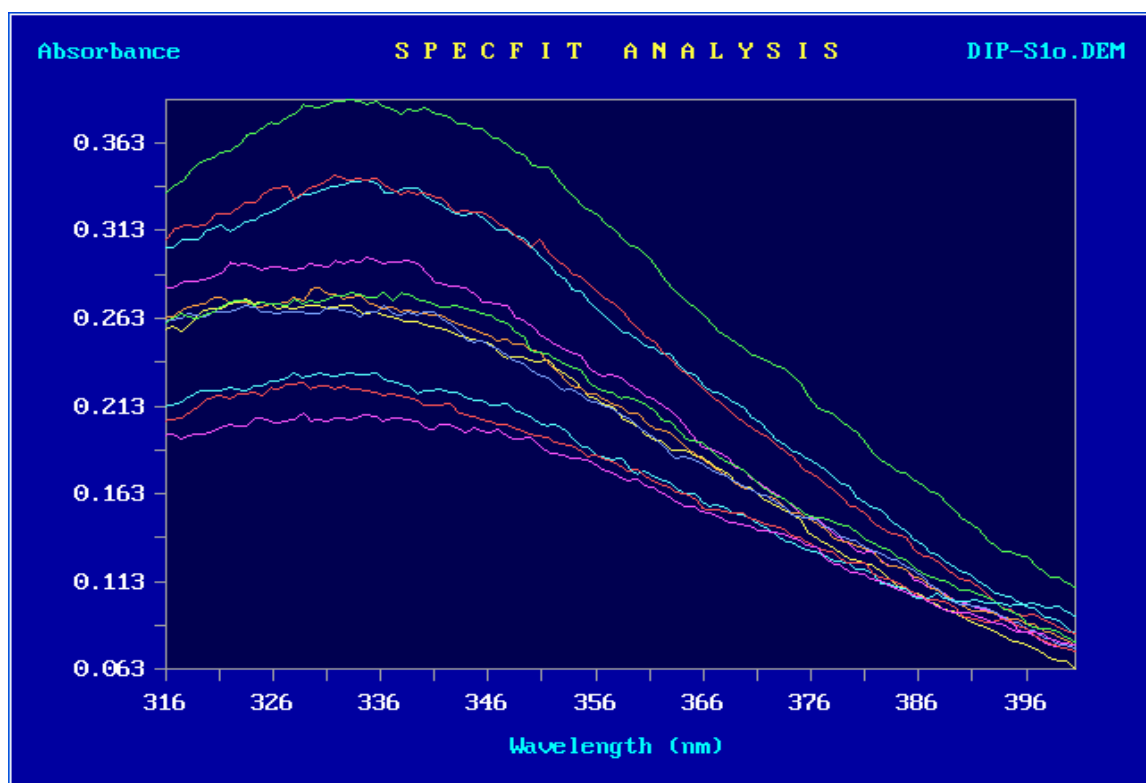
4.2.2. DIPIRIDAMOL I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

DIP-S1.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			06-16-2015	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters	
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B			
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
110	y	u	v	6.30460D+00	1.18723D-01	
Iter 2		$\Sigma(\text{squares}) = 1.8270D-01$		$\sigma(\text{abs}) = 1.2128D-02$	Marq = 0.00D+00	
Species	Wmax	Molar abs				
100	331.8	1.924D+06				
110	332.7	1.109D+06				

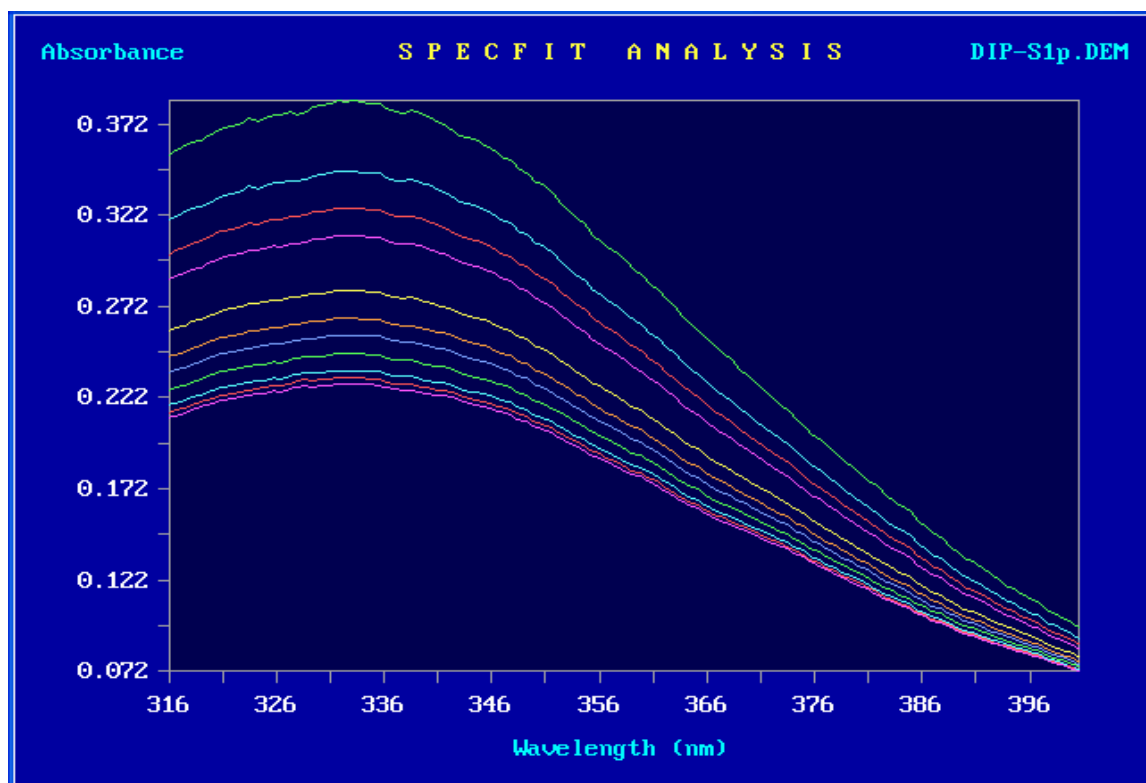
Slika 19: Model vezanja dipiridamola i desijaliniziranog AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 20: Fit pri 340 nm



Slika 21: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i desijaliniziranog AGP-a



Slika 22: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina dipiridamola i desijaliniziranog AGP-a

4.3. MORFIN

Korišteni morfin već je bio u formi otopine te je za mjerenje dodatno razrijeđen do konačnih koncentracija. Pripremljen je niz otopina morfina i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojem je koncentracija AGP-a bila konstantna dok je koncentracija morfina bila u rasponu od $3,5 \times 10^{-4}$ do $2,7 \times 10^{-2}$ M. Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se morfin veže za nativni odnosno desijalinizirani AGP u dva stupnja. U prvom stupnju morfin se veže u omjeru 1:1 te lijek vezan na AGP pojačava fluorescenciju u odnosu na AGP bez vezanog lijeka (konstanta K_1) dok se u drugom stupnju za svaku molekulu AGP-a vežu 3 molekule morfina te dolazi do gašenja fluorescencije (konstanta K_2).

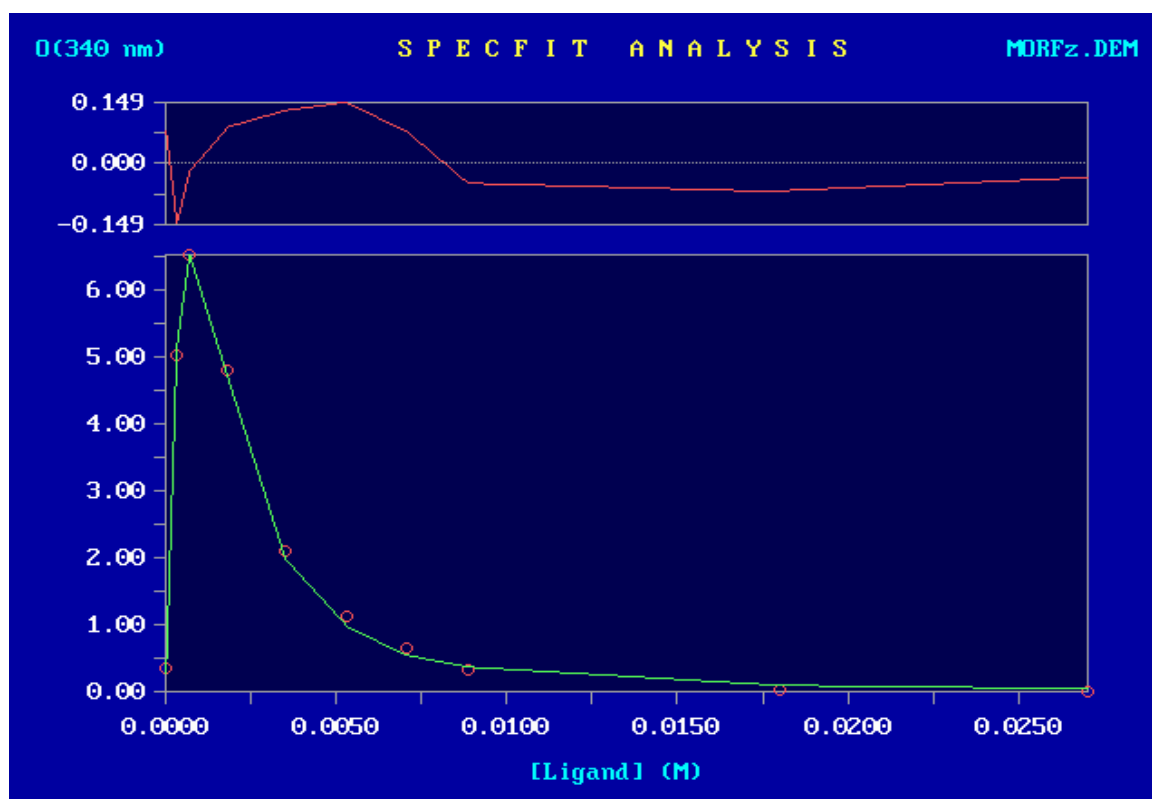
Tablica 3: Koncentracije morfina i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama

