Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXI, knj. 23.

Grujica Žarković

1986

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/0b90ada0-dcbb-442a-88d3-7b1322fdbc8b

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

YU ISSN 0350-0071

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXI

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 23

Redakcioni odbor
JAKOB GAON, DŽEMAL REZAKOVIĆ i GRUJICA ŽARKOVIĆ

ANU BiH АНУ БиХ

Urednik
GRUJICA ŽARKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1986.

ANTON ŠTALC i MARJETA ŠENTJURC

MOGUĆNOSTI UPOTREBE ELEKTRONSKE PARAMAGNETNE REZONANCIJE U FARMAKOLOŠKIM I TOKSIKOLOŠKIM ISPITIVANJIMA LIJEKOVA

APSTRAKT. Metoda elektronske paramagnetne rezonancije je spektroskopska metoda koja, između ostalog, omogućava proučavanje različitih farmakoloških i toksikoloških osobina lijekova. Metodu je moguće koristiti za proučavanje resorpcije, raspodjele, eliminacije i metabolizma lijekova. Moguće ju je koristiti i za proučavanje efekata lijekova na receptore ili encime, odnosno na membrane ćelija i tkiva. Uticaji lijekova na membrane obično su rezultat različitih fizikalno-kemijskih osobina lijekova. Od naših istraživanja prikazani su rezultati s područja proučavanja acetilholinesteraze i holinoreceptora, kao i uticaja holinergičkih supstancija na fluidnost membrana.

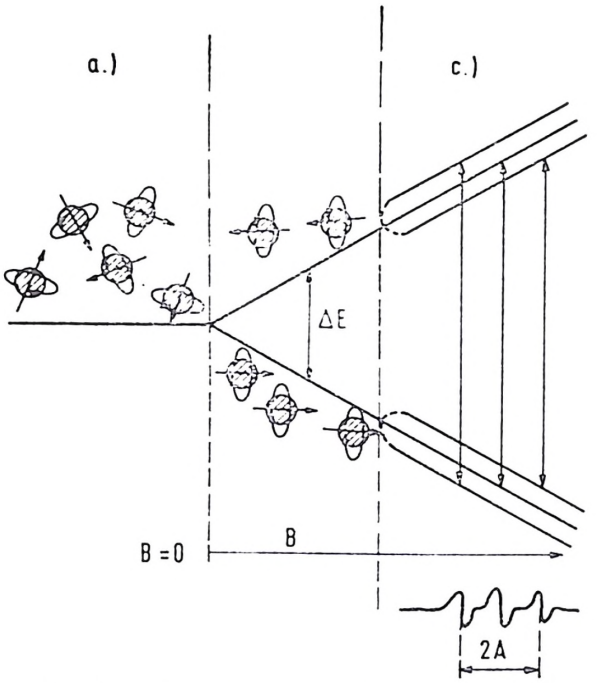
Uvod

Elektronska paramagnetna rezonancija je spektroskopska metoda pomoću koje se mogu mjeriti paramagnetni centri u tvari. Izvor tih centara su slobodni elektroni. Paramagnetni centri bioloških sistema su ili slobodni radikali, koji se pojavljuju kao međuprodukti metabolizma, ili ioni prelaznih elemenata, koji su često kofaktori encima (Fe^{3+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}). Biološki materijal, međutim, moguće je označiti paramagnetnim centrom. U tu svrhu moguće je upotrijebiti spinske označivače. Običan označivač u ovakvim spojevima je NO radikal. Za taj radikal specifično je da ima slobodne elektrone sa magnetnim momentom i jezgro atoma azota. Kada je takav radikal u magnetnom polju, magnetni momenat elektrona se orijentiše paralelno ili suprotno magnetnom polju, što znači da su elektroni podijeljeni na dva energetska nivoa. Zbog interakcije između magnetnog momenta elektrona i jezgra azota energetski nivoi se dalje dijele. To cijepanje moguće je opisati kao superfini rascjep spektara EPR (2A), (slika 1). Oblik spektara EPR zavisi i od dinamike paramagnetnog centra, što znači da zavisi od okoline u kojoj se paramagnetni centar nalazi, koja mu dozvoljava veću ili manju pokretljivost (slika 2). Ta osobina veoma je značajna za istraživanja u biološkim sistemima. Naime, po promjeni u obliku i intenzitetu spektara EPR moguće je zaključiti u kojoj se sredini molekula nalazi. Ukoliko zbog uticaja različitih biološki aktivnih faktora dođe do promjene u okolini molekule, ta se promjena može odraziti u prom-

jeni spektara EPR. U praksi to znači da promjenama spektara EPR tumačimo promjene koje su u pitanju (8, 11).

