

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

MARIJA VERBUČ

**VREDNOTENJE PONOVLJIVOSTI REZULTATOV IN
VITRO TESTIRANJ UČINKOVIN NA INTEGRINSKIH
RECEPTORJIH**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom, dr. Kristine Nadrah, mag. farm.dr.med.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za njeno vodenje, strokovno pomoč in nasvete pri diplomi. Posebej bi se rada zahvalila somentorici dr. Kristini Nadrah, mag. farm.dr.med., za pomoč, nasvete in vodstvo pri eksperimentalnem delu, za izčrpne odgovore na vprašanja, za vzpodbude ter dobro voljo. Prav tako se zahvaljujem tudi svojim staršem, sošolcem in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me podpirali v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom dr. Kristine Nadrah, mag., farm.dr.med.

Marija VERBUČ

Komisija: - prof.dr. Janja Marc
- prof.dr. Marija Sollner Dolenc
- dr. Kristina Nadrah
- dr. Anamarija Zega

Ljubljana, 2009

Kazalo:

1. UVOD.....	6
1.1 INTEGRINI.....	6
1.1.1. STRUKTURA INTEGRINSKIH RECEPTORJEV.....	6
1.1.2. NAČIN VEZANJA INTEGRIN-LIGAND.....	8
1.2. FIBRINOGENSKI RECEPTOR.....	10
1.3. VITRONEKTINSKI RECEPTOR.....	11
1.4. LIGANDI ZA INTEGRINSKE RECEPTORJE.....	11
1.4.1. NARAVNI LIGANDI.....	11
1.4.2. TERAPEVTSKO UPORABNI ANTAGONISTI FIBRINOGENSKEGA IN VITRONEKTISKEGA RECEPTORJA.....	13
1.5. METODA ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	15
1.6. IN VITRO TEST ZA DOLOČANJE AFINITETE SPOJIN DO INTEGRINSKIH RECEPTORJEV.....	16
1.6.1. IZVEDBA KOMPETITIVNEGA PROTEIN-VEZAVNEGA TESTA ZA UGOTAVLJANJE AFINITETE VEZAVE POTENCIALNIH.....	17
ANTAGONISTOV INTEGRINSKIH RECEPTORJEV.....	17
1.6.2. DOLOČITEV IC50 ANTAGONISTOV INTEGRINSKIH.....	19
RECEPTORJEV NA OSNOVI EKSPERIMENTALNIH PODATKOV.....	19
2. NAMEN DELA.....	20
3. MATERIALI IN METODE.....	21
3.1. PRIDOBLENI PODATKI MERITEV.....	21
3.2. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	23
3.2.1. OSNOVNI STATISTIČNI PARAMETRI.....	23
3.2.2. ANALIZA VARIANCE (ANOVA).....	24
3.2.3. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV.....	25
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26
4.1. TESTNI SISTEM FIBRINOGENSKI RECEPTOR Z AGONISTOM.....	27
FIBRINOGENOM.....	27
4.2. TESTNI SISTEM VITRONEKTINSKI RECEPTOR Z AGONISTOM VITRONEKTINOM.....	29
5. ZAKLJUČEK.....	31
6. LITERATURA.....	32

POVZETEK

Integrini spadajo v družino glikoproteinskih receptorjev odgovornih za celično adhezijo. So heterodimerni transmembranski proteini, ki omogočajo povezavo celic s proteini zunajceličnega matriksa in skrbijo za prenos informacij med celico in okoljem. Sestavljeni so iz različnih α - in β - podenot, med seboj povezanih z nekovalentnimi interakcijami. Precej ligandov integrinov vsebuje aminokislinsko sekvenco Arg-Gly-Asp (RGD), preko katerih se vežejo na integrine.

Najbolj raziskan med njimi je fibrinogeni receptor, poznan tudi pod imenom GPIIb/IIIa. Je ključni receptor pri procesu strjevanja krvi in ima pomembno vlogo pri kardiovaskularnih boleznih. Antagonisti fibrinogenskega receptorja preprečujejo vezavo fibrinogena na trombocite in se že uporabljajo pri zdravljenju in preprečevanju nekaterih bolezni. Poleg samega fibrinogenskega receptorja je precej raziskan tudi vitronektinski receptor ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$).

Vezavo naravnih ligandov ali različnih modularjev na integrinske receptorje lahko ugotovljamo z *in vitro* testno metodo, podobno imunokemijskim testom. S spremembo različnih faktorjev so preverjali to *in vitro* testno metodo z namenom, da bi dobili boljše in bolj ponovljive rezultate. Zanimalo jih je, kako vplivajo na vrednosti različne koncentracije terapevtsko uporabnih antagonistov fibrinogenskega in vitronektinskega receptorja ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$). Uporabljali so različne standarde, kot so: RGDS, cRGDfv, tirofiban in eptifibatid. Te spojine so tekmovali z naravnim ligandom za vezavno mesto in s tem so dobili podatke (IC_{50}), v kolikšni meri so sposobni izpodriniti naravni ligand. IC_{50} je definirana kot koncentracija spojine, ki povzroči 50 % inhibicijo vezave naravnega agonista na določen receptor.

V okviru diplomske naloge smo s pomočjo statističnih metod ugotavljali, kakšna je ponovljivost rezultatov uporabljene testne metode in na tej osnovi poskusili ovrednotiti primernost njene uporabe kot presejalnega testa za merjenje afinitete spojin do integrinskih receptorjev. V večini primerov smo ugotovili nesignifikantne razlike med istovrstnimi poskusi ter tako iz tega lahko zaključimo, da je ta metoda sprejemljiva za določanje afinitete spojin do obravnavanih integrinskih receptorjev.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab = protitelo

ADP = adenzin fosfat

Ag = antigen

ANOVA = analiza variance

ECM = zunajcelični matriks

ELISA = encimsko imunski test (*enzyme immuno assay ali enzyme-linked immunosorbent assay*)

RGD = aminokislinska sekvenca Arg-Gly-Asp

rlu/s = relativne svetlobne enote na sekundo (relative light units/second)

Integrilin® = eptifibatid

N- nesignifikanten

1. UVOD

1.1 INTEGRINI

Integrini spadajo v družino adhezijskih molekul. V tej družini se nahajajo tudi selektini, kadherini in imunoglobulini. Imajo podobno zgradbo, toda različno specifičnost za ligande. Integrini so površinske celične molekule, ki omogočajo povezavo celic s proteini zunajceličnega matriksa in tako skrbijo za prenos informacij med celico in njenim okoljem. Nekateri so na površini celic nenehno prisotni, drugi le takrat, ko je celica aktivirana. Nekateri se vseskozi nahajajo v aktivirani obliki, drugi potrebujejo aktivacijo, da bi dosegli stopnjo visoke afinitete za vezavo naravnih ligandov. Sodelujejo v regulaciji mnogih fizioloških in patoloških procesov. Tako vplivajo na hemostazo, tkivno morfogenezo, apoptozo, vnetje, regulacijo celične rasti, migracijo celic.¹⁻⁴ V patoloških procesih so vključeni v procese, kot so tromboza, tumorsko metastaziranje, revmatoidni artritis. Integrini so receptorji, katerih vloga je, da posredujejo pri interakcijah med:

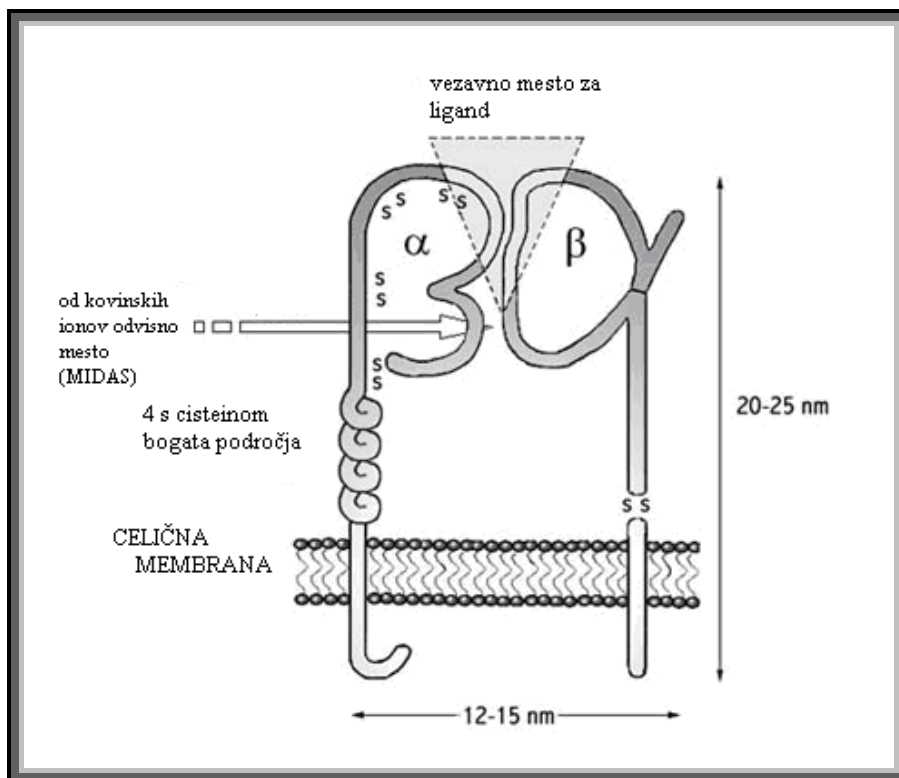
- dvema celicama,
- celico in ekstracelularnim matriksom ter
- celico in patogenom.