Broj otopine	Koncentracija AGP-a (nativnog i desijalinizirane forme) (mol dm^{-3})	Koncentracija lijeka (mol dm^{-3})
1	2×10^{-7}	0
2	2×10^{-7}	$3,5 \times 10^{-4}$
3	2×10^{-7}	$7,1 \times 10^{-4}$
4	2×10^{-7}	$1,8 \times 10^{-3}$
5	2×10^{-7}	$3,5 \times 10^{-3}$
6	2×10^{-7}	$5,3 \times 10^{-3}$
7	2×10^{-7}	$7,1 \times 10^{-3}$
8	2×10^{-7}	$8,9 \times 10^{-3}$
9	2×10^{-7}	$1,8 \times 10^{-2}$
10	2×10^{-7}	$2,7 \times 10^{-2}$

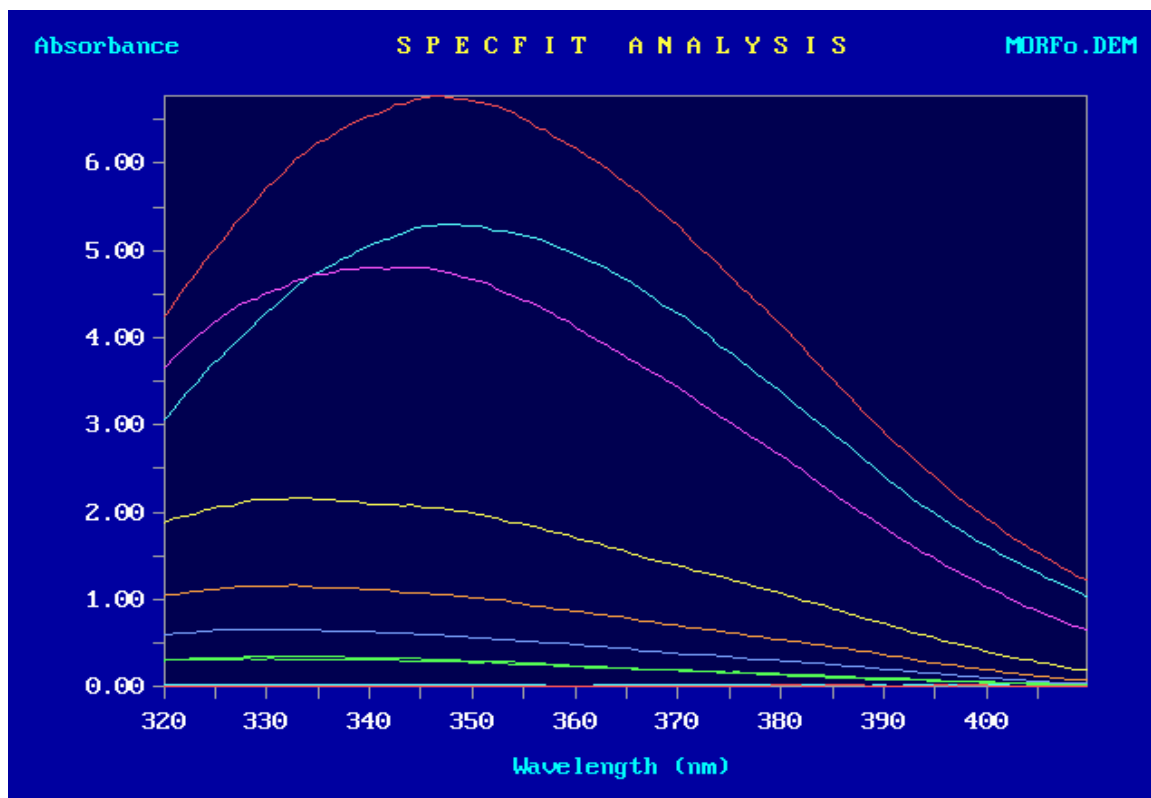
4.3.1. MORFIN I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

MORF.DEM		SPECFIT PARAMETERS			05-15-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			4 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.000000+00	0.000000+00
010	n	u	f	0.000000+00	0.000000+00
110	y	u	v	3.327420+00	8.681720-02
130	n	u	v	8.934160+00	4.004200-02
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 2.3130+01$		$\sigma(\text{abs}) = 1.38900-01$	Marq = 0.000+00	
Species	Wmax	Molar abs			
100	360.5	1.6720+06			
110	346.1	6.1670+07			

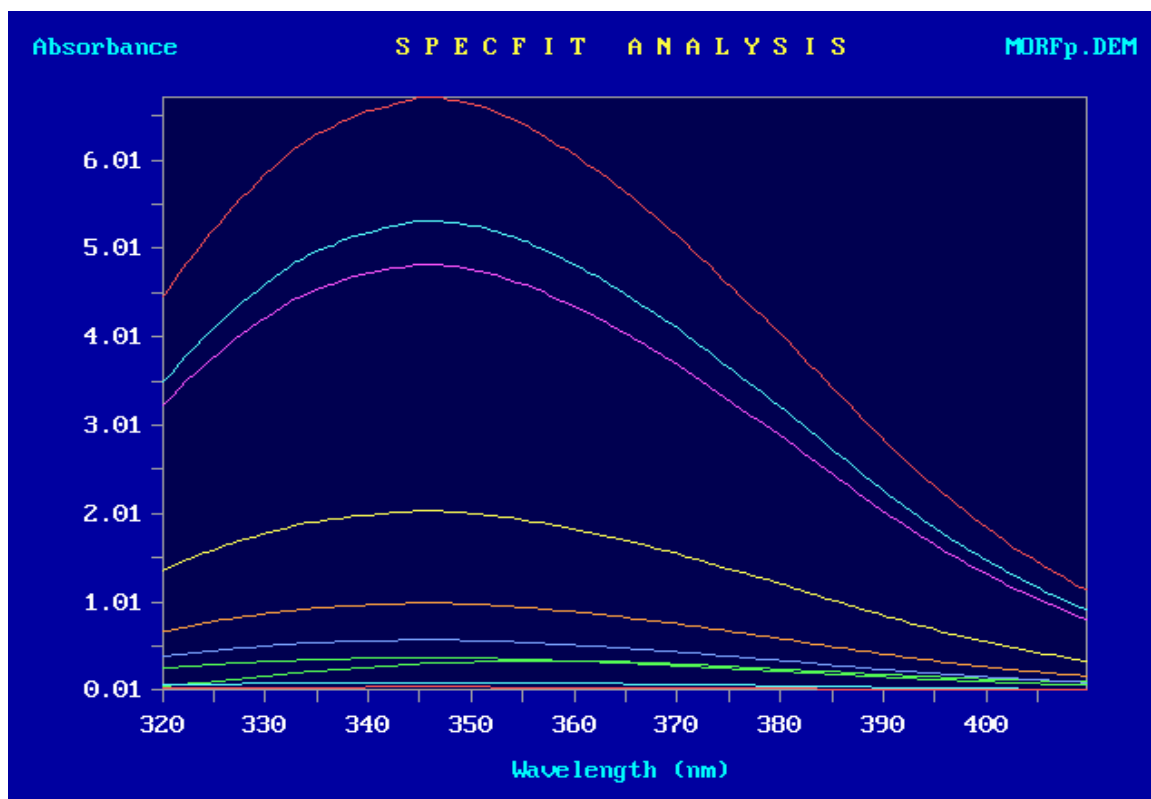
Slika 23: Model vezanja morfina i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 24: Fit pri 340 nm



Slika 25: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina morfina i AGP-a

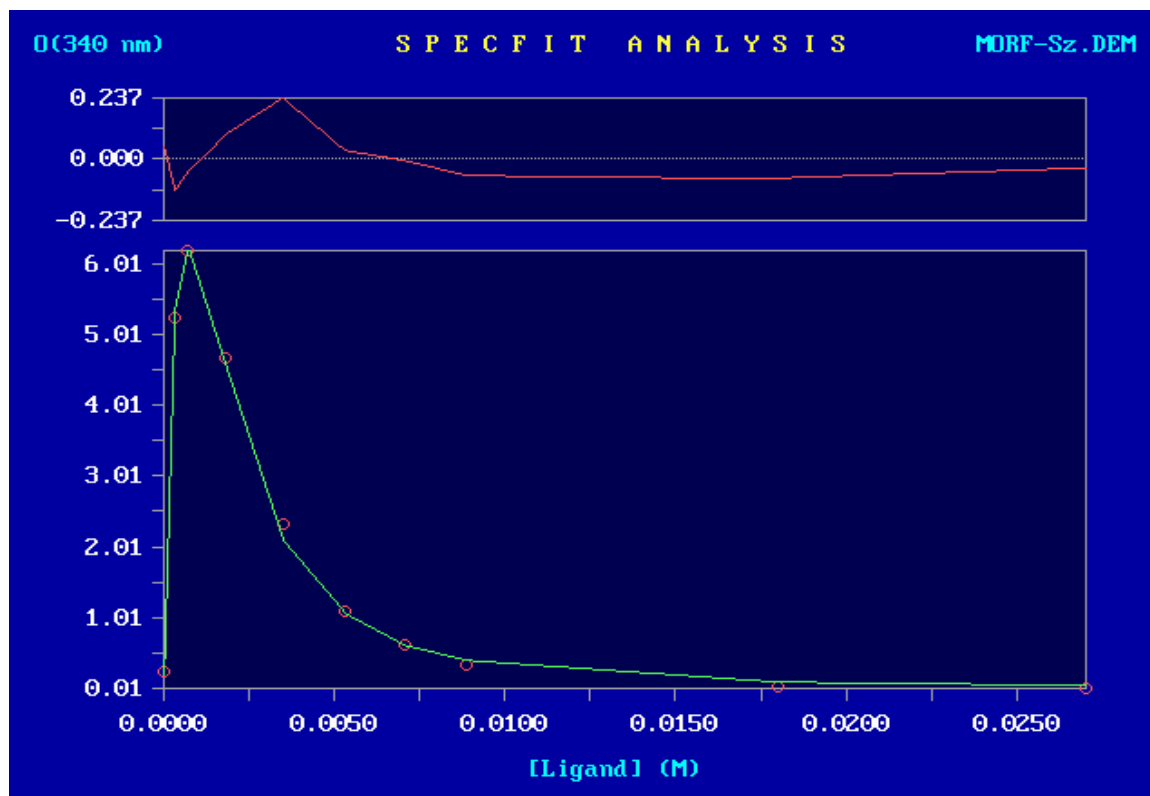


Slika 26: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina morfina i AGP-a