Dosadašnja proučavanja spektara EPR dala su uvid u različita područja farmakologije. Naime, metodom EPR moguće je pratiti bio-

Slika 1.



Energetski nivoi NO radikala u magnetnom polju:

a — osnovni energetski nivo kod B = O
b — rascjep energetskih nivoa elektrona zbog interakcije magnetnog momenta elektrona i vanjskog magnetnog polja B
c — superfini rascjep energetskih nivoa elektrona zbog interakcije magnetnog momenta elektrona i magnetnog momenta jezgra azota

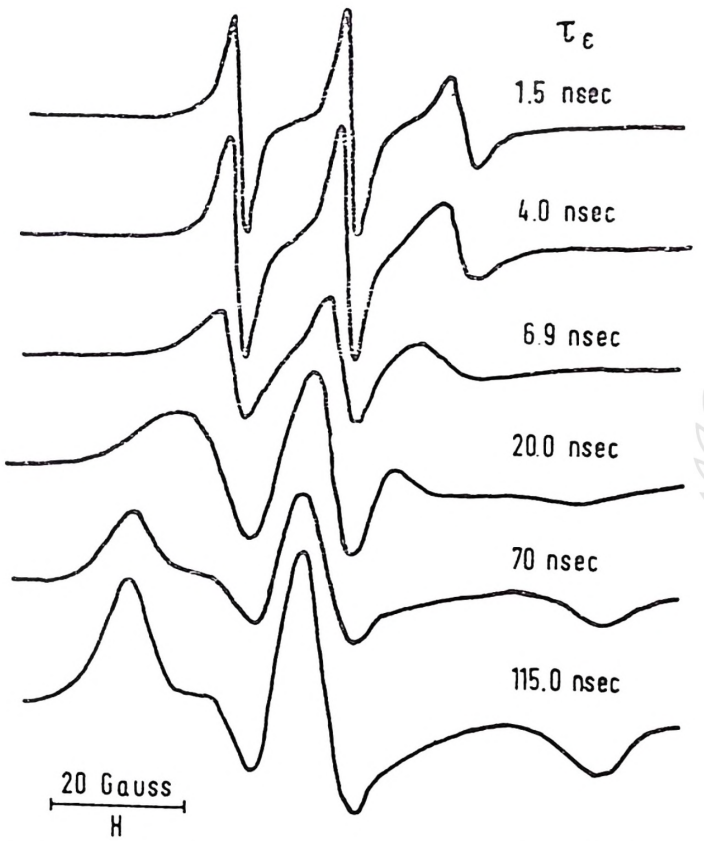
loški aktivnu supstanciju na svim nivoima, od resorpcije, preko specifičnog djelovanja na receptore ili nespecifičnog u membranama, do sekrecije metabolita.

Određivanje koncentracije aktivne supstancije: Leute i surad. (4) prvi put su upotrijebili metodu EPR za određivanje koncentracije morfina u krvi. Metoda ja analogna radioimunološkoj metodi. Kada se krvi sa morfinom doda kompleks protutjelo morfina — spinski označeni morfin, ovaj morfin se oslobađa iz kompleksa. Time se mijenja njegova pokretljivost, kao i spektar EPR. Promjena u spektru znači prisustvo morfina, a intenzitet tog dijela spektra količinu prisutnog morfina.

ANU BiH АНУ БиХ

Vezivanje za proteine plazme: Vezivanje spinskog označivača za makromolekulu uzrokuje promjenu u pokretljivosti spinskog označivača. Na taj način moguće je odrediti količinu supstancije koja se veže za bjelančevine plazme. U tu svrhu potrebno je istraživanu supstanciju spinski označiti. Kritička tačka tih ispitivanja je da označivanje supstancije može izazvati značajne promjene njenih osobina, što znači irelevantne rezultate. Međutim, u mnogim primjerima metoda EPR veoma dobro koreliše sa rezultatima ultrafiltracije (5). Metodom EPR

Slika 2.



Spektri elektronske spinske rezonancije spinskog označivača u rastvoru pri različitoj pokretljivosti molekula, koju karakteriše korelaciono vrijeme τ_c

moguće je odrediti i broj molekula koje se vezuju za pojedine bjelančevine u serumu. Kao primjer navodimo rad S c h a r e i surad. (7), koji su odredili jedino mjesto za vezivanje maleimida i nekoliko njih za vezivanje masnih kiselina za albumine seruma.