1.1.1. STRUKTURA INTEGRINSKIH RECEPTORJEV

Integrini so heterodimerni transmembranski proteini, sestavljeni iz različnih α - in β -podenot, med seboj povezanih z nekovalentnimi interakcijami. Do sedaj je poznanih 8 različnih β - in 19 različnih α -podenot, katere se med seboj povezujejo v najmanj 25 heterodimerov (slika 1).⁵

Večja α -podenota običajno vsebuje okrog 1100 aminokislin, medtem ko manjšo β -podenoto sestavlja okoli 700 aminokislinskih ostankov. α -Podenota je sestavljena iz dveh verig, ki sta povezani z disulfidno vezjo. α -Podenota vsebuje 3-4 področja, ki vežejo dvovalentne katione (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), ki so potrebni za vezavo liganda. β -podenota pa vsebuje 4 s cisteinom bogata področja, ki se nahajajo v bližini N-terminalnega konca.²

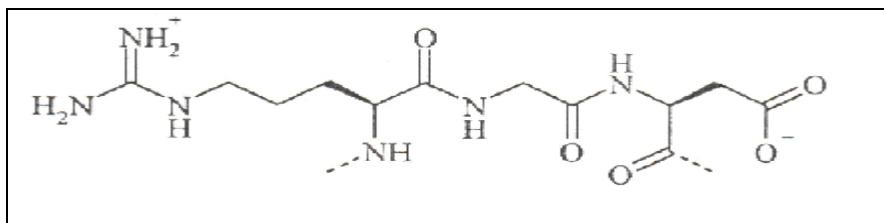
α - in β -podenoti sta povezani preko NH_2 -terminalnih delov in tvorita veliko globularno glavo, preostanka dela oblikujeta daljša vzporedna repka, ki preideta skozi membrano v notranjost celice. Globularna glava je odgovorna za vezavo različnih ligandov. Ima tudi odseke, kateri se povezujejo z dvovalentnimi kationi. Vpliv dvovalentnih kationov na vezavne sposobnosti integrinov je običajno odvisen od vrste celic in vrste heterodimera. Zunajcelični odseki obeh verig se vežejo z različnimi ligandi, kot so npr. glikoproteini zunajceličnega matriksa, proteini na površini drugih celic, komponentami komplemента. Povezave potekajo preko vmesnih citoplazemskih proteinov: talina, vinkulina in α -aktinina⁵.



Slika 1: Integrinski receptor⁶

Ti proteini predstavljajo nekakšen most, ki preko membrane omogoča povezavo aktinskih filamentov citoskeleta z ekstracelularnim matriksom (ECM), s tem pa omogočajo tudi prevajanje signalov v celico in iz nje. Pri vezavi sodelujeta obe podenoti receptorja z večjimi vezavnimi mesti na vrhu obeh zank. Njihove tridimenzionalne strukture ne poznamo zaradi njihove transmembranske narave, znana pa so aminokislinska zaporedja posameznih verig.⁷⁻¹¹

Skupna značilnost večine integrinskih receptorjev je, da se na receptor vežejo z RGD (Arg-Gly-Asp) vezavno sekvenco.²



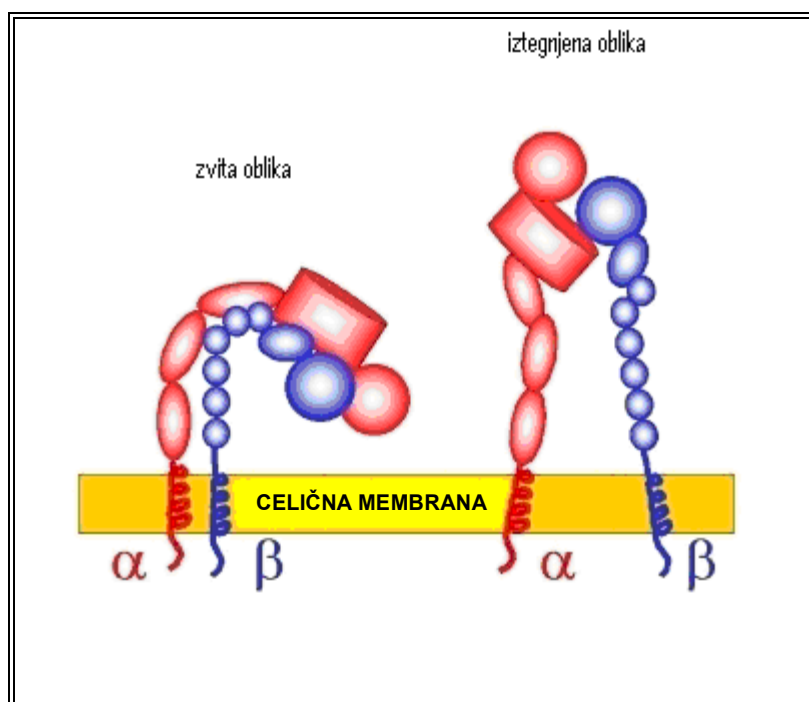
Slika 2: RGD (arginil-glicil-asparingska kislina) vezavna sekvenco.²

1.1.2. NAČIN VEZANJA INTEGRIN-LIGAND

Integrinski receptorji se nahajajo v različnih konformacijah. Najpomembnejši sta **zvita in iztegnjena**.

V mirujočem stanju se integrini nahajajo v zviti konformaciji, ki ima nizko afiniteto in domnevno ne more vezati fizioloških ligandov. Iztegnjena oblika ima višjo afiniteto in samo v tem stanju je integrinski receptor sposoben vezave liganda, saj ima v tem stanju odkrita vezavna mesta.

Da pride do spremembe konformacije, je potreben dodatek ligandov, kot so: protitelesa, divalentni kationi (Mn^{2+}), ki se vežejo na zunajcelično domeno, ter povzroči hitro preoblikovanje konformacije iz zvite v iztegnjeno obliko.^{3,8,12}



Slika 3: Prikaz zvite in iztegnjene konformacije receptorja.⁹

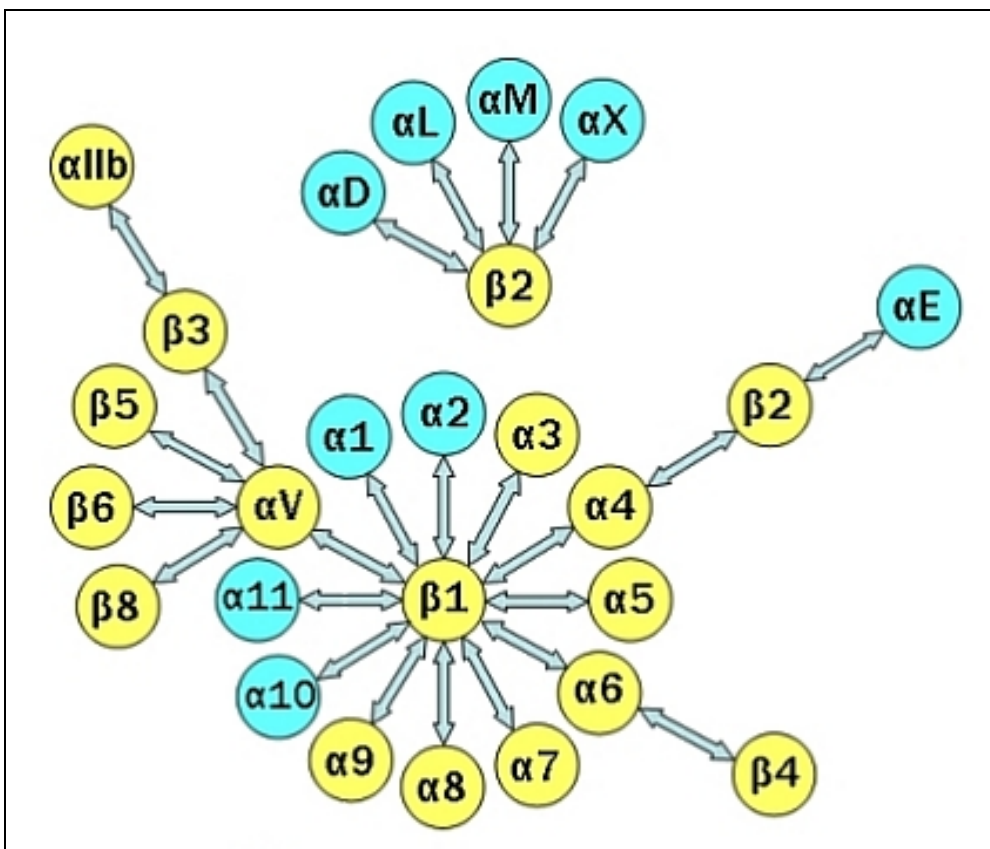
Do aktivacije integrinskih receptorjev lahko pride zaradi signalizacije iz zunanosti celice v notranjost celice (*»outside-in«* signalizacija), lahko pa signaliziranje poteka v obratni smeri, ko pride zaradi znotrajceličnih dogodkov do aktivacije receptorja (*»inside-out«* signalizacija). Vsak par α - in β -podenote predstavlja edinstven integrin, ki ima različne vezavne lastnosti. Nekateri integrini prepoznajo samo en ligand, medtem ko drugi lahko prepoznajo več različnih. α - in β - podenoti vsebujeta področji, ki se nahajata na

ekstracelularnem delu ali glavi in predstavljata vezavno mesto za ligand. Tako podenoti sodelujeta pri vezavi liganda.

