

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA KOLAR

***IN VITRO* DOLOČANJE AKTIVNOSTI POTENCIALNIH
ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN MORSKEGA IZVORA**

IN VITRO ACTIVITY EVALUATION OF POTENTIAL
ANTITHROMBOTIC AGENTS OF MARINE ORIGIN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm. Vzorci so bili pridobljeni od institucij, ki so sodelovale v evropskem projektu Marex (European Union FP7 Integrated Project MAREX: *Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds: From Discovery to Sustainable Production and Industrial Applications* - Project No. FP7-KBBE-2009-3-245137).

Zahvala

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Janezu Ilašu, mag. farm. za usmerjanje in pomoč pri izdelavi magistrskega dela.

Iskrena hvala staršem za finančno in moralno podporo ter vsem domačim, ker ste verjeli vame. Hvala družini Pucko za spodbudne besede. Hvala Katji, ker mi že 25 let stoji ob strani. Hvala Borisu za vso ljubezen, potrpežljivost in razumevanje.

Hvala tudi prijateljem in sošolcem za zabavna in nepozabna študijska leta.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Tamara Kolar

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO RAZPREDELNIC	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII

1 UVOD	1
1.1 ISKANJE SPOJIN VODNIC NARAVNEGA IZVORA.....	1
1.1.1 Iskanje spojin vodnic morskega izvora	3
1.2 HEMOSTAZA IN MOTNJE V STRJEVANJU KRVÍ	4
1.2.1 Motnje hemostaze.....	7
1.2.1.1 Tromboza	7
1.2.2 Antitrombotiki	7
1.3 SERINSKE PROTEAZE.....	8
1.3.1 Tripsin.....	9
1.3.2 Trombin	10
1.3.3 Faktor Xa	10
1.4 DIREKTNI INHIBITORJI TROMBINA IN FAKTORJA Xa	11
1.5 INTEGRINI.....	13
1.5.1 Fibrinogenški receptor.....	14
1.5.1.1 Antagonisti na fibrinogenških receptorjih.....	14
1.6 VEČTARČNI ANTITROMBOTIKI.....	15
2 NAMEN NALOGE	16

3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 PRIPRAVA VZORCEV	17
3.2 TESTIRANJE INHIBICIJE SERINSKIH PROTEAZ Z AMIDOLITIČNO METODO	17
3.2.1 Materiali in pogoji merjenja	17
3.3 ENCIMSKA KINETIKA	18
3.4 AMIDOLITIČNA METODA IN DOLOČANJE K_i	20
3.4.1 Določanje K_i za trombin, faktor Xa in tripsin	21
3.4.2 Določanje selektivnosti.....	23
3.5 TESTIRANJE ZAVIRANJA VEZAVE FIBRINOGENA NA FIBRINOGENSKE RECEPTORJE Z IMUNOKEMIJSKIM TESTOM	23
3.5.1 Materiali in pogoji merjenja	23
3.5.2 Model vezave liganda na receptor	24
3.5.3 Merjenje zasedenosti fibrinogenih receptorjev z imunokemijskim testom	26
3.6 HPLC	30
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1 REZULTATI TESTIRANJA AKTIVNOSTI NA SERINSKE PROTEAZE IN FIBRINOGENSKI RECEPTOR	32
4.2 RAZPRAVA.....	39
4.2.1 Aktivnost	39
4.2.2 Selektivnost na trombin in faktor Xa glede na tripsin	40
4.2.3 Potencialne spojine z antitrombotičnim učinkom	40
4.2.2 Sestava ekstraktov	44
4.2.3 Topnost in čistost ekstraktov	47
4.2.4 Potek in kritične stopnje testiranja – serinske proteaze	49
4.2.4.1 Nanos pufra in raztopin potencialnih inhibitorjev	49
4.2.4.2 Nanos encima	49
4.2.4.3 Nanos substrata	49
4.2.4.4 Merjenje absorbance	49
4.2.4.5 Rokovanje s proteini.....	51
4.2.5 Potek in kritične stopnje testiranja – fibrinogeni receptor	51

4.2.5.1 Nanos fibrinogenih receptorjev	51
4.2.5.2 Nanos 1 % BSA	52
4.2.5.3 Nanos biotiniliranega fibrinogena in potencialnih kompetitivnih ligandov	52
4.2.5.4 Spiranje in sušenje mikrotitrskih ploščic.....	52
4.2.5.5 Izračun in uporaba štiri-parametrne enačbe.....	53
4.2.7 Problem DMSO in vpliv na testiranje	53
5 SKLEP.....	55
6 VIRI IN LITERATURA.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematičen prikaz postopka iskanja novih spojin vodnic naravnega izvora.....	3
Slika 2: Koagulacijska kaskada	6
Slika 3: <i>Glycyrrhiza glabra</i> oz. Golostebelni sladki koren – glicirizin inhibira trombin ...	12
Slika 4: <i>Bothrops jararaca</i> – strupa botrojaracin in botroalternin se vežeta na trombin....	12
Slika 5: <i>E. coli</i> – ekotin inhibira faktor Xa	12
Slika 6: Kromogeni substrat za trombin	20
Slika 7: Kromogeni substrat za faktor Xa oz. tripsin.....	20
Slika 9: Shematičen prikaz imunokemijskega testa na trdnem nosilcu	29
Slika 10: Mikrotitrna ploščica pred nanosom in 10 minut po nanosu kromogenega substrata	31
Slika 11: Graf inhibicije faktorja Xa z DMSO	33
Slika 12: Aktivnost spojin glede na posamezne tarče.....	39
Slika 13: Aktivnost na posamezne tarče glede na jakostni razred K_i in rezidualno aktivnost pri 100 $\mu\text{g/mL}$ potencialnega antagonista	40
Slika 14: Graf inhibicije trombina z MX-TK-124	41
Slika 15: Graf inhibicije faktorja Xa z MX-TK-124 v 3 % DMSO.....	41
Slika 16: Potencialni antagonisti fibrinogenega receptorja.....	42
Slika 17: Graf inhibicije trombina s frakcioniranimi ekstrakti enakega izvornega organizma	43
Slika 18: HPLC spektri spojine MX-TK-159 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	44

Slika 19: HPLC spektri spojine MX-TK-160 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	45
Slika 20: HPLC spektri spojine MX-TK-161 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	45
Slika 21: HPLC spektri spojine MX-TK-162 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	46
Slika 22: HPLC spektri spojine MX-TK-163 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	46
Slika 23: HPLC spektri spojine MX-TK-164 analizirani pri treh valovnih dolžinah.....	47
Slika 24: Mikrotitrne ploščice po nanosu biotiniziranega fibrinogena in preiskovanih spojin	48
Slika 25: Reakcija nastanka <i>p</i> -nitroanilina	50
Slika 26: Graf inhibicije trombina – obarvana in neobarvana spojina.....	51

KAZALO RAZPREDELNIC

Razpredelnica I: Faktorji koagulacije.....	5
Razpredelnica II: Razdelitev antitrombotikov	8
Razpredelnica III: Naravni inhibitorji trombina in faktorja Xa.....	11
Razpredelnica IV: Primerjava farmakokinetičnih lastnosti nekaterih učinkovin.....	13
Razpredelnica V: Rezultati testiranja podani v barvni karti.....	34

POVZETEK

Tromboza in z njo povezani srčno-žilni zapleti so glavni vzrok prezgodnje smrti v razvitih državah. Zaradi težnje k čim manjši pojavnosti stranskih učinkov, se raziskovalci še vedno trudijo poiskati nove antitrombotične učinkovine.

V sklopu magistrske naloge smo testirali aktivnost kompleksnih morskih ekstraktov na različne tarče, pri čemer smo se osredotočili na trombin, faktor Xa in fibrinogeni receptor. Trombin in faktor Xa sta se v preteklosti že izkazala kot primerni tarči za razvoj peroralno aktivnih antikoagulantov. Težavo predstavlja strukturna podobnost vezavnega mesta z drugimi serinskimi proteazami, zato je v izogib stranskim učinkom potrebno določiti aktivnost tudi na podobne encime, npr. pankreasno serinsko proteazo, tripsin.

Pri našem delu smo z encimskimi testi kolorimetrično vrednotili amidolitično aktivnost trombina, faktorja Xa in tripsina po dodatku potencialnih inhibitorjev morskega izvora. Encimom in potencialnim inhibitorjem smo dodali kromogeni substrat in preko merjenja absorbance določali nastanek rumeno obarvanega *para*-nitroanilina. Več kot ga je nastalo, večja je bila rezidualna amidolitična sposobnost encima in večja je bila absorbanca. V primeru iskanja potencialnih antiagregatornih učinkovin smo uporabili imunokemijski test. Fibrinogenskemu receptorju smo dodali nativni ligand – z biotinom označen fibrinogen in hkrati potencialne antagonist morskega izvora. Po dodatku s peroksidazo konjugiranih protiteles proti biotinu in kemoluminiscenčnega reagenta smo merili kemoluminiscenco, ki je bila rezultat reakcije med peroksidazo in reagentom. Večja kot je bila, več nativnega liganda se je vezalo na receptorje. Pri delu nam je največ težav povzročala intenzivna obarvanost nekaterih ekstraktov in vpliv DMSO, ki smo ga uporabili kot topilo. Ta je v uporabljenih koncentracijah dal lažno pozitivne rezultate, in sicer v primeru faktorja Xa, tripsina in fibrinogenkega receptorja. Dobljene rezultate smo korigirali.

Med testiranimi ekstrakti smo našli nekaj potencialno učinkovitih in selektivnih inhibitorjev trombina in antagonistov fibrinogenkega receptorja. 19 ekstraktov je bilo aktivnih na trombin in fibrinogeni receptor, en ekstrakt pa na trombin, faktor Xa in fibrinogeni receptor. Če so učinki dejansko posledica delovanja ene molekule, imamo spojino, ki lahko z modifikacijo potencialno deluje na več tarč hkrati in je odskočna deska za razvoj več-tarčne antitrombotične učinkovine.

Ključne besede: serinske proteaze, inhibitorji trombina, faktor Xa, fibrinogeni receptor

ABSTRACT

Thrombosis and the accompanying cardio-vascular diseases are the major cause of death in the developed countries. Scientists are still in search for new antithrombotic agents with improved safety profiles.

The present master's thesis discusses the testing and the testing results of potential antithrombotics of marine origin. We decided to test their activity on three different targets: thrombin, factor Xa and the fibrinogen receptor. Thrombin and factor Xa have proved to be successful targets for orally available anticoagulants, but having taken in consideration the similarity to other serine proteases, we also tested activity on trypsin to assess selectivity.

With colorimetric enzyme assay we measured the amidolytic activity of thrombin, factor Xa and trypsin in presence of potential inhibitors of marine origin. Chromogenic substrate was added to the mixture of enzyme and potential inhibitor and the appearance of yellowish para-nitroaniline was determined through the increased absorbance level. The higher the absorbance, the larger was the amount of p-nitroaniline and the higher was the residual enzyme activity. In search for anti-aggregatory agents we used the immunochemical method where we measured chemiluminescence. The native ligand marked with biotin and potential antagonists were added to receptors simultaneously. After the addition of antibodies against biotin which were conjugated with peroxidase, chemiluminiscent reagent was added into the mixture. In case of potential antagonist binding, there was smaller amount of fibrinogen bound and the chemiluminescence signal was lower. Our biggest concerns were the dark coloured extracts and DMSO we used as a solvent. It influenced the results as false positives. We had to correct the results accordingly.

We found some interesting compounds. There were satisfactorily enough potent and selective potential thrombin inhibitors and also fibrinogen receptor antagonists. 19 of them were active on both targets (thrombin and fibrinogen receptors). One extract showed activity against three targets – thrombin, factor Xa and fibrinogen receptor. Thus, in case this activity is actually induced by a single compound, after modification, this could be a lead to a multitarget antithrombotic agent.

Key words: serine proteases, thrombin inhibitors, factor Xa, fibrinogen receptor

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	protitelesa (angl. <i>Antibodies</i>)
ACN	acetonitril
ADP	adenozin difosfat
AUC	površina pod krivuljo (angl. <i>Area Under the Curve</i>)
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>Bovine Serume Albumine</i>)
CYP	citokrom P450
DMSO	dimetil sulfoksid
ELISA	encimskoimunski test (angl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
GPIIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa (fibrinogenški receptor)
HBSA	pufer iz BSA, NaCl in HEPES
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (angl. <i>High Performance Liquid Cromatography</i>)
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (angl. <i>High Throughput Screening</i>)
IC₅₀	inhibitorna koncentracija, ki povzroči 50 % inhibicijo
K_i	konstanta inhibicije
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PAINS	spojine, ki motijo <i>in vitro</i> teste (angl. <i>Pan-Assay INterference Compounds</i>)
PTA	predhodnik plazemskega tromboplastina (angl. <i>Plasma Thromboplastin Antecedent</i>)
RGD	zaporedje Arg-Gly-Asp
TAFI	s trombinom aktiviran inhibitor fibrinolize (angl. <i>Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i>)
TF	tkivni faktor
TXA₂	tromboksan A ₂
TFPI	inhibitor poti tkivnega faktorja (angl. <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)
TM	trombomodulin
t-PA	tkivni aktivator plazminogena
u-PA	urokinazni aktivator plazminogena
UV/VIS	ultravijolična/vidna spektroskopija
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>World Health Organisation</i>)

1 UVOD

1.1 ISKANJE SPOJIN VODNIC NARAVNEGA IZVORA

Najstarejši zapisi o uporabi okoli tisoč rastlin za namene zdravljenja segajo že v leto 2600 p.n.š. na območje Mezopotamije (1). Leta 1985 se je po oceni WHO približno 65 % svetovnega prebivalstva primarno zdravilo s tradicionalnimi zdravilnimi rastlinami, v kar pa ni zajeta populacija bolj razvitih dežel, kjer so prav tako v uporabi zdravilne učinkovine razvite iz spojin vodnic naravnega izvora (2). Ta številka priča o pomembnosti naravnih virov zdravil še danes.

Omejitve pri iskanju spojin vodnic naravnega izvora

Znanstveniki so do danes raziskali in biološko ovrednotili manj kot 10 % vseh naravnih virov (3). Razlogov za to je več. Prva težava je že sama dostopnost naravnega materiala, tako fizična kot zakonska. Konvencija o biološki raznovrstnosti iz leta 1992 namreč določa, da države same odločajo o varstvu in o preudarni rabi naravnih virov (4). Nekatere države so s svojimi zakoni dostop do naravnega materiala otežile, spet druge pa na tem področju še nimajo urejene regulative (3). Naslednja ovira je kompleksna sestava virov naravnih spojin, ki otežuje izolacijo, detekcijo in karakterizacijo novih potencialnih spojin vodnic (5). Možno je tudi, da se med postopkom izolacije in čiščenja znebimo kakšnega za delovanje pomembnega kofaktorja in izgubimo aktivnost. Naravni ekstrakti so velikokrat obarvani, kar oteži samo testiranje, ki temelji na uporabi kromogenih substratov, lahko so netopni in sestavljenih iz številnih komponent, ki lahko izražajo sinergistično ali zaviralno delovanje in nam dajo lažno pozitivne ali negativne rezultate. Zgodi se lahko, da nam ne uspe izločiti motečih spojin, ki se nespecifično in neselektivno vežejo na različne tarče oz. jih strukturno spremenijo ali pa se v raztopini preiskovane spojine tvorijo agregati, ki se prav tako nespecifično vežejo (6, 7). Pri uporabi naravnih virov je potrebno raziskati in dokazati, ali morebitna aktivnost resnično izvira iz novo odkrite spojine in deluje po novem mehanizmu ali pa gre že za raziskano spojino (dereplikacija) (8).

Prednosti iskanja spojin vodnic naravnega izvora

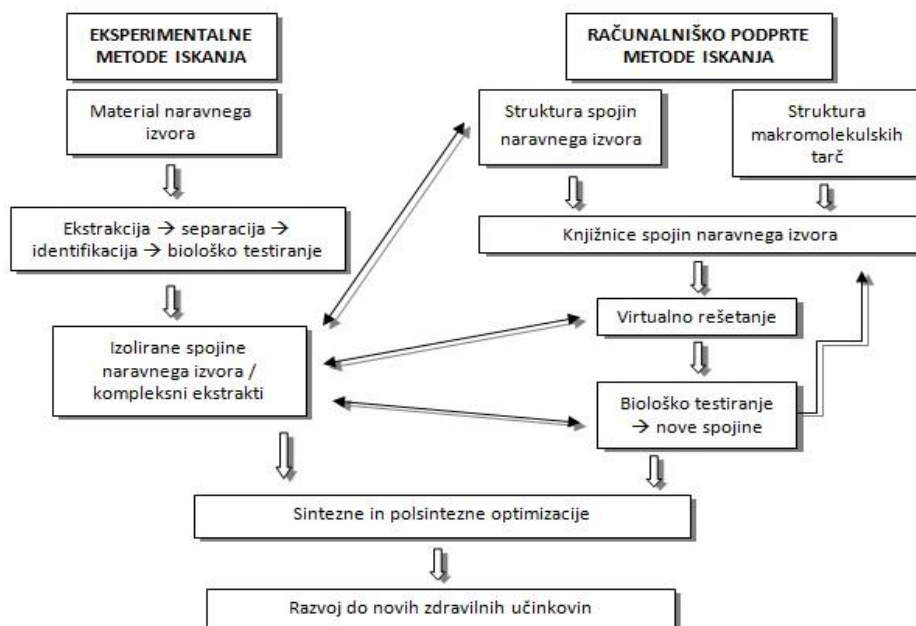
Kljub vsem oviram je iskanje spojin vodnic naravnega izvora izredno pomembno ravno zaradi raznolikosti, ki jo narava nudi. V naravi lahko namreč najdemo širok spekter kemijskih struktur, ki jih (še) ni moč sintetizirati. Spojine vodnice lahko iščemo praktično kjerkoli. V kraljestvu rastlin raziskovalci testirajo tradicionalna zelišča, rastline, ki so

filogenetsko blizu zdravilnim rastlinam ali pa proizvajajo podobne sekundarne metabolite in zgolj naključne še nepoznane rastline (5). Mikroorganizmi so se že v preteklosti izkazali za pomemben vir učinkovin, saj smo iz njih pridobili antibiotike, imunosupresive in statine (3). Ni znano koliko vrst mikrobov obstaja, je pa dejstvo, da imajo sposobnost hitrega spreminjanja in prilagajanja na ekstremne pogoje, tako da nove vrste nastajajo vedno znova. Raziskanih naj bi bilo le 1 % vseh mikroorganizmov. Omembe vredni so tudi insekti. Na svetu živi več kot 30 milijonov vrst, ampak le peščica jih je bilo testiranih v farmakoterapevtske namene (3). Razvoj tehnologije je omogočil, da lahko naravne vire črpamo tudi v ekstremnih okoljih, ki so bila nedolgo nazaj še nedostopna.

Veliko naravnih spojin je topnih v polarnih topilih, zato jih lahko analiziramo z uporabo HPLC z obrnjeno fazo (5). Alan L. Harvey iz Inštituta za farmacijo in biomedicinske znanosti iz Glasgowa navaja, da je pri analizi določenega nabora učinkovin polovica testiranih nizkomolekularnih naravnih spojin ustrezala pravilom Lipinskega za peroralna zdravila. Druga polovica je imela sicer večjo molekulsko maso, več vrtljivih vezi in več stereogenih centrov, vendar še vedno relativno nizek logP (9). Sodobne separacijske, analize in eksperimentalne tehnike že omogočajo enostavnejšo in hitrejšo ekstrakcijo, izolacijo in karakterizacijo novih spojin naravnega izvora (t.i. rešetanje visoke zmogljivosti, HTS). V uporabi so ekstrakcijske metode z majhno porabo organskih topil, kjer ni potrebno dodatno koncentriranje spojine in čiščenje pred nadaljnjo uporabo. (npr. ekstrakcija s superkritičnimi fluidi, trdno-fazna ekstrakcija) (10). Za izolacijo se uporabljajo različne tehnike, ki omogočajo ločitev komponent že pri zelo majhnih količinah vzorca. V današnjem času se najpogosteje uporablja HPLC v kombinaciji z MS, UV/VIS in NMR, kar nam istočasno omogoča separacijo in identifikacijo novih spojin (5, 11). (Slika 1 prikazuje postopek iskanja spojin vodnic naravnega izvora.)

Ker je iz narave težko pridobiti zadostno količino materiala in ker bi to bilo tudi okolju škodljivo, znanstveniki danes uporabljajo različne tehnike, ki omogočajo pridobivanje naravnih spojin na alternativen način. V primeru rastlin lahko uporabimo nediferencirane celice, ki v različnih pogojih in ob dodatku različnih stimulansov, proizvajajo različne količine snovi, ki so predmet raziskovanja. Pospešimo oz. zavremo lahko tudi določene presnovne poti in tako pridobimo več sekundarnih metabolitov, kot bi jih iz samega organizma (3, 5). Presnovke mikroorganizmov, še posebej iz težje dostopnih in tistih, ki jih je težje gojiti, lahko z gensko spremembo pridobivamo iz primernejših vrst. Preiskovani vrsti odvzamemo genetski material, ki kodira sintezo določenega metabolita in ga

vgradimo v genetski kod druge vrste, npr. *E. coli* (3, 9). Ta metoda se v večji meri uporablja pri lišajih in morskih organizmih (3).



Slika 1: Shematičen prikaz postopka iskanja novih spojin vodnic naravnega izvora (povzeto po (11))

1.1.1 ISKANJE SPOJIN VODNIC MORSKEGA IZVORA

Več kot 70 % površja Zemlje zavzema morje. Veliko organizmov živi na obali, morskih čereh in v plitvinah morja, sodobna potapljaška oprema pa je omogočila tudi podrobnejše spoznavanje globokomorskega sveta. Kljub temu še veliko ostaja skritega. Nekateri znanstveniki menijo, da se je v globokih morjih in na koralnih grebenih razvilo celo več življenjskih oblik kot v deževnih gozdovih. Glede na to, da je večina morskih organizmov prilagojena na »sedečo« obliko življenja, so za obstoj vrste morali razviti določene obrambne in komunikacijske mehanizme. V ta namen proizvajajo najrazličnejše kemijske snovi, ki lahko postanejo vir novih spojin vodnic (12, 13).