Proučavanje metabolita: Kod metabolizma različitih lijekova pojavljuju se slobodni radikali koji se mogu identificirati metodom EPR.

Interesantna su proučavanja mogućih metabolita, koji mogu biti značajni u kancerogenezi. Sa druge strane, ova proučavanja daju uvid u ulogu pojedinih encima, primarnih u metabolizmu različitih lijekova: citokrom P-450, aminooksidaza, reduktaza itd. (1).

U ovim proučavanjima često se koristi metoda spinske zamke *(spin trapping)*, kojom se kratko živeći slobodni radikali, pomoću dijamagnetnih molekula, transformišu u stabilne radikale (3). S obzirom da se mnogi lijekovi u procesu metabolizma mijenjaju u slobodne radikale, očekuje se da će ova metoda biti veoma upotrebljiva za određivanje strukture tih radikala.

Proučavanje farmakoloških efekata na receptorima: Ovim ispitivanjima mogu se dobiti informacije o topografiji vezivnih mjesta (imunoglobulina, encima, receptora itd.), kao i odrediti pojedine distancije u molekuli, naročito u aktivnom centru. Klasičan model za ova ispitivanja je karboanhidraza C sa spinski označenim sulfonamidnim diureticima i sa lancima različite strukture i dužine između nitroksidnog radikala i sulfonamidne grupe. Za molekule sa kratkim lancima karakteristični su spektri EPR sa ograničenim kretanjem nitroksidnog radikala. Međutim, kada dužina lanca prelazi 1,4 nm, dobiju se spektri EPR koji su karakteristični za veoma mobilan nitroksidni radikal, što pokazuje da na toj dužini nitroksidni radikal izlazi iz džepa aktivnog centra encima. Istraživanjima je dokazano da je aktivni centar tog encima dubok 1,4 nm (16). Istim istraživanjima objašnjena je i razlika između dva izoencima karboanhidraze, koji imaju sličnu strukturu a različitu encimsku aktivnost. Primjenom pirolidinskih sulfonamidnih označivača nisu našli razlike u strukturi aktivnog centra. Međutim, primijenivši piperidinski analog ustanovili su da manje aktivan izoencim pokazuje veću slobodu rotacije nitroksidnih radikala nego aktivniji. To znači da je kod manje aktivnog izoencima mikrogeografija aktivnog centra drugačija nego kod aktivnijeg (16). Pri ovim ispitivanjima treba obratiti pažnju na svojstva spinski označenih analoga, koji ne bi smjeli gubiti osnovne farmakološke osobine. Zato je ova ispitivanja potrebno kombinovati sa farmakološkim i biohemijskim ispitivanjima (1).

Osim dubine džepa, moguće je odrediti i druge dimenzije u aktivnom centru ili, u slučaju multiplih veznih mjesta, distanciju između njih (1). Moguće je pratiti i kinetiku vezivanja liganada na receptore (17) ili promjene u uređenosti membrane po vezivanju liganada na receptore (2).

Proučavanja kancerogenih supstancija i antimetastatika na membranama: Metodom EPR moguće je proučavati i interakciju biološki aktivnih supstancija u membrani. Veoma značajna ispitivanja tog tipa su, npr., istraživanja interakcije spinski označenih forbolestera, poznatih kokancerogena, i membrane ćelija. U tim eksperimentima bili su upotrijebljeni spinski označeni estri forbola sa masnim kiselinama, u koje je spinska sonda ugrađena na različitim mjestima alkilnog lanca. Mjerenjem spektara EPR u ravnotežnom stanju može se ocijeniti dio moleluka koji prodire u unutrašnjost ćelija, dio koji se ugrađuje u membranu, i dio koji ostaje u vanjskom rastvoru. U tu svrhu se suspenziji ćelija dodaje paramagnetni ion fericijanid, koji ne ide u unutrašnjost

ćelije. Zbog interakcije spinskog označivača, koji je u vanjskom rastvoru sa tim paramagnetnim ionom, mijenja se spektar EPR. Time se može razlikovati dio spinskog označivača koji ide u ćeliju od onoga koji ostaje van nje. Prema obliku spektara EPR dalje se može ocijeniti koji je dio spinskog označivača u membrani a koji u ćeliji. To znači da je proučavanjem spektara EPR i promjena u intenzitetu pojedinih komponenata u spektru EPR moguće dobiti podatke o tome kako je membrana propusna za pojedine forbole estre. Proučavanja P e č a r a i surad. (6) pokazala su da forbol ne ide u unutrašnjost ćelije. To znači da njegov efekat nije posljedica direktnog uticaja na RNA u ćeliji nego je rezultat uticaja na membranu, što prouzrokuje niz reakcija koje senzibilišu ćeliju za druge kancerogene faktore.