Integrini se med seboj razlikujejo glede na:

- mehanizem, s pomočjo katerega se aktivira njihova vezavna kapaciteta
- tipi celic, ekstracelularni matriks oz. vnetne ligande, ki jih vežejo
- tipe signalnih poti, ki jih aktivirajo.

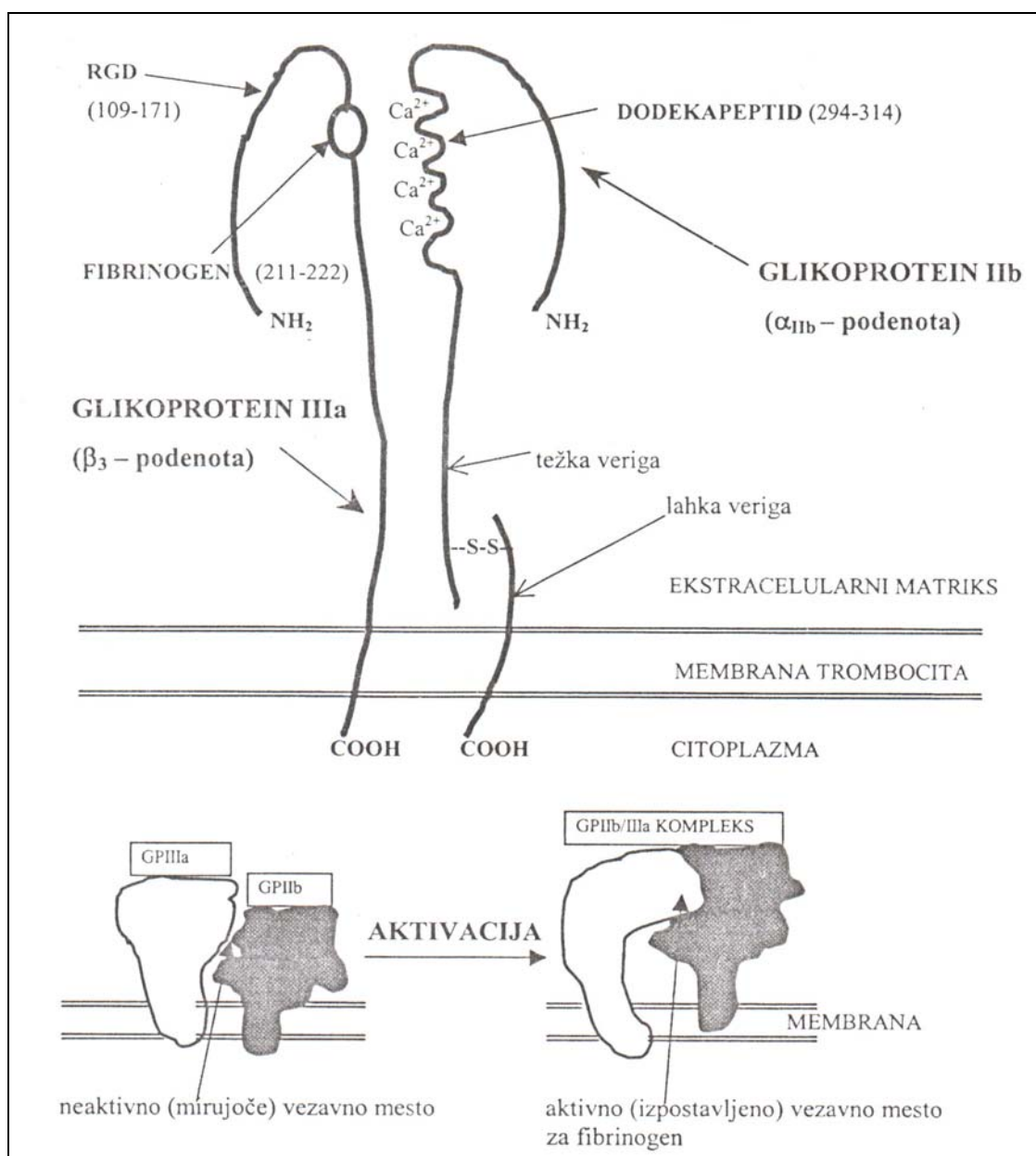
Poznamo več integrinskih receptorjev, ki se glede na prisotnost β - podenote delijo v tri družine β_1 , β_2 , β_3 .¹⁻⁷



Slika 4: Kombinacija α - in β - podenote.⁹

1.2. FIBRINOGENSKI RECEPTOR

Fibrinogeni receptor je poznan tudi pod imenom GPIIb/IIIa in je prvi opisan in raziskan izmed integrinov. Nahaja se na trombocitih in megakariocitih, našli pa so ga tudi na nekaterih melanomskih celicah. Receptor je heterodimer, sestavljen iz α - in β -podenote, ki sestavljata ekstracelularno glavo z N-terminalnim delom in dvema repoma s C-terminalnim delom, ki tvorita transmembranski in znotrajcelični segment receptorja. β -podenoto sestavlja ena veriga z dvema konzervativnima regijama. Vezavna mesta za ligande se nahajajo na ekstracelularni glavi.^{10,13}



Slika 5: Struktura fibrinogenskega GPIIb/IIIa receptorja.¹¹

Fibrinogeni receptor je ključen receptor pri agregaciji trombocitov, ki poteka z navskrižno vezavo z dvovalentnimi plazemskimi proteini fibrinogenom in von Willebrandovim faktorjem. Sestavljata ga GPIIb ali α_{IIb} in GPIIIa ali β_3 podenota. V membrani trombocitov je velika količina teh receptorjev, približno 50.000 do 80.000. Ti receptorji se nahajajo v neaktivnem stanju. V α -granulah v citoplazmi se nahajajo rezervni receptorji, ki se lahko sprostijo na površje ob aktivaciji trombocita. S tem se lahko količina receptorjev na površini trombocita poveča tudi za 50 %. Fibrinogeni receptor ima ključno vlogo pri strjevanju krvi.^{5,9,12}

1.3. VITRONEKTINSKI RECEPTOR ($\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$)

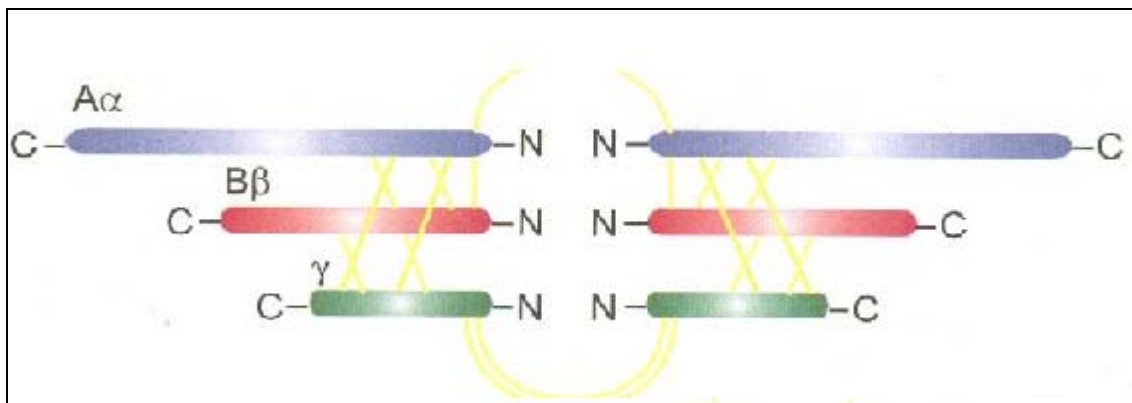
Vitronektinski receptor ($\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$) najdemo na osteoklastih, vaskularnih gladkomišičnih, endotelnih ter različnih tumorskih celicah. Vitronektinski receptor se veže z različnimi ligandi, ki so prisotni v ekstracelularnem matriksu ali krvi. Med drugim tudi s fibrinogenom, fibronektinom, vitronektinom in osteopontinom. Vsem je skupna RGD aminokislinska sekvenca¹³.

1.4. LIGANDI ZA INTEGRINSKE RECEPTORJE

1.4.1. NARAVNI LIGANDI

Fibrinogen: Je heksameren, topen plazemski protein, ki je sestavljen iz dveh setov treh različnih verig (α, β in γ). Igra ključno vlogo v kaskadi strjevanja krvi. Dimerna struktura omogoča povezavo molekule fibrinogena z dvema trombocitoma preko vezave na fibrinogeni receptorja na dveh različnih trombocitih.