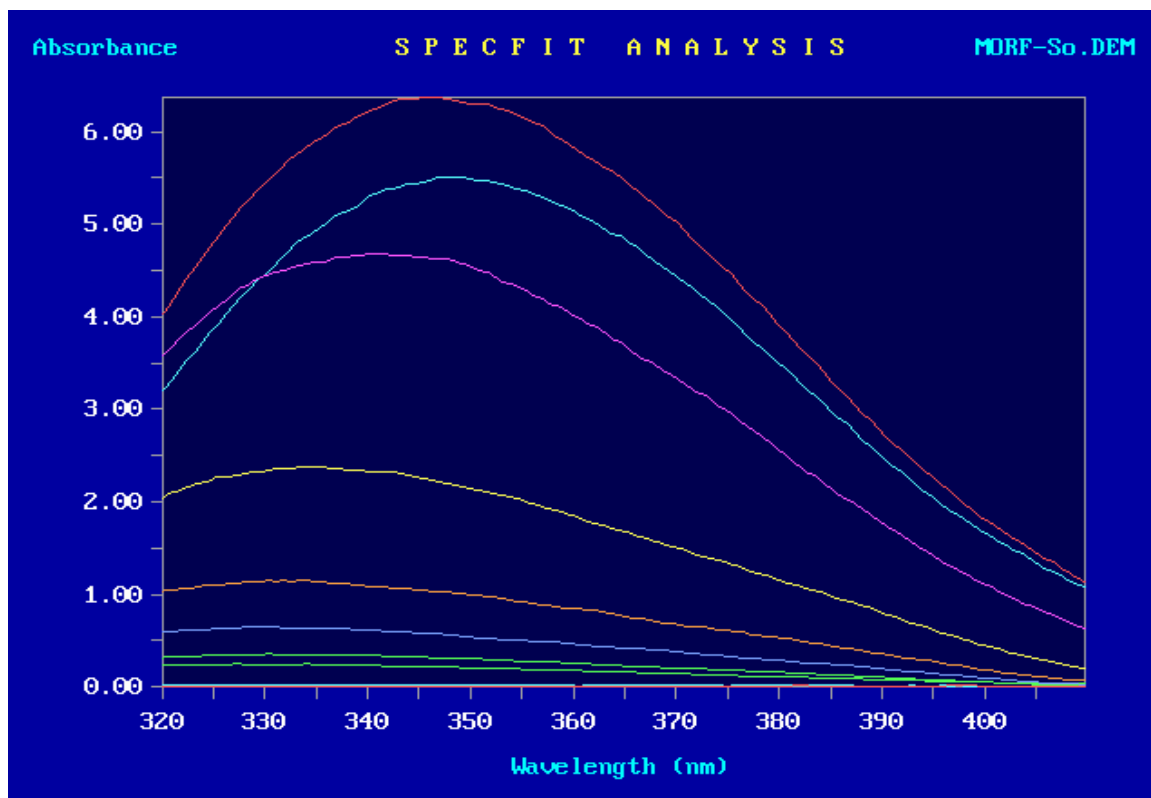
4.3.2. MORFIN I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

MORF-S.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			05-15-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			4 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.000000+00	0.000000+00
010	n	u	f	0.000000+00	0.000000+00
110	y	u	v	3.616950+00	9.390810-02
130	n	u	v	9.044640+00	5.584860-02
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 2.4480+01$		$\sigma(\text{abs}) = 1.42900-01$		Marq = 0.000+00
Species	Wmax	Molar abs			
100	356.9	1.2830+06			
110	346.9	4.6560+07			

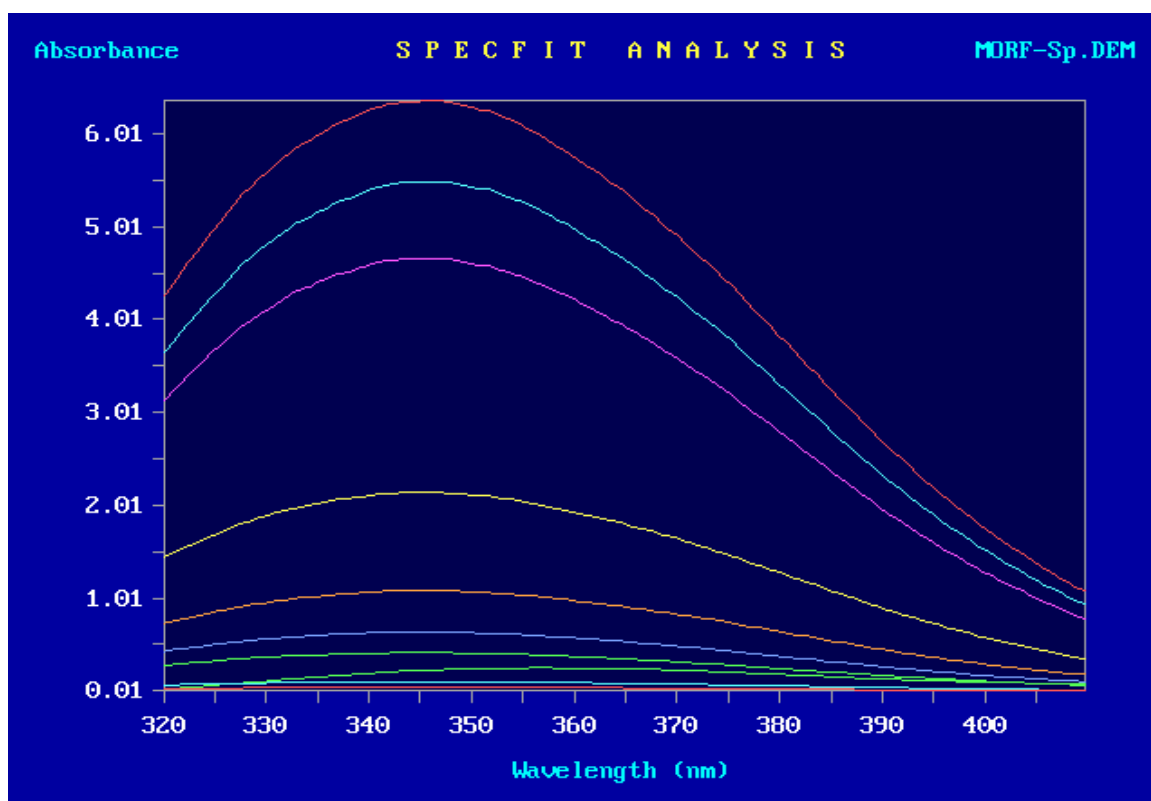
Slika 27: Model vezanja morfina i desijaliniziranog AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 28: Fit pri 340 nm



Slika 29: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina morfina i desijaliniziranog AGP-a



Slika 30: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina morfina i desijaliniziranog AGP-a

4.4. IMIPRAMIN

Matična otopina imipramina pripremljena je otapanjem imipramina u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatnog razrjeđenja konačna koncentracija metanola u mjerenim otopinama je bila manja od 0,1%. Pripremljen je niz otopina imipramina i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojem je koncentracija AGP-a bila konstantna dok je koncentracija imipramina bila u rasponu od 2×10^{-7} do 2×10^{-5} M. Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se imipramin veže za nativni odnosno desijalinizirani AGP u omjeru 1:1. Prepreku u mjerenju predstavljala je činjenica da sam imipramin pokazuje fluorescenciju.

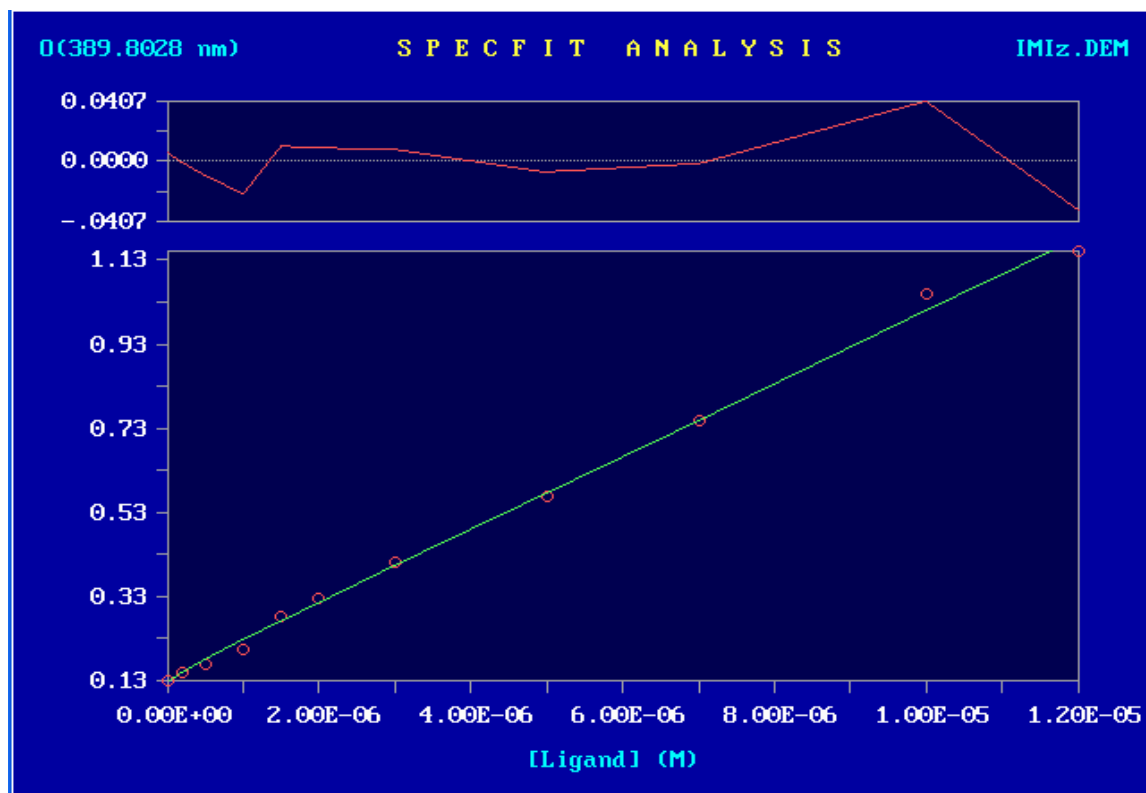
Tablica 4: Koncentracije imipramina i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama

Broj otopine	Koncentracija AGP-a (nativnog i desijalinizirane forme) (mol dm^{-3})	Koncentracija lijeka (mol dm^{-3})
1	2×10^{-7}	0
2	2×10^{-7}	2×10^{-7}
3	2×10^{-7}	1×10^{-6}
4	2×10^{-7}	2×10^{-6}
5	2×10^{-7}	3×10^{-6}
6	2×10^{-7}	5×10^{-6}
7	2×10^{-7}	7×10^{-6}
8	2×10^{-7}	1×10^{-5}
9	2×10^{-7}	$1,2 \times 10^{-5}$
10	2×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-5}$
11	2×10^{-7}	2×10^{-5}