Prvo aktivno spojino morskega izvora so odkrili bolj ali manj po naključju, in sicer v začetku 50. let 19. stol. v Karibskem morju. Adenin arabinozid iz spužve *Cryptotheca crypta* izraža protivirusno delovanje, citozin arabinozid pa deluje kot antimetabolit (12, 13). Za bolj sistematično in podrobnejše raziskovanje morskih organizmov je bil potreben razvoj zelo občutljivih analitskih tehnik, kot so NMR, MS in HPLC, saj je bila količina dosegljivega materiala precej omejena. Raziskave so v preteklosti potekale dokaj počasi, z razvojem HPLC konec 70. let prejšnjega stoletja pa se je odkrivanje novih spojin znatno

povečalo (14). Največ težav tako danes povzročajo omejene razpoložljive zaloge materiala. Večje količine materiala se pridobivajo neposredno iz naravnih virov, iz akvakulture oz. s fermentacijo ter sintezno (15). Prva odobrena zdravilna učinkovina morskega izvora je postal ne-opioidni analgetik ziconotid, izoliran iz polža *Conus magus* (1, 10, 12). Od prve izolirane morske spojine do danes so znanstveniki odkrili že veliko (potencialnih) učinkovin morskega izvora, med drugim tudi učinkovine z antitrombotičnim delovanjem.

1.2 HEMOSTAZA IN MOTNJE V STRJEVANJU KRVİ

V normalnih fizioloških pogojih ima organizem sposobnost, da ob poškodbah žil zmanjša krvavitev, jo ustavi in v zadnji fazi poškodovano žilo obnovi (16). Izjemnega pomena je tudi obraten proces, ki v skladu s potrebami organizma poskrbi, da ne pride do prekomernega strjevanja krvi in tromboze.

S terminom hemostaza označujemo fiziološke mehanizme za preprečitev izgube krvi (17, 18). Poteka v štirih fazah, ki so med seboj prepletene in soodvisne. Vaskularno in trombocitno fazo opredeljujemo kot primarno hemostazo, koagulacijo krvi in fibrinolizo pa kot sekundarno hemostazo. V prvi - vaskularni fazi, pride do kontrakcije gladkih mišičnih celic, žila se skrči in krvavitev se zmanjša (17, 18, 19). Ob stiku trombocitov s poškodovanim površjem žile nastopi druga - trombocitna faza. Trombociti se morfološko spremenijo in začnejo izražati trombocitni glikoproteinski receptor za kolagen preko katerega se vežejo na poškodovan subendotelij (adhezija trombocitov). Nastopi kompleksno sestavljen proces, aktivacija trombocitov (16, 17, 19). Pri tem sodelujejo številni elementi, predvsem pa trombin (17). Po principu pozitivne povratne zanke nastaja močan aktivator trombocitov, tromboksan (19). Zraven aktivacije povzroča tudi agregacijo trombocitov (17). S heterodimerizacijo GP IIb in GP IIIa nastane membranski receptor za fibrinogen GPIIb/IIIa. Fibrinogen ima zaradi dualne strukture (sestavljen je iz dveh setov α , β in γ verig, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi), sposobnost, da poveže po dva trombocita in tako prispeva k agregaciji trombocitov (17, 20). Nastane trombocitni čep.

Tretja faza je koagulacija. V koagulacijski kaskadi nastopajo različni faktorji in kofaktorji (razpredelnica I). Poteka po ekstrinzični in intrinzični poti. V obeh primerih se sproži kaskada dogodkov, ki privedejo do aktivacije faktorja X (slika 2). Koagulacija od te točke naprej poteka po skupni poti. Aktivacija protrombina do trombina poteka preko kompleksa protrombinaze, ki ga sestavljajo Xa kot encim, Va kot kofaktor in pa kalcijevi ioni ter

fosfolipidi. Nastali trombin pretvori topni fibrinogen v netopni fibrin (17, 19). Fibrinski monomeri polimerizirajo, transglutaminaza FXIIIa pa jih premreži in učvrsti (17, 20). Ko se poškodba zaceli, nastopi četrta faza - fibrinoliza. Fibrinski čep se razgradi in kri lahko nemoteno teče dalje (16). Pri tem igra glavno vlogo serinska proteaza, plazmin, ki ima veliko afiniteto do fibrina in se nanj veže že v času nastajanja čepa (17).

Razpredelnica I: Faktorji koagulacije (povzeto po (27))

FAKTOR	KRATICA	FUNKCIJA
fibrinogen	I	prekurzor fibrina
protrombin*	II	prekurzor trombina
tkivni faktor, tkivni tromboplastin	TF, III	ob stiku trombocitov s TF nastopi trombocitna faza hemostaze
kalcij	IV	aktivacija faktorjev
proakcelerin, labilni faktor	V	Va deluje kot kofaktor za Xa, sestavlja protrombinazni kompleks
akcelerin	VI, Va	ni ločena enota
prokonvertin, stabilni faktor*	VII	aktivacija z vezavo na TF, kompleks aktivira FIX in FX
antihemofilni faktor A, antihemofilni globulin	VIII	VIIIa aktivira IX, kompleks IXa/VIIIa/PL aktivira X
Christmasov faktor, antihemofilni faktor B*	IX	IXa v kompleksu z VIIIa in PL aktivira X
Stuart-Prowerjev faktor, Stuartov faktor*	X	Xa tvori kompleks Xa/Va/PL in aktivira protrombin
predhodnik plazemskega tromboplastina (PTA), antihemofilni faktor C	XI	XIa v prisotnosti Ca^{2+} aktivira IX
Hagemanov faktor, kontaktni faktor	XII	XIIa preko negativno nabite površine ali kalikreina aktivira PK in XI
faktor, ki stabilizira fibrin, Laki-Lorandov faktor	XIII	kataliza peptidne vezi med molekulami fibrina - stabilizacija strdka
prekalikrein, Fletcherjev faktor	PK	kalikrein katalizira nadaljnjo aktivacijo XII v XIIa
visokomolekularni kininogen, Fitzgeraldov faktor	HMWK	kroži v kompleksu z XI ali prekalikreinom
protein C	PC	inhibira aktivnost VIIIa in Va
protein S	PS	kofaktor za aktiviran protein C
inhibitor poti tkivnega faktorja	TFPI	veže Xa in ga inaktivira, kompleks TFPI/Xa inaktivira VIIa/TF
prokoagulant, fosfolipid	PL	komponenta aktivatorja X (IXa/VIIIa/FL) in aktivatorja trombina (FXa/Va/PL)
trombomodulin	TM	vezavno mesto za trombin na površini endotelijskih celic, po vezavi nanj trombin aktivira PC

(* od vitamina K odvisen faktor)

Primarna in sekundarna hemostaza delujeta po principu pozitivne povratne zanke in se med seboj pospešujeta. Da ne pride do prekomernega strjevanja krvi, so potrebne učinkovite negativne povratne zanke. Pomembno vlogo pri zaustavljanju koagulacije imajo nepoškodovane endotelijske celice. Sproščajo vazodilatatorja NO in prostaciklin (19). Proizvajajo inhibitorje zunanje tkivne poti (TFPI), ki se vežejo v kompleks s FVIIa in TF

The diagram illustrates the blood coagulation cascade, divided into three main pathways: INTRINZIČNA POT (Intrinsic Pathway), EKSTRINZIČNA POT (Extrinsic Pathway), and SKUPNA POT (Common Pathway). It also shows the FIBRINOLIZA (Fibrinolysis) process.

INTRINZIČNA POT (Intrinsic Pathway):

- Prekalikrein is converted to Kalikrein by HMWK (High Molecular Weight Kininogen).
- Kalikrein converts XII to XIIa.
- XIIa converts XI to XIa.
- XIa, along with IIa and Ca²⁺, converts IX to IXa.
- IXa, along with VIII and VIIa, converts X to Xa.

EKSTRINZIČNA POT (Extrinsic Pathway):

- TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibits the TF-VII complex.
- TF (Tissue Factor) and VII form a complex that converts VII to VIIa.
- VIIa, along with X and Ca²⁺, converts X to Xa.

SKUPNA POT (Common Pathway):

- Xa, along with V and Ca²⁺, converts II (protrombin) to IIa (thrombin).
- IIa, along with I and Ca²⁺, converts I (fibrinogen) to Ia (fibrin).
- Ia, along with VIIIa and Ca²⁺, converts VIIIa to fibrinski cep (fibrin clots).
- fibrinski cep is converted to razpadni produkti fibrina (fibrin degradation products) by TAFI (Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor).

FIBRINOLIZA (Fibrinolysis):

- plazminogen is converted to plazmin by t-PA (tissue-type plasminogen activator) and u-PA (urokinase-type plasminogen activator).
- plazmin, along with antiplazmin, converts fibrinski cep to razpadni produkti fibrina.

Regulatory Factors:

- Protein S, along with IIa, converts Protein C + trombomodulin to Protein Ca.
- Protein Ca inhibits IIa.
- antitrombin inhibits IIa.
- heparin inhibits IIa.

Slika 2: Koagulacijska kaskada (rdeče puščice – inhibicija, črne puščice – aktivacija)

1.2.1 MOTNJE HEMOSTAZE

Kadar so mehanizmi aktivacije in zaviranja strjevanja krvi neuravnovešeni, prihaja do motenj v strjevanju, ki se kažejo v eni ali drugi skrajnosti bodisi kot krvavitev, bodisi kot tromboza. Obstajajo tudi kompleksne motnje, npr. trombotična trombocitična purpura, kjer pacient trpi istočasno za trombozo in za hemoragično diatezo (19).

1.2.1.1 Tromboza

V grobem ločimo arterijsko in vensko trombozo. Če se trombi tvorijo v globokih venah, govorimo o flebotrombozi, če so pa prisotni v površinskih venah pa gre za manj nevaren tromboflebitis. Arterijska tromboza v veliki večini primerov nastane zaradi ateroskleroze (19). Na deformirane predele žilnega endotelija se začnejo adherirati trombociti in tvorijo bel trombus, ki ovira pretok krvi. Tromb se lahko odlepi in povzroči tromboembolijo (6, 19). Motena je oskrba tkiva s hranilnimi snovmi in kisikom, kar se v srcu kaže kot srčni, v možganih pa kot možganski infarkt (17). Takšne zaplete običajno preprečujemo z zdravili, ki zavirajo delovanje trombocitov (19).

Flebotromboza nastane zaradi preveč aktivnih procesov koagulacije. Pogosteje se pojavlja, kadar je pretok krvi dlje časa upočasnen, pri poškodbah tkiva, pri povišani koncentraciji fibrinogena itd. Tromb je v primeru flebotromboze precej slabo pritrjen in se lahko hitro utrga (19). Dokler je pritrjen na steni vene, je oteženo odvajanje krvi in nastajajo edemi ter vnetja. Če se tromb odlepi, nastali embolus potuje v vse večje vene in lahko konča v pljučih, kjer povzroči pljučno embolijo (17). Za zdravljenje in tudi preventivno se pri operativnih posegih uporabljajo antikoagulant (19).

Pri tromboflebitisu je tromb stabilnejši in močnejše pritrjen ter običajno ne predstavlja večje nevarnosti (19).

1.2.2 ANTITROMBOTIKI

Tromboza velikokrat pripelje do zapletov, kot so srčni infarkt ali možganska kap, ki so med vodilnimi vzroki invalidnosti in smrti v razvitem svetu. Da bi bilo takšnih primerov čim manj, se uporabljajo zdravila v preventivne in kurativne namene (razpredelnica II).

Razpredelnica II: Razdelitev antitrombotikov - (povzeto po (6, 10, 21))

RAZRED UČINKOVIN	MEHANIZEM DELOVANJA	STRANSKI UČINKI in SLABOSTI	UČINKOVINE
ANTIKOAGULANTI	preprečevanje nastanka strdkov		
antagonisti vitamina K	inhibicija vit. K 2,3-epoksid reduktaze in vit. K kinon reduktaze → onemogočena γ -karboksilacija Glu ostankov od vit. K odvisnih faktorjev	pri novorojencih malformacija kosti in krvavitve (intrakranialne), nekroze kože/ pogost monitoring, interakcije s številnimi zdravili in hrano, presnovna variabilnost	kumarinski derivati (varfarin), indandioni
indirektni inhibitorji trombina in faktorja Xa	povzročijo konformacijsko spremembo antitrombina, tako da 1000-krat hitreje veže trombin ali faktor Xa, tvori komplekse v razmerju 1:1 in jih inaktivira	krvavitve, alergije, izguba las, pri daljši uporabi osteoporoza, trombocitopenija/ parenteralna aplikacija, vsakodnevni monitoring	heparini različnih molekulskih mas
direktni inhibitorji trombina in faktorja Xa	direktna vezava in inhibicija trombina in faktorja Xa	trombin opravlja več fizioloških funkcij → stranski učinki; ni antidota	hirudin, bivalirudin, lepirudin (bivalentni), argatroban, dabigatran; rivaroksaban, apiksaban
FIBRINOLITIKI	interagirajo s plazminogenom - nastaja plazmin, ki razgrajuje fibrinska vlakna in povzroči razpad že nastalih strdkov	plazmin je neselektiven in ne razkraja samo patoloških strdkov, temveč lahko poruši integriteto žilne stene	streptokinaza, urokinaza, antistreplaza, reteplaza, alteplaza, tenekteplaza
ANTIAGREGATORNE UČINKOVINE	preprečevanje zlepljanja trombocitov		
zaviralci ciklooksigenaze	preprečijo nastanek TXA ₂ , ki konformacijsko spremeni trombocite, ki nato sprostijo signalne molekule iz granul ter agregirajo	ulkusne razjede, rezistenca (acetilsalicilna kislina)	acetilsalicilna kislina, sulfipirazon
antagonisti ADP receptorjev	ireverzibilno blokirajo ADP receptorje na površini trombocitov, ADP sicer močno inducira agregacijo in stimulirajo TXA ₂	slabost, diareja, dispepsija, redkeje levkopenija (tiklopidin), neutropenija, rezistenca (klopidogrel), trombotična trombocitna purpura, krvavitve	tiklopidin, klopidogrel
antagonisti Fbr receptorjev	vežejo se na GP IIb/IIIa in preprečijo vezavo Fbr	parenteralna aplikacija	epitifibatid, abciaksimab, tirofiban
ostalo			dipiridamol, cilostazol, epoprostenol, anagrelid

1.3 SERINSKE PROTEAZE

Veliko število encimov, ki sodelujejo v procesu hemostaze, spada v obsežno encimsko družino serinskih proteaz (tudi trombin in faktor Xa). Serinske proteaze so proteolitični encimi, ki imajo v aktivnem mestu prisoten serinski ostanek Ser 195. (Številčenje zaporedja aminokislin je zaradi strukturne podobnosti skladno z razporeditvijo aminokislin pri serinski proteazi kimotripsinu (27).) Serinske proteaze delujejo po enakem mehanizmu (22). Katalitično triado sestavljajo serin, histidin in aspartat (23). Prva reakcija poteče kot bazično katalizirana nukleofilna adicija. Negativen naboj na aspartatu okrepi bazični

značaj histidina in stabilizira imidazolni kation. Histidin nato sprejme proton in na serinskem preostanku nastane nukleofilen center, ki napade karbonilni ogljik amidne vezi substrata. Nastane kovalenten tetraedičen substrat, ki ga stabilizira glicin 193. Zaradi resonančne nestabilnosti se na N koncu odcepi polipeptid in nastane intermediat acil-encim. Ponovno poteče nukleofilna adicija, tokrat prevzame vlogo nukleofila voda. Podobno kot v prejšnji stopnji nastane tetraedičen intermediat, ki razpade na drug polipeptid in encim, ki lahko vstopa v nove reakcije (22).

Serinske proteaze sodelujejo v različnih fizioloških procesih, in sicer so dejavne pri prebavi, oploditvi, v razvoju, v boju proti okužbam in pri vnetju, nepogrešljive pa so tudi v centralnem živčnem sistemu. Najbolj poznano področje delovanja serinskih proteaz je hemostaza (23). Med seboj se serinske proteaze razlikujejo po selektivnostnem žepu S1, ki je pri različnih encimskih tipih strukturno drugačen. V grobem jih lahko razdelimo na tri skupine. Prva skupina so proteaze podobne kimotripsinu, ki imajo v žepu S1 hidrofobne aminokisline, zato se nanje vežejo druge hidrofobne aminokisline, ki jih proteaze cepijo. Druga skupina so proteaze podobne tripsinu, ki ima v selektivnostnem žepu negativno nabito asparaginsko kislino, zato cepijo peptidne vezi za pozitivno nabiti aminokislinami, kot sta lizin in arginin. V tretji skupini so proteaze, ki imajo precej majhen S1, tako kot elastaza. Ta skupina lahko cepi le proteine, ki imajo relativno majhne končne aminokisline na položaju P1 (npr. alanin ali glicin) in lahko dosežejo žep S1 (23, 24).

Endogeni zaviralci serinskih proteaz skrbijo, da je aktivnost skladna s potrebami organizma. Kadar je med zaviralci in encimi porušeno ravnovesje, se izrazijo patološki procesi. Najbolj znani endogeni zaviralci serinskih proteaz so serpini. Ti se kovalentno vežejo na acil-encim intermediat in preprečijo deacilacijo, saj porušijo oksianionsko luknjo, ki je potrebna za potek reakcije. Reakcija je ireverzibilna in serpini niso več funkcionalni (24). Med serpina spada tudi antitrombin, ki s prokoagulacijskimi serinskimi proteazami tvori komplekse v razmerju 1:1 in jih inaktivira.

1.3.1 TRIPSIN

Tripsin nastaja iz tripsinogena v trebušni slinavki in se izloča v dvanajstnik ter sodeluje pri prebavi beljakovin (25). V aktivnem mestu ima podobno kot trombin in faktor Xa Asp 189 z negativnim nabojem, stene žepa pa so hidrofobne, zato se vanj lahko ujamejo le daljše nerazvejane alifatske in pozitivno nabite verige z argininom in lizinom (26).

1.3.2 TROMBIN

Trombin spada v skupino proteaz podobnim tripsinu. Nastane iz protrombina. Reakcijo katalizira aktiviran faktor Xa. Sestoji iz krajše polipeptidne verige A in daljše polipeptidne verige B, ki sta med seboj povezani z disulfidnim mostom (22, 27) ter elektrostatskimi interakcijami v stranskih verigah (27). Trombin ima sposobnost avtokatalize in cepi svojo vez med Arg 285 ter Thr 286, pri čemer se odcepi N-končni del verige A in nastane α -trombin (22). Veriga B je homologna B verigi tripsina in podobno kot tripsin tudi trombin cepi Arg-X, redkeje Lys-X (22, 27). Vezavno mesto je zaradi podaljšanih zank veliko globlje in težje dostopno kot pri serinskih proteazah iz pankreasa, kar pojasni slabšo vezavo naravnih inhibitorjev serinskih proteaz (22). Na dnu je aspartatna karboksilna skupina (Asp 189), zato se v žep S1 vežejo bazični deli substratov oz. inhibitorjev. Žep je bolj hidrofoben kot tripsinski. Zraven S1 je majhen hidrofoben in rigidni proksimalni žep P (S2), v katerega se ujemajo majhni hidrofobni deli substratov ali inhibitorjev. Večje hidrofobno področje predstavlja distalni žep D (S3), kamor se vežejo večji hidrofobni deli, kot je so npr. *D*-fenilalanin in analogi (27). Na trombinu sta prisotni tudi dve pozitivno nabiti mesti, kamor se vežeta fibrinogen (vezavno mesto za anione I) in heparin (vezavno mesto za anione II) (27).

Fizioloških vlog trombina je več. Najbolj je poznano njegovo sodelovanje v koagulacijski kaskadi, zraven tega pa preko TAFI zavira fibrinolizo in utrdi fibrinski čep. Ima sposobnost avtoregulacije in po principu negativne povratne zanke zavira koagulacijo. Kot izjemno močan aktivator trombocitov sodeluje tudi v procesu primarne hemostaze. Vlogo ima tudi pri vnetju, proliferaciji različnih tipov celic, celjenju kosti, ... (28, 29).

1.3.3 FAKTOR Xa

Tudi faktor Xa spada v skupino proteaz podobnih tripsinu. Prekurzor faktor X se sintetizira v jetrih in se v neaktivni obliki izloča v kri. V procesu koagulacije se odcepi 52 aminokislin in faktor preide v aktivno obliko Xa (30). Skupaj s kofaktorjem Va in v prisotnosti kalcijevih ionov na površju fosfolipidov sestavlja kompleks protrombinaze, ki cepi protrombin na dveh mestih tako, da se tvori trombin.

Aktivno mesto je bolj odprto, ampak dokaj podobno aktivnemu mestu trombina. Prisotni sta bazični mesti, ki sta strukturno podobni mestoma za vezavo fibrinogena in heparina (27). Se pa razlikujeta v sestavi hidrofobnega žepa, saj ima faktor Xa na dnu področje z negativnim nabojem. Za razliko od drugih serinskih proteaz je tako faktor Xa sposoben

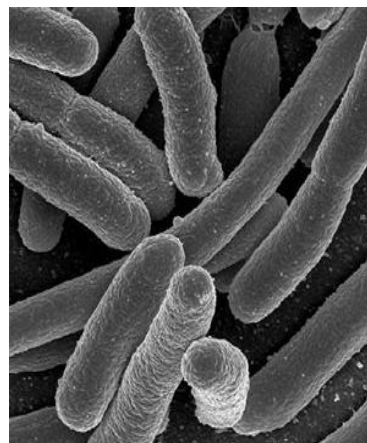
tvorbe kation- π interakcij, kar mu omogoča selektivnost (30). Pri opazovanju kompleksov faktorja Xa z inhibitorji so ugotovili, da so si pozitivno nabite skupine inhibitorjev zelo blizu z indolnim obročem Trp 215. Inhibitorji tripsina se vežejo na enako mesto, zato številni inhibitorji faktorja Xa inhibirajo tudi tripsin in delujejo neselektivno (27).

1.4 DIREKTNI INHIBITORJI TROMBINA IN FAKTORJA Xa

Za preprečevanje strjevanja krvi so že v času Hipokrata uporabljali pijavke. Uporaba se je izkazala za racionalno z odkritjem hirudina, specifičnega direktnega inhibitorja trombina, izoliranega iz slin *Hirudo medicinalis* (razpredelnica III). Iz vrste *Haementeria officinalis* so izolirali antistasin, ki je kompetitiven inhibitor faktorja Xa.