Trombin cepi fibrinogen do fibrina s tem pa nastane netopen fibrinski strdek. Deluje tudi kot kofaktor pri ADP- inducirani trombocitni agregaciji. Trombocitni receptor za fibrinogen označujemo tudi kot integrinski receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ugotovili so, da γ -veriga povzroča agregacijo trombocitov primerljivo s fibrinogenom, α -veriga izkazuje manjšo aktivnost, β -veriga pa nobene. Za inhibicijo vezave fibrinogena na trombocitni receptor naj bi bil odgovoren 12 delni C-terminalni del γ -verige. Pri α -verigi pa sta za vezavo na receptor odgovorni zaporedje RGDS, ki se nahaja na C-terminalni gibljivi regiji te verige in zaporedje RGDF, ki se nahaja v bližini N-terminalnega konca. Peptidi, ki vsebujejo to zaporedje, sprožijo tako fibrinogeno vezavo, kot tudi agregacijo trombocitov. Sklepamo lahko, da sta tako zaporedje RGD kot C-terminalni del γ -verige odgovorni za vezavo na fibrinogeni receptor. Dokazano je tudi, da se ti dve zaporedji pri vezavi na receptor ovirata, ni pa še razjasnjeno ali gre pri tem za vezavo na isto receptorsko mesto ali pa poteče alosterično oviranje.^{9,14}



Slika 6: Shematski prikaz molekule fibrinogena. Verige α , β , γ so povezane z disulfidnimi vezmi. (rumene črtice) ¹⁵

Fibronektin: Fibronektinska molekula je substrat za celično adhezijo in vsebuje vezavna mesta za kolagen, fibrin in heparin. Nahaja se v telesnih tekočinah vključno s plazmo, organiziran je v ekstracelularnem matriksu, bazalnih membranah, krvnih žilah in v stromi. Vloga fibronektina je pomembna v mnogih procesih, tudi pri razvoju embrija in celjenju ran.

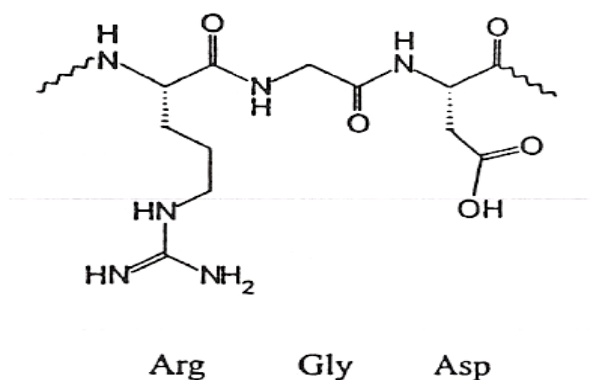
Za njegovo vezavo je odgovorno zaporedje RGD, čeprav sta bili ugotovljeni še dve sinergistični regiji, ki lahko posamezno interagirata z receptorjem ali pa modificirata konformacijo RGD zanke.

Receptorji za fibronektin so $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, na vse se veže fibronektin preko zaporedja RGD^{9,14}.

Vitronektin: Je plazemski protein, ki omogoča celično širitev (migracijo) in pripajanje in je ligand za številne integrinske receptorje: $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$...itd. Interakcija poteče preko zaporedja RGD N-terminalne regije. Sodeluje pri nastajanju in razgradnji krvnih strdkov, tako da varuje trombin pred inaktivacijo z antitrombinom III, inhibira aktivacijo plazminogena, prav tako pa stabilizira inhibitorno aktivnost PAI-1¹⁶.

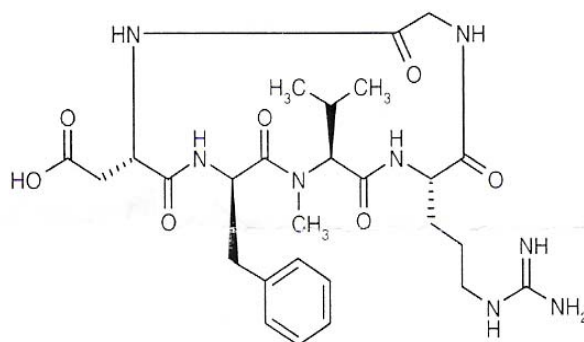
1.4.2. TERAPEVTSKO UPORABNI ANTAGONISTI FIBRINOGENSKEGA IN VITRONEKTISKEGA RECEPTORJA

RGD aminokislinsko zaporedje – arginil-glicil-asparaginska kislina je najverjetneje najpogostejši celični prepoznavni motiv. To zaporedje je osnova za razvoj različnih antagonistov na integrinskih receptorjih, še posebej tistih, ki preprečujejo agregacijo trombocitov.¹⁷



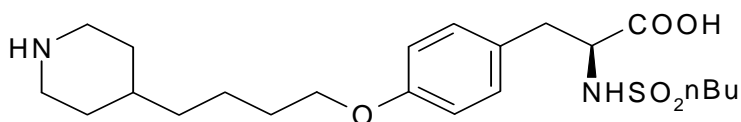
Slika 7: Aminokislinsko zaporedje RGD.¹⁷

c(RGDf-N-Me-V) (Cilengitide): ciklo(arginil-glicil-aspartil-D-fenilalanil-N-metil-valin). Je selektiven antagonist $\alpha_v\beta_3$ in $\alpha_v\beta_5$ integrina. Pri določenih cikliziranih derivatih so ugotovili bistveno večjo jakost in specifičnost kot pri njihovih linearnih analogih. Kot antagoniste poznamo ciklične penta- in heksapeptide. Je inhibitor angiogeneze. Kot učinkovito sredstvo se je izkazal pri študijah zaviranja angiogeneze revmatoidnega artritisa pri zajcih in tumorske angiogeneze pri miših.^{18,19}



Slika 8: Kemijska struktura Cilengitida (ciklo-L-glicil-L-asparaginska kislina-D-fenilalanin-N(metil)-L-valin.²⁰

Tirofiban (Aggrastat®): Je že v terapijo uvedena učinkovina v obliki IV aplikacije. Nepeptidni reverzibilni antagonist deluje tako, da inhibira agregacijo trombocitov, ker se reverzibilno veže na trombocitni receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ in s tem prepreči vezavo fibrinogena. Uporablja se pri zdravljenju kardiovaskularnih bolezni.

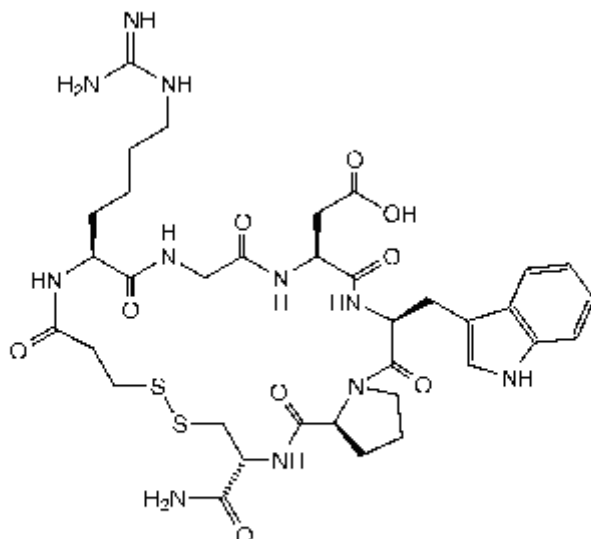


Slika 9: Kemijska struktura tirofibana.²¹

Eptifibatid (Integrilin®)

Učinkovina je antagonist integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ciklični heksapeptid. Sestavlja ga šest aminokislin in en merkaptopeptidni ostanek. Uporablja se za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni kot intravensko uporabna antiagregatorna učinkovina. Je zaviralec agregacije trombocitov. To pomeni, da preprečuje nastajanje krvnih strdkov. Eptifibatid zaustavi združevanje krvnih ploščic, tako da blokira beljakovino na njihovi površini, zaradi katere so ploščice lepljive (glikoprotein IIb/III).²²

Integrilin poleg eptifibatida vsebuje tudi pomožne snovi; citronsko kislino monohidrat, natrijev hidroksid in vodo za injekcije



Slika10: Kemijska formula eptifibatida.²³

Ker nas zanimajo vedno nove učinkovine z boljšimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi, je potrebno najprej ustrezno testirati potencialno biološko aktivne nove spojine, ali imajo afiniteto do integrinskih receptorjev. Pogosto uporabljamo kot presejalno metodo prirejeno imunokemijsko metodo.

Za primerjavo in prikaz razlik med osnovnimi ELISA testi in prirejeno imunokemijsko metodo za določanje afinitete spojin do integrinskih receptorjev v nadaljevanju predstavljamo izvedbe ELISA testov in metode pri vrednotenju afinitete spojin do integrinskih receptorjev.

1.5. METODA ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Encimskoimunski testi EIA ali ELISA so eni od najbolj občutljivih in specifičnih imunskih poskusov za kvantitativno določanje antigenov in protiteles. Skupna vsem imunokemijskim metodam je imunska reakcija med antigenom in protitelesom in nastanek imunskega kompleksa. Princip preizkusa je najbolj podoben radioimnskemu testu (RIA), katerega načelo je tekmovanje radioaktivno zaznamovanega antigena in nezaznamovanega antigena za določeno (majhno) količino afinitetnih protiteles. Pri tej tehniki uporabljamo namesto radioaktivnega izotopa encim za označevanje imunskega kompleksa.

Pri testu ELISA uporabljamo različne encime, npr.: alkalno fosfatazo, peroksidazo in *p*-nitrofenil fosfatazo. Če te encime pomešamo s primarnim substratom, dajo obarvan reakcijski produkt.