Proučavanja uticaja antimetastatika, kao što su derivati dimetiltrijazena, na osobine membrana ćelija, pokazala su da se fluidnost membrana ćelija L 1210 povećava. S druge strane, mjerenja EPR pokazuju da se u ćelijama sa antimetastatičnim supstancijama smanjuje brzina redukcije nitroksidnog radikala. Taj je efekat pripisati encimima u membrani ćelija, koji se pod uticajem antimetastatika smanjuje (9).

Ostala istraživanja na membranama: U okviru ispitivanja uticaja farmakološki aktivnih tvari na membrane metodom EPR su već opisani različiti efekti djelovanja alkohola, centralnih i lokalnih anestetika i dr. (11).

Osim ispitivanja direktnih uticaja na mebrane, moguće je proučavati i interakciju liposoma sa ćelijama. Liposomi mogu biti upotrijebljeni kao nosioci lijekova u ćelije. Taj transfer možemo pratiti metodom EPR. Kao primjer je praćen transfer spinski označenih masnih kiselina iz membrane eritrocita u membrane liposoma. Po inkubaciji eritrocita sa liposomima, moguće je mjeriti promjene u intenzitetu spektara EPR već u roku manjem od dva minuta (10).

Iz svih navedenih primjera može se zaključiti da je metoda elektronske paramagnetne rezonancije upotrebljiva za proučavanje uticaja supstancija na različite biološke sisteme, kao i za proučavanje strukture makromolekula. U našem radu smo ovu metodu upotrebili za proučavanje mikrogeografije aktivnog centra acetilholinesteraze i holinoreceptora, kao i za proučavanje specifičnih uticaja holinergičkih supstancija na acetilholinesterazu i kolinoreceptor ili nespecifičnih uticaja na membrane.

Metodika

U dosadašnjim eksperimentima uzorke za mjerenje spektra EPR pripremali smo po različitim postupcima, zavisno od cilja istraživanja. Spektre EPR mjerili smo na EPR spektrometru Varian E-9; frekvencija modulacije 100 kHz, amplituda modulacije 0,1 mT i snaga mikrotalasa 50 mW.

Proučavanje acetilholinesteraze: Spinski označivač, koji je ireverzibilni inhibitor acetilholinesteraze, vezivali smo na aktivni serin pod

uslovima koji uslovljavaju selektivno vezivanje i inhibiciju encima do 95 posto (12).

Proučavanje holinoreceptora: U proučavanjima mikrogeografije aktivnog centra holinoreceptora električnog organa drhtulje inkubirali smo membranski vezan receptor sa spinskim označivačima onoliko vremena koliko je potrebno za ireverzibilnu blokadu u farmakološkim pokusima. Selektivnost vezivanja određivali smo upotrebom različitih holinergičnih agonista ili antagonista. U tim proučavanjima kao spinske označivače upotrijebili smo strukturne analoge acetilholina koji se mogu vezati za aktivno mjesto, reverzibilno ili ireverzibilno (15).

Proučavanje nespecifičnih efekata holinergičnih supstancija na membranama električnog organa drhtulje i humanih eritrocita: Suspenziju električnog organa drhtulje centrifugirali smo i suspendirali u Ringerovom rastvoru sa 10 μmol/l spinskog označivača — metilnog estera palmitinske kiseline (MeFASL). Nakon inkubacije (10 min, sobna temperatura) 70 mg sedimenta, dodali smo 10 μl Ringerovog rastvora ili 10 μl Ringerovog rastvora sa 10 μmol/l somana ili 0,1 mmol/l d-tubokurarina, ili ezerina, ili DFP ili 1 mmol/l 2-PAM. U paralelnim pokusima sediment smo inkubirali sa 10 mmol/l barbitona ili fenobarbitona (13).

Koncetriranu suspenziju ljudskih eritrocita (8 ml) centrifugirali smo i tri puta isprali fiziološkim rastovorom pH 7,4 2 ml suspenzije eritrocita inkubirali smo 10 min na sobnoj temperaturi sa 10 μmol/l MeFASL. Nakon toga 100 μl eritrocita dodali smo 10 μl fiziološkog rastvora pH 7,4, propilenglikola, 10 μmol/l somana, 1 mmol/l 2-PAM ili HI-6.