Razpredelnica III: Naravni inhibitorji trombina in faktorja Xa (povzeto po (27, 30))

SPOJINA	IZVORNI ORGANIZEM	MEHANIZEM DELOVANJA
hirudin	<i>Hirudo medicinalis</i> - medicinska pijavka	C-končni del proteina se umesti na vezavno mesto za fibrinogen, N-končni del pa sega v aktivno mesto trombina
hemadin	<i>Haemadipsa sylvestris</i> - indijska pijavka	N-končni del se veže v aktivno mesto trombina, C-končni del pa na vezavno mesto za heparin
triabin	<i>Triatoma pallidipennis</i> - vrsta stenice	veže se na vezavno mesto za fibrinogen
botrojaracin, botroalternin	<i>Bothrops jararaca</i> - vrsta kače (slika 4)	vežeta se na vezavni mesti na trombinu
rodniin	<i>Rhodnius prolixus</i> - vrsta stenice	vezava na aktivno mesto in vezavno mesto za fibrinogen
ornitodorin	<i>Ornithodoros moubata</i> - vrsta mehkega klopa	vezava na aktivno mesto in vezavno mesto za fibrinogen
glicirizin	<i>Glycyrrhiza glabra</i> - sladki koren (slika 3)	veže se na vezavno mesto za fibrinogen
TAP (Tick Anticoagulant peptide)	<i>Ornithodoros moubata</i> - vrsta mehkega klopa	vezava na katalitično mesto faktorja Xa
ekotin	<i>E. coli</i> (slika 5)	inhibitor faktorja Xa
antistasin	<i>Haementeria officinalis</i> - mehiška pijavka	inhibicija prostega faktorja Xa in protrombinaznega kompleksa



Slika 3: *Glycyrrhiza glabra* oz. Golostebelni sladki koren – glicirizin inhibira trombin

Slika 4: *Bothrops jararaca* – strupa botrojaracin in botroalternin se vežeta na trombin

Slika 5: *E. coli* – ekotin inhibira faktor Xa

Največja težava naravnih inhibitorjev je njihova velikost in neprimernost za *p.o.* aplikacijo, zato se so raziskave usmerile v iskanje majhnih reverzibilnih inhibitorjev trombina in faktorja Xa (21, 27). Prvi nizkomolekularni inhibitor trombina je bil efegatran, ki pa se je zelo počasi in močno vezal. Boljšo vezavo so dosegli s prvim peroralnim direktnim inhibitorjem trombina, ksimelagatranom (predzdravilo), ki pa so ga leta 2006 ukinili, saj se je izkazal za hepatotoksičnega (20). Danes se za *p.o.* aplikacijo uporablja dabigatran, parenteralno pa se aplicirata še argatroban in bivalirudin (bivalentni inhibitor – vezava v aktivno mesto in vezavno mesto za fibrinogen).

Neprimeren farmakokinetičen značaj je razlog, da naravni inhibitorji faktorja Xa niso ugodni za uporabo v terapiji (30). Namesto tega se uporabljajo sintetični analogi pentasaharida, ki je potreben za vezavo na antitrombin, kot sta fondaparinuks in idraparinuks. Takšne učinkovine delujejo selektivno samo na faktor Xa, saj so prekratke, da bi lahko povezale antitrombin s trombinom (31). Direktni inhibitorji faktorja Xa so nizkomolekularne, v glavnem peroralno uporabne učinkovine, ki se vežejo neposredno na aktivno mesto faktorja Xa ali na faktor Xa vezan v protrombinski kompleks (30, 31). Trenutno sta v uporabi rivaroksaban in apiksaban (razpredelnica IV). Direktni inhibitorji faktorja Xa imajo nekatere prednosti tudi pred direktnimi inhibitorji trombina. Trombin namreč opravlja več fizioloških funkcij, kar lahko pripomore k pojavnosti stranskih učinkov. Faktor Xa močno vpliva na nastanek tromba, saj lahko preko protrombinaznega kompleksa ena sama molekula povzroči sintezo 138 molekul trombina. Z vezavo na protrombinazni kompleks lahko tako preprečijo kontinuirano sintezo trombina. Podobnost

v zgradbi aktivnega mesta obeh faktorjev je omogočila sintezo dualnih učinkovin, ki delujejo na obe tarči in tako koagulacijo še močneje zavrejo (27).

Razpredelnica IV: Primerjava farmakokinetičnih lastnosti nekaterih učinkovin (povzeto po (21))

UČINKOVINA	DABIGATRAN	RIVAROKSABAN	APIKSABAN	VARFARIN
t_{max}	1.5 - 2 h	2 h	3 - 4 h	5 dni
$t_{1/2}$	12 - 17 h	5 - 9 h	8 - 15 h	36 - 48 h
vezava na plazemske beljakovine	35%	92 - 95 %	87 %	99 %
V_d	60 - 70 L	50 L	majhen	8 L
izločanje preko ledvic	80 %	33 %	25 %	0 %
interakcije	P-gp	P-gp, CYP3A4	P-gp, CYP3A4	CYP2C9, CYP1A2

Direktni inhibitorji trombina in faktorja Xa imajo pred antagonistami vitamina K, ki so še vedno najpogostejše uporabljene antitrombotične učinkovine, kar nekaj prednosti. Učinek nastopi v kratkem času po prejetem odmerku in po ukinitvi terapije pride hitreje do prenehanja delovanja kot npr. pri varfarinu. Korelacija med odmerkom in učinkom je pri direktnih inhibitorjih trombina in faktorja Xa precej bolj jasna. Interakcij s hrano in ostalimi zdravili je manj in rutinski monitoring ni potreben (izjema so ledvični bolniki). Pri varfarinu na drugi strani, je potrebno določiti odmerek za vsakega posameznika posebej, saj se zaradi razlik v presnovi odmerek giba od 0,5 mg pa vse do 20 mg dnevno (21), prav tako so potrebne redne meritve protrombinskega časa. Tudi pojav možganskih krvavitev je v primeru inhibitorjev trombina in faktorja Xa za 50 % manjši kot pri uporabi antagonistov vitamina K. Uporabo direktnih inhibitorjev trombina in faktorja Xa omejujejo ledvične bolezni, saj izločanje v veliki meri poteka preko teh (21).

1.5 INTEGRINI

Integrini so transmembranski receptorji, ki se z zunanjo stranjo vežejo na izvencelične površine, z notranjo stranjo pa so povezani s citoskeletom notranje membrane celice (32). Omogočajo tudi povezave med celicami. Od drugih receptorjev prisotnih na celični membrani se integrini razlikujejo po tem, da ligande vežejo z manjšo afiniteto in so za 10 do 100-krat številnejši. Takšen mehanizem celicam omogoča gibljivost in prepreči nepotrebno ireverzibilno adhezijo na zunajcelični matriks oz. drugo celico. Zraven vezave na zunajcelične površine, je njihova naloga tudi obveščanje celice o površini, na katero je vezana. Sposobni so sprožiti notranjo signalizacijo (33).

Integrini so dimerne molekule, sestavljene iz verige α in β , ki sta med seboj nekovalentno povezani. Poznamo 24 α in 9 β enot, ki v različnih celicah nastopajo v različnih kombinacijah, kar integrinom omogoča selektivno vezavo na zunajcelične površine. Za vezavo je pomembna prisotnost kalcijevih ali magnezijevih kationov. Ti se lahko vežejo tako na α kot na β enoto in pripomorejo k večji afiniteti in selektivnosti za ligande (33). α_{IIb} in β_3 enota sestavljata fibrinogeni receptor.

1.5.1 FIBRINOGENSKI RECEPTOR

Sestavljen je iz glikoproteina IIb (α_{IIb}) in IIIa (β_3), nanj pa se poleg fibrinogena v manjši meri vežejo še fibronektin, vitronektin in von Willebrandov faktor. Aminokislinsko zaporedje zaslužno za vezavo vseh ligandov na GPIIb/IIIa je Arg-Gly-Asp (RGD), za vezavo fibrinogena pa je odgovorno tudi zaporedje Lys-Glu-Ala-Gly-Asp-Val (34).

Na membrani posameznega trombocita je od 40.000 do 80.000 receptorjev (35).

S heterodimerizacijo postanejo aktivni in vežejo fibrinogen, ki je kot dualna molekula sposobna vezave dveh trombocitov (34). Pri nadaljnji koagulaciji nastajajo novi GPIIb/IIIa in se izražajo na membrani trombocita. Trombociti agregirajo in nastane trombus (35).

1.5.1.1 ANTAGONISTI NA FIBRINOGENSKIH RECEPTORJIH

Pomembnost fibrinogenkega receptorja kot tarčo antikoagulantnega zdravljenja so odkrili pri iskanju izvora Glanzmannove bolezni. Pri tej bolezni na površini trombocitov nista prisotna glikoproteina IIb in IIIa, zato ne pride do agregacije trombocitov in bolniki pri poškodbah prekomerno krvavijo (34, 35).

Antagonisti GP IIb/IIIa so se izkazali za boljše zaviralce agregacije kot kombinacija acetilsalicilne kisline in heparina (8). Poznamo tri razrede takšnih učinkovin. V prvi razred spadajo protitelesa proti fibrinogenskem receptorju (8, 36, 37, 38). Uporablja se monoklonsko hibridno mišje-človeško protitelo abciximab, ki se ireverzibilno in nekompetitivno veže na fibrinogeni receptor ter (*in vitro*) neselektivno tudi na vitronektinski receptor (36, 37, 38, 39). V drugi skupini so antagonisti, ki vsebujejo KGD (Lys-Gly-Asp), zaporedje, ki zagotavlja selektivno vezavo na fibrinogeni receptor. V uporabi je ciklični heptapeptid epitifibatid. Tretjo skupino predstavljajo sintezni peptidomimetiki, ki oponašajo prostorsko razporeditev zaporedja RGD (Arg-Gly-Asp). Takšna učinkovina je tirofiban (35). Učinkovine se v večji meri uporabljajo pri nestabilni

angini pectoris (8) in akutnem koronarnem sindromu. Aplicirajo se intravensko (36, 38). Raziskave so usmerjene v iskanje peroralnih antagonistov, vendar so vse potencialne učinkovine izkazale (pre)močno delovanje in povečale nevarnost krvavitve (36).

1.6 VEČTARČNI ANTITROMBOTIKI

Za preprečevanje tromboemboličnih zapletov pri določenih kroničnih boleznih in stanjih je indicirana dolgotrajna ali celo vseživljenjska večtirna antitrombotična terapija. Takšne bolezni sta npr. atrijska fibrilacija in akutni koronarni sindrom (40). V primeru atrijske fibrilacije v kombinaciji z akutnim koronarnim sindromom ali perkutano arterijsko intervencijo pa ob veliki možnosti pojava kapi in majhni možnosti krvavitve, uporabljamo trotirno antitrombotično terapijo (41, 42). Kompliance in kvaliteto življenja bolnikov bi lahko izboljšali z uporabo antitrombotikov, ki bi delovali na več tarč hkrati. Raziskovalci se že več let ukvarjajo z iskanjem oz. sintezo dualnih antikoagulacijskih, dualnih antiagregatornih in dualnih antikoagulacijskih in hkrati antiagregatornih učinkovin (43).

2 NAMEN NALOGE

Naše delo bo potekalo v okviru interdisciplinarnega evropskega projekta MAREX, ki se že od leta 2010 ukvarja z raziskavami morskih organizmov kot potencialnih novih virov zdravilnih učinkovin. Namen naloge je na podlagi biološke aktivnosti poiskati nove molekule z antitrombotičnim delovanjem. Na več načinov bomo čim bolj ekonomično - časovno in finančno - ovrednotili spojine morskega izvora kot vir novih potencialnih antitrombotikov.

Osredotočili se bomo na:

- preverjanje aktivnosti spojin kot potencialnih direktnih inhibitorjev trombina in faktorja Xa,
- selektivnost potencialnih antikoagulantnih učinkovin,
- preverjanje afinitete potencialnih antagonistov do fibrinogeneskega receptorja,
- sestavo ekstraktov in vpliv frakcioniranja ekstraktov na aktivnost in afiniteto.

Za potrditev aktivnosti na serinske proteaze bomo uporabili amidolitično metodo s kromogenimi ekstrakti. Za primerjavo jakosti inhibitorjev bomo izračunali inhibicijske konstante K_i in jih primerjali s konstanto inhibicije direktnega inhibitorja trombina, argatrobana.

Selektivnost inhibitorjev trombina in faktorja Xa bomo določili glede na aktivnost na pankreatično serinsko proteazo, tripsin.

Po principu testa ELISA bomo določili afiniteto spojin do fibrinogeneskega receptorja. Za določitev stopnje zaviranja bomo izračunali kolikšen odstotek receptorjev so zasedli antagonisti in rezultate primerjali z že poznanim antagonistom, tirofibanom.

Pozorni bomo na topnost izoliranih ekstraktov. Vzorce bomo analizirali še s tehniko HPLC z obrnjeno fazo in opazovali sestavo ekstraktov in pa vpliv frakcionacije izvornega ekstrakta na aktivnost .

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV

Prejeli smo 164 kompleksnih ekstraktov morskega izvora, ki so bili ekstrahirani v različna ekstrakcijska topila. V prvi stopnji smo jih raztopili v DMSO oz. v bidestilirani vodi do začetne koncentracije 10 mg/mL. Če topnost ni bila dobra, smo si pomagali z uporabo ultrazvočne kadičke. Če se topnost ni bistveno izboljšala, smo postopoma dodajali topilo in redčili do končnih koncentracij 5; 2,5 oz. do najmanj 1 mg/mL. Tako pripravljene vzorce smo hranili v hladilniku. Končna koncentracija DMSO v mikrotitrski ploščici ni nikjer presegla 5% (v primeru testiranja inhibicije serinskih proteaz) oz. 12 % (v primeru testiranja vezave na fibrinogeni receptor).

3.2 TESTIRANJE INHIBICIJE SERINSKIH PROTEAZ Z AMIDOLITIČNO METODO

3.2.1 MATERIALI IN POGOJI MERJENJA

Materiali in aparature

- Mikrotitrne polistirenske plošče s 96 vdolbinicami
- Avtomatske pipete in nastavki za pipetiranje
- Vibracijski mešalnik
- Ultrazvočna kadička
- Avtomatski čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4
- Laboratorijska steklovina

Reagenti

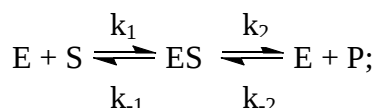
- DMSO
- Demineralizirana voda Milli Q
- Pufer HBSA, pH 7,5
- Humani trombin Sigma Aldrich T7572-250 UN
- Goveji tripsin Sigma Aldrich T9201, ≥ 7500 BAEE enot/mg
- Goveji faktor Xa Chromogenix 71 nkat
- Substrat za trombin Chromogenix S₂₂₃₈
- Substrat za tripsin in faktor Xa Chromogenix S₂₂₂₂

Pogoji merjenja

Absorbanco smo merili pri temperaturi 25°C.

3.3 ENCIMSKA KINETIKA

Potek encimsko katalizirane reakcije lahko zapišemo kot:



kjer je E encim, S substrat, ES kompleks, ki ga tvorita encim in substrat in P produkt. Za nastanek kompleksa ES, morata biti encim in substrat v raztopini. Kompleks ES lahko razpade nazaj na encim in substrat ali pa se pretvori v produkt in prosti encim. Če v raztopini prevladuje substrat, je favoriziran nastanek kompleksa ES.

Začetno hitrost reakcije lahko opišemo z enačbo:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_2 [ES]. \quad (\text{enačba 1})$$

Ko je vzpostavljeno ravnotežje in hitrost nastanka kompleksa ES enaka njegovemu razpadu, lahko definiramo disociacijsko konstanto K_s :

$$K_s = k_{-1}/k_1 = \frac{[E][S]}{[ES]}. \quad (\text{enačba 2})$$

Upoštevajoč

$$[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES] \quad (\text{enačba 3})$$

lahko $[ES]$ izrazimo kot:

$$[ES] = \frac{[E]_{\text{tot}}[S]}{K_s + [S]} \quad (\text{enačba 4})$$

in

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E]_{\text{tot}} [S]}{K_s + [S]} \quad (\text{enačba 5})$$

Pri nizkih koncentracijah substrata, ko je $K_s \gg [S]$, velja:

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E]_{\text{tot}} [S]}{K_s} \quad (\text{enačba 6})$$

In hitrost encimsko katalizirane reakcije hitro narašča.

Pri visokih koncentracijah substrata, ko je $K_s \ll [S]$, velja:

$$v_0 = k_2 \cdot [E]_{\text{tot}} \quad (\text{enačba 7})$$

Vse molekule encima so zasedene s substratom, pride do nasičenja encima in doseže se maksimalna hitrost.

$$v_{\text{max}} = k_2 \cdot [E]_{\text{tot}} \quad (\text{enačba 8})$$

Z upoštevanjem zgornje enačbe lahko iz enačbe 5 izpeljemo:

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (\text{enačba 9})$$

Kinetiko encimske reakcije opisuje Michaelis-Mentenova enačba:

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad (\text{enačba 10})$$

kjer v_0 predstavlja začetno hitrost reakcije pri določeni koncentraciji substrata $[S]$, v_{max} je maksimalna hitrost, K_m pa predstavlja Michaelisovo konstanto. Michaelisova konstanta je v bistvu koncentracija substrata, pri kateri je začetna hitrost enaka polovici maksimalne hitrosti. Specifična je za vsak par encim-substrat in odvisna od več dejavnikov (pH, temperatura, ionska moč...) (25).

Pri reverzibilni kompetitivni inhibiciji encimov lahko potek reakcije opišemo:



+

I



EI ;

kjer je I inhibitor in EI kompleks, ki ga tvorita encim in inhibitor.

Če je koncentracija inhibitorja med reakcijo konstantna in v prebitku v primerjavi z encimom, lahko hitrost reakcije opišemo z enačbo:

$$v_i = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (\text{enačba 11})$$

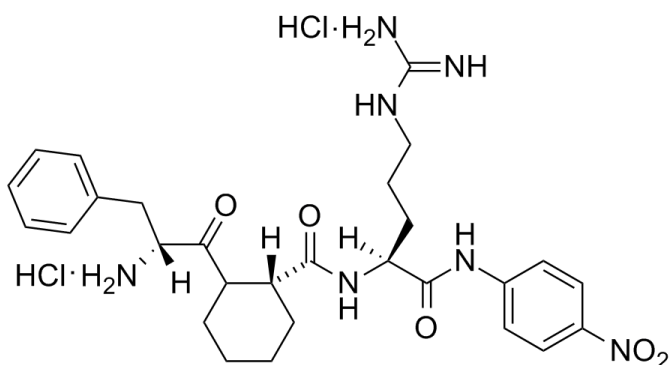
kjer $[I]$ predstavlja koncentracijo inhibitorja, K_i pa predstavlja konstanto inhibicije.

Iz razmerja hitrosti v odsotnosti in prisotnosti inhibitorja lahko izpeljemo enačbo za izračun K_i :

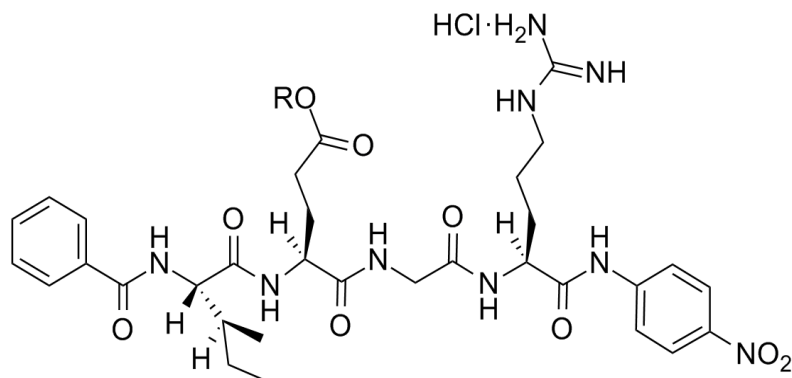
$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{v_0}{v_i} - 1\right) \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)} \quad (\text{enačba 12})$$

3.4 AMIDOLITIČNA METODA IN DOLOČANJE K_i

Amidolitična metoda temelji na cepitvi amidne vezi kromogenega substrata. V primeru testiranja aktivnosti serinskih proteaz mora izbran substrat izkazovati določeno specifičnost za vezavo na encim. Aktiven encim cepi amidno vez v substratu in nastane kromofor, v našem primeru rumeno obarvan *p*-nitroanilin z absorpcijskim maksimumom pri 405 nm. Večja kot je koncentracija encima, hitreje poteka cepitev vezi in več kromofora nastane. Če so prisotni inhibitorji, ki delujejo neposredno na encim, se nastajanje le tega zmanjša. Absorbanca je torej premosorazmerna aktivnosti encima (44).



Slika 6: Kromogeni substrat za trombin



Slika 7: Kromogeni substrat za faktor Xa oz. tripsin

3.4.1 DOLOČANJE K_i ZA TROMBIN, FAKTOR Xa IN TRIPSIN

Slepi vzorec:

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali 100 μL pufra HBSA. Dodali smo 50 μL bidestilirane vode. Inkubirali smo 15 minut pri sobni temperaturi (25°C). Po 15 minutah smo dodali še 50 μL kromogenega substrata za trombin S_{2238} (končna koncentracija 40 μM) (slika 6) oz. v primeru faktorja Xa in tripsina 50 μL kromogenega substrata za faktor Xa in tripsin S_{2222} (končna koncentracija 50 μM) (slika 7), ploščico pretresli, vstavili v spektrofotometer in pri 405 nm valovne dolžine 8 minut kontinuirano merili porast absorbance na vsakih 10 sekund.

Kontrolni vzorec:

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali 50 μL pufra HBSA. Dodali smo 50 μL bidestilirane vode. Dodali smo 50 μL sveže pripravljenega encima (trombin s končno koncentracijo 0.25 E/ml, faktor Xa s končno koncentracijo 0.5 nkat/ml oz. tripsin s končno koncentracijo 1 mE/ml). Inkubirali smo 15 minut pri sobni temperaturi (25°C). Po 15 minutah smo dodali še 50 μL kromogenega substrata za trombin S_{2238} (končna koncentracija 40 μM) oz. v primeru faktorja Xa in tripsina 50 μL kromogenega substrata za faktor Xa in tripsin S_{2222} (končna koncentracija 50 μM), ploščico pretresli, vstavili v spektrofotometer in pri 405 nm valovne dolžine 8 minut kontinuirano merili porast absorbance na vsakih 10 sekund.