Razvili so številne variante testa ELISA, s katerimi lahko kvalitativno in kvantitativno določamo protitelesa in antigene. Pripravimo si umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protiteles ali antigena, iz katere lahko razberemo neznano koncentracijo v vzorcu.^{8, 24,25}

Ta test je primeren tudi za katerikoli analit (protein), ki je sposoben v nadaljevanju vezati protitelo. Ugotavljamo lahko, v kolikšni meri se naravni ligand veže v primerjavi z antagonistom na ustrezen receptor.²⁶

1.6. IN VITRO TEST ZA DOLOČANJE AFINITETE SPOJIN DO INTEGRINSKIH RECEPTORJEV

In vitro določanje afinitete RGD peptidomimetikov spada med ELISA testu podobne metode, saj poteka na enak način kot ELISA test, le da namesto protitelesa uporabimo receptor, namesto antigena pa ligand. Tudi tukaj kot trden nosilec uporabljamo mikrotitrsko ploščico, vendar na njeno površino imobiliziramo izbrani integrinski receptor. Nato si pripravimo enaki količini biotiniziranega naravnega liganda in potencialnega antagonista ter ju v čim krajšem času naneseemo na ploščico. Po določeni inkubacijski dobi ploščico speremo in na mikrotitrski mesta naneseemo kozja protitelesa proti biotinu. Protitelesa imajo vezan encim peroksidazo.

Po določeni inkubacijski dobi tudi ta protitelesa speremo, da na ploščici ostanejo le vezana protitelesa in dodamo substrat za peroksidazo – kemiluminiscenčni reagent. Pri tem poteče reakcija razgradnje reagenta in sproščanja hladne svetlobe, ki jo lahko izmerimo z ustrežno aparaturo²⁵.

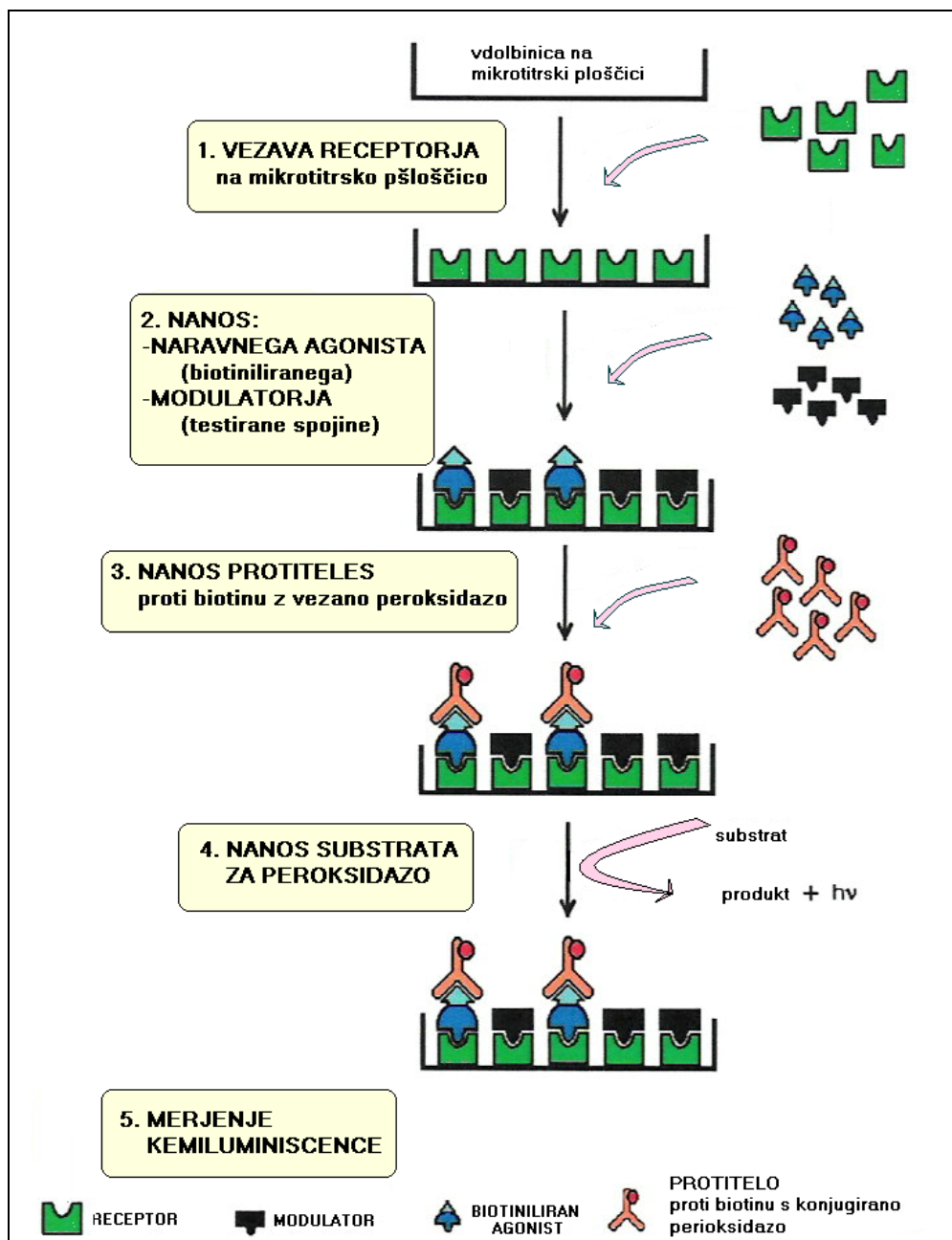
Osnovna metoda je izpeljana iz testnega sistema ELISA, pri čemer namesto primarnega protitelesa na trden nosilec (mikrotitrski ploščica) kovalentno vežemo receptor. Temu testnemu sistemu pravimo kompetitivni protein-vezavni test (CPBA- competitive protein binding assay) na osnovi »sendvič« tehnike, kjer je preiskovani ligand ujet med dve makromolekuli (receptor in protitelo).²⁶

1.6.1. IZVEDBA KOMPETITIVNEGA PROTEIN-VEZAVNEGA TESTA ZA UGOTAVLJANJE AFINITETE VEZAVE POTENCIALNIH ANTAGONISTOV INTEGRINSKIH RECEPTORJEV

Pri testu vezanja liganda uporabljajo specifične receptorje in njim specifične ligande. Metoda je kvantitativna in jo izvajamo v testnih epruветah ali mikrotitrskih ploščicah. Potek testiranja je prikazan na sliki 12, v nadaljevanju pa podajamo še kratek opis postopka.

Receptor je vezan na dnu mikrotitrskе ploščice (integrin). V prvi fazi testiranja tekmujeta označen ligand (biotinilirani agonist) z neoznačenim ligandom (potencialni antagonist). Pri tem gre za kompetitiven proces vezave agonista in potencialnega antagonistа. Razmerje vezave med antagonistom in agonistom na receptor je sorazmerno z vezavno afiniteto antagonistа. V drugi fazi nanese mo protitelesa proti biotinu z vezano peroksidazo, ki se veže na agonist (biotinilirani fibrinogen). Temu sledi dodatek substrata za encim (peroksidazo) in merjenje odgovora nastalega z encimsko katalizirano reakcijo. Jakost sproščene svetlobe merimo z luminometrom in je sorazmerna s količino vezanega agonista (biotinilirani fibrinogen). Večja kot je jakost sproščene svetlobe, manjša je torej vezavna afiniteta antagonistа.

Afiniteto vezave potencialnega antagonistа do receptorja izrazimo z vrednostjo IC_{50} . Ta vrednost predstavlja koncentracijo učinkovine (potencialnega antagonistа), ki je potrebna za 50 % inhibicijo vezave fiziološkega liganda v primerjavi s pozitivno kontrolo (popolna zasedenost receptorja s fiziološkim ligandom)²⁶.



Slika 12: Shematski prikaz *In vitro* testne metode za ugotavljanje aktivnosti vitronektinskih in fibrinogenskih antagonistov.^{26,27}

Pri tem testu lahko pride tudi do nelinearnega odziva. To pomeni, da z večanjem količine reagenta (agonist, modulator) ne dobimo ustrezno večjega odziva in zato ne moremo primerjati testov izvedenih z različnimi količinami reagentov (agonist, modulator), saj linearne odvisnosti med količino le-teh in odzivom ni. Vzrokov, ki lahko privedejo do tega, je lahko več. Pri vezavi receptorjev na ploščico lahko pride do spremembe njegove konformacije ali celo do denaturacije. Pri preveliki količini receptorja lahko pride do povečane vezave multivalentnega liganda na ploščico in s tem posledično do izkazovanja povišane afinitete. Nelinearnost se večja s številom korakov, ki jih izvajamo pri testu imunokemijskem testu.