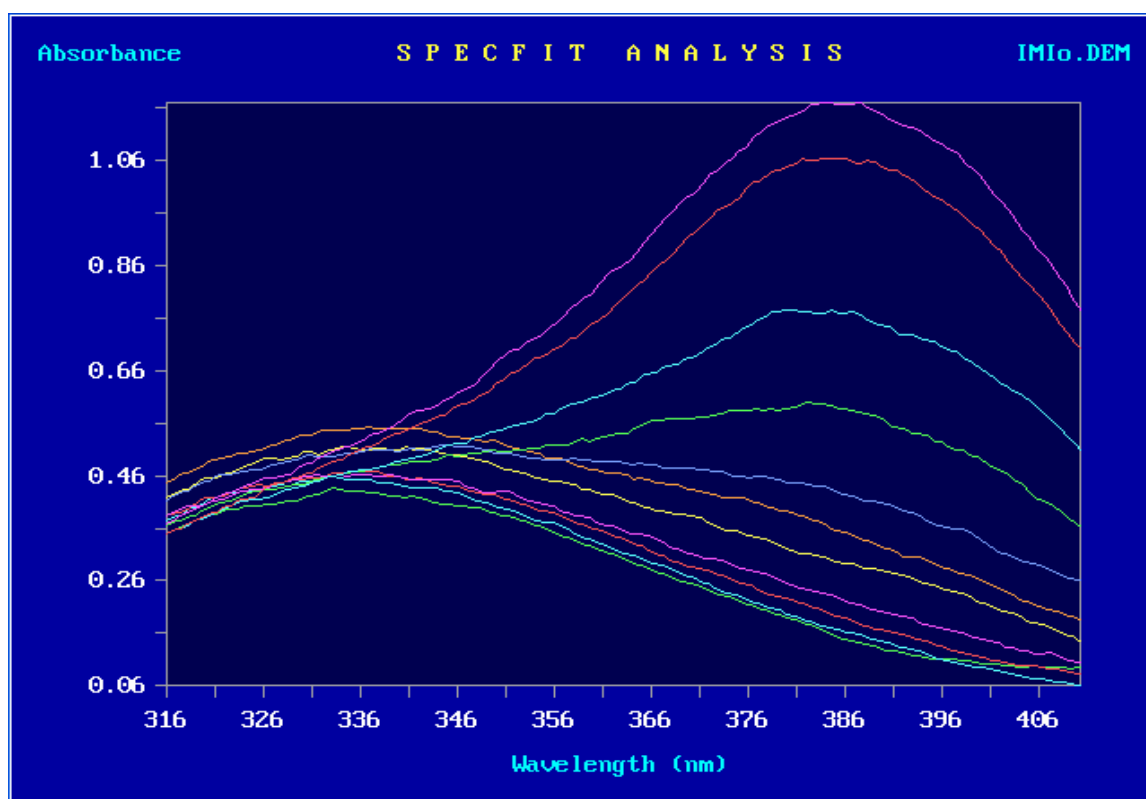
4.4.1. IMIPRAMIN I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

IMI.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			02-19-2014
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	6.39662D+00	3.35355D-01
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 5.413\text{D}-01$		$\sigma(\text{abs}) = 1.9769\text{D}-02$	Marq = 0.00D+00	
Species	λ_{max}	Molar abs			
100	333.5	2.160D+06			
010	387.8	8.683D+04			
110	336.9	2.597D+06			

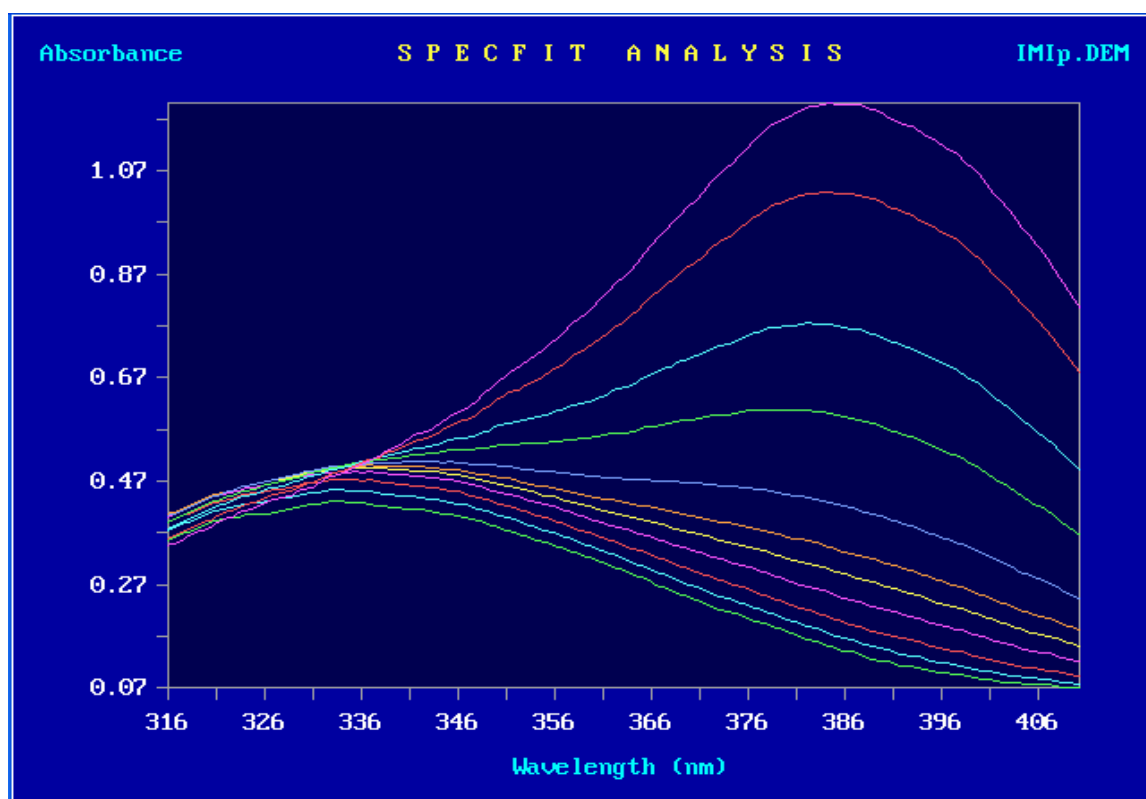
Slika 31: Model vezanja imipramina i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 32: Fit pri 390 nm



Slika 33: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imipramina i AGP-a

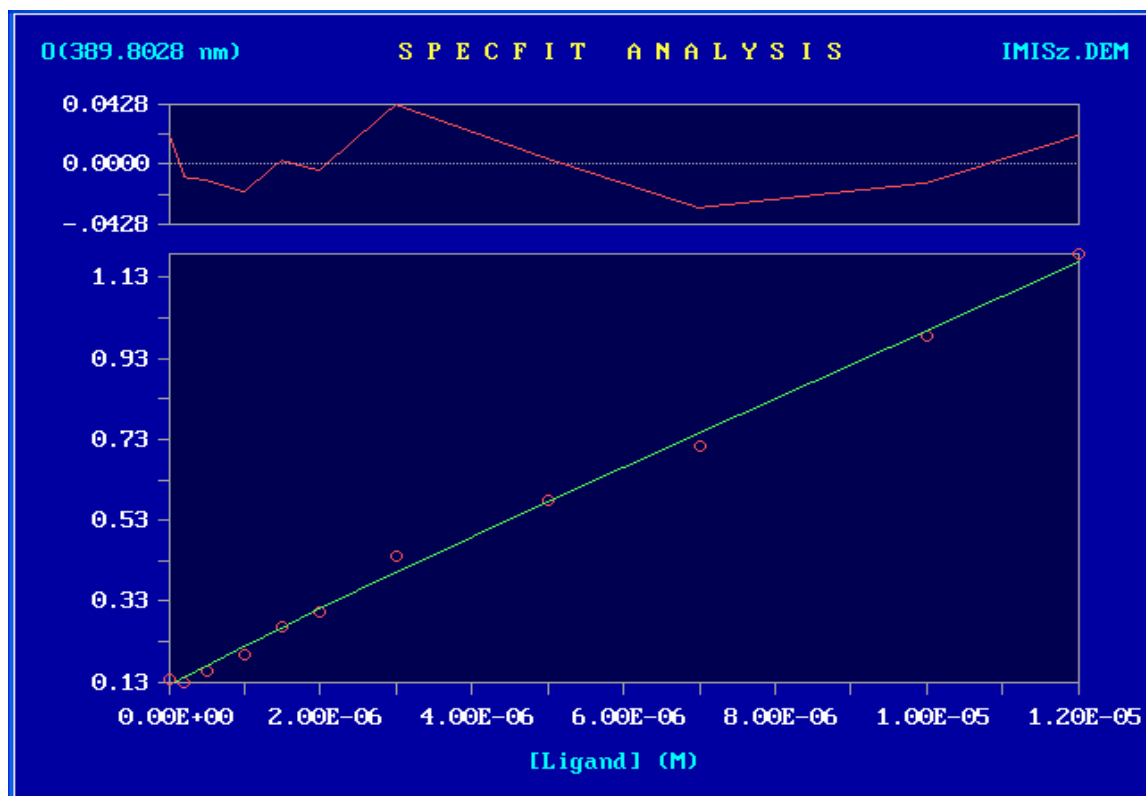


Slika 34: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina imipramina i AGP-a