Testiran vzorec:

Priprava raztopin inhibitorjev za testiranje na trombin:

- Raztopina spojine v DMSO: 10 mg/ml
18 μL spojine (10 mg/ml) + 132 μL vode $\rightarrow$ 150 μL raztopine 1200 $\mu\text{g/ml}$
(končna k. 300 $\mu\text{g/ml}$)
- Raztopina spojine v DMSO: 5 mg/ml
24 μL spojine (5 mg/ml) + 126 μL vode $\rightarrow$ 150 μL raztopine 800 $\mu\text{g/ml}$
(končna k. 200 $\mu\text{g/ml}$)
- Raztopina spojine v DMSO: 2,5 mg/ml
24 μL spojine (2,5 mg/ml) + 126 μL vode $\rightarrow$ 150 μL raztopine 400 $\mu\text{g/ml}$
(končna k. 100 $\mu\text{g/ml}$)

- Raztopina spojine v DMSO: 1 mg/ml
30 μ L spojine (1 mg/ml) + 120 μ L vode $\rightarrow$ 150 μ L raztopine 200 μ g/ml
(končna k. 50 μ g/ml)

Priprava raztopin inhibitorjev za testiranje na faktor Xa in tripsin:

- Raztopina spojine v DMSO: 10 mg/ml
33 μ L spojine (10 mg/ml) + 242 μ L vode $\rightarrow$ 275 μ L raztopine 1200 μ g/ml
(končna k. 300 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 5 mg/ml
44 μ L spojine (5 mg/ml) + 231 μ L vode $\rightarrow$ 275 μ L raztopine 800 μ g/ml
(končna k. 200 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 2,5 mg/ml
44 μ L spojine (2,5 mg/ml) + 231 μ L vode $\rightarrow$ 275 μ L raztopine 400 μ g/ml
(končna k. 100 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 1 mg/ml
55 μ L spojine (1 mg/ml) + 195 μ L vode $\rightarrow$ 275 μ L raztopine 200 μ g/ml
(končna k. 50 μ g/ml)

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali 50 μ L HBSA pufru. Dodali smo 50 μ L pripravljenih raztopin inhibitorjev s končno koncentracijo 50; 100; 200 ali 300 μ g/mL. Dodali smo 50 μ L sveže pripravljenega encima (trombin s končno koncentracijo 0.25 E/ml, faktor Xa s končno koncentracijo 0.5 nkat/ml oz. tripsin s končno koncentracijo 1 mE/ml. Inkubirali smo 15 minut pri sobni temperaturi (25°C). Po 15 minutah smo dodali še 50 μ L kromogenega substrata za trombin S₂₂₃₈ (končna koncentracija 40 μ M) oz. v primeru faktorja Xa in tripsina 50 μ L kromogenega substrata za faktor Xa in tripsin S₂₂₂₂ (končna koncentracija 50 μ M), ploščico pretresli, vstavili v spektrofotometer in pri 405 nm valovne dolžine 8 minut kontinuirano merili porast absorbance na vsakih 10 sekund.

Vsako meritev smo izvedli v dvojniku in v primeru velikih odstopanj smo meritve ponovili. Prav tako smo meritve ponovili v primeru dobre inhibicije trombina in faktorja Xa. V primeru izjemno dobre inhibicije smo meritve opravili še pri nižjih koncentracijah

inhibitorjev. Za izračun konstant inhibicije po enačbi (12) smo uporabili povprečni količnik med v_0 in v_i ob predpostavki, da imamo čiste spojine z molekulsko maso 500 g/mol.

V začetku testiranja smo ugotovili, DMSO vpliva na rezultate meritev v primeru faktorja Xa in v manjši meri tudi v primeru tripsina, zato smo v naslednjih ploščicah ovrednotili tudi vpliv samega DMSO v uporabljenih koncentracijah (3; 4 in 5 %) na delovanje faktorja Xa in tripsina. Naš spremenjen kontrolni vzorec je torej vseboval DMSO in K_i smo izračunali iz razmerja hitrosti v_{DMSO}/v_i . V primeru faktorja Xa smo v primeru dobre inhibicije meritve opravili še pri 1 % koncentraciji DMSO.

3.4.2 DOLOČANJE SELEKTIVNOSTI

Zaradi podobnosti vezavnih mest tripsina in tripsinu podobnima serinskima proteazama trombina in faktorja Xa, smo želeli preveriti kakšna je selektivnost direktnih inhibitorjev trombina glede na tripsin in faktor Xa. Podobno smo želeli preveriti kakšna je selektivnost direktnih inhibitorjev Xa glede na tripsin in trombin. Selektivnost smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$\text{selektivnost (Trb glede na Try)} = \frac{K_i(\text{Try})}{K_i(\text{Trb})} \quad (\text{enačba 13})$$

$$\text{selektivnost (FXa glede na Try)} = \frac{K_i(\text{Try})}{K_i(\text{FXa})} \quad (\text{enačba 14})$$

3.5 TESTIRANJE ZAVIRANJA VEZAVE FIBRINOGENA NA FIBRINOGENSKE RECEPTORJE Z IMUNOKEMIJSKIM TESTOM

3.5.1 MATERIALI IN POGOJI MERJENJA

Materiali in aparature

- Mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami – bele (*Greiner, Lumitrac 600 high-binding microtiter plates*)
- Avtomatske pipete in nastavki za pipetiranje
- Vibracijski mešalnik
- Ultrazvočna kadička
- Avtomatski čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4
- Laboratorijska steklovina

Reagenti

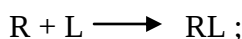
- DMSO, Sigma Aldrich
- Demineralizirana voda Milli Q
- Humani integrin IIb/IIIa, Calbiochem (osnovna koncentracija 2,38 mg/mL)
- Pufer BSA
- Pufer za ploščice (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM MnCl_2 , pH uravnan s 5 M HCl do pH 7,4)
- Pufer za spiranje (na 1 L pufera za ploščice dodan 1 mL Tween-a)
- Humani fibrinogen, Calbiochem, pred uporabo biotiniliran (osnovna koncentracija 1,76 μM)
- Kozja protitelesa proti biotinu konjugirana s hrenovo peroksidazo, Calbiochem
- Kemoluminiscenčni ELISA substrat, Roche
 - Substrat A: luminol in 4-jodofenol
 - Substrat B: H_2O_2

Pogoji merjenja

Absorbanco smo merili pri temperaturi 25°C.

3.5.2 MODEL VEZAVE LIGANDA NA RECEPTOR

Vezavo liganda na receptor lahko v splošnem opišemo z enačbo:



kjer je R receptor, L ligand in RL kompleks med receptorjem in ligandom. Vezava je odvisna od števila receptorjev, koncentracije liganda in pa afinitete vezave. Merilo za afiniteto je disociacijska konstanta K_d , ki jo izračunamo po naslednji enačbi:

$$K_d = \frac{[\text{L}] \cdot [\text{R}]}{[\text{LR}]} = \frac{[\text{L}] \cdot ([\text{R}]_{\text{tot}} - [\text{LR}])}{[\text{LR}]} ; \quad (\text{enačba 15})$$

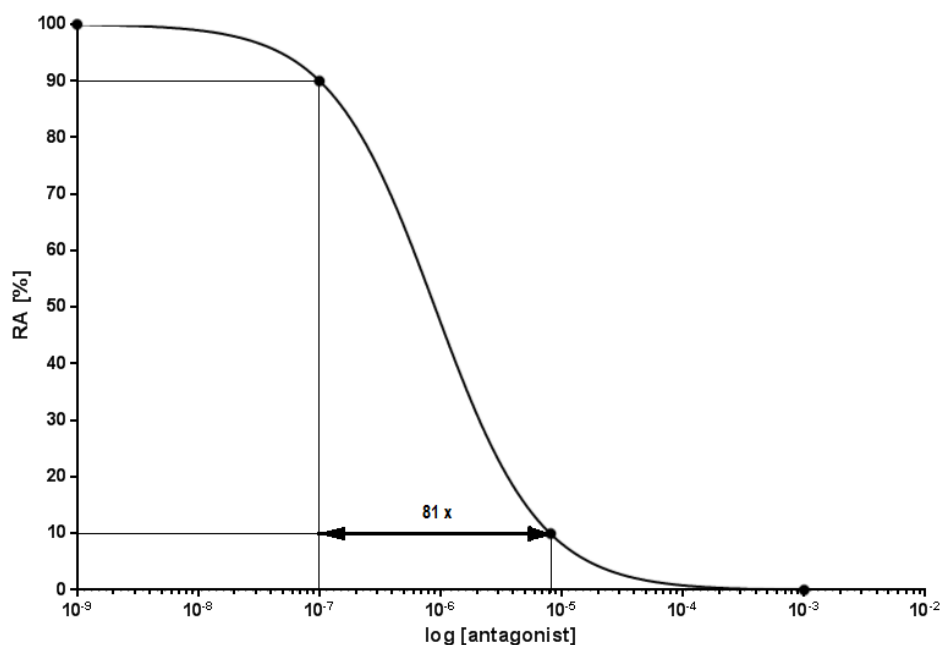
kjer je [L] koncentracija prostega liganda, [R] koncentracija prostega receptorja in [LR] koncentracija kompleksa med ligandom in receptorjem. K_d predstavlja koncentracijo liganda, pri kateri je zasedenost receptorjev 50 %. Večja kot je K_d , nižja je afiniteta liganda do receptorja (45). Zasedenost receptorja izračunamo po enačbi:

$$\text{zasedenost R} = \frac{[\text{LR}]}{[\text{R}]_{\text{tot}}} = \frac{[\text{L}]}{K_d + [\text{L}]} ; \quad (\text{enačba 16})$$

V prisotnosti antagonista, parcialnega ali inverznega agonista se odziv ob enaki koncentraciji nativnega liganda zmanjša. Če gre za kompetitivno vezavo, se zmanjša tudi sama vezava nativnega liganda. Odziv, ki ga povzroči vezava liganda na receptor, lahko opišemo s štiri-parametrično enačbo:

$$\text{Odziv} = D + \frac{V-D}{1+10^{(\log EC_{50}-x)*h}}; \quad (\text{enačba 17})$$

Kjer je D najmanjši odziv, torej odziv v odsotnosti liganda (intrinzična aktivnost receptorja), V največji odziv, torej odziv, ko so vsi receptorji zasedeni z ligandom, EC_{50} koncentracija agonista, ki povzroči 50 % odziv med najmanjšim in največjim možnim odzivom, x koncentracija agonista in h Hillov koeficient. Krivulja, ki opiše odziv v odvisnosti od koncentracije liganda, ima v primeru enega vezavnega mesta sigmoidno obliko, njen naklon pa je odvisen od Hillovega koeficienta. Višji kot je, bolj strma je krivulja in obratno. Če je Hillov koeficient višji od 1, pomeni, da z vsako vezano molekulo liganda, hitrost vezave naslednjih molekul narašča. Obratno se zgodi pri koeficientu manjšem od 1. Veliko ligandov povzroči rast odziva s Hillovim koeficientom 1, torej afiniteta vezave naslednjih molekul ni pogojena s predhodno vezanimi molekulami. V tem primeru velja, da bo koncentracija liganda, ki povzroči 90 % odziv, 81-krat višja od koncentracije, ki povzroči 10 % odziv (slika 8) (46).



Slika 8: Krivulja odvisnosti RA od logaritemske koncentracije kompetitivnega antagonista (povzeto po 46)

V primeru antagonizma ob nespremenjeni koncentraciji liganda in z višanjem koncentracije antagonista, se odziv manjša – krivulja pada. Če gre za kompetitiven antagonizem, znaša Hillov koeficient -1. Če je na receptorju samo eno vezavno mesto in se tako ligand kot antagonist reverzibilno vežeta, v ravnotežju velja (46):

$$\text{Odziv} = D + \frac{V-D}{1+10^{(\log IC_{50}-x)*h}}; \quad (\text{enačba 18})$$

Kjer je IC_{50} koncentracija antagonista, ki povzroči 50 % manjšo vezavo nativnega liganda. Ker znaša Hillov koeficient v primeru kompetitivnega antagonizma -1, lahko enačbo preoblikujemo:

$$\text{Odziv} = D + \frac{V-D}{1+10^{(x-\log IC_{50})}}. \quad (\text{enačba 19})$$

Za oceno vezave potencialnih antagonistov smo uporabili štiri-parametrsko enačbo v programu GraphPad Prism 6.

3.5.3 MERJENJE ZASEDENOSTI FIBRINOGENSKIH RECEPTORJEV Z IMUNOKEMIJSKIM TESTOM

Slepi vzorec

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali 100 μL pufru za ploščice in pustili preko noči pri 4°C. Naslednji dan smo pufer izlili, ploščice dobro posušili in v vsako vdolbinico odpipetirali 200 μL pufru z 1 % BSA. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi. Dvakrat po 2 minuti smo spirali s pufrom za spiranje. Pripravili smo raztopino biotiniziranega fibrinogena (2,4 ml osnovne 1,76 μM raztopine fibrinogena v 17,6 ml pufru za ploščice). V vsako vdolbinico smo dodali 50 μL tako pripravljene raztopine fibrinogena in 50 μL pufru za ploščice ter pustili stati 2 uri pri sobni temperaturi. Nanešena koncentracija fibrinogena je znašala 0,11 μM oz. 36 $\mu\text{g/mL}$. Ponovno smo spirali dvakrat po dve minuti s pufrom za spiranje. V vsako vdolbinico smo dodali 100 μL raztopine protiteles proti biotinu v pufru z 0,1 % BSA in pustili stati 1 uro pri sobni temperaturi. Spirali smo trikrat po 5 minut s pufrom za spiranje. Dodali smo po 50 μL kemoluminiscenčnega reagenta ter mešali 15 minut in nato pomerili kemoluminiscenco.

Kontrolni vzorec

60 μL fibrinogenskih receptorjev osnovne koncentracije 2,38 mg/mL smo razredčili v 41 mL pufru za ploščice in po 100 μL odpipetirali v mikrotitrne plošče (končna koncentracija 3,48 $\mu\text{g/mL}$). Preko noči smo jih shranili pri 4°C. Naslednji dan smo izlili raztopino

integrina, ploščice dobro posušili in v vsako vdolbinico odpipetirali 200 μ L pufra z 1 % BSA puffer, da smo pokrili nespecifična vezavna mesta. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi. Dvakrat po 2 minuti smo spirali s pufrom za spiranje. Pripravili smo raztopino biotiniliranega fibrinogena (2,4 ml osnovne 1,76 μ M raztopine fibrinogena v 17,6 ml pufra za ploščice). V vsako vdolbinico smo dodali 50 μ L tako pripravljene raztopine fibrinogena in 50 μ L DMSO (končne konc. 4, 8, 10 in 12 %) ter pustili stati 2 uri pri sobni temperaturi. Končna koncentracija fibrinogena je znašala 0,11 μ M oz. 36 μ g/mL. Ponovno smo spirali dvakrat po dve minuti s pufrom za spiranje. V vsako vdolbinico smo dodali 100 μ L raztopine protiteles proti biotinu v pufu z 0,1 % BSA pufu in pustili stati 1 uro pri sobni temperaturi. Spirali smo trikrat po 5 minut s pufrom za spiranje. Dodali smo po 50 μ L kemoluminiscenčnega reagenta ter mešali 15 minut in nato pomerili kemoluminiscenco.

Primerjalni vzorec

60 μ L fibrinogenskih receptorjev osnovne koncentracije 2,38 mg/mL smo razredčili v 41 mL pufra za ploščice in po 100 μ L odpipetirali v mikrotitrne plošče (končna koncentracija 3,48 μ g/mL). Preko noči smo jih shranili pri 4°C. Naslednji dan smo izlili raztopino integrina, ploščice dobro posušili in v vsako vdolbinico odpipetirali 200 μ L pufra z 1 % BSA, da smo pokrili nespecifična vezavna mesta. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi. Dvakrat po 2 minuti smo spirali s pufrom za spiranje. Pripravili smo raztopino biotiniliranega fibrinogena (2,4 ml osnovne 1,76 μ M raztopine fibrinogena v 17,6 ml pufra za ploščice). V vsako vdolbinico smo dodali 50 μ L tako pripravljene raztopine fibrinogena in 50 μ L tirofibana v končnih koncentracijah 0,1; 0,5 in 2 nM. Končna koncentracija fibrinogena je znašala 0,11 μ M oz. 36 μ g/mL. Zmes smo premešali in pustili stati 2 uri pri sobni temperaturi. Ponovno smo spirali dvakrat po dve minuti s pufrom za spiranje. V vsako vdolbinico smo dodali 100 μ L raztopine protiteles proti biotinu v pufu z 0,1 % BSA pufu in pustili stati 1 uro pri sobni temperaturi. Spirali smo trikrat po 5 minut s pufrom za spiranje. Dodali smo po 50 μ L kemoluminiscenčnega reagenta ter mešali 15 minut in nato pomerili kemoluminiscenco.

Testiran vzorec

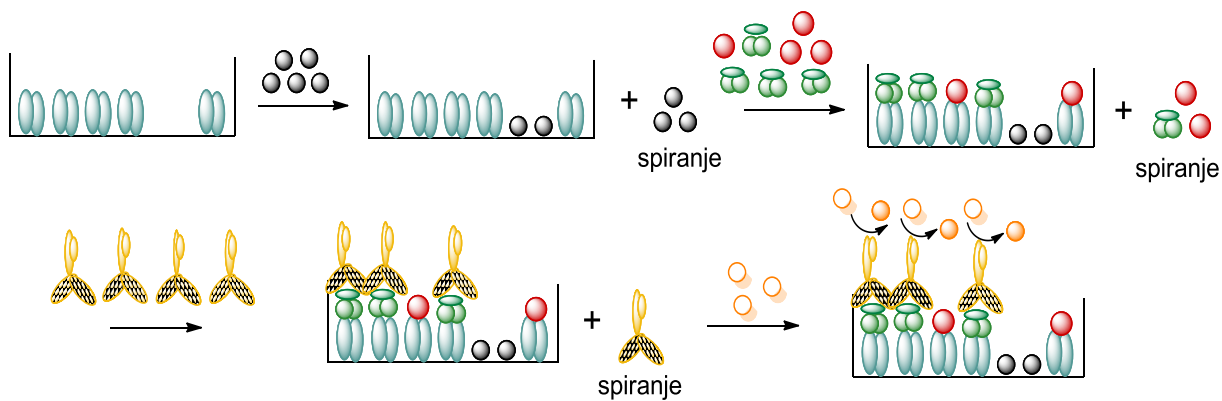
Priprava raztopin inhibitorjev:

- Raztopina spojine v DMSO: 10 mg/ml
28 μ L spojine (10 mg/ml) + 147 μ L vode $\rightarrow$ 175 μ L raztopine 1600 μ g/ml
(končna k. 800 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 5 mg/ml
35 μ L spojine (5 mg/ml) + 140 μ L vode $\rightarrow$ 175 μ L raztopine 1000 μ g/ml
(končna k. 500 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 2,5 mg/ml
42 μ L spojine (2,5 mg/ml) + 133 μ L vode $\rightarrow$ 175 μ L raztopine 600 μ g/ml
(končna k. 300 μ g/ml)
- Raztopina spojine v DMSO: 1 mg/ml
35 μ L spojine (1 mg/ml) + 140 μ L vode $\rightarrow$ 175 μ L raztopine 200 μ g/ml
(končna k. 100 μ g/ml)

60 μ L fibrinogenских receptorjev osnovne koncentracije 2,38 mg/mL smo razredčili v 41 mL pufru za ploščice in po 100 μ L odpipetirali v mikrotitrne plošče (končna koncentracija 3,48 μ g/mL). Preko noči smo jih shranili pri 4°C. Naslednji dan smo izlili raztopino integrina, ploščice dobro posušili in v vsako vdolbinico odpipetirali 200 μ L pufru z 1 % BSA, da smo pokrili nespecifična vezavna mesta. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi. Dvakrat po 2 minuti smo spirali s pufrom za spiranje. Pripravili smo raztopino biotiniliranega fibrinogena (2,4 ml osnovne 1,76 μ M raztopine fibrinogena v 17,6 ml pufru za ploščice). V vsako vdolbinico smo dodali 50 μ L tako pripravljene raztopine fibrinogena in 50 μ L potencialnih antagonistov, premešali in pustili stati 2 uri pri sobni temperaturi. Končna koncentracija fibrinogena je znašala 0,11 μ M oz. 36 μ g/mL. Ponovno smo spirali dvakrat po dve minuti s pufrom za spiranje. V vsako vdolbinico smo dodali 100 μ L raztopine protiteles proti biotinu v pufru z 0,1 % BSA in pustili stati 1 uro pri sobni temperaturi. Spirali smo trikrat po 5 minut s pufrom za spiranje. Dodali smo po 50 μ L kemoluminiscenčnega reagenta ter mešali 15 minut in nato pomerili kemoluminiscenco (slika 9).

Vsako meritev smo izvedli v dvojniku. Ker že sam DMSO nekoliko zniža vezavo fibrinogena, smo pomerili v kolikšni meri je to prisotno pri določeni uporabljeni

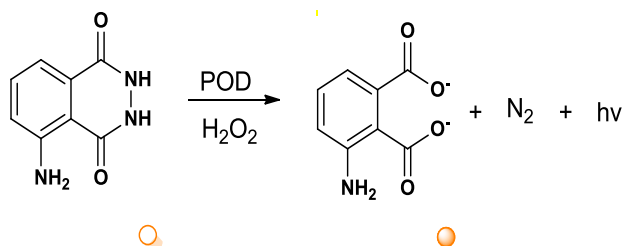
koncentraciji in to upoštevali pri določitvi vezave biotiniliranega fibrinogena. Za izračun vezave na receptor pri 100 $\mu\text{g/mL}$ smo uporabili GraphPad Prism program, kjer smo upoštevali *enačbo 18*.



LEGENDA

-  fibrinogeni receptor
-  BSA
-  biotiniliran fibrinogen
-  potencialni antagonist
-  Ab proti biotinu konjugirano s POD
-  kemoluminiscenci reagent

reagent A (luminol in 4-jodofenol) + reagent B (H_2O_2)



Slika 9: Shematičen prikaz imunokemijskega testa na trdnem nosilcu

3.6 HPLC

Večina spojin so bili frakcionirani ekstrakti originalnih ekstraktov. Z metodo HPLC z obrnjeno fazo smo želeli preveriti kakšna je sestava vzorca, koliko spojin je prisotnih in kako frakcionacija vpliva na aktivnost spojin ter okvirno ovrednotiti, katere frakcije so odgovorni za aktivnost.

5 μ L vzorcev, ki smo jih pripravili za testiranje na fibrinogeni receptor, smo razredčili na 500 μ L z demineralizirano vodo.

Preizkusili smo več različnih metod za HPLC analizo. Spreminjali smo vrsto kolone, temperaturo, topila, gradient topil in čas trajanja analizne metode. Pri vseh ekstraktih smo želeli uporabiti enako metodo z univerzalnimi pogoji. Izbrana metoda se je izkazala za najbolj učinkovito, saj nam je pri največ ekstraktih uspelo ločiti vrhove.