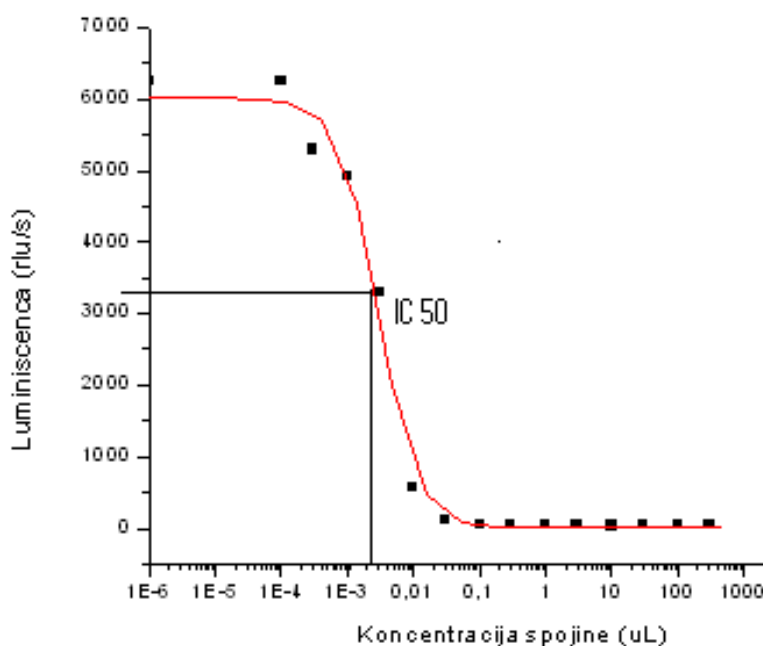
Nelinearnost lahko izboljšamo na ta način, da uporabljamo biotinilirane agoniste, ki se zaradi majhne velikosti biotina manj sterično ovirajo²⁸. Med kemijsko reakcijo se sprošča svetloba (kemiluminiscenca). Pri tej metodi merimo jakost sproščene svetlobe, ki je sorazmerna s količino vezanega agonista (biotiniliranega fibrinogena). Večja kot je jakost sproščene svetlobe, manjša je torej afiniteta antagonist.

1.6.2. DOLOČITEV IC_{50} ANTAGONISTOV INTEGRINSKIH

RECEPTORJEV NA OSNOVI EKSPERIMENTALNIH PODATKOV

S pomočjo matematičnega programa (OriginPro (Microcal Software Inc., Northampton USA)) narišemo graf odvisnosti luminiscence (rlu/s, relativne luminiscenčne enote/s) (izmerjeni eksperimentalni podatki) od logaritemske koncentracije antagonistov integrina (μM) meritvam pa prilagajamo sigmoidno krivuljo (slika 13).

Na x-osi so logaritmi koncentracij posameznih spojin v μM , na y-osi pa izmerjene vrednosti luminiscence (rlu/s). V nekaterih primerih IC_{50} ne moremo določiti zaradi neuspešnega prilagajanja sigmoidne krivulje eksperimentalnim podatkom, vzroke zato smo navedli v prejšnjem poglavju.



Slika 13: Princip prilagajanja sigmoidne krivulje eksperimentalnim podatkom in določitev vrednosti IC_{50} .

2. NAMEN DELA

V predhodnih poskusih so raziskovalci na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko kemijo, skušali ovrednotiti vpliv različnih faktorjev na vrednosti IC_{50} antagonistov fibrinogenkega recptorja in vitronektinskega receptorja ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) določenih z že vpeljanim *in vitro* testnim sistemom, ki so ga razvili v skupini prof. dr. Athanassionasa Giannisa, na Inštitutu za organsko kemijo Univerze Kerlsuhne. Princip tega testa temelji na modificiranem encimsko-imunskem testu.

Naša naloga je bila, da meritve, ki so jih izvajali različni diplomanti in raziskovalci vse od leta 2002 do leta 2005 statistično ovrednotimo glede ponovljivosti. Vsi izmerjeni rezultati so se zapisovali v dnevnik in iz njega smo dobili vse potrebne podatke. Osredotočili smo se na poskuse, kjer so ovrednotiti afiniteto vezave antagonistov v primerjavi z naravnimi ligandi na vitronektinski in fibrinogeni receptor. Uporabljeni ligandi (antagonisti) so bili RGDS, cRGDfV, tirofiban in eptifibatid.

Dobljenim eksperimentalnim podatkom smo s pomočjo matematičnega programa OriginPro (Microcal Software Inc., Northampton, USA) prilagajali sigmoidno krivuljo. Njen prevoj je predstavljal vrednosti IC_{50} . To je koncentracija antagonistov, ki povzročajo 50 % inhibicijo vezave naravnega liganda na določen podtip integrinskega receptorja.

S statistično obdelavo na zgornji način pridobljenih rezultatov za IC_{50} smo želeli ugotoviti ali se rezultati med serijami istih poskusov, med seboj signifikantno razlikujejo. Ob morebitnih signifikantnih razlikah bomo poskusili iz danih podatkov ugotoviti, zakaj je do teh razlik prišlo in jih tudi navesti. Predvsem bomo preverili, če so bili med samo izvedbo poskusa spremenjeni naslednji parametri: temperatura, koncentracija posameznih komponent testnega sistema, serije mikrotitrskih ploščic in ali so ti poleg različnih izvajalcev poskusov odgovorni za morebitne signifikantne spremembe med določenimi IC_{50} .

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PRIDOBLJENI PODATKI MERITEV

Meritve, katerih rezultate smo uporabili v diplomskem delu, so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani- Katedri za farmacevtsko kemijo od leta 2002 do leta 2005. Meritve so izvajali in izmerili različni diplomanti in raziskovalci. Izmerjeni rezultati so se zapisovali v dnevnik, iz katerega smo dobili vse potrebne podatke: uporabljene koncentracije, čase izvajanja poskusa oz ostale pogoje (vrsta uporabljenega receptorja, agoniste in antagonistov).

Pri izvedbi naloge smo se osredotočili na poskuse, kjer so želeli ovrednotiti afiniteto vezave antagonistov v primerjavi z naravnimi ligandi na vitronektinski ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) oz. fibrinogeni receptor. Uporabljeni ligandi (antagonisti) so bili naslednji:

- RGDS
- cRGDfV
- tirofiban (Aggrastat®)
- eptifibatid (Integrilin®).

S pomočjo programa ORIGIN 6.0. smo iz izmerjenih vrednosti za kemiluminiscenco izračunali vrednosti IC_{50} . S temi dobljenimi vrednostmi pa smo statistično vrednotili rezultate v odvisnosti od zgoraj navedenih parametrov.

Uporabljene poskuse, ki so bili izvedeni v različnih časovnih obdobjih, smo zapisali s številkami in črkami. Za vsak različen datum smo uporabili številko, če pa je bila meritev večkrat izvedena, smo uporabili zraven še črko. Za datum 11.9.2003 smo poleg številke in črke uporabili še podpisano številko, ki pomeni, da so na eni ploščici dvakrat izvajali isti poskus. Uporabili smo poskuse, ki so se izvajali od leta 2002 do leta 2005 in so predstavljeni v tabeli 1.

Tabela 1: Podatki, ki smo jih uporabili za statistično vrednotenje rezultatov določanja afinitete do integrinskih receptorjev

ŠTEVILO	DATUM POSKUSA	VRSTA RECEPTORJA + AGONISTA	VRSTA ANTAGONISTA
1	3.9.2003	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	eptifibatid
2	9.9.2003	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	eptifibatid
3	14.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	eptifibatid
4	17.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	eptifibatid
5	14.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	cRGDfV
6	17.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	cRGDfV
7	11.9.2003	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	cRGDfV
8	23.12.2002	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	RGDS
9	12.9.2003	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	RGDS
10	14.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	RGDS
11	17.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	RGDS
12	9.6.2003	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	Tirofiban
13	14.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	Tirofiban
14	17.1.2005	Fibrinogenski receptor + fibrinogen	Tirofiban
15	11.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	eptifibatid
16	17.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	eptifibatid
17	16.3.2004	Vitronektinski receptor + vitronektin	cRGDfV
18	5.9.2003	Vitronektinski receptor + vitronektin	cRGDfV
19	10.9.2003	Vitronektinski receptor + vitronektin	cRGDfV
20	11.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	cRGDfV
21	17.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	cRGDfV
22	8.9.2003	Vitronektinski receptor + vitronektin	RGDS
23	19.4.2004	Vitronektinski receptor + vitronektin	RGDS
24	11.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	RGDS
25	17.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	RGDS
26	8.9.2003	Vitronektinski receptor + vitronektin	Tirofiban
27	11.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	Tirofiban
28	17.1.2005	Vitronektinski receptor + vitronektin	Tirofiban

Izbrali smo poskuse, kjer so bile meritve izvedene v treh paralelkah.

Za vsak poskus nas je zanimalo ali pride do signifikantnih razlik med poskusom ali ne, če se pogoji izvedbe razlikujejo glede na zgoraj opisane parametre. S tem smo ugotavljali ali je metoda ponovljiva ali ne.

3.2. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

3.2.1. OSNOVNI STATISTIČNI PARAMETRI

Za lažje razumevanje statističnih testov moramo poznati osnovne statistične pojme. Eno skupino meritev z n ponovitvami opišemo z naslednjimi statističnimi pojmi:

$$\text{povprečje meritev } \bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n},$$

kjer je i indeks ponovitev in x_i vrednost posameznih ponovitev,

$$\text{vsota kvadrantov razlik} = \sum_i (x_i - \bar{x})^2$$

je merilo za odstopanje vseh meritev ene skupine od povprečja.