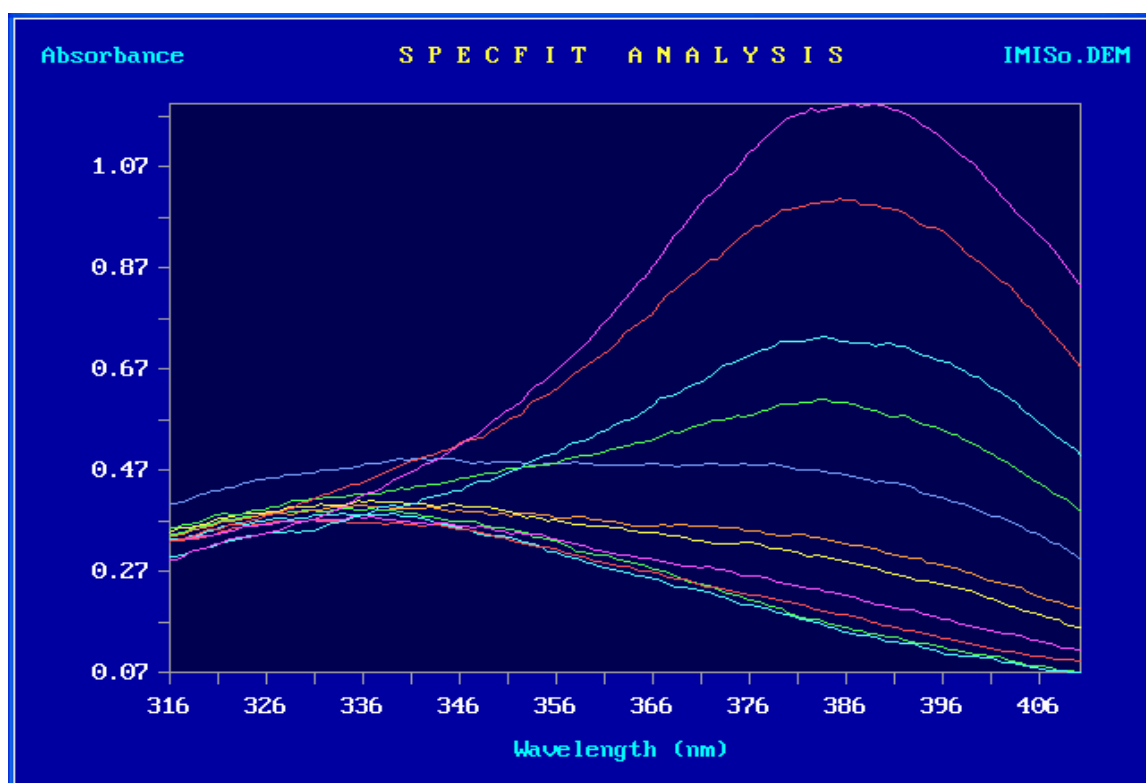
4.4.2. IMIPRAMIN I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

IMIS.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			06-17-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log β_{xyz}	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	5.46266D+00	4.77086D-01
Iter 4	$\Sigma(\text{squares}) = 6.746D-01$		$\sigma(\text{abs}) = 2.2070D-02$		Marq = 0.00D+00
Species	λ_{max}	Molar abs			
100	335.2	1.870D+06			
010	389.2	8.337D+04			
110	326.5	2.530D+06			

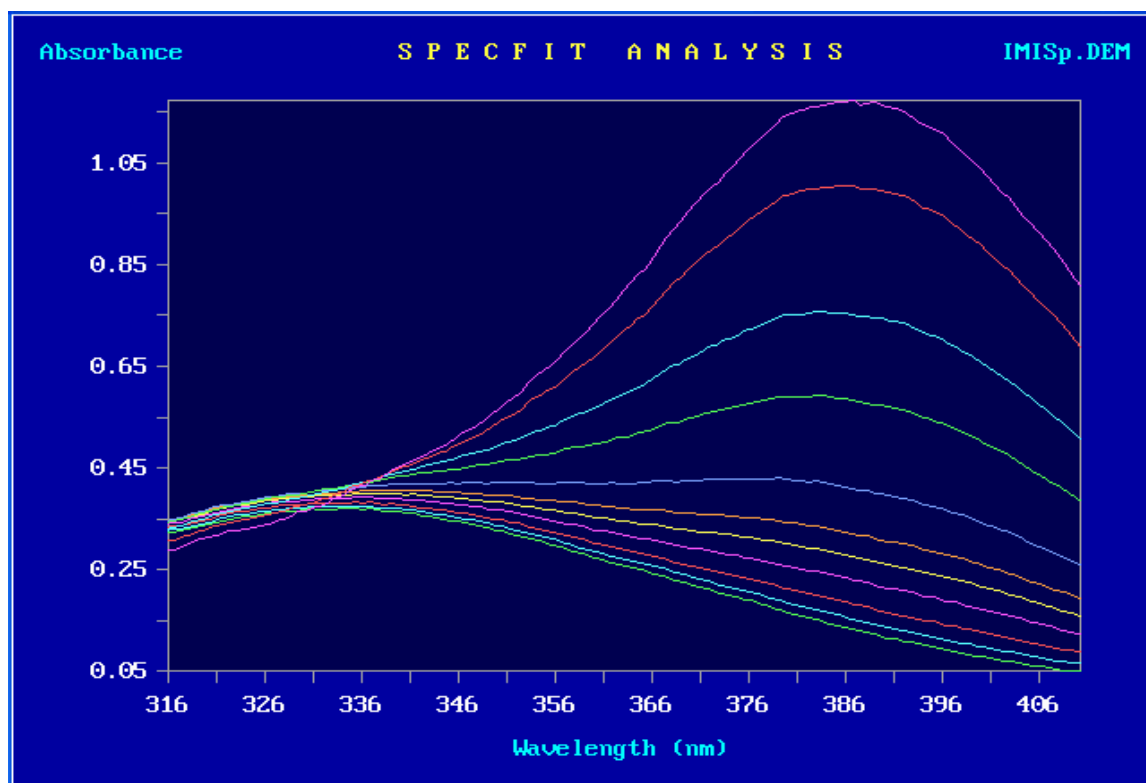
Slika 35: Model vezanja imipramina i desijaliniziranog AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 36: Fit pri 390 nm



Slika 37: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina imipramina i desijaliniziranog AGP-a



Slika 38: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina imipramina i desijaliniziranog AGP-a

4.5. PROPRANOLOL

Matična otopina propranolola pripremljena je otapanjem propranolola u vodi te je za mjerenje matična otopina dodatno razrijeđena do konačnih koncentracija. Pripremljen je niz otopina propranolola i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u kojem je koncentracija AGP-a bila konstantna dok je koncentracija propranolola bila u rasponu od 2×10^{-7} do $1,5 \times 10^{-5}$ M. Modelom vezanja korištenim za obradu izmjerenih vrijednosti pretpostavljeno je da se propranolol veže za nativni odnosno desijalinizirani AGP u omjeru 1:1. Kompleks lijeka vezanog na AGP pojačava fluorescenciju. Propranolol, kao i imipramin, pokazuje fluorescenciju što predstavlja prepreku u mjerenju.

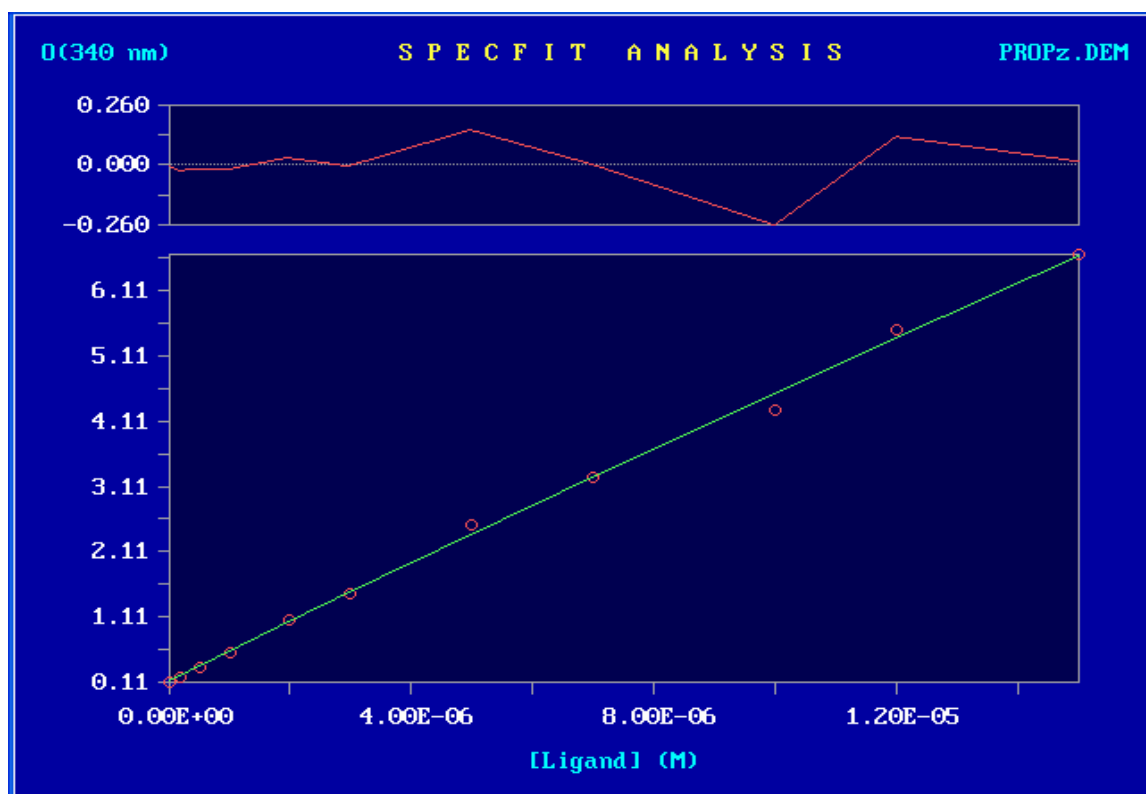
Tablica 5: Koncentracije propranolola i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a u mjerenim otopinama

Broj otopine	Koncentracija AGP-a (nativnog i desijalinizirane forme) (mol dm^{-3})	Koncentracija lijeka (mol dm^{-3})
1	2×10^{-7}	0
2	2×10^{-7}	2×10^{-7}
3	2×10^{-7}	5×10^{-7}
4	2×10^{-7}	1×10^{-6}
5	2×10^{-7}	2×10^{-6}
6	2×10^{-7}	3×10^{-6}
7	2×10^{-7}	5×10^{-6}
8	2×10^{-7}	7×10^{-6}
9	2×10^{-7}	1×10^{-5}
10	2×10^{-7}	$1,2 \times 10^{-5}$
11	2×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-5}$