Metoda

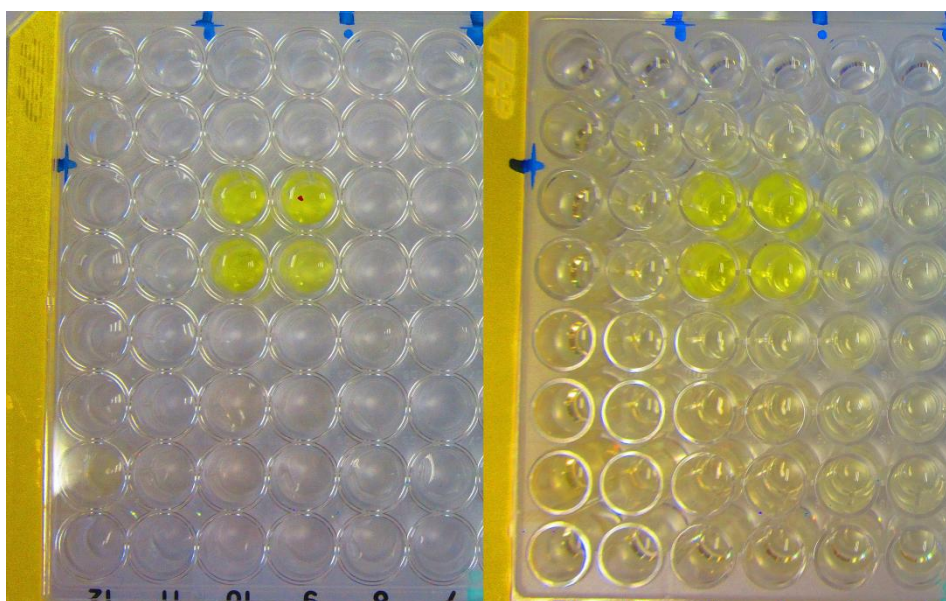
- Topilo: voda in acetonitril; 2 min 5 % ACN, 8 min 50 % ACN, 14 min 90 % ACN, 15 min 95 % ACN
- Kolona: Eclipse plus C18; 5 μ m 4,6 mm x 150 mm
- Temperatura: sobna
- Injiciran volumen: 20 μ L
- Čas: 20 min
- Valovna dolžina: $\lambda_1 = 220$ nm, $\lambda_2 = 254$ nm, $\lambda_3 = 280$ nm.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Testirali smo 164 ekstraktov oz. frakcioniranih ekstraktov morskega izvora. Nismo poznali sestave in čistosti spojin, prav tako za večino vzorcev nismo poznali izvirnega organizma in postopka ekstrakcije. V prvi stopnji dela smo znano maso posameznega ekstrakta raztopili v ustreznem volumnu topila (DMSO ali prečiščena voda), tako da smo dobili raztopino v koncentraciji 10 mg/mL. Če se spojina ni raztopila, smo nadalje redčili do koncentracije 5; 2,5 oz. 1 mg/mL. Pri raztapljanju smo si pomagali z ultrazvokom.

Za vsak ekstrakt smo testirali aktivnost na trombin, tripsin, faktor Xa in fibrinogenški receptor, torej smo opravili 656 testov.

Za testiranje aktivnosti na serinske proteaze smo uporabili amidolitično metodo. V prisotnosti in odsotnosti potencialnih inhibitorjev smo pri 405 nm izmerili porast absorbance v linearnem začetnem delu Michaelis-Mentenove krivulje, ki je bil premosorazmeren s hitrostjo nastanka rumeno obarvanega *p*-nitroanilina (slika 10) po encimsko katalizirani cepitvi kromogenega substrata ($v = dA/dt$). Metodo so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani že predhodno preizkusili v okviru diplomskih in magistrskih nalog (44). Za izračun konstant inhibicije smo uporabili povprečni količnik med v_0 in v_i ob predpostavki, da imamo čiste spojine z molekulsko maso 500 g/mol.



Slika 10: Mikrotitrna ploščica pred nanosom in 10 minut po nanosu kromogenega substrata

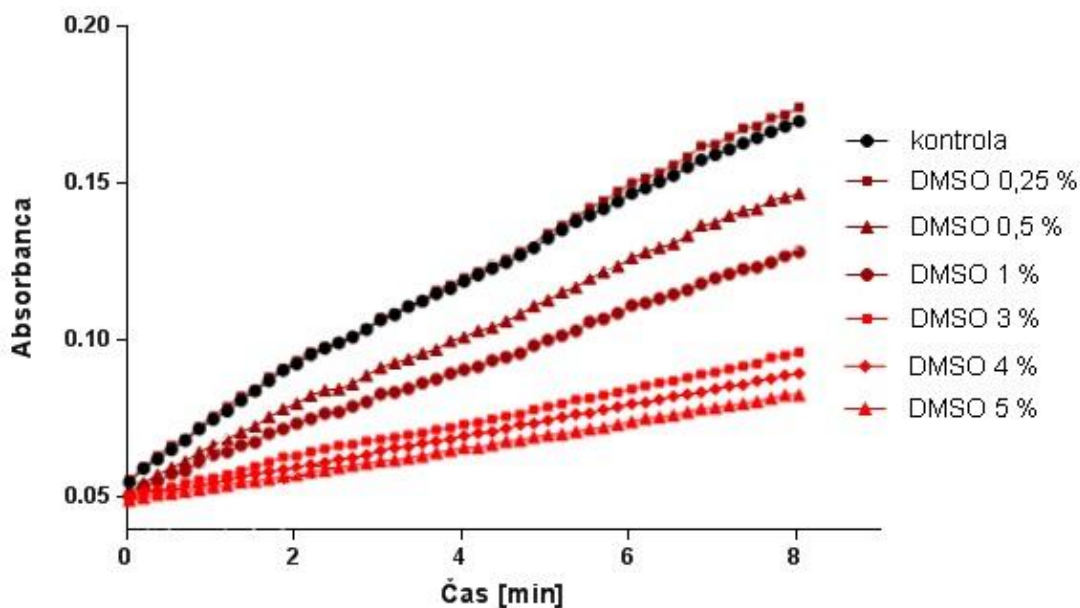
Za testiranje potencialnega antagonizma smo uporabili imunokemijski *in vitro* test, kjer smo označen vezan ligand detektirali s kemoluminiscenčno reakcijo. Tudi to metodo so že preizkusili na katedri za farmacevtsko kemijo (47).

4.1 REZULTATI TESTIRANJA AKTIVNOSTI NA SERINSKE PROTEAZE IN FIBRINOGENSKI RECEPTOR

Ker so bili naši vzorci naravne spojine in nam sestava in čistost nista bili poznani, smo kot potencialne inhibitorje obravnavali vse spojine, ki so dosegle konstanto inhibicije pod 300 μM pri predpostavki, da imamo čisto spojino z molekulsko maso 500 g/mol. Aktivne spojine smo razvrstili v štiri razrede s K_i do vključno 10 μM , K_i od 10 μM do vključno 50 μM , K_i od 50 μM do vključno 100 μM ter K_i od 100 μM do vključno 300 μM .

V primeru fibrinogenskega receptorja smo med aktivne spojine šteli tiste, ki so pri 100 $\mu\text{g/mL}$ (oz. pri 0,2 mM ob predpostavki, da imamo spojino s 500 g/mol) povzročile 70 % ali manjšo vezavo nativnega liganda. Aktivne spojine smo razdelili v štiri razrede, in sicer v razred pri katerem je bila vezava biotiniliranega fibrinogena 20 % ali manj, v razred pri katerem je bila vezava biotiniliranega fibrinogena večja od 20 % in manjša ali enaka 30 %, v razred pri katerem je bila vezava biotiniliranega fibrinogena večja od 30 % in manjša ali enaka 50 % in v razred pri katerem je bila vezava biotiniliranega fibrinogena manjša ali enaka 70 %.

V primeru faktorja Xa smo ugotovili, da ga pri visokih koncentracijah inhibira že sam DMSO, zato smo izmerili še inhibicijo faktorja Xa pri različnih koncentracijah DMSO (slika 11). Ugotovili smo, da v koncentracijah 3; 4 in 5 % v/v precej inhibira faktor Xa, njegov vpliv se pa občutno zmanjša pri 1 % koncentraciji. Rezultate smo korigirali in za izračun K_i namesto v_0/v_i uporabili količnike v_{DMSO}/v_i –spremenili smo kontrolni vzorec. Da bi se karseda znebili vpliva DMSO, smo pri spojinah, pri katerih smo zaznali potencialno aktivnost, naknadno pripravili še raztopine s končno koncentracijo DMSO 1 % in jih testirali še pri nižjih koncentracijah potencialnih inhibitorjev (100; 50; 25; 10 $\mu\text{g/mL}$). Če bi pomerili aktivnost ekstraktov pri 0,25 % koncentraciji DMSO, kjer ni več vpliva na meritve, bi bila koncentracija potencialnih inhibitorjev prenizka in mogoče zaradi tega ne bi zaznali aktivnosti.



Slika 11: Graf inhibicije faktorja Xa z DMSO

Tudi v primeru tripsina smo ugotovili, da ga inhibira že sam DMSO, vendar ne v tolikšni meri kot faktor Xa. Rezultate smo korigirali enako kot rezultate inhibicije faktorja Xa.

Za testiranje afinitete do fibrinogeneskega receptorja smo uporabili kompetitiven *in vitro* imunokemijski test. Nativni ligand (fibrinogen) je bil označen z biotinom, in po dodatku s peroksidazo označenih protiteles ter kemoluminiscenčnega reagenta smo merili kemoluminiscenco. Večja kot je bila, več biotiniziranega fibrinogena se je vezalo na fibrinogenske receptorje in manjša je bila afiniteta preiskovanih spojin in obratno.

Pri testiranju smo ugotovili, da že sam DMSO v odsotnosti potencialnih antagonistov zniža vezavo fibrinogena. Ker smo delali še v nekoliko višjih koncentracijah DMSO in zaradi predhodnih težav pri testiranju na encimski tarči, smo DMSO v ustreznih koncentracijah že vključili v kontrolni vzorec. Vezavo biotiniziranega fibrinogena smo izračunali kot:

$$\text{Zasedenost R} = \frac{\text{Signal testnega vzorca} - \text{signal slepega vzorca}}{\text{Signal DMSO} - \text{signal slepega vzorca}} \quad (\text{enačba 20})$$

Zaradi boljše preglednosti so rezultati podani v razpredelnici, kjer ima vsaka spojina glede na razred aktivnosti v katerega se uvršča, svojo pripadajočo barvo. Zraven aktivnosti so v tabeli še barva raztopine vzorca v DMSO oz. prečiščeni vodi, izhodna koncentracija in izračunana selektivnost glede na tripsin. Nižja kot je izhodna koncentracija, slabša je topnost spojine v topilu (razpredelnica V).

LEGENDA:

 $K_i < 10 \mu\text{M}$; $< 20 \% \text{ RA @ } 100 \mu\text{g/ml}$ **$K_i < 50 \mu\text{M}$; $< 30 \% \text{ RA @ } 100 \mu\text{g/ml}$** **$K_i < 100 \mu\text{M}$; $< 50 \% \text{ RA @ } 100 \mu\text{g/ml}$** **$K_i < 300 \mu\text{M}$; $< 70 \% \text{ RA @ } 100 \mu\text{g/ml}$**

Prazna polja predstavljajo neaktivne spojine. Z NT so označeni ekstrakti, ki se niso popolnoma raztopili.

Razpredelnica V: Rezultati testiranja podani v barvni karti.

Spojina	Trb	FXa	Try	Fbr rec.	Barva	konc. založne raztopine (mg/mL)	Selektivnost Trb	Selektivnost FXa
MX-TK-001					svetlo rumena	10	1	/
MX-TK-002					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-003					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-004					svetlo rumena	2,5	1	/
MX-TK-005					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-006					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-007					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-008					rahlo rumena	10	3	/
MX-TK-009					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-010					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-011					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-012					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-013					rumena-rjava	10	/	/
MX-TK-014					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-015					brezbarvna	2,5	/	/
MX-TK-016					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-017					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-018					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-019					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-020					svetlo rumena	5	/	/
MX-TK-021					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-022					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-023					brezbarvna	2,5	/	/
MX-TK-024					rumena	10	/	/

Spojina	Trb	FXa	Try	Fbr rec.	Barva	konc. založne raztopine (mg/mL)	Selektivnost Trb	Selektivnost FXa
MX-TK-025					rumena	10	7	/
MX-TK-026					rumena	5	/	/
MX-TK-027					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-028					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-029					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-030					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-031					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-032					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-033					rumena	10	44	/
MX-TK-034					temno rumena	10	/	/
MX-TK-035					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-036					rumena	10	/	/
MX-TK-037					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-038					rumena	10	/	/
MX-TK-039					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-040					rumena	10	/	/
MX-TK-041					temno rumena	5	/	/
MX-TK-042					rumena	10	/	/
MX-TK-043					rumena	10	/	/
MX-TK-044					oranžnorumena	10	281	/
MX-TK-045					oranžnorumena	10	/	/
MX-TK-046					rumena	2,5	/	/
MX-TK-047					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-048					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-049					rahlo rumena	10	/	/
MX-TK-050					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-051					svetlo rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-052					rumena	10	/	/
MX-TK-053					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-054					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-055					rumena	10	/	/
MX-TK-056					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-057					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-058					svetlo rumena	10	32	/
MX-TK-059					svetlo rumena	10	/	/

Spojina	Trb	FXa	Try	Fbr rec.	Barva	konc. založne raztopine (mg/mL)	Selektivnost Trb	Selektivnost FXa
MX-TK-060					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-061					/	NT (1)	/	4
MX-TK-062					zelenorjava	10	/	/
MX-TK-063					zelenorjava	10	/	/
MX-TK-064					temno zelena	10	/	/
MX-TK-065					temno zelena	NT (1)	/	/
MX-TK-066					rumenozelena	10	108	/
MX-TK-067					zelena, skoraj črna	10	10	/
MX-TK-068					zelena, skoraj črna	10	3	/
MX-TK-069					zelena, skoraj črna	10	3	/
MX-TK-070					zelena, skoraj črna	5	9	/
MX-TK-071					/	NT (1)	/	1
MX-TK-072					rumena	10	8	1
MX-TK-073					rjavordeča	10	10	/
MX-TK-074					rjavordeča	10	6	/
MX-TK-075					rjavordeča	10	2	0
MX-TK-076					/	NT (1)	/	/
MX-TK-077					/	NT (1)	/	/
MX-TK-078					/	NT (1)	14	/
MX-TK-079					/	NT (1)	16	1
MX-TK-080					/	NT (1)	17	/
MX-TK-081					/	NT (1)	/	/
MX-TK-082					/	NT (1)	11	/
MX-TK-083					/	NT (1)	14	/
MX-TK-084					/	NT (1)	233	/
MX-TK-085					/	NT (1)	32	/
MX-TK-086					/	NT (1)	3	0
MX-TK-087					/	NT (1)	11	0
MX-TK-088					/	NT (1)	7	/
MX-TK-089					/	NT (1)	5	/
MX-TK-090					/	NT (1)	12	/
MX-TK-091					/	NT (1)	5	/
MX-TK-092					/	NT (1)	/	/
MX-TK-093					oranžnorjava	10	9	/
MX-TK-094					oranžnorjava	10	8	/

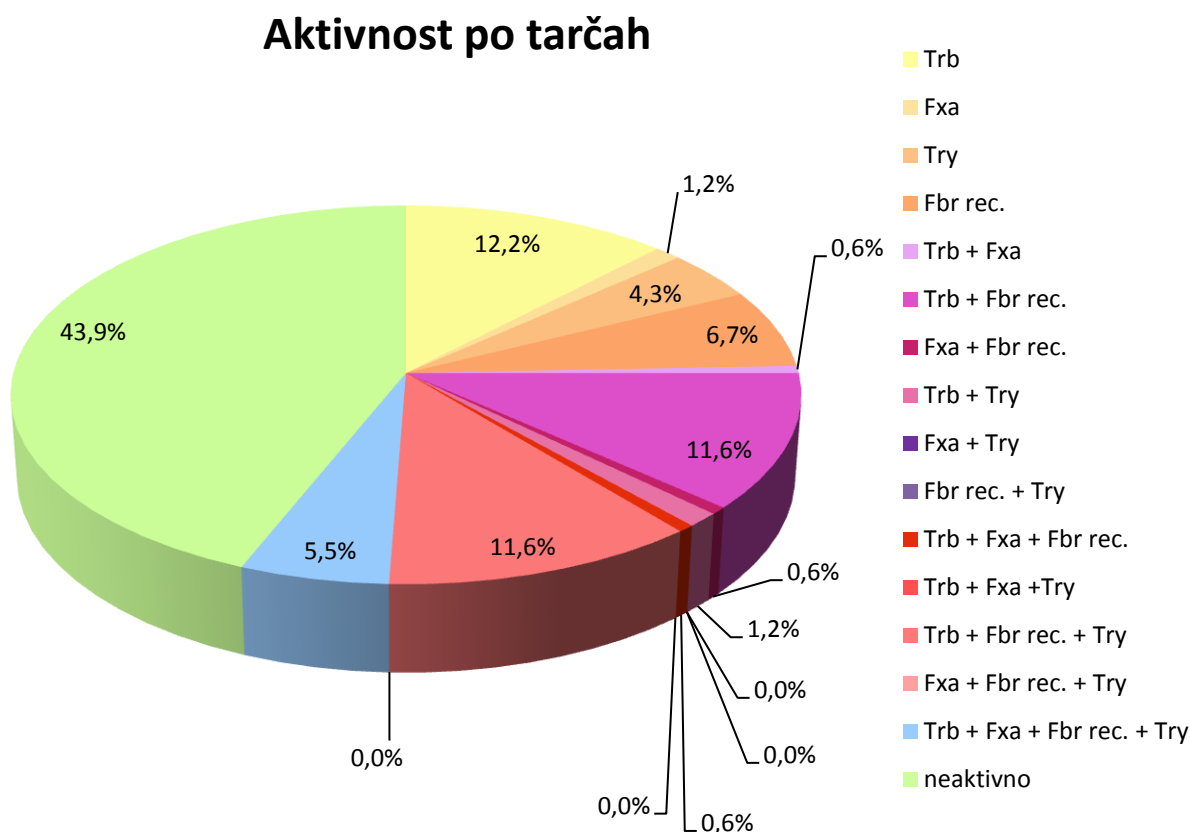
Spojina	Trb	FXa	Try	Fbr rec.	Barva	konc. založne raztopine (mg/mL)	Selektivnost Trb	Selektivnost FXa
MX-TK-095					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-096					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-097					rumenozelena	10	9	/
MX-TK-098					rumena	10	9	/
MX-TK-099					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-100					temno rumena	5	/	/
MX-TK-101					rumena	10	/	/
MX-TK-102					temno zelena	10	36	/
MX-TK-103					rumena	10	29	/
MX-TK-104					rumena	5	/	/
MX-TK-105					rumena	10	/	/
MX-TK-106					rumena	10	/	/
MX-TK-107					rumena	10	12	/
MX-TK-108					rumena	10	/	/
MX-TK-109					rumena	5	192	/
MX-TK-110					rumena	10	/	/
MX-TK-111					svetlo rumena	10	47	/
MX-TK-112					rumena	10	9	/
MX-TK-113					rumena	5	/	/
MX-TK-114					oranžnorumena	2,5	6	/
MX-TK-115					oranžnorjava	10	9	/
MX-TK-116					oranžnorjava	10	63	/
MX-TK-117					rjava	10	5	/
MX-TK-118					rjava	10	15	/
MX-TK-119					rjava	10	9	/
MX-TK-120					rjava	10	12	0
MX-TK-121					rdečerjava	10	7	0
MX-TK-122					rdečerjava	10	13	1
MX-TK-123					rjava	10	1	/
MX-TK-124					rjava	10	84	0
MX-TK-125					brezbarvna	10	/	/
MX-TK-126					rumenkasta	10	/	/
MX-TK-127					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-128					svetlo rumena	10	7	/
MX-TK-129					umazano oranžna	10	/	/

Spojina	Trb	FXa	Try	Fbr rec.	Barva	konc. založne raztopine (mg/mL)	Selektivnost Trb	Selektivnost FXa
MX-TK-130					svetlo rumena	10	/	/
MX-TK-131					rumenkasta	2,5	12	/
MX-TK-132					oranžnorjava	10	6	/
MX-TK-133					oranžnorjava	10	15	/
MX-TK-134					rumena	10	23	/
MX-TK-135					rumena	10	9	/
MX-TK-136					rumenorjava	10	2	0
MX-TK-137					oranžnorjava	10	12	/
MX-TK-138					rjava	10	9	1
MX-TK-139					rumena	NT (1)	2	/
MX-TK-140					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-141					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-142					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-143					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-144					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-145					rumena	NT (1)	/	1
MX-TK-146					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-147					rumena	NT (1)	65	/
MX-TK-148					rumena	NT (1)	85	/
MX-TK-149					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-150					rumena	NT (2,5)	28	/
MX-TK-151					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-152					rumena	NT (1)	56	/
MX-TK-153					rumena	NT (2,5)	125	/
MX-TK-154					rumena	NT (2,5)	347	/
MX-TK-155					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-156					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-157					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-158					rumena	NT (1)	/	/
MX-TK-159					oranžnorumena	10	54	/
MX-TK-160					oranžnorumena	10	5	/
MX-TK-161					oranžnorumena	10	6	/
MX-TK-162					oranžnorumena	10	6	/
MX-TK-163					oranžnorumena	10	503	/
MX-TK-164					oranžnorumena	10	/	/

4.2 RAZPRAVA

4.2.1 AKTIVNOST

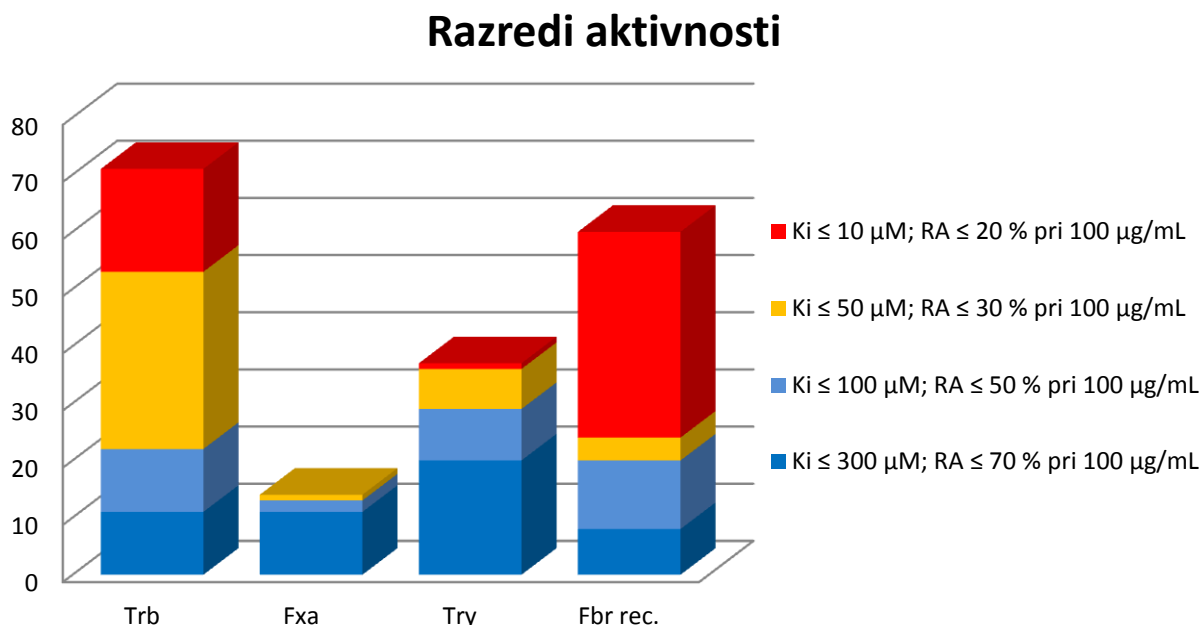
Ugotovili smo, da je 92 spojin izkazovalo aktivnost na vsaj eno tarčo, 9 spojin pa je neselektivno inhibiralo vse štiri tarče. 23 spojin je bilo aktivnih na dve tarči, od tega 19 na trombin in fibrinogeni receptor, ena na fibrinogeni receptor in faktor Xa, dve na trombin in tripsin, ena pa je bila potencialen dualni inhibitor trombina in faktorja Xa. 19 spojin je bilo aktivnih hkrati na trombin, tripsin in fibrinogeni receptor, ena pa na trombin, faktor Xa in fibrinogeni receptor. 20 spojin je bilo selektivno aktivnih na trombin, dve pa na faktor Xa in 11 na fibrinogeni receptor (slika 12).