število prostih stopenj je število meritev, ki jih lahko v znanem povprečju prosto izberemo. Pri eni skupini meritev je število prostostnih stopenj vedno $n-1$.

varianca meritev je količnik med vsoto kvadratov razlik in število prostostnih stopenj:

$$v = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

standardni odklon meritev je kvadratni koren variance meritev:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{v} \text{ in pomeni povprečen odstop meritev od povprečja.}$$

3.2.2. ANALIZA VARIANCE (ANOVA)

Analiza variance (ANVA) je statistična metoda, ki proučuje vpliv določenega faktorja na odklone posameznih vrednosti na spremenljivke od njihove skupne aritmetične sredine. Pri ANOVI testiramo vpliv ene ali več neodvisnih spremenljivk na odvisno spremenljivko. Metoda je uporabna, kadar je odvisna spremenljivka vsaj intervalnega značaja, neodvisne spremenljivke pa so nominalne. Temelji na dejstvu, da varianca vsakega vzorca, vzete iz iste populacije, predstavlja nepristransko oceno variance populacije. Po vrednostih preučevanega faktorja osnovno množico (populacijo), ki ima svojo aritmetično sredino μ in varianco σ^2 in se torej porazdeljuje po normalni porazdelitvi, razdelimo na več podmnožic. Te podmnožice imajo vsaka svojo aritmetično sredino, katere s pomočjo analize variance medsebojno primerjamo^{28,30,31}.

Analizo variance uporabljamo takrat, kadar primerjamo več skupin meritev. Skupne meritve se med seboj razlikujejo glede na vplive različnih nadzorovanih dejavnikov, kot so: pogoji shranjevanja, temperatura inkubacije, itd.. Tako lahko primerjamo vse vplive med seboj in gledamo vire razlik. Posledice so lahko slučajne napake meritev, druge pa so lahko posledica nadzorovanega dejavnika. S pomočjo ANOVE primerjamo vpliv obeh dejavnikov.

V primeru, da študiramo vpliv enega faktorja, uporabljamo enosmerno ali enofaktorsko ANOVO. Kadar na rezultate vplivata dva faktorja, uporabljamo dvosmerno ali dvofaktorsko ANOVO, ki jo lahko nadgradimo tako, da poleg vplivov faktorjev določimo tudi vplive interakcij faktorjev.

Enosmerna ali enofaktorska ANOVA

Z enosmerno ANOVO primerjamo vpliv enega faktorja in slučajne napake. Podatke imamo razvrščene po skupinah, v katerih so ponovitve meritev istega vzorca. Skupine se med seboj ločijo glede na velikost vpliva nadzorovanega dejavnika

Dvosmerna ali dvofaktorska ANOVA

Pri dvosmerni ANOVI določamo, kako se meritve razlikujejo med seboj v odvisnosti od dveh faktorjev.^{28,30,31}

3.2.3. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Za statistično vrednotenje rezultatov testiranja smo uporabili Microsoftov program Excel. V ta program smo vnesli rezultate meritev kemiluminiscence in smo izračunali poprečje meritve te standardno deviacijo za vsako meritev. Dobljene rezultate smo vnesli v program Microcal ORIGIN 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA). S pomočjo tega programa pa smo lahko narisali logaritemske grafe luminiscence (rlu/s) v odvisnosti od logaritma koncentracije antagonista integrina (μM).

Eksperimentalnim vrednostim smo nato prilagajali sigmoidno krivuljo. Prevoj sigmoidne krivulje predstavlja koncentracijo antagonista, ki povzroča 50 % inhibicijo vezave biotinitiranega agonista na receptor in ustreza vrednosti IC_{50} za posamezno spojino.

S pomočjo statističnega programa SPSS 14.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, USA) smo statistično ovrednotili vrednosti IC_{50} posameznega antagonista, pozitivnih in negativnih kontrol pri posameznih pogojih.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Ugotavljanje afinitete vezave antagonistov v primerjavi z naravnimi ligandi na fibrinogeni in vitronektinski ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) receptor lahko izvajamo kot izpeljanko imunokemijskega testa (ELISA), pri kateri namesto primarnega protitelesa na trdni nosilec (mikrotitrna ploščica) vežemo receptor. Temu testnemu sistemu pravimo kompetitivni protein-vezavni test (CPBA- competitive protein binding assay) na osnovi »sendvič« tehnike, saj je preiskovalni ligand »ujet« med dve makromolekuli (receptor in protitelo).

Ker je ta test za vrednotenje modulatorjev integrinskih receptorjev presejalni, je pomembno, da so rezultati ponovljivi. Tako pričakujemo, da bomo dobili za naravni ligand za integrinske receptorje oz za njihove antagoniste ustrezno ponovljive rezultate. Vendar pa v literaturi zasledimo kar precejšnje razlike v IC_{50} .

Iz množice izvedenih poskusov smo izbrali in obdelali samo tiste poskuse, ki so vsebovali fibrinogeni receptor z agonistom fibrinogenom ter različne antagoniste, kot so eptifibatid, RGDS, cRGDFV, tirofiban ter vitronektinski receptor z agonistom vitronektinom in z različnimi antagonisti. Do sedaj je znano, da ima fibrinogeni receptor večjo afiniteto do fibrinogena, ki je endogeni ligand, kot vitronektinski receptor ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$). Slednji ima večjo afiniteto do vitronektina.

Pri vseh poskusih, ki so bili izvedeni, nas je zanimalo ali je ponovljivost ustrezna. S statistično obdelavo smo želeli preveriti, kakšne so vrednosti IC_{50} , ki so bile pridobljene pod istimi pogoji eksperimenta v različnih časovnih obdobjih. Sami parametri se bistveno niso spremenili, največje spremembe so bile, da so bili receptorji, agonisti in antagonisti iz različnih časovnih serij. Med samim izvajanjem teh poskusov so ugotovili, da rezultati variirajo in v diplomski nalogi smo hoteli ugotoviti, ali so te razlike signifikantne.

4.1. TESTNI SISTEM FIBRINOGENSKI RECEPTOR Z AGONISTOM FIBRINOGENOM

Preverjali smo varianco dveh časovno različno izmerjenih vrednosti, pri čemer velja, da je $\alpha = 0,05$. Dobljene statistične vrednosti, ki so bile manjše od $\alpha = 0,05$, smo ovrednotili kot signifikantne. Vrednosti nad to mejo, pa smo ovrednotili kot nesignifikantne, s tem pa smo opredelili, da ta sprememba ne vpliva signifikantno na naše meritve.

Pri tem smo uporabljali statistično metodo analize variance (Anova).

Tabela 2: Testni sistem z antagonistom eptifibatid. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 1-4 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	1	2	3	4
1		N	N	N
2	N		0.010	N
3	N	0.010		0.015
4	N	N	0.015	

Za antagonist eptifibatid smo ugotovili, da smo dobili signifikantne razlike med poskusoma 2 ($P=0.010$) in 3 ($P=0.010$) ter poskusoma 3 ($P=0.015$) in 4 ($P=0.015$).

Tabela 3: Testni sistem z antagonistom cRGDfV. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 5-7 izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije. Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	5	6	7
5		N	0.004
6	N		N
7	0.004	N	

Za antagonist cRGDfV smo ugotovili, da smo dobili signifikantno razliko med poskusoma 5 ($P=0.004$) in 7 ($P=0.004$).

Tabela 4: Testni sistem z antagonistom RGDS. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 8-11 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	8	9	10	11
8		N	N	N
9	N		N	0.002
10	N	N		N
11	N	0.002	N	

Za RGDS smo ugotovili, da smo dobili signifikantne razlike med poskusom 9 ($P=0.002$) in 11 ($P=0.002$).

Tabela 5: Testni sistem z antagonistom tirofibanom. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 12-14 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	12	13	14
12		N	N
13	N		N
14	N	N	

V primeru, ko je bil poskus uporabljen antagonist tirofiban, signifikantnih razlik v IC_{50} ni bilo določenih.

Kot je razbrati iz zgoraj navedenih tabel 2-5, smo v primeru testnega sistema fibrinogeni receptor, fibrinogen in tirofiban dobili nesignifikantno razliko med poskusi, kar kaže na dobro ponovljivost rezultatov, v nekaj primerih kjer je bil kot antagonist uporabljen bodisi eptifibatid, cRGDfV ali RGDS pa smo ugotovili signifikantne spremembe med IC_{50} določenim.

Postopki poskusov so bili pri vseh treh antagonistih enaki. Prav tako pa so med samo izvedbo poskusov uporabljali materiale istih proizvajalcev, razlika je bila v različnih serijah ter v osebi, ki je poskus izvajala. Zaradi tega smo pričakovali, da ne bo prišlo do razlik. Vendar je kljub temu do teh razlik prišlo, katere lahko razberemo iz zgoraj navedenih tabel. Razlike smo tako dobili pri cRGDfV, RGDS in eptifibatidu. Vzrok lahko morda iščemo v večji specifičnosti oz. afiniteti antagonistov za fibrinogeni receptor. Specifična antagonista za fibrinogeni receptor sta tirofiban in eptifibatid. V primeru tirofibana res ni prišlo do signifikantnih razlik. Kljub temu, da je eptifibatid specifičen za ta receptor, smo pri naši obdelavi dobili signifikantne razlike. Te razlike lahko predpišemo subjektivnemu faktorju (analitik) oz. objektivnim faktorjem (uporaba pipet, serija ostalih reagentov, ki so bili pri poskusu potrebni). Na rezultate lahko vpliva tudi samo spiranje med poskusi in na koncu tudi merjenje kemiluminiscence.

4.2. TESTNI SISTEM VITRONEKTINSKI RECEPTOR ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) Z AGONISTOM VITRONEKTINOM

Preverjali smo varianco dveh časovno različno izmerjenih vrednosti, pri čemer velja, da je $\alpha = 0,05$. Dobljene statistične vrednosti, ki so bile manjše od $\alpha = 0,05$, smo ovrednotili kot signifikantne. Vrednosti nad to mejo, pa smo ovrednotili kot nesignifikantne (N), s tem pa smo opredelili, da ta sprememba ne vpliva signifikantno na naše meritve.