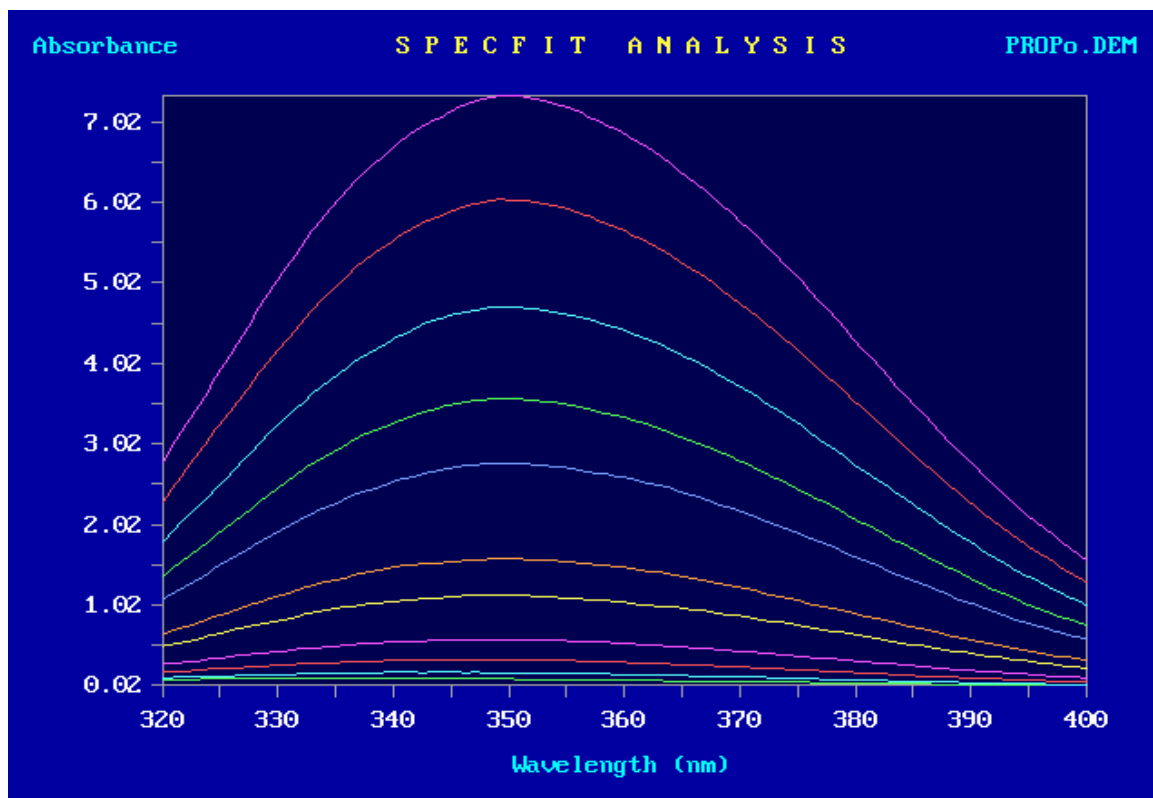
4.5.1. PROPRANOLOL I NATIVNI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

PROP.DEM		SPECFIT PARAMETERS			06-16-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log B)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) B		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	3.57640D+00	2.35221D-01
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 7.4230D+00$		$\sigma(\text{abs}) = 7.9450D-02$		Marq = 0.00D+00
Species	λ_{max}	Molar abs			
100	340.3	5.860D+05			
110	350.2	6.744D+06			

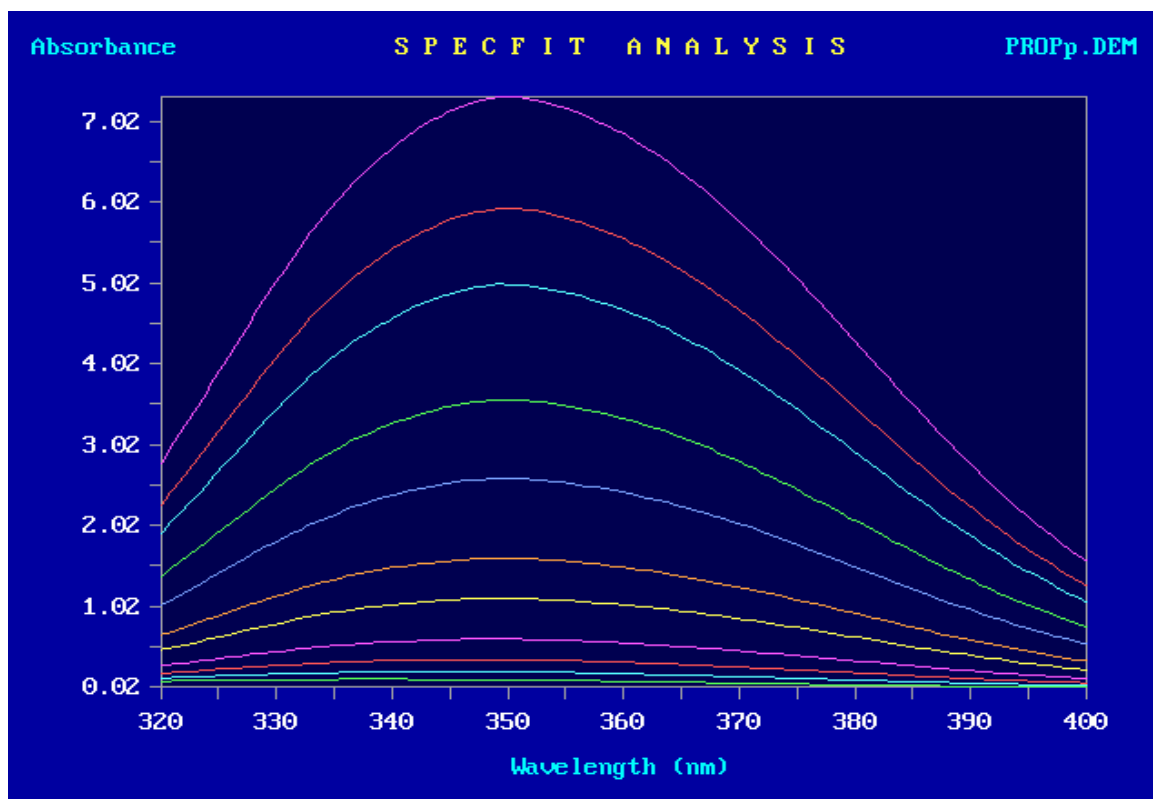
Slika 39: Model vezanja propranolola i AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 40: Fit pri 340 nm



Slika 41: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina propranolola i AGP-a

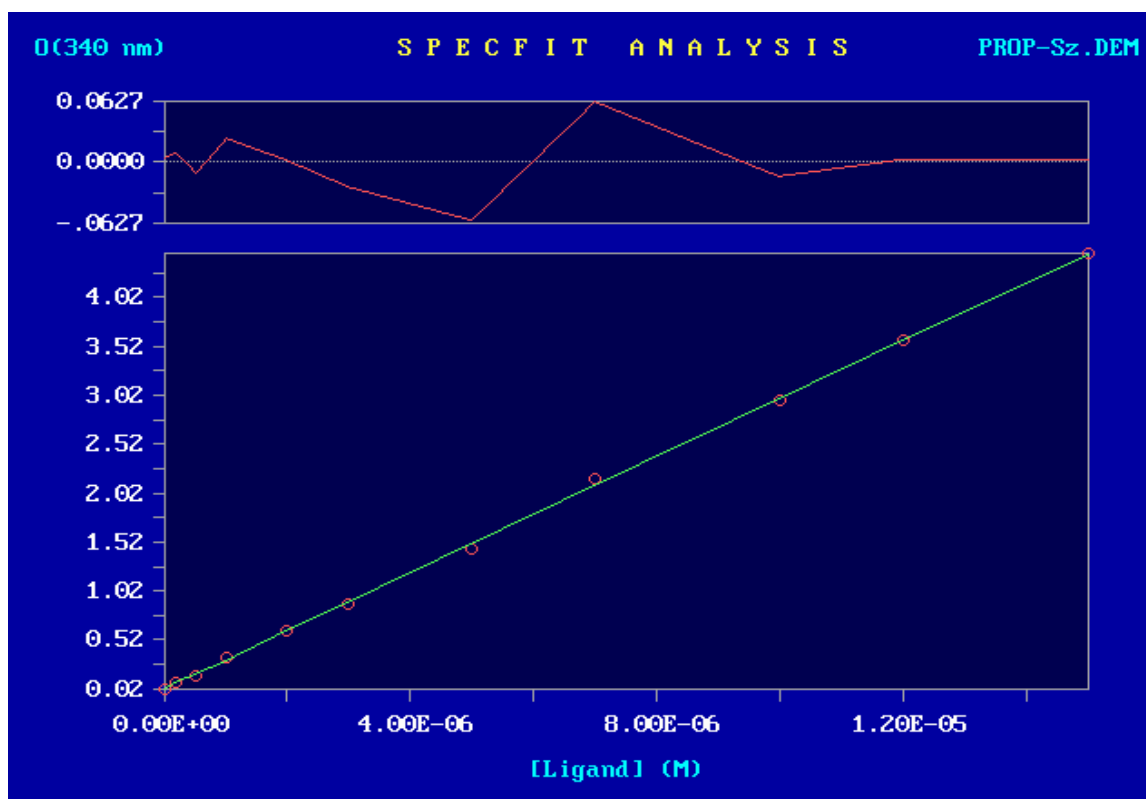


Slika 42: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina propranolola i AGP-a