Slika 12: Aktivnost spojin glede na posamezne tarče

Med potencialnimi inhibitorji trombina je bilo 22 spojin s $K_i \leq 10 \mu\text{M}$, 33 spojin pa s $K_i \leq 50 \mu\text{M}$. 18 spojin je imelo $K_i \leq 100 \mu\text{M}$, 12 pa jih je bilo s $K_i \leq 300 \mu\text{M}$. Skupno je bilo potencialnih inhibitorjev trombina 85. Med potencialnimi inhibitorji faktorja Xa je bilo 12 spojin, od tega 1 spojina s $K_i \leq 50 \mu\text{M}$, 2 spojini s $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ in 9 spojin s $K_i \leq 300 \mu\text{M}$. Med potencialnimi antagonisti fibrinogenkega receptorja je bilo kar 36 spojin, pri

katerih je bila vezava fibrinogena manjša ali enaka 20 %, 4 spojine so dopustile 20 do 30 % vezavo fibrinogena, pri 12 spojinah je bila vezava fibrinogena med 30 in 50 % in pri 8 spojinah med 50 in vključno 100 % (slika 13).



Slika 13: Aktivnost na posamezne tarče glede na jakostni razred K_i in rezidualno aktivnost pri 100 $\mu\text{g/mL}$ potencialnega antagonista

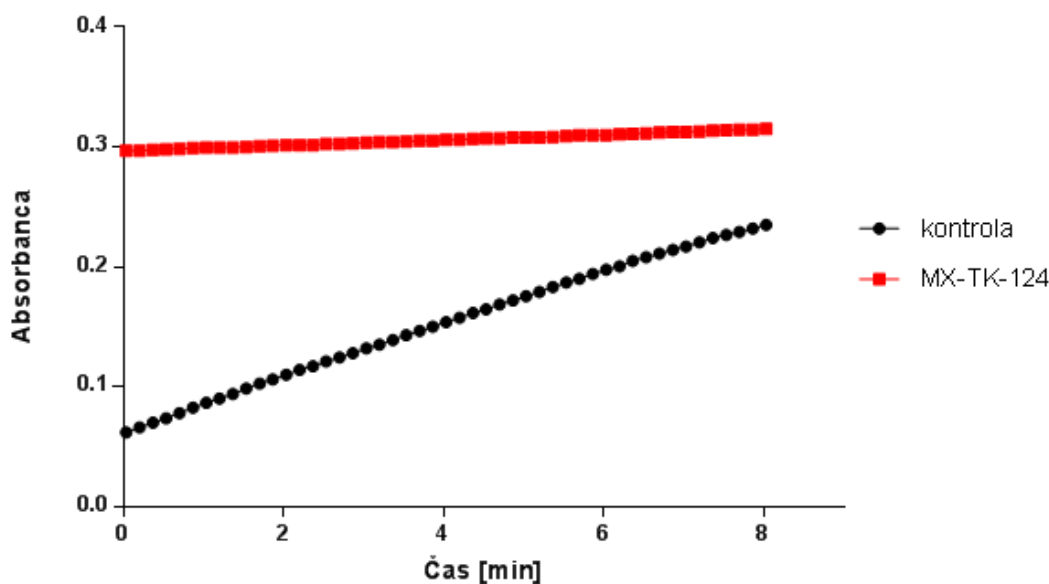
4.2.2 SELEKTIVNOST NA TROMBIN IN FAKTOR Xa GLEDE NA TRIPSIN

Spojinam, ki so izkazovale aktivnost na trombin, faktor Xa ali oba encima, smo izračunali selektivnost glede na tripsin po *enačbah* 4 in 6. 11 spojin 50-krat močnejše inhibira trombin kot tripsin, najbolj pa izstopajo predvsem spojine MX-TK-163, ki 503-krat močnejše inhibira trombin kot tripsin, MX-TK-154, ki 347-krat močnejše inhibira trombin kot tripsin, MX-TK-044, ki 281-krat močnejše inhibira trombin kot tripsin, in spojina MX-TK-84, ki 233-krat močnejše inhibira trombin kot tripsin. Nobena spojina ni selektivno inhibirala faktorja Xa.

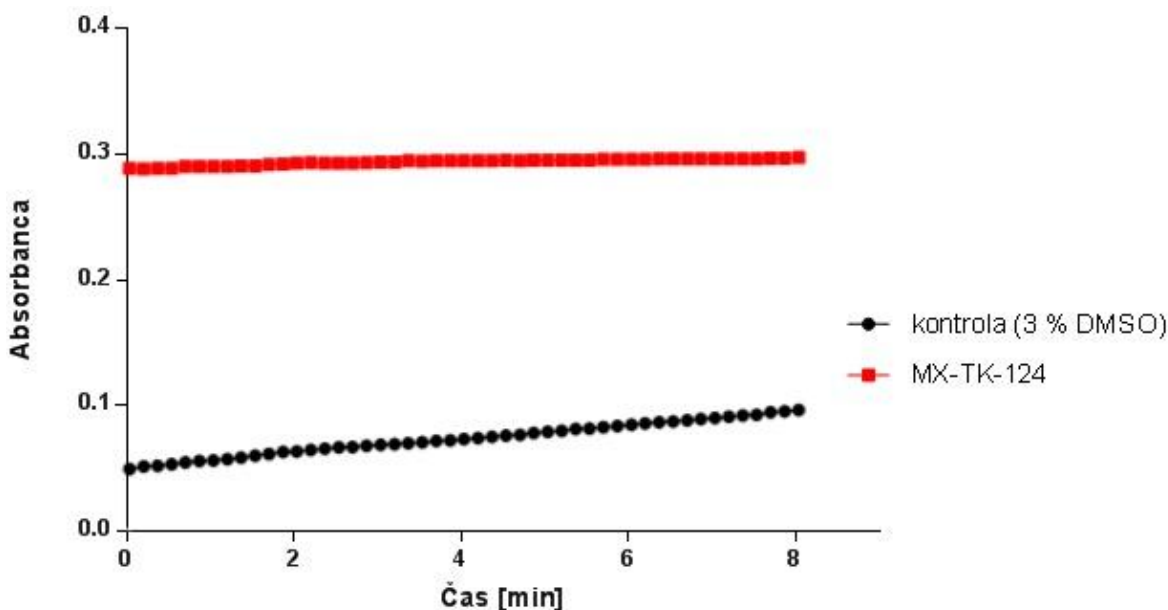
4.2.3 POTENCIALNE SPOJINE Z ANTITROMBOTIČNIM UČINKOM

Največjo aktivnost na trombin je izkazovala sicer spojina MX-TK-124 (slika 14 in slika 15). Poleg trombina je bila dobro aktivna še na fibrinogeni receptor (pri 100 mg/mL je vezanega 1,8 % fibrinogena) in šibko aktivna na faktor Xa. Njen K_i za trombin je znašal $3,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Za primerjavo lahko vzamemo K_i argatrobana, ki so ga na Katedri za

farmacevtsko kemijo že predhodno določili z enako metodo in je znašal $0,009 \pm 0,0007 \mu\text{M}$ (44). Najboljšo selektivnost za trombin (med encimskimi tarčami) izkazuje spojina MX-TK-163, njena K_i pa znaša $7,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ in je tako zraven spojine MX-TK-154 s K_i $6,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ najbolj obetaven potencialni inhibitor trombina. Hkrati je dober potencialen antagonist fibrinogeneskega receptorja, medtem ko spojina MX-TK-154 izkazuje aktivnost samo na trombin. Ostale dobro selektivne spojine imajo K_i nad $50 \mu\text{M}$, vendar je potrebno poudariti, da ne gre za čiste spojine in da ne vemo kolikšna je dejanska koncentracija molekule, ki je odgovorna za aktivnost.

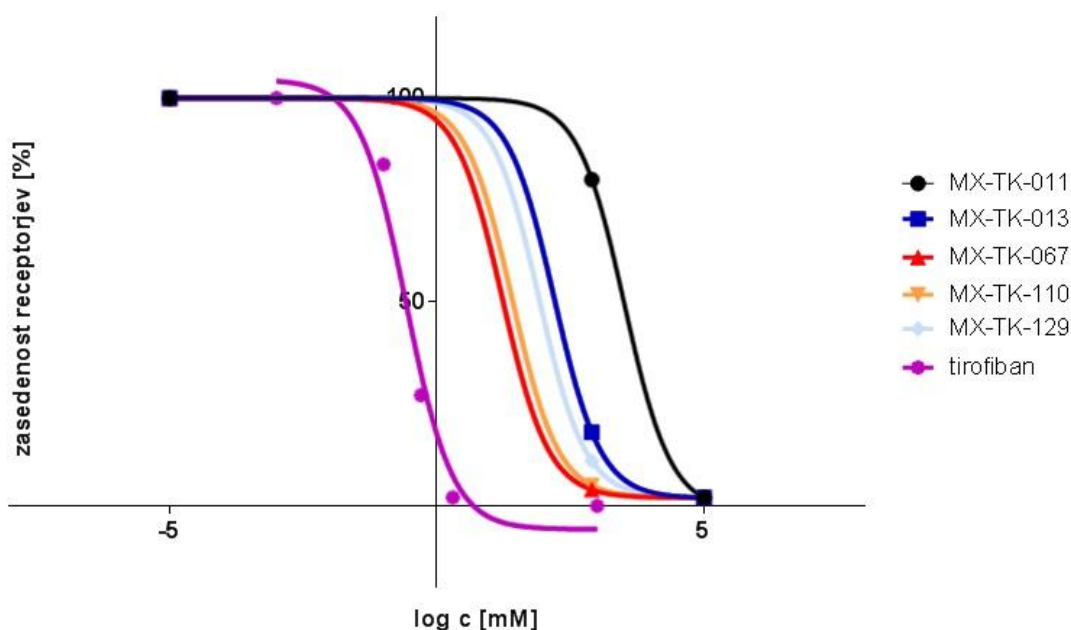


Slika 14: Graf in hibicije trombina z MX-TK-124



Slika 15: Graf in hibicije faktorja Xa z MX-TK-124 v 3 % DMSO

Dobri potencialni in selektivni antagonisti fibrinogenškega receptorja, so bile spojine MX-TK-046 (pri 100 $\mu\text{g/mL}$ 1,8 % zasedenost s fibrinogenom) in MX-TK-164 (pri 100 $\mu\text{g/mL}$ 2,1 % zasedenost s fibrinogenom) in spojina MX-TK-077 (pri 100 $\mu\text{g/mL}$ 9,6 % zasedenost s fibrinogenom). Med potencialnimi (morda) dualnimi antitrombotiki z dobrim delovanjem na trombin in fibrinogenški receptor je najbolj izstopala spojina MX-TK-163, zasedenost s fibrinogenom je bila namreč 1,7 %, K_i na trombin pa $7,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Ostali učinkoviti potencialni antagonisti fibrinogenškega receptorja so bili neselektivni. Slika 16 prikazuje krivulje zasedenosti receptorjev z biotiniliranim fibrinogenom v odvisnosti od logaritemske vrednosti koncentracije potencialnih antagonistov.



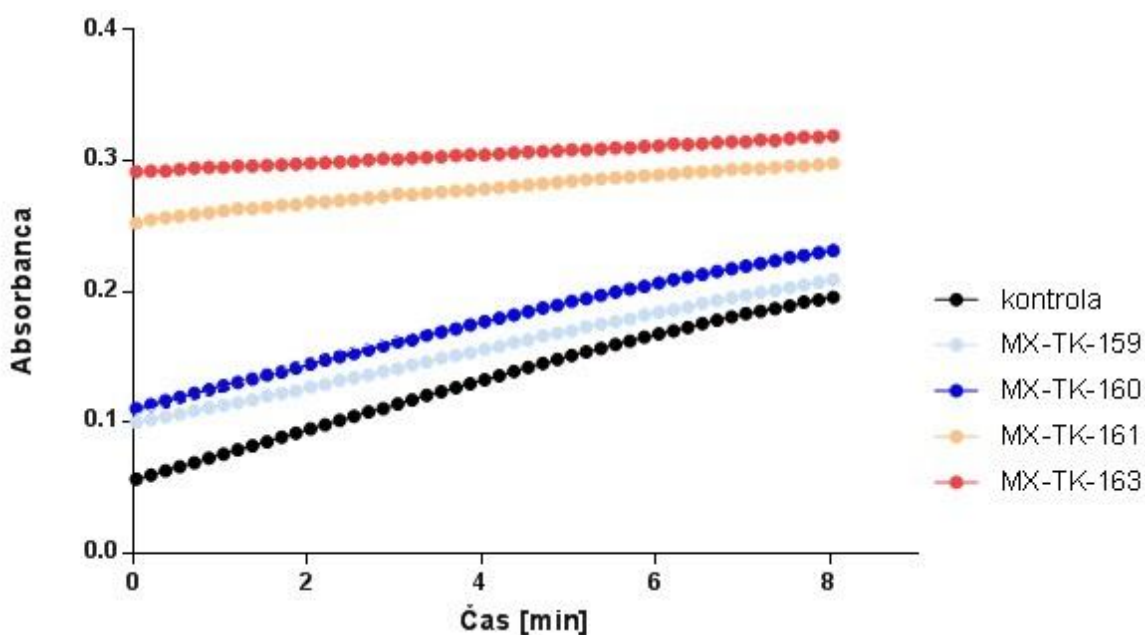
Slika 16: Potencialni antagonisti fibrinogenškega receptorja

Ekstrakti MX-TK-075, MX-TK-079, MX-TK-086, MX-TK-087, MX-TK-120, MX-TK-121, MX-TK-122, MX-TK-136 in MX-TK-138 so izkazovali aktivnost na vse štiri tarče. Najverjetneje so v teh ekstraktih prisotne spojine, ki na različne načine motijo *in vitro* teste (PAINS – *Pan-Assay INterference compoundS*). Lahko npr. neposredno motijo signale (npr. intenzivno obarvane spojine), lahko porušijo strukturo proteinov ali tvorijo agregate (7).

Ekstrakt MX-TK-124 je izkazoval delovanje na vse tarče, razen tripsina. Če je aktivnost posledica ene same spojine, je takšna spojina zelo zanimiva za morebiten razvoj več-tarčne

učinkovine. Uporabnost takšne spojine bi lahko bila omejena zaradi povečane možnosti pojava krvavitev.

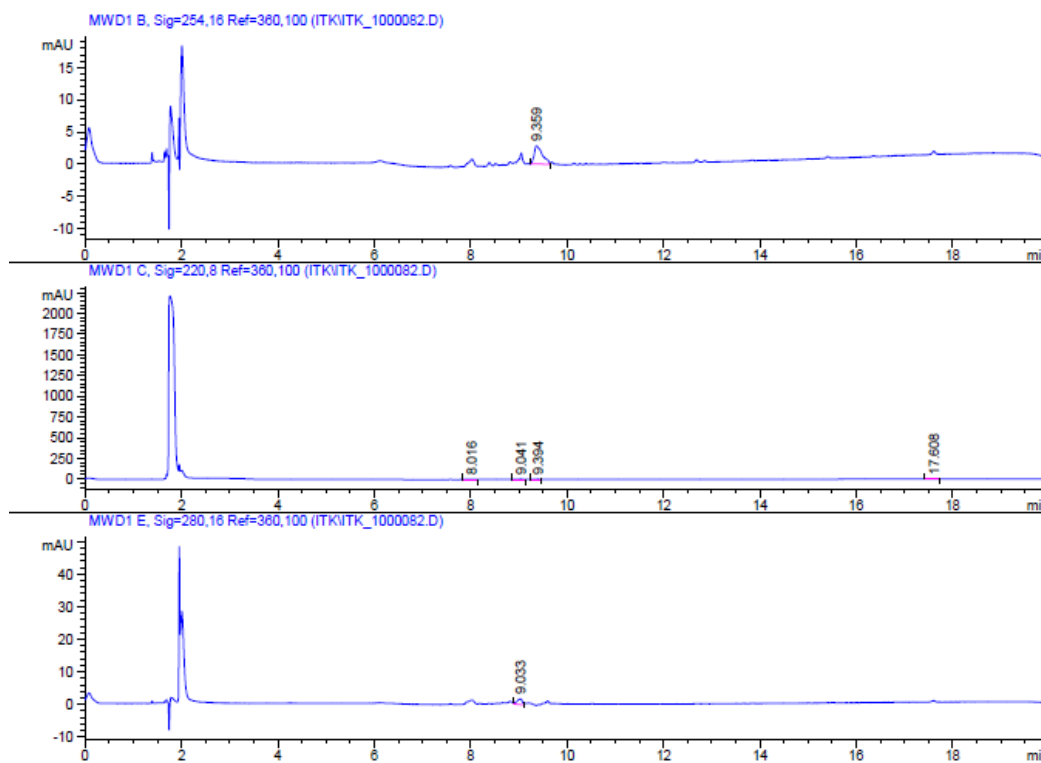
Kot potencialni antitrombotiki so posebej zanimive spojine od MX-TK-159 do MX-TK-160, za katere vemo, da so ekstrakti izolirani iz istega organizma (slike 17 - 23). MX-TK-159 je primarni ekstrakt, MX-TK-160 je ostanek v vodi, ostali ekstrakti pa so bili ekstrahirani v različna topila. Vidimo lahko, da spojine niso aktivne na faktor Xa. Aktivnost na trombin in fibrinogeni receptor je pri primarnem ekstraktu najnižja, kar je v nasprotju s pričakovanji. Predvidevamo, da so prisotne tudi spojine, ki motijo delovanje potencialnih inhibitorjev trombina oz. antagonistov fibrinogenega receptorja. V vodnem preostanku več ni spojine aktivne na trombin, lahko sklepamo, da je slabše topna v vodi, kar bi lahko bila potencialna nova aktivna spojina, saj so pri razvoju edinega registriranega direktnega peroralno aktivnega inhibitorja trombina dabigatrana imeli težave ravno zaradi visoke polarosti in manjše biološke uporabnosti. Danes se uporablja v obliki predzdravila dabigatran eteksilata (48).