Pri tem smo uporabljali statistično metodo analize variance (Anova).

Za testni sistem vitronektinski receptor, vitronektin in kot antagonist eptifibatid sta bila izvedena le dva poskusa. Ta dva poskusa sta navedena pod številka 15 in 16. Zaradi premalo izvedenih poskusov nismo imeli dovolj podatkov, da bi lahko analizirali testni sistem. Za ta testni sistem bi bilo potrebno izvajati še več poskusov in nato bi lahko sam testni sistem statistično ovrednotili.

Tabela 6: Testni sistem z antagonistom cRGDfV. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 17-21 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	17	18	19	20	21
17		N	N	N	N
18	N		N	N	N
19	N	N		N	N
20	N	N	N		N
21	N	N	N	N	

Tabela 7: Testni sistem z antagonistom RGDS. Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 22-25 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	22	23	24	25
22		N	N	N
23	N		N	N
24	N	N		N
25	N	N	N	

Tabela 8: Testni sistem z antagonistom tirofibanom: Primerjava vrednosti IC_{50} v poskusih 26-28 (izvedeni poskusi v različnih časovnih obdobjih in različne serije). Črka N pomeni nesignifikantno.

Št. poskusa	26	27	28
26		N	N
27	N		0.029
28	N	0.029	

Pri antagonistu tirofibanu je prišlo do signifikantnih razlik med poskusoma 27 in 28.

Na osnovi zgoraj navedenih tabel 6-8 smo v primeru testnega sistema vitronektinski receptor, vitronektin s cRGDfV in vitronektinski receptor, vitronektin z RGDS dobili nesignifikantno razliko. Pri testnem sistemu vitronektinski receptor, vitronektin s tirofibanom pa je prišlo do signifikantnih razlik.

Izvedba poskusov je bila pri vseh treh antagonistih enaka po metodi CPBA do integrinskih receptorjev. Prav tako pa so med izvedbo poskusov uporabljali materiale istih proizvajalcev, razlika je bila le v osebi, ki je poskus izvajala ter različnih serijah poskusov. Zaradi tega smo pričakovali, da ne bo prišlo do razlik. Vendar je kljub temu do teh razlik prišlo, katere lahko razberemo iz zgoraj navedenih tabel. Razlike smo tako dobili pri tirofibanu.

Ta sprememba se je morda pojavila, ker tirofiban ni specifičen za vitronektinski receptor. To domnevo smo na nek način potrdili pri fibrinogenskem receptorju, kar lahko razberemo iz tabele številka 5. Poleg tega pa je lahko vzrok za razlike v subjektivnem faktorju (analitik, uporaba pipet, serija reagentov, ki so bile pri poskusu potrebne), samo spiranje med poskusom in na koncu lahko tudi merjenje kemiluminiscence.

Nesignifikantna razlika pri cRGDfV in RGDS nam pa dokazuje, da sta ta dva liganda specifična za vitronektinski receptor.

Na osnovi obeh receptorskih sistemov lahko tudi zaključimo, da je prišlo do večjih odstopanj (signifikantnih razlik) v primeru manj specifičnega antagonista.

Ker smo v večini primerov dokazali nesignifikantne razlike, lahko trdimo, da je metoda ponovljiva in primerna kot presejalna metoda za ugotavljanje afinitete spojin do integrinskih receptorjev.

5. ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali je modificiran imunokemijski test, ki so ga priredili raziskovalci na Katedri za framacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo za določanje afinitete ligandov do integrinskih receptorjev, ustrezna presejalna metoda za vrednotenje novih spojin kot modulatorjev prej omenjenih receptorjev.

Da bi dokazali uporabnost metode, smo uporabili testne sisteme z različnimi ligandi in različne integrinske receptorje. Spojinam smo določili vrednosti IC_{50} ter na njihovi osnovi statistično izračunali (ANOVA), ali se rezultati med seboj signifikantno ali nesignifikantno razlikujejo.

Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- Pri testiranju afinitete ligandov do vitronektinskega oz. fibrinogenskega receptorja, izražene z IC_{50} , smo dobili zelo malo signifikantnih razlik.
- Te razlike v največji meri lahko pripišemo izvajalcem poskusa. Lahko so posledica nenatančnega nanosa vzorcev oz reagentov (pipetiranja), spiranja testnih ploščic, merjenja kemiluminiscence.
- S to metodo z dokaj veliko zanesljivostjo vrednotimo afiniteto spojin do obravnavanih integrinskih receptorjev.

6. LITERATURA

1. Šimundić A.: Structura i funkcija ahdezijskih molekula. Biochemija medica, Zagreb 2001; 11:1-2
2. Cesar J., Sollner Dolenc M.: Terapevtska uporabnost antagonistov vitronektinskega receptorja. Far. Vestn. 2000; 51: 483-490
3. Nadrah K., Sollner Dolenc M.: Dual Antagonist of Integrins. Current Medicinal Chemistry 2005; 12: 1449-1466
4. Nadrah K., Sollner Dolenc M.: Načrtovanje antagonistov vitronektinskega receptorja. Znanstveno delo podiplomskih študentov v Sloveniji 2004; 409-417
5. Fruston P.B., Cullberson J.C., Hartman G.D.: Molekular Model of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integin. J. Med. Chem. 2003; 46: 5316-5325
6. <http://www.cc.jyu.fi/~ppkank/gradu/pictures/iconform.jpg> 12.3.2007 (slikovno gradivo)
7. Turck G.C.: Inhibitors of integins. Current Opinions in Pharmacology 2002; 2: 394-402
8. Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 112-113, 331-334
9. <http://www.medicine.ox.ac.uk/ndog/mardon/integrin.htm>- 12.3.2007
10. Alberts B.: Molecular biology of the cell, 4 th. Ed., New York, Garland Science 2002: 995-999
11. Cesar J., Šegula M., Sollner Dolenc M.: Novejše antiagregorne učinkovine: antagonisti fibrinogenskega receptorja GPIIb/IIIa receptorja. Farm. Vestn. 2002; 51: 261-275
12. Thimotey A. Springer, Jian-Huain Wag: The tree-dimensional structure of integrins and theiré ligands and conformational regulations of cell adhesion. Boston 2004: 29-63
13. Scarborough R.M., Klaiman N.S., Phillips D.R.: Palatet Glycoprotein Iib/IIIa Antagonists. Circulations 1999; 100: 437-444
14. Yang J., Zhan C., Dong X., Yang K., Wang F.: Interaction of homan fibrinogen receptor (GPIIb/IIIa) with decorsin. Acta Pharmacol Sin 2004; Aug (8): 1096-1104
15. Nadrah K.: Sinteza simptomov antagonistov integrinskih receptorjev, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2002

16. Tuckwell S. D.: Humphires, J. M.; Molecular and cellular biology of integrins, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 1993, 15, 149-171
17. Nicolaou K.C.: Trujillo, I. J.; Jandeleit, B.; Chibale, K.; Rosenfeld, M.; Diefenbach, B.; Cheresch, D.A.; Goodman, S.L.; Design, Synthesis and Biological Evaluation of Nonpeptide Integrin Antagonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1998, 6:1185-1208
18. Haubner R.: Finsinger, D.; Kessler, H.; Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ Integrin for New Cancer Therapy, *Angew. Chem. Int. Engl.*, 1997, 36, 1374-1389
19. Sorbera L.A.: Graul, A.; Castaner, J.; Cilengitide, *Drugs of future 2000*, 25(7): 674-678
20. Eskens F.A.L.M.: Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A; Brindely, C; Bottcher, S.; Wynedaele, W.; Dreves, J; Verweij, J.; van Oosterom, A.T.; Phase I and Pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumor, *European Journal of Cancer*, 2002, 39, 917-926
21. Eldered C., Judkins D.: Fibrinogen receptor Antagonists: Design and Clinical Applications, *Progress in Medicinal Chemistry*, 1999, 36: 29-90
22. http://www.wellnaturally.com/ingredientsinfo/info_tween.html 12.3.2007
23. <http://www.rxlist.com/cgi/generic/tiro.htm> 15.3.2007 (slikovno gradivo)
24. Božič B.: Imunokemijske metode v klinični kemiji – presejalni ali potrditveni testiti?. *Farm. Vestn.* 2000; 51 (posebna izdaja): 342-344
25. Interna navodila za izvedbo testa na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo v Ljubljani
26. Šuper B.: In vitro določanje afinitete triazinskih derivatov RGD do integrinskih receptorjev, *Diplomsko delo*, Ljubljana, 2006
27. Tangemann K., Engel J.: Demonstration of non-linear detection in ELISA resulting in up to 1000-fold too high affinities of fibrinogen binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *FEBS Letters* 1995; 358: 179-181
28. Zver I., Bohanec S., Kozjak F.: Uporaba ANOVA v stabilnosti zdravil. *Farm. Vestn.* 1999; 50: 35-40
29. Addicks E., Mazitschek R., Giannis A.: Synthesis and Biological Investigation of Novel Tricyclic Benzodiazepinedione- Based RGD Analogues. *ChemBioChem* 2002; 3:1028-1088

30. Adamič Š.: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1980: 93-97
31. Mrhar A., Primožič A.: Statistične metode v farmaciji. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 1983: 71-74

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARIJA VERBUČ

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009