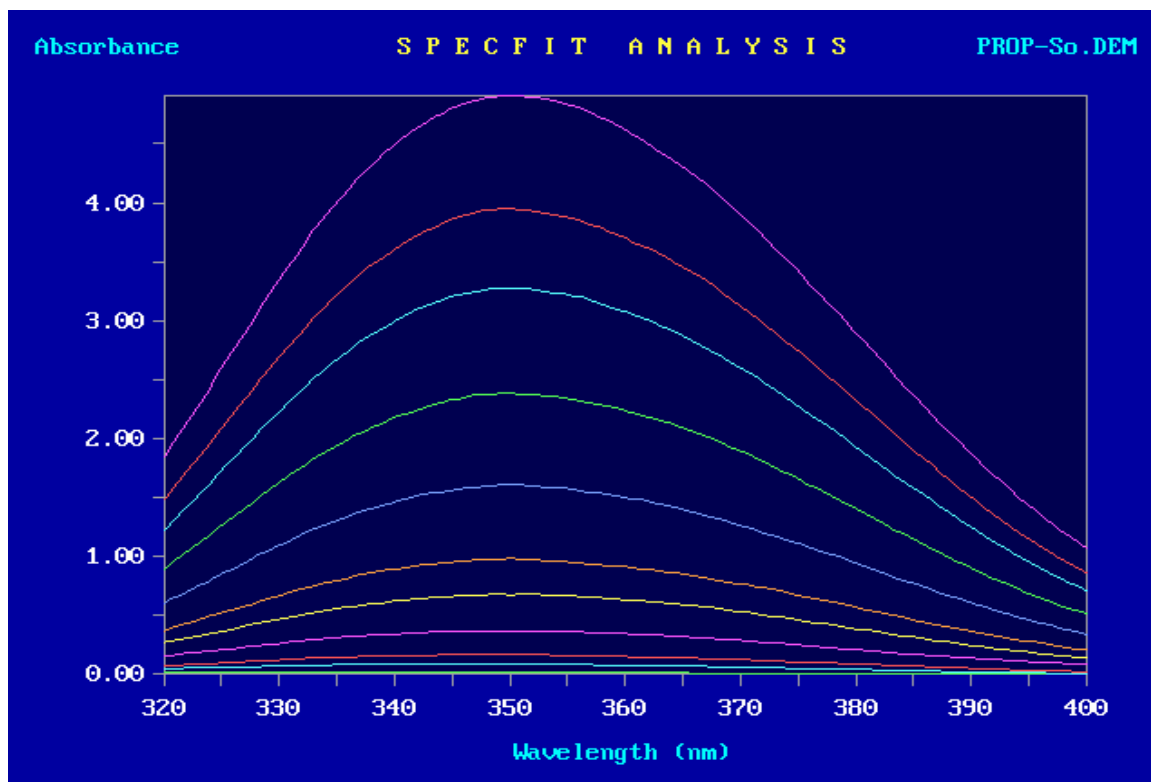
4.5.2. PROPRANOLOL I DESIJALINIZIRANI α 1-KISELI GLIKOPROTEIN

PROP-S.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			06-16-2015
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log Bxyz	$\sigma(\log \beta)$
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β		
100	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
010	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00
110	y	u	v	2.65606D+00	5.26442D-01
Iter 2	$\Sigma(\text{squares}) = 5.9310-01$		$\sigma(\text{abs}) = 2.24570-02$		Marq = 0.000D+00
Species	λ_{max}	Molar abs			
100	335.6	9.713D+04			
110	350.1	3.631D+09			

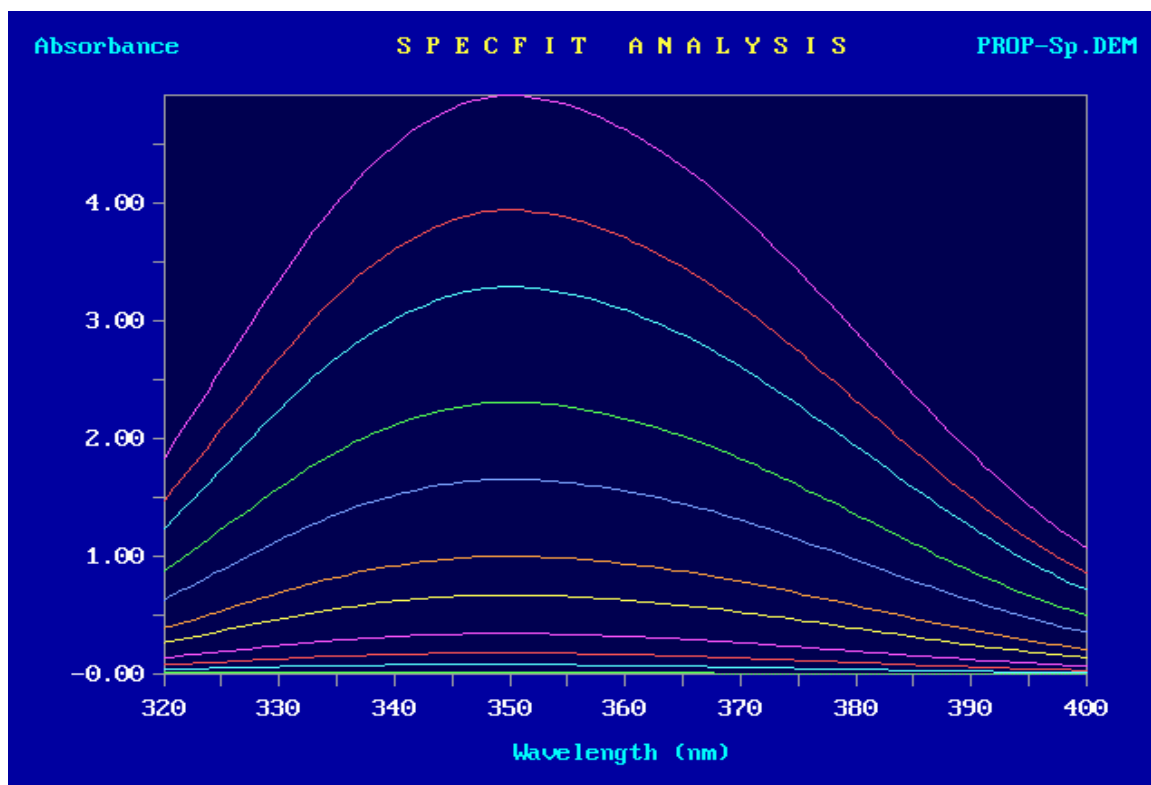
Slika 43: Model vezanja propranolola i desijaliniziranog AGP-a, konstanta vezanja i pripadajuća standardna devijacija



Slika 44: Fit pri 340 nm



Slika 45: Izmjereni spektri koncentracijskog niza otopina propranolola i desijaliniziranog AGP-a



Slika 46: Predviđeni spektri koncentracijskog niza otopina propranolola i desijaliniziranog AGP-a

5. ZAKLJUČCI

Provedenim eksperimentima pokazano je da promjena u glikozilaciji AGP-a uzrokuje promjenu konstanta vezanja kod odabranih lijekova.

Nakon desijalinizacije AGP-a imatinib se veže više od 100 puta slabije za desijaliniziranu formu AGP-a nego za njegovu nativnu formu.

Efekt desijalinizacije AGP-a na vezanje dipiridamola je suprotan te će se nakon desijalinizacije AGP-a dipiridamol vezati s više nego dvostruko većom konstantom vezanja.

Morfin se za AGP veže u dva koraka, te dobiveni rezultati pokazuju da se nakon desijalinizacije AGP-a konstanta vezanja morfina na desijalinizani AGP u odnosu na nativni povećava u oba koraka.

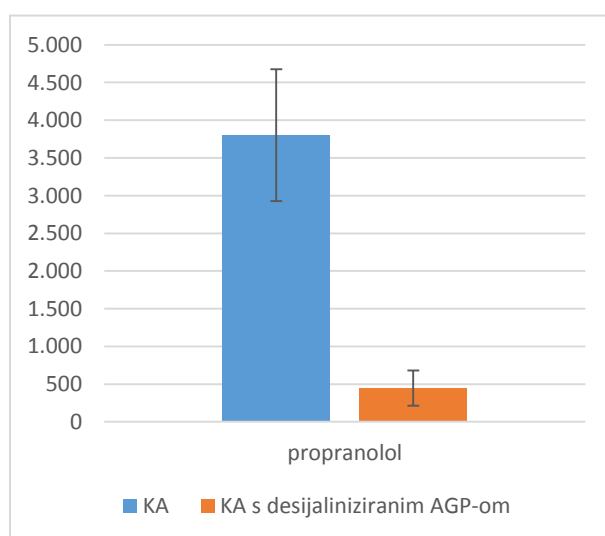
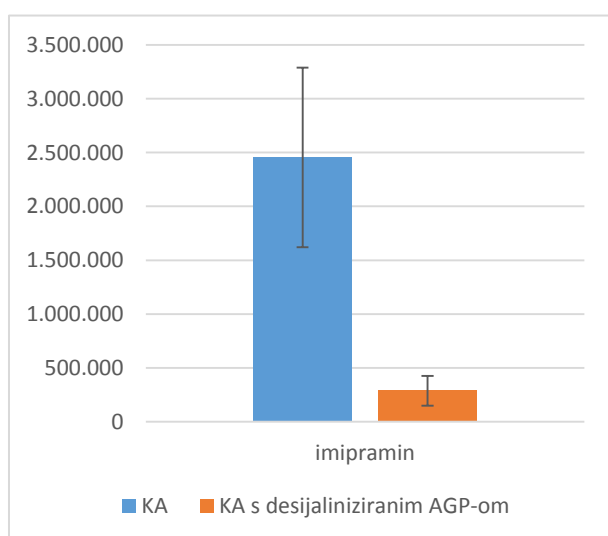
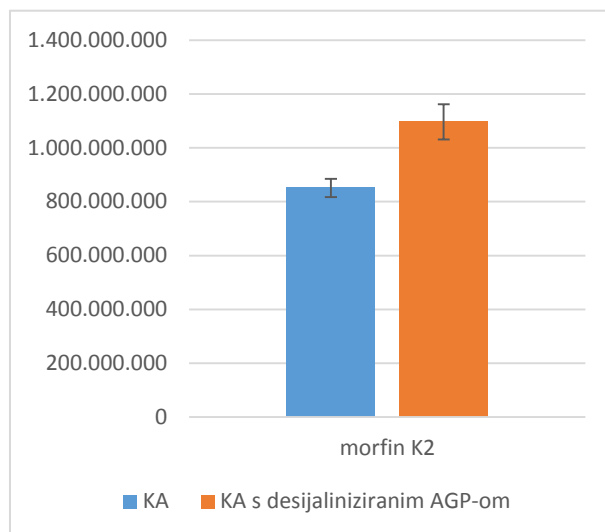
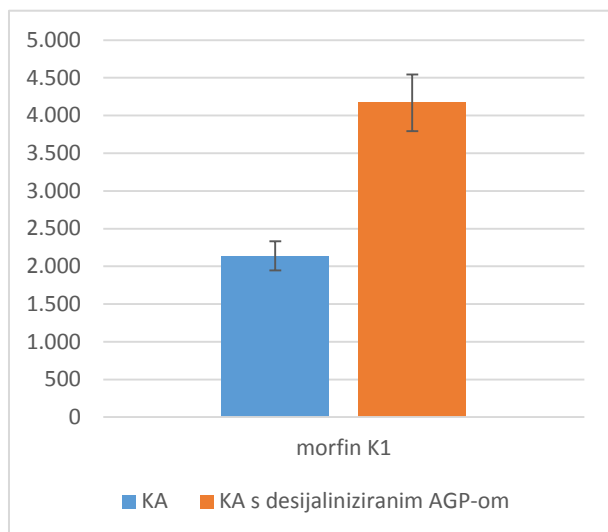
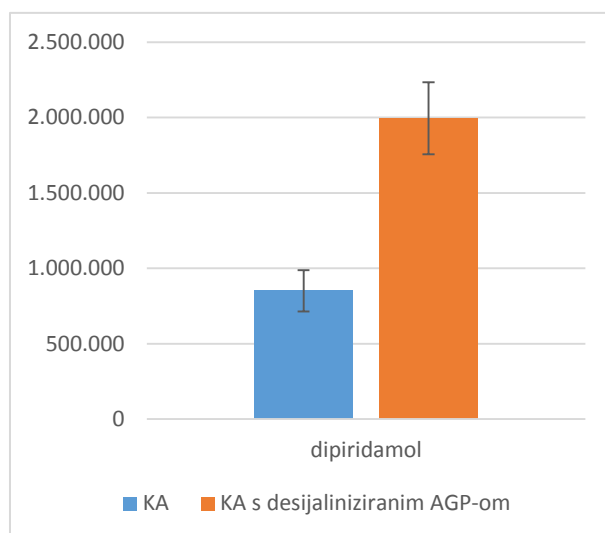
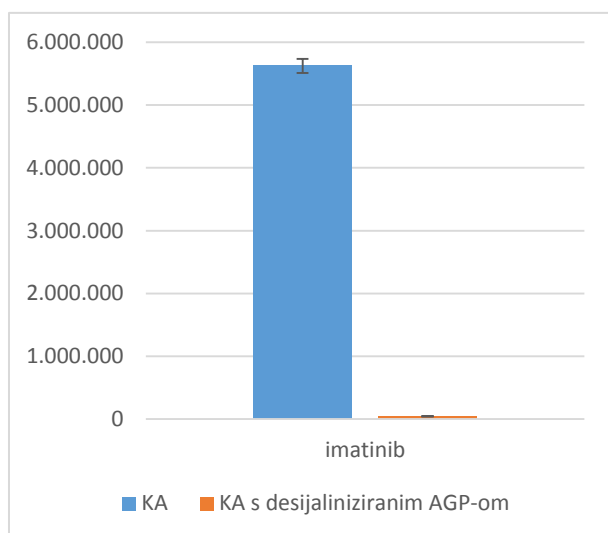
Eksperimentom dobiveni rezultati pokazuju da desijalinizacija AGP-a smanjuje konstantu vezanja imipramina. Imipramin i sam pokazuje fluorescenciju, te bi se efekt promjene glikozilacije AGP-a na promjenu konstante kemijske ravnoteže trebao potvrditi nekom drugom tehnikom.