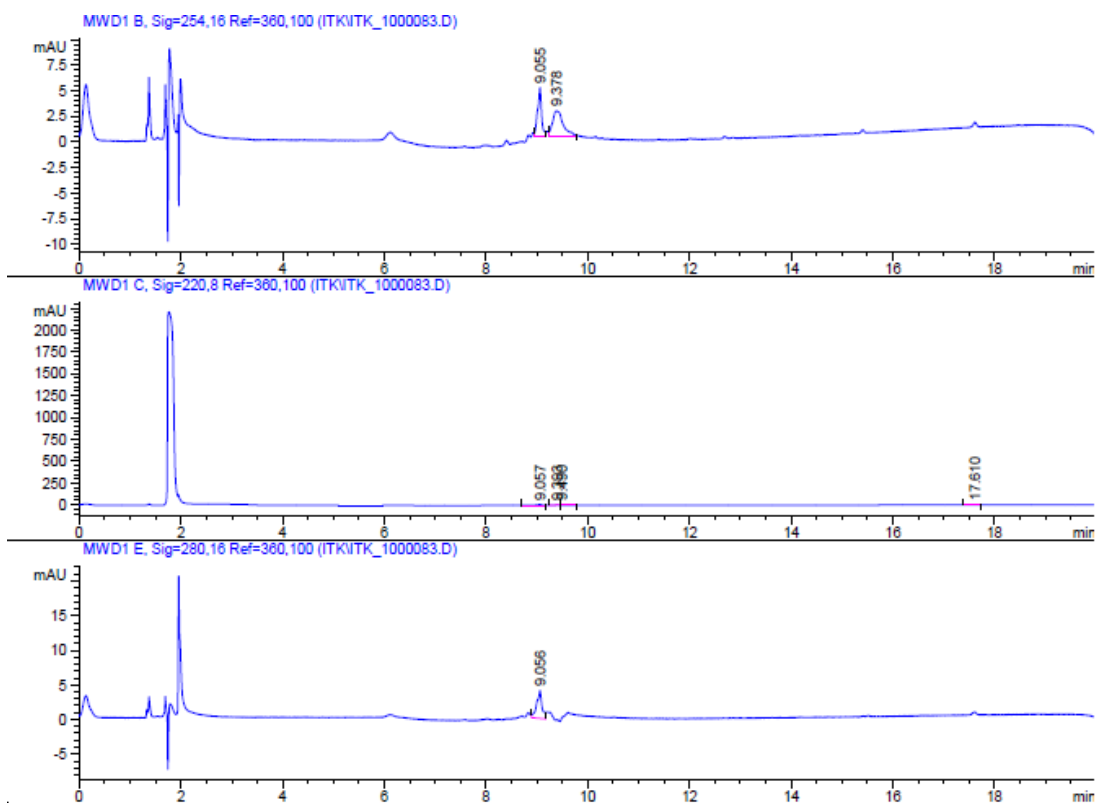
Slika 17: Graf inhibicije trombina s frakcioniranimi ekstrakti enakega izvornega organizma

4.2.2 SESTAVA EKSTRAKTOV

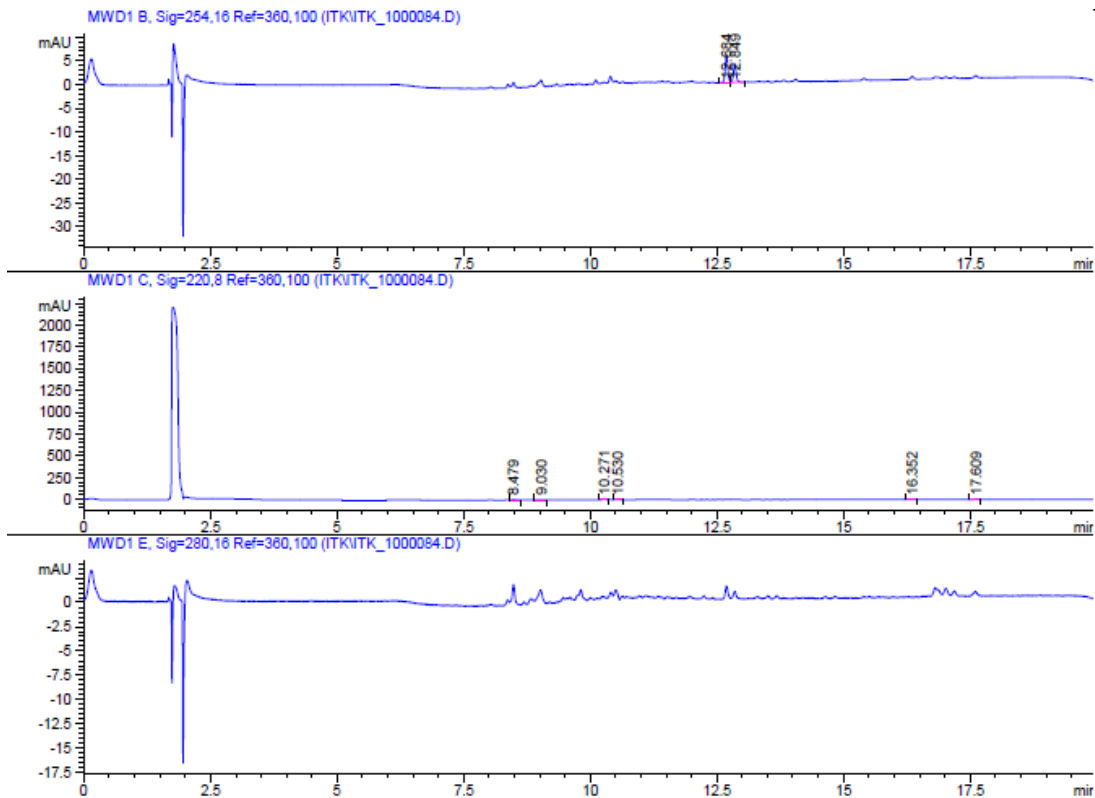
S HPLC z obrnjeno fazo smo želeli ugotoviti kakšna je sestava ekstraktov, kako frakcionacija primarnega ekstrakta vpliva na aktivnost oz. če se v vzorcih, ki izhajajo iz istega izvornega ekstrakta pojavlja enaka spojina, ki bi lahko bila odgovorna za aktivnost in bi jo bilo v naslednjih stopnjah potrebno izolirati in dodatno ovrednotiti. Za veliko število vzorcev nismo poznali izvornega organizma in postopkov ekstrakcije. Z izbrano metodo nismo dobili rezultatov, ki bi nakazali, katere spojine bi lahko bile odgovorne za aktivnost, saj so ekstrakti zelo kompleksni. Pri kromatogramih posameznih ekstraktov je opaznih veliko vrhov, ki se niso dobro ločili ali pa jih ni oz. imajo zelo majhno AUC. V prvem delu do spojine MX-TK-067 so bili spektri prazni ali s posameznimi vrhovi z majhno AUC. Sklepamo lahko, da ti vzorci niso vsebovali komponent, ki bi jih lahko zaznali z UV detektorjem in te spojine tudi niso izkazovale (visoke) aktivnosti. Spektri preostalih spojin so imeli veliko vrhov, kar je za pričakovati pri naravnih ekstraktih. Opazili smo, da je bilo pri spojinah, ki so izkazovale boljšo aktivnost oz. so nespecifično delovale na več tarč, s HPLC zaznanih več vrhov in obratno pri neaktivnih spojinah.



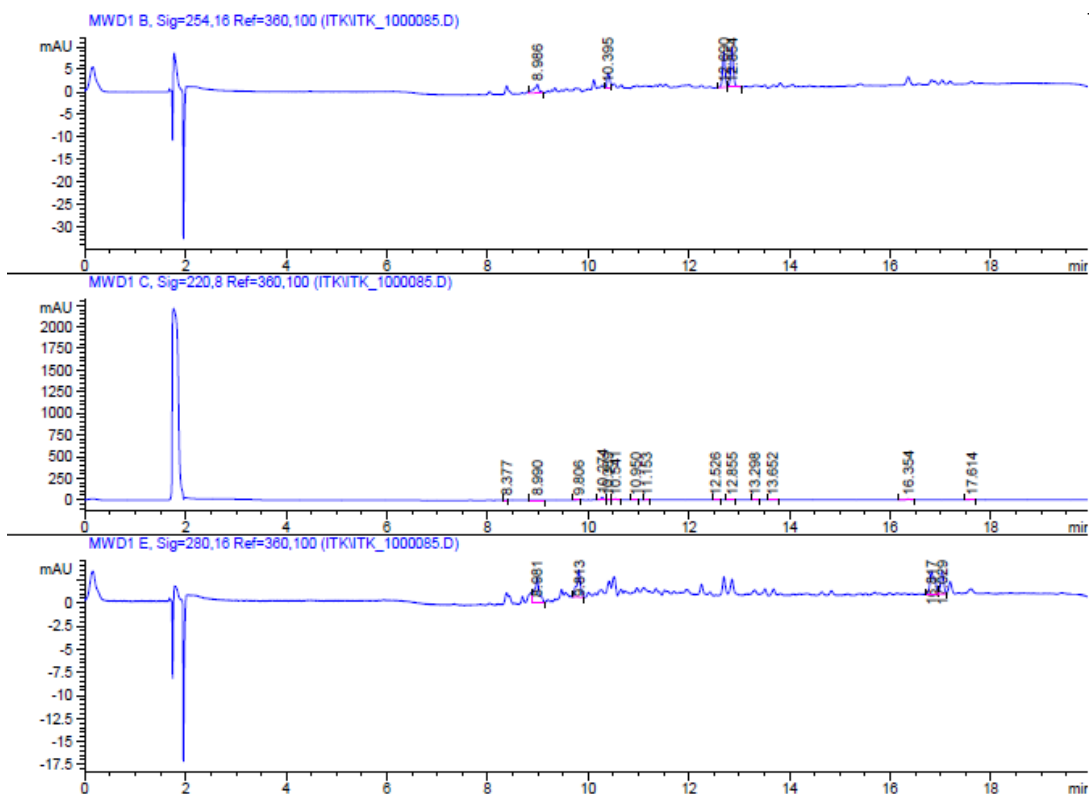
Slika 18: HPLC spektri spojine MX-TK-159 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)



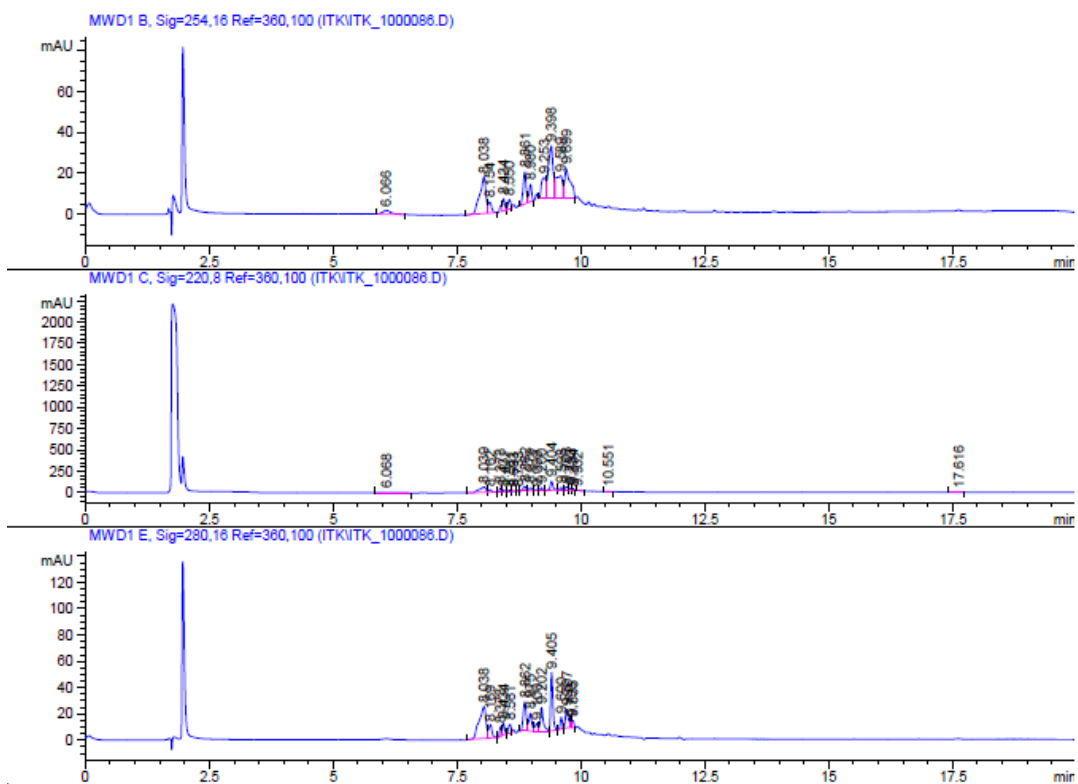
Slika 19: HPLC spektri spojine MX-TK-160 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)



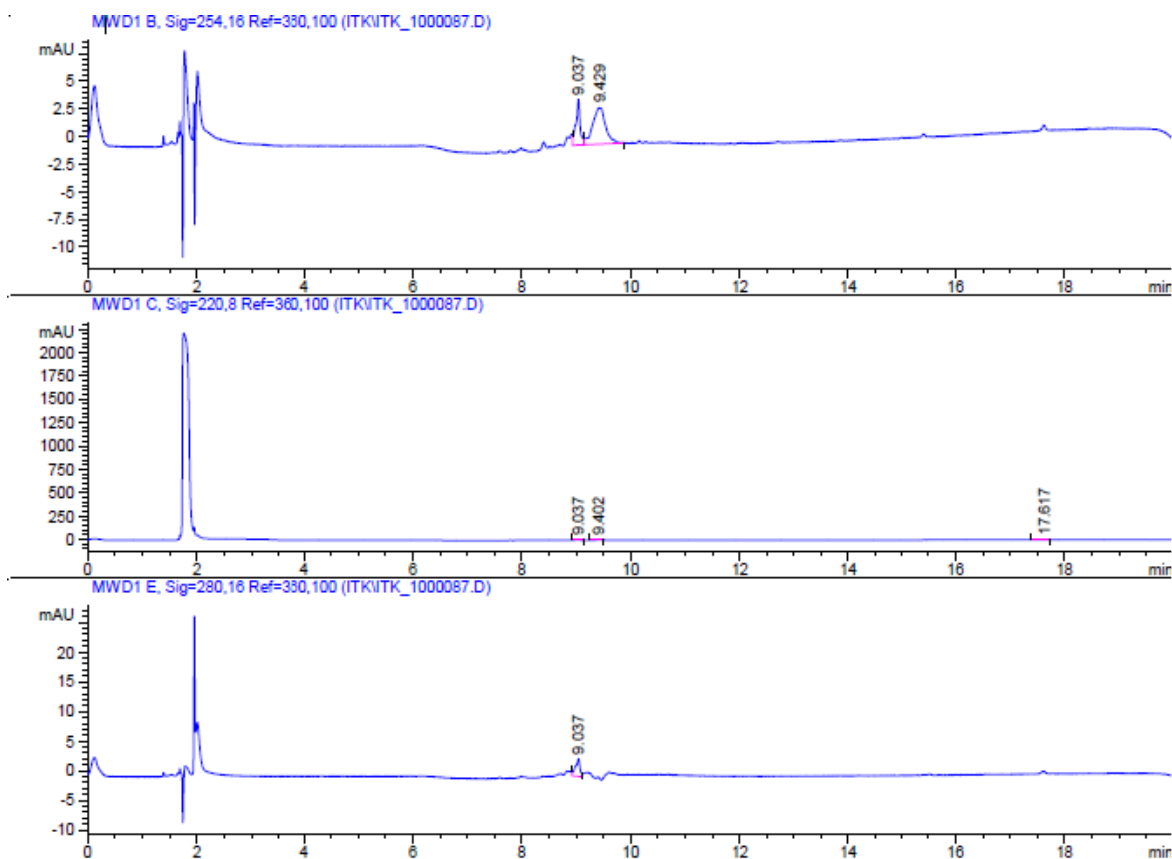
Slika 20: HPLC spektri spojine MX-TK-161 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)



Slika 21: HPLC spektri spojine MX-TK-162 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)



Slika 22: HPLC spektri spojine MX-TK-163 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)



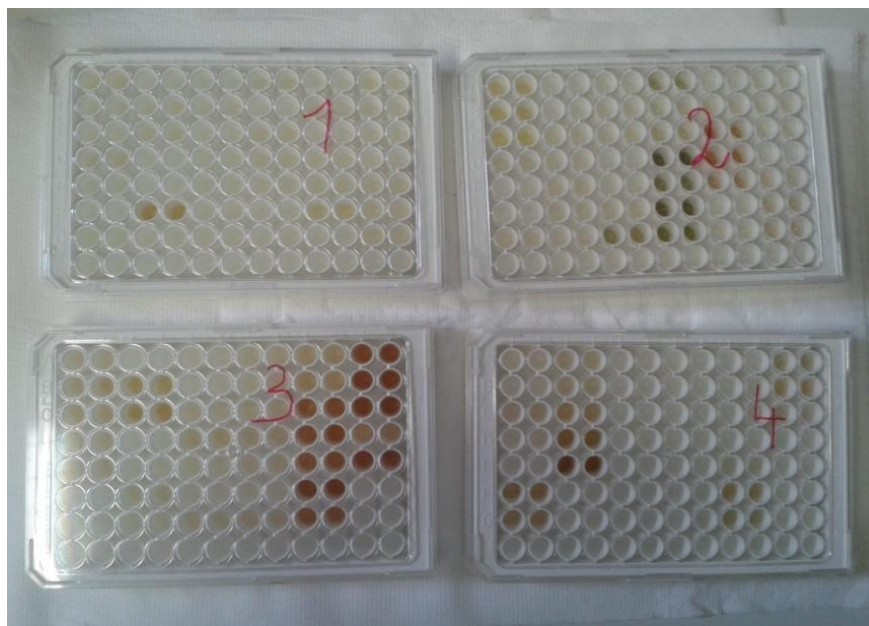
Slika 23: HPLC spektri spojine MX-TK-164 analizirani pri treh valovnih dolžinah (254 nm, 220 nm in 280 nm)

Iz spektrov je razvidna kompleksnost ekstraktov. Za ekstrakte, ki izkazujejo aktivnost na več tarč, ne moremo zagotovo trditi, ali je ena sama molekula odgovorna za vezavo na vse tarče ali je znotraj enega ekstrakta več različnih molekul, ki se vežejo na različne tarče. S tem, ko smo testirali kompleksne ekstrakte, smo pridobili veliko časa in prihranili finančna sredstva, saj smo že v začetnih stopnjah testiranja izločili neaktivne ekstrakte. Na drugi strani imamo pa ekstrakte, ki izkazujejo aktivnost na eno ali več tarč in takšne se v naslednjih stopnjah testiranja splača očistiti in okarakterizirati še posamezne komponente.

4.2.3 TOPNOST IN ČISTOST EKSTRAKTOV

Pred pričetkom testiranja aktivnosti na trombin, faktor Xa in tripsin ter fibrinogeni receptor, smo morali vzorce raztopiti v ustreznem volumnu topila. Topilo izbora je bil DMSO, saj raztaplja veliko število organskih in anorganskih snovi, je relativno netoksičen in cenovno ugoden. Prav tako deluje krioprotektivno (49). Večina spojin je bila topna v DMSO že v koncentraciji 10 mg/mL, v nasprotnem primeru pa smo redčili na koncentracije 5; 2,5 in 1 mg/mL. Nekatere spojine niso bile topne niti v koncentraciji 1

mg/mL, niti se niso raztapljale pomočjo ultrazvoka, zato jih nismo redčili še na nižje koncentracije, saj je slaba topnost omejitveni kriterij pri iskanju potencialnih spojin vodnic. Za veliko število spojin nismo poznali natančnih postopkov izolacije, čiščenja in ekstrakcije, zato dopuščamo možnost, da je neraztopljena snov pravzaprav ostanek celičnih membran ali drugih lipofilnih elementov, ki so po pripravi ostali v vzorcu, ali pa gre za kontaminacijo. Kljub temu smo pomerili aktivnost takšnih spojin, vendar nam v tem primeru natančna koncentracija raztopine ni poznana, zato izmerjen K_i ni točen. Pri raztapljanju so nam težave povzročale tudi temno obarvane spojine, kot npr. spojine od MX-TK-067 do MX-TK-070, ki so bile skoraj črne in nismo dobro videli, ali se je ves vzorec raztopil (slika 24). Pri nekaterih že raztopljenih vzorcih smo ugotovili, da se naslednji dan po odtalitvi pojavi usedlina, kar je lahko posledica zamrzovanja raztopin v DMSO. Ko del DMSO namreč zmrzne, se tam topnost nekoliko zmanjša, koncentracija v tekočem delu naraste kar pa skupaj z nižanjem temperature povzroči precipitacijo (50). Pred testiranjem smo zato vsak vzorec temeljito premešali s pomočjo vibracijskega mešalnika.



Slika 24: Mikrotitrne ploščice po nanosu biotiniliranega fibrinogena in preiskovanih spojin

4.2.4 POTEK IN KRITIČNE STOPNJE TESTIRANJA – SERINSKE PROTEAZE

4.2.4.1 Nanos pufra in raztopin potencialnih inhibitorjev

Pri testiranju smo najprej v vse vdolbinice mikrotitrne plošče nanесли op 50 μL pufra HBSA. Dodali smo 50 μL bidestilirane vode oz. raztopin potencialnih inhibitorjev (osnovna raztopina v DMSO razredčena z vodo). Po dodatku raztopin potencialnih inhibitorjev v vdolbinice ploščic, smo bili pozorni na morebiten pojav oborine, vendar se to v nobenem primeru ni zgodilo.

4.2.4.2 Nanos encima

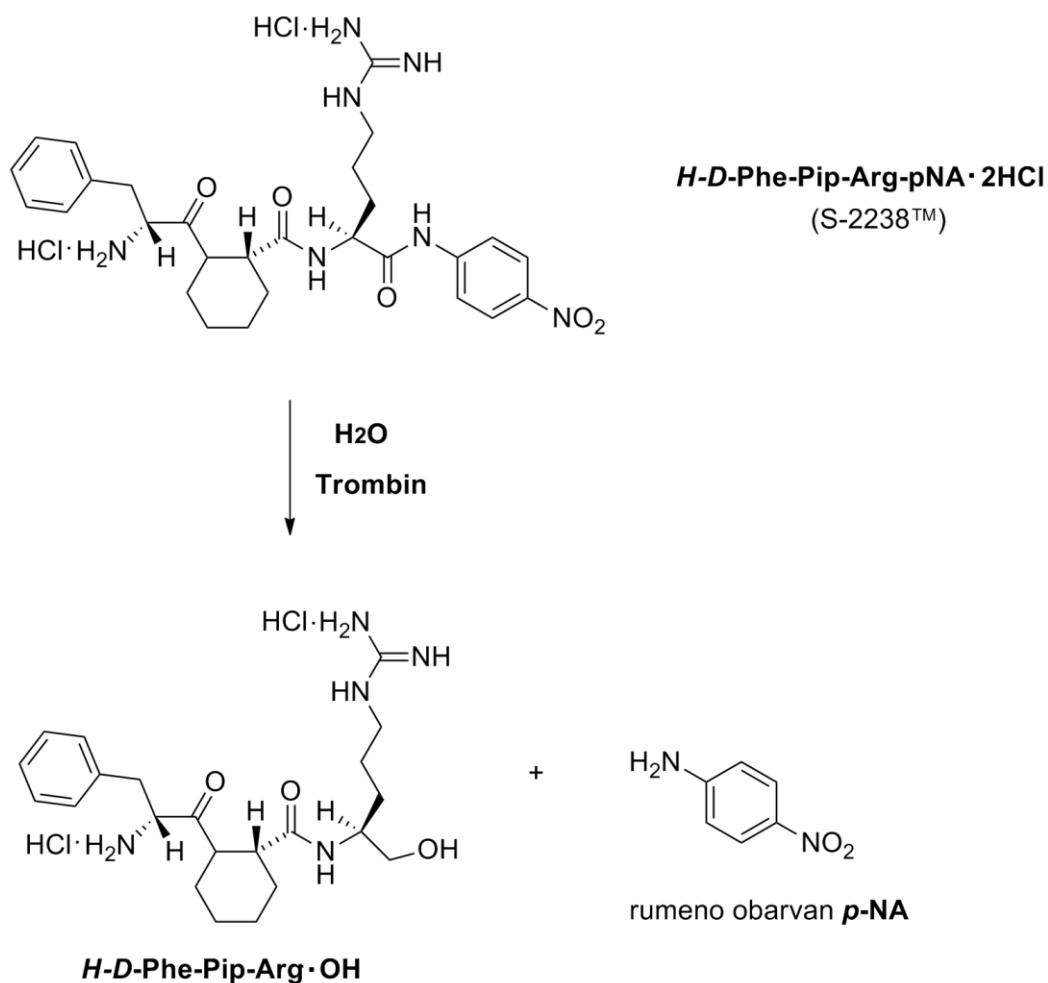
Encim (trombin, faktor Xa in tripsin) smo za vsako testiranje sveže pripravili. Iz zamrzovalnika smo vzeli po navodilu proizvajalca že pripravljeno raztopino encima, jo počasi odtalili, odpipetirali potrebno količino in jo redčili s pufrom HBSA. Pufer se je kljub previdnemu pipetiranju penil.

4.2.4.3 Nanos substrata

Po 15 minutah smo dodali ustrezen substrat, pripravljen po navodilu proizvajalca. Po dodatku substrata smo ploščice premešali in karseda hitro vstavili v avtomatski čitalec, da ne bi zamudili začetka reakcije. Oblika nekaterih grafov ni takšna, kot bi pričakovali. Izgleda, kot da je začetek reakcije počasen (tudi pri kontroli) in počasi doseže zgornji plato (v_{max}). Ker je iz grafov proti koncu merjenja vseeno viden zgornji plato, domnevamo, da začetka reakcije nismo zamudili, pač pa bi manjša začetna hitrost v_0 lahko bila posledica prešibkega premešanja ploščice pred vstavitvijo v avtomatski čitalec. Tako je substrat počasneje prihajal v stik z encimom in reakcija je stekla počasneje in kasneje dosegla zgornji plato. Ker se je to dogajalo v vseh vdolbinicah mikrotitrne plošče, je bila reakcija počasnejša v vseh primerih, tako v kontroli kot pri dodatku potencialnih inhibitorjev. Ker za določanje K_i potrebujemo razmerje med v_0 in v_i , predvidevamo, da počasnejša reakcija ni imela vpliva na končne rezultate.

4.2.4.4 Merjenje absorbance

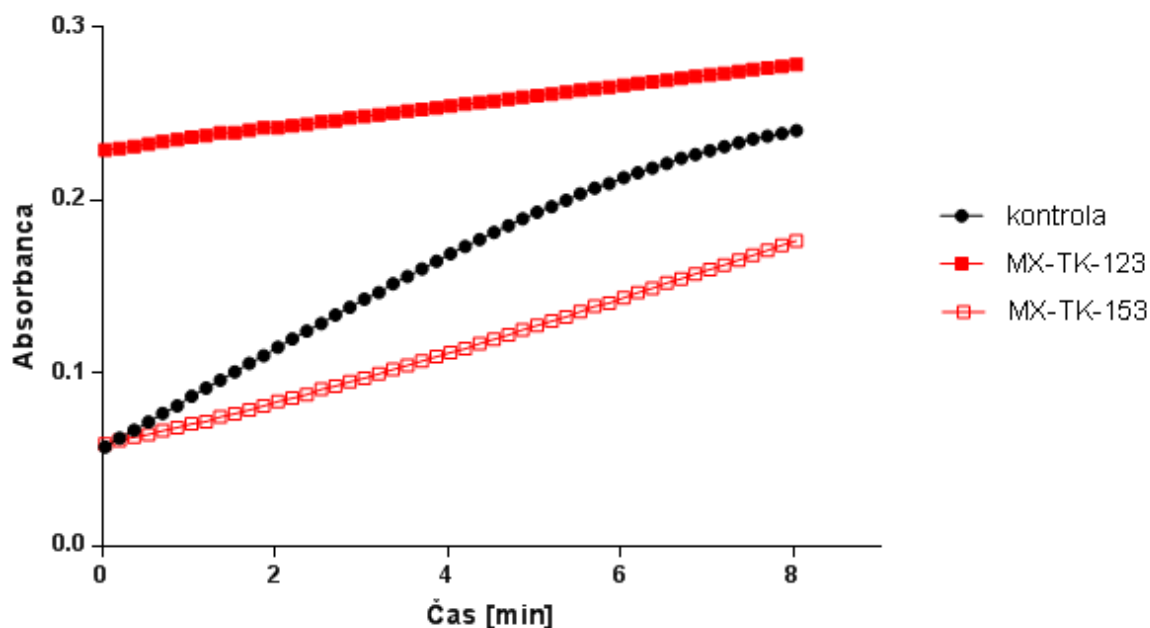
S kolorimetrično metodo smo merili nastanek rumeno obarvanega *p*-nitroanilina, ki je nastajal po encimski cepitvi amidne vezi kromogenega substrata (slika 25).



Slika 25: Reakcija nastanka *p*-nitroanilina

Sprememba v absorbanci pri 405 nm je bila sorazmerna nastanku *p*-nitroanilina in če je preiskovana spojina inhibirala encim, se je nastajanje *p*-nitroanilina ustrezno zmanjšalo. Problematične so bile intenzivno obarvane spojine, kjer bi lahko prihajalo do motenj v zaznavanju novonastalega rumeno obarvanega *p*-nitroanilina.

Na sliki 26 sta prikazana grafa inhibicije trombina spojin MX-TK-123 in MX-TK-153. Spojini imata primerljivo K_i (obe približno 11 μM), vendar je spojina MX-TK-123 obarvana rjavo, spojina MX-TK-153 pa svetlo rumeno. Krivulji imata podoben naklon, vendar je pri spojin MX-TK-123 absorbanca že v začetku visoka.



Slika 26: Graf inhibicije trombina – obarvana (MX-TK-123) in neobarvana spojina (MX-TK-153)

4.2.4.5 Rokovanje s proteini

Ker smo pri delu uporabljali encime, smo morali zagotoviti pogoje, ki so potrebni za njihovo optimalno delovanje oz. ne povzročijo denaturacije. Osnovno raztopino smo počasi odtajali, delovne raztopine pa smo pripravili tik pred uporabo, pri čemer smo se izogibali močnemu stresanju. Ves čas smo delali pri sobni temperaturi in uporabljali pufer HBSA s fiziološkim pH 7,4.

4.2.5 POTEK IN KRITIČNE STOPNJE TESTIRANJA – FIBRINOGENSKI RECEPTOR

4.2.5.1 Nanos fibrinogenских receptorjev

V prvi stopnji testiranja smo v vse vdolbinice mikrotitrne ploščice nanесли fibrinogenске receptorje oz. pufer za ploščice v primeru slepe kontrole. Delovno raztopino fibrinogenskega receptorja smo pripravili z dodatkom pufru za ploščice osnovni raztopini, ki je bila predhodno pripravljena po navodilih proizvajalca in shranjena na - 70°C. Tako pripravljene ploščice smo inkubirali preko noči pri 4°C. Predpostavljali smo, da imamo v vseh vdolbinicah približno enako število vezanih receptorjev, saj smo jih dodali v prebitku.

4.2.5.2 Nanos 1 % BSA

Naslednji dan smo v vsako vdolbinico dodali 1 % BSA, da smo prekrili nespecifična vezavna mesta na ploščici. Raztopina BSA se je precej penila. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi in nato sprali s pufrom za spiranje.

4.2.5.3 Nanos biotiniliranega fibrinogena in potencialnih kompetitivnih ligandov

V tretji stopnji smo v primeru slepe in pozitivne kontrole dodali biotiniliran fibrinogen, v primerjalnih vzorcih biotiniliran fibrinogen in različne koncentracije tirofiban in v testnih vzorcih biotiniliran fibrinogen ter raztopine potencialnih antagonistov. Na tej stopnji smo delali karseda hitro, saj smo morali nanesti biotiniliran fibrinogen in potencialne antagoniste v čim krajšem možnem času, saj gre za kompetitivno reakcijo. Vsebinsko vsake vdolbinice smo premešali s pomočjo avtomatske pipete, da smo dobili homogeno zmes nativnega in kompetitivnega liganda. Inkubirali smo 2 uri pri sobni temperaturi in sprali s pufrom za spiranje.

V naslednji stopnji smo v vse vdolbinice mikrotitrne ploščice dodali raztopino ovčjih protiteles proti biotinu, ki so bila označena s peroksidazo. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi in sprali s pufrom za spiranje. Na koncu smo dodali kemoluminiscentni reagent in ploščico pustili stati 15 min na sobni temperaturi in nato pomerili kemoluminiscenco. Večja kot je bila kemoluminiscenca, več fibrinogena se je vezalo na receptorje in manjša je bila afiniteta potencialnih antagonistov.

Rezultati nam povedo v kolikšni meri se je fibrinogen vezal na receptorje oz. v kolikšni meri so se vezali kompetitivni ligandi. Ne moremo zagotovo trditi ali vezani kompetitivni ligandi delujejo kot agonisti ali kot antagonisti, saj nismo določali aktivnosti, ampak zgolj afiniteto.

4.2.5.4 Spiranje in sušenje mikrotitrskih ploščic

Kritičen parameter je na vseh stopnjah je bilo spiranje. Ploščico smo namreč sprali tako, da smo v vdolbinice dodali pufer za spiranje, nato pa ploščice obrnili navzdol in močno potolkli po papirnati podlagi, dokler ta ni bila suha. Če nam ne bi uspelo odstraniti vsega pufra in nevezanih substratov, bi ti kasneje lahko motili meritve, hkrati pa bi bila ob morebitnem zastajanju pufra koncentracija v naslednjih stopnjah dodanih reagentov nižja od zelene oz. bi variirala od vdolbinice do vdolbinice.

4.2.5.5 Izračun in uporaba štiri-parametrne enačbe

Za izračun vezave fibrinogena pri 100 $\mu\text{g/mL}$ antagonista smo uporabili GraphPad Prism in upoštevali enačbo (18). Za zgornji plato (V) smo upoštevali vezavo fibrinogena v odsotnosti antagonista (kontrolni vzorec) in mu določili vrednost 100 (100 % vezava fibrinogena). Za spodnji plato smo vzeli vrednost vezave fibrinogena v prisotnosti visoke koncentracije registriranega antagonista tirofibana (2 nM primerjalni vzorec).

4.2.7 PROBLEM DMSO IN VPLIV NA TESTIRANJE

Pri eksperimentalnem delu nam je največ težav povzročal DMSO, ki je že sam zaviral delovanje encimov (faktorja Xa in tripsina) in vezavo fibrinogena na fibrinogeni receptor. V literaturi ni veliko podatkov o vplivu DMSO na rezultate *in vitro* testov v koncentracijah, ki smo jih uporabljali oz. pri tako nizkih koncentracijah (do 5 %) v predhodnih testiranjih niso imeli težav (44). Če bi imeli čiste spojine, bi delali pri nižjih koncentracijah DMSO, ker pa smo imeli kompleksne ekstrakte, smo za dovolj veliko koncentracijo posameznih spojin v vdolbinicah mikrotitrskih plošč, morali vnesti tudi višje koncentracije DMSO.

Delovne raztopine encimov in receptorjev so bile vse pripravljene sveže, zato lahko razliko med motnjami v primeru faktorja Xa, tripsina in DMSO ter na drugi strani trombin najbrž iščemo v strukturi vezavnega mesta. DMSO se preferenčno veže na aromatske in hidrofobne stranske verige, interakcije s polarnimi skupinami pa niso favorizirane. S poskusi so ugotovili, da so v nizkih koncentracijah in pri nizkih temperaturah proteini hidratirani, kar stabilizira njihovo nativno strukturo (51). Pri nizkih temperaturah so hidrofobne interakcije šibkejše, zato se DMSO veže v manjši meri in deluje krioprotektivno. V večjih koncentracijah in tam, kjer so aromatski in hidrofobni fragmenti bolj izpostavljeni, se DMSO veže v večji meri in pripomore k razvitju nativne oblike proteina (51). Če primerjamo vezavna mesta faktorja Xa, tripsina in trombina, lahko vidimo, da je pri trombinu vezavno mesto globlje in bolj zaprto ter posledično težje dostopno kot pri tripsinu (22, 23). Vezavno mesto faktorja Xa je sicer podobno vezavnemu mestu trombina, vendar bolj odprto in lažje dostopno (30). To je možen razlog za večjo vezavo DMSO in razvitje nativne strukture, ki izgubi aktivnost. V eni izmed študij so dokazali, da DMSO že v majhnih koncentracijah povzroči agregacijo proteinov (52). Prav tako so dokazali, da že majhne koncentracije lahko znižajo afiniteto majhnih molekul do proteinov, torej bi v našem primeru lažno pozitivni rezultati bili posledica manjše

vezave kromogenih substratov na encime ter biotiniliranega fibrinogena na receptor (52). V primeru testiranja vezave na fibrinogeni receptor smo delali pri nekoliko višjih koncentracijah DMSO (do 12 %), zato smo ga vključili v kontrolni vzorec. Prav tako smo njegov vpliv ocenjevali tudi pri testiranju na serinske proteaze in ga v primeru faktorja Xa in tripsina vključili v kontrolni vzorec in izračun K_i .

4.3 MOŽNOSTI ZA IZBOLJŠAVO TESTIRANJA

Ker je DMSO v višjih koncentracijah zaviral delovanje faktorja Xa in tripsina ter se vezal na fibrinogenske receptorje (ali jih denaturiral), bi bila smiselna uporaba drugega topila oz. delo z manjšimi koncentracijami. Vsekakor bi vpliv uporabljenih koncentracij DMSO morali ovrednotiti že v samem začetku testiranja. Testiranje v treh paralelah bi nam doprineslo k večji točnosti rezultatov, vendar bi bilo to časovno in cenovno bolj potratno. Za določanje selektivnosti na fibrinogeni receptor, bi bilo spojinam potrebno določiti tudi aktivnost na druge integrinske tarče (npr. vitronektinski receptor, fibronektinski receptor). Za natančnejšo določitev IC_{50} na fibrinogeni receptor, bi bilo smiselno določanje aktivnosti pri več koncentracijah potencialnih antagonistov.

5 SKLEP

V okviru magistrskega dela smo iskali nove potencialne antitrombotične učinkovine med kompleksnimi ekstrakti morskega izvora. Uporabili smo encimske in imunokemijske teste in z že poznanimi metodami določali aktivnost na trombin, faktor Xa in zaradi selektivnosti še na tripsin. Prav tako smo določali aktivnost na fibrinogenški receptor. Ugotovili smo:

- Od 164 spojin jih je 92 izkazovalo aktivnost vsaj na eno tarčo, od tega je bilo 76 potencialnih antitrombotikov.
- 20 spojin je selektivno inhibiralo trombin, dve spojini sta selektivno inhibirali faktor Xa, 11 spojin pa se je selektivno vezalo na fibrinogenški receptor.
- 19 spojin je bilo potencialnih (morda) dualnih antitrombotikov, ki delujejo na trombin in fibrinogenški receptor.
- Ena spojina je bila potencialni dualni inhibitor trombina in faktorja Xa.
- Največji potencial imajo spojine:
 - MX-TK-154 kot selektivni potencialni inhibitor trombina,
 - MX-TK-046, MX-TK-077 in MX-TK-164 kot selektivni potencialni antagonisti fibrinogenškega receptorja,
 - MX-TK-163 kot potencialni dualni antitrombotik, ki deluje na trombin in fibrinogenški receptor,
 - MX-TK-124, ki deluje na trombin, faktor Xa in fibrinogenški receptor.
- Nobena spojina znatno ne inhibira faktorja Xa
- DMSO v uporabljenih koncentracijah zavira delovanje faktorja Xa, v manjši meri pa tudi tripsina in fibrinogenškega receptorja.

Naše rezultate smo posredovali institucijam, ki so nam poslale pripravljene ekstrakte. V nadaljevanju bodo zanimive ekstrakte dodatno očistili in posameznim zanimivim spojinam bo izmerjena aktivnost na tarče. Ko bodo ugotovili katera spojina je odgovorna za aktivnost, bodo določili strukturo spojine. Če ne gre za že poznano spojino, jo bodo poskušali sintetizirati in optimizirati ter izboljšati farmakokinetične lastnosti in afiniteto ter selektivnost.

6 VIRI IN LITERATURA

1. Cragg MG, Newman JD: Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 2013; 3670-95.
2. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel SA, Soejarto DD, Guo Z: Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 1985; 63(6): 965-81.
3. Harvey A: Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 2000; 5(7): 294-300.
4. Uradni list RS, št. 30/1996. Zakon o ratifikaciji Konvencije o biološki raznovrstnosti (MKBR).
5. Vuorela P, Leinonen M, Saikku P, Tammela P, Rauha JP, Wennberg T, Vuorela H: Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 2004; 11:1375-89.
6. Seethala R, Zhang L. *Handbook of drug screening*. 2nd ed., Informa Healthcare, New York, 2009.
7. Baell J, Walters ML A: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*, 2014; 513: 481-83.
8. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002; 24-30; 615-616.
9. Harvey L A: Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 2008; 13: 894-901.
10. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram MK, Yoga Latha L: Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2011; 8(1):1-10.
11. Jukič M, Perdih P, Šolmajer T: Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn*, 2012; 63: 54-63.
12. Cox-Gad S: *Drug Discovery Handbook*. Wiley-Interscience, Hoboken, 2005: 31-33.
13. Chin JW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn DA: Drug Discovery From Natural Sources. *The AAPS Journal*, 2006; 8 (2): 239-253

14. Newman JD, Cragg MG: Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *J. Nat. Prod.*, 2004; 67: 1216-38.
15. Murray HG, Munro, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford JHS, Lill EL, Li S, Battershill C, Duckworth A: The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 1999; 70: 15–25.
16. Bresjanec M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije. 3. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 11-12.
17. Dopsaj V, Jelić-Ivanović Z, Marisavljević D, Mitić G, Terzić B, Matić G: Antikoagulantna terapija – klinički i laboratorijski aspekti, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2005; 9-31.
18. Guyton AC, Hall J E: Textbook of Medical Physiology, 10th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2006; 419-25.
19. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009; 152-56.
20. Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, 2005; 9-34.
21. Schulman S: Advantages and limitations of the new anticoagulants. *J Intern Med*, 2014; 275(1):1-11
22. Voet D, Voet J G: Biochemistry. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 2004; 521-27.
23. Neitzel JJ: Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education*, 2010; 3(9):21.
24. Huntington JA: Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost.*, 2011; 9 (Suppl. 1): 26–34.
25. Pečar Fonovič U, Obermajer N, Jevnikar Z, Bojana M, Rojnik M, Kos J: Vaje iz farmacevtske biokemije. Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana, 2009; 48-58.

26. Schröder Leiros HK, Brandsdal BO, Andersen OA, Os V, Leiros I, Helland R, Ootle J: Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. *Protein Science*, 2004; 13:1056-70.
27. Marinko P, Krbavčič A, Kikelj D: Inhibitorji trombina in novi pristopi za razvoj antikoagulantnih učinkovin. *Farm Vestn*, 2003; 54: 583-99.
28. Hongbao M, Young J, Shen C: Thrombin. *Nature and Science*, 2008; 6(2).
29. Licari LG, Kovacic JP. Thrombin physiology and pathophysiology. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009; 19(1): 11-22.
30. Zega A, Obreza A, Urleb U: Inhibitorji faktorja Xa. *Farm Vestn*, 1999; 50 (1): 53-57.
31. Blank, Rupprecht HJ and Ralf. Clinical Pharmacology of Direct and Indirect Factor Xa Inhibitors. *Drugs*, 2010; 70 (16): 2153-70.
32. Slovenski medicinski slovar. Dostopano 28.01.2014; dostopno na: <http://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar>
33. Alberts B, Johnson A, Lewis J: *Molecular Biology of the Cell*. 4th Ed. New York, Garland Science, 2002.
34. Schneider DJ: Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2011; 72(4): 672–82.
35. Ferguson JJ, Waly HM, Wilson JM: Fundamentals of coagulation and glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition. *American Heart Journal*, 1998; 135(4): 35-42.
36. Schneider DJ: Antiplatelet therapy: glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Br J Clin Pharmacol.*, 2011; 72(4): 672-82.
37. Schneider DJ, Baumann PQ, Whitaker DA, Sobel BE. Variation in the ability of glycoprotein IIb-IIIa antagonists to exert and maintain their inhibitory effects on the binding of fibrinogen. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005; 46(1): 41-45.
38. Kalantzi K, Tsoumani M, Goudevenos IA, Tselepis AD: Pharmacodynamic Properties of Antiplatelet Agents Current Knowledge and Future Perspectives. *Disclosures Expert Rev Clin Pharmacol.*, 2012; 5(3): 319-36.
39. Kikelj D: Antitrombotična zdravila pri starostnikih. *Farm Vestn* 2005; 56: 78-81.

40. Bryniarski L, Pelc-Nowicka A, Zabojszcz M, Mirek-Bryniarska E: Dual antiplatelet therapy and antithrombotic treatment: Recommendations and controversies. *Cardiol J*, 2009; 16(2): 179-89.
41. Paikin J, Wright D, Crowther M, Mehta S, Eikelboom J: Triple Antithrombotic Therapy in Patients With Atrial Fibrillation and Coronary Artery Stents. *Circulation*, 2010; 121: 2067-70.
42. Sodelavci Bolnišnice Golnik in Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani: Golniški simpozij 2011 Klinična farmacija; Antikoagulantna terapija. Bolnišnica Golnik – Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011; 9-22.
43. Ilič M, Kikelj D, Ilaš J: Multitarget Antithrombotic Drugs. *Current topics in Medicinal Chemistry*; 2011; 11: 2834-48.
44. Trampuš Bakija A: Določanje antitrombotičnih lastnosti reverzibilnih inhibitorjev trombina in vitro in in vivo. Magistrsko delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2002.
45. De Jong L, Donald RA, Piet Franke J, Bischoff R: Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications. *Journal of Chromatography. B*, 2005; 829: 1–25.
46. Mailman R, Boyer J.: Theory and practise of receptor characterization and drug analysis. Dostopano decembra 2014, dostopno na: http://www.pdg.cnb.uam.es/cursos/BioInfo2002/pages/Farmac/Comput_Lab/Radioligandos/Mailman_Boyer/index.htm.
47. Hohler P: Vpliv testnih pogojev na merjenje IC₅₀ antagonistov fibrinogenškega receptorja v in vitro testih. Diplomsko delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
48. Peterlin Mašič L: Učinkovine, ki vplivajo na trombozo. *Farm Vestn*, 2014; 65: 118–28.
49. Cat chem. Product Assay – DMSO. Dostopano 12.01.2015, dostopno na: <http://www.kat-chem.hu/en/prod-bulletins/dmso>.

50. Borchardt R, Kerns E, Lipinski C, Thakker D, Wang B:. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004.
51. Arakawa T, Kita Y, N. Timasheff S. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophysical Chemistry*, 2007; 131: 62–70.
52. Tjernberg A1, Markova N, Griffiths WJ, Hallén D. DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen*, 2006; 11(2):131-7.