Propranolol također i sam fluorescira, te bi se efekt promjene glikozilacije na promjenu konstante kemijske ravnoteže trebao ispitati nekom drugom tehnikom. Dobiveni rezultati pokazuju da će se propranolol slabije vezati za desijaliniziranu nego za nativnu formu AGP-a.

Za bolje razumijevanje rezultata, u praksi se često izmjerene konstante kemijske ravnoteže (K_A) između lijekova i AGP-a prikazuju kao $K_D = 1 / K_A$, jedinicu koja prikazuje afinitet spojeva (liješkova), za vezno mjesto AGP-a. Kada je koncentracija liganda tj. lijeka jednaka vrijednosti K_D , tada je ligand vezan na 50% raspoloživih veznih mjesta.

Tablica 6: Sažeti prikaz izmjerenih asocijacijskih konstanti vezanja ($\log K_A$ i K_A) između lijekova i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a

Lijek	Izmjerena $\log K_A$ u kompleksu sa nativnim AGP-om	Izmjerena $\log K_A$ u kompleksu sa desijaliniziranim AGP-om	Izmjerena K_A u kompleksu sa nativnim AGP-om	Izmjerena K_A u kompleksu sa desijaliniziranim AGP-om
Imatinib	$6,75 \pm 0,02$	$4,65 \pm 0,04$	$(5,62 \pm 0,11) \times 10^6$	$(4,47 \pm 0,18) \times 10^4$
Dipiridamol	$5,93 \pm 0,16$	$6,30 \pm 0,12$	$(8,51 \pm 1,36) \times 10^5$	$(2,00 \pm 0,24) \times 10^6$
Morfin	1. $3,33 \pm 0,09$ 2. $8,93 \pm 0,04$	1. $3,62 \pm 0,09$ 2. $9,04 \pm 0,06$	1. $(2,14 \pm 0,20) \times 10^3$ 2. $(8,51 \pm 0,34) \times 10^8$	1. $(4,17 \pm 0,38) \times 10^3$ 2. $(1,10 \pm 0,07) \times 10^9$
Imipramin	$6,39 \pm 0,34$	$5,46 \pm 0,48$	$(2,45 \pm 0,83) \times 10^6$	$(2,88 \pm 1,38) \times 10^5$
Propranolol	$3,58 \pm 0,23$	$2,65 \pm 0,52$	$(3,80 \pm 0,87) \times 10^3$	$(4,47 \pm 0,23) \times 10^2$



Slika 47: Grafički prikaz konstanti asocijacije (KA) s pripadajućim standardnim devijacijama između lijekova i nativnog odnosno desijaliniziranog AGP-a

6. LITERATURA

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

Brinkman-van der Linden EC, van Ommen EC, van Dijk W. Glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis(x) groups. *Glycoconj J*, 1996, 13, 27-31.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman P, Kinneary JF. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals twelfth edition. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station N.J., 1996.

Elliott HG, Elliott MA, Watson J, Steele L, Smith KD. Chromatographic Investigation of the Glycosylation Pattern of Alpha-1-Acid Glycoprotein Secreted by the HEPG2 Cell Line; a Putative Model for Inflammation?. *Biomed Chrom*, 1995, 9, 199-204.

Ferderbar K, Određivanje glikanskih struktura prisutnih na humanom α 1-kiselom glikoproteinu, diplomski rad, 2013.

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

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

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1482, 157-171.

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

Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi AR, Poland DC, van Dijk W, Kuwano H, Kochibe N, Yazawa S. alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer*, 2004, 101, 2825-2836.

- Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α_1 -acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725, 128-135.
- Hocheplied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. α_1 -Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & Growth Factor Rev*, 2003, 14, 25-34.
- Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev*, 2001, 33, 161-235.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija 11. izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 2011.
- Kratochwil NA, Huber W, Mueller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs – revisited. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 4, 507-512.
- Gornik O. Glikozilacija serumskih proteina tijekom akutnog upalnog odgovora. Zagreb, doktorski rad, 2007.
- Shiyan SD, Bovin N. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of α_1 -acid glycoprotein. *Glycoconj J*, 1997, 14, 631-638.
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole, 2007, str. 399-422.
- Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Rasmussen, Niemann CU, Udby L, Borup R, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Porse BT, Borregaard N. Highly glycosylated α_1 -acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2005, 78, 462-470.

7. SAŽETAK

U ovom radu ispitivan je efekt promjene konstante vezanja imatiniba, dipiridamola, morfina, imipramina i propranolola na $\alpha 1$ -kiselog glikoprotein uslijed promjene u uzorku njegove glikozilacije. Tehnika korištena u ispitivanju bila je fluorescencijska spektrofotometrija. Rezultati ispitivanja ukazuju na to da desijalinizacija $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina uzrokuje promjenu u konstantama kemijske ravnoteže između odabranih lijekova i $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina. Kod imatiniba, imipramina i propranolola desijalinizacija $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina će uzrokovati smanjenje konstante kemijske ravnoteže između lijekova i $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina dok će kod dipiridamola i morfina efekt biti suprotan i nakon desijalinizacije $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina oni će se jače vezati za desijaliniziranu formu $\alpha 1$ -kiselog glikoproteina.

SUMMARY

In this work an effect of change in glycosylation pattern of α 1-acid glycoprotein on the binding constants of imatinib, dipyridamole, morphine, imipramine and propranolol was examined by spectrofluorometric measurements. Results indicate that there is an effect of desialylation of α 1-acid glycoprotein on binding constants of selected drugs. Desialylation of α 1-acid glycoprotein will reduce the binding constant for imatinib, imipramine and propranolol. On the other hand, dipyridamole and morphine will bind with a higher binding constant to α 1-acid glycoprotein after its desialylation.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PROMJENA GLIKOZILACIJE α 1-KISELOG GLIKOPROTEINA – UTJECAJ NA KONSTANTU VEZANJA ODABRANIH LIJEKOVA

Hrvoje Curiš

SAŽETAK

U ovom radu ispitivan je efekt promjene konstante vezanja imatiniba, dipiridamola, morfina, imipramina i propranolola na α 1-kiseli glikoprotein uslijed promjene u uzorku njegove glikozilacije. Tehnika korištena u ispitivanju bila je fluorescencijska spektrofotometrija. Rezultati ispitivanja ukazuju na to da desijalinizacija α 1-kiselog glikoproteina uzrokuje promjenu u konstantama kemijske ravnoteže između odabranih lijekova i α 1-kiselog glikoproteina. Kod imatiniba, imipramina i propranolola desijalinizacija α 1-kiselog glikoproteina će uzrokovati smanjenje konstante kemijske ravnoteže između lijekova i α 1-kiselog glikoproteina dok će kod dipiridamola i morfina efekt biti suprotan i nakon desijalinizacije α 1-kiselog glikoproteina oni će se jače vezati za desijaliniziranu formu α 1-kiselog glikoproteina.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 47 grafičkih prikaza, 6 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: α 1-kiseli glikoprotein, glikozilacija, desijalinizacija, imatinib, dipiridamol, morfin, imipramin, propranolol

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

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

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

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

CHANGE IN GLYCOSYLATION OF α 1-ACID GLYCOPROTEIN – EFFECT ON THE BINDING CONSTANTS OF SELECTED DRUGS

Hrvoje Curiš

SUMMARY

In this work an effect of change in glycosylation pattern of α 1-acid glycoprotein on the binding constants of imatinib, dipyridamole, morphine, imipramine and propranolol was examined by spectrofluorometric measurements. Results indicate that there is an effect of desialylation of α 1-acid glycoprotein on binding constants of selected drugs. Desialylation of α 1-acid glycoprotein will reduce the binding constant for imatinib, imipramine and propranolol. On the other hand, dipyridamole and morphine will bind with a higher binding constant to α 1-acid glycoprotein after its desialylation.

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

Thesis includes: 47 pages, 47 figures, 6 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: α 1-acid glycoprotein, glycosylation, desialylation, imatinib, dipyridamole, morphine, imipramine, propranolol

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

The thesis was accepted: July 2015.