Rezultati i diskusija

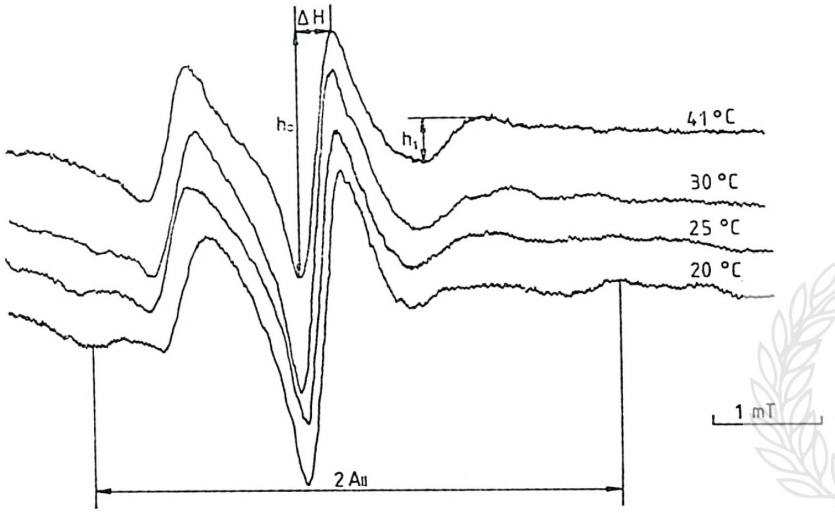
Proučavanje acetilholinesteraze: Dosadašnja proučavanja aktivnog centra acetilholinesteraze dala su nam značajnu informaciju o mikrogeografiji aktivnog centra. Metodom EPR uspjeli smo odrediti da su neke alosteričke osobine holinergičnih supstancija u korelaciji sa promjenom u strukturi aktivnog centra. Takođe je bilo moguće odrediti značaj strukture aktivnog centra, kao i strukture molekula reaktivatora na reaktivacione osobine aktivatora, i pratiti kinetiku reaktivacije različitim reaktivatorima (14).

Proučavanje holinoreceptora: Proučavanja su pokazala da se ireverzibilni analogi acetilholina vežu za SH grupu na podjedinici α, koja je locirana kod vezivnog mjesta za acetilholin. Dio spinskog označivača ugrađuje se na aktivno mjesto holinoreceptora. Vezivanje za to mjesto smanjuje slobodu rotacije spinskog označivača, što znači da je aktivni centar holinoreceptora zatvorena struktura. Spinsko označivanje dvaju bromanaloga acetilholina vjerovatno uzrokuje promjenu tih molekula u muskarinsku konformaciju i time prekid akceleracije vezivanja za SH grupu, koja je inače specifična za supstancije sa kvartarnom strukturom (15).

Proučavanja na membrani električnog organa drhtulje i humanih eritrocita: Proučavanja uticaja različitih holinergičnih supstancija na

membrani električnog organa drhtulje *Torpedo marmorata* pokazala su da 2-PAM, d-tubokurarin i DFP ne utiču na uređenost i dinamiku fosfolipidnih lanaca. Drugim riječima, u prisustvu spomenutih supstancija ne mijenja se vrijednost maksimalnog superfinog rascjepa ($2A_{II}$) i korelacionog vremena (τ_c) spinskog označivača, koji karakterišu te promjene. Sa druge strane, u prisustvu somana mijenja se τ_c, vrijeme se produžava, što znači da se dinamika fosfolipida smanjuje. Uticaj somana na membranu se razlikuje od uticaja fenobarbitona, koji inače povećava fluidnost membrane (13). Slična istraživanja na eritrocitima (slika 3, tabela 1) potvrdila su da soman uzrokuje promjene u kore-

Slika 3.



Spektri elektronske paramagnetne rezonacije spinskog označivača MeFASL (10,3) ugrađenog u membrane eritrocita, pri različitim temperaturama

Tabela 1.

KORELACIONO VRIJEME τ_c SPINSKOG OZNAČIVAČA MeFASL (10,3) UGRAĐENOG U MEMBRANE ERITROCITA, PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I UZ PRISUSTVO FIZIOLOŠKOG RASTVORA pH 7,4, PROPILENGLIKOLA, 2-PAM, HI-6 I SOMANA

Uzorak	25°C τ_c ns	31°C τ_c ns	36°C τ_c ns	41°C τ_c ns
Fiziološki rastvor (n = 7)	4,92±0,15	3,59±0,07	2,96±0,08	2,52±0,04
Propilenglikol (n = 8)	4,66±0,29	3,49±0,18	2,84±0,14	2,36±0,06
1 mmol/l 2-PAM fiz. r. (n = 3)	4,94±0,04	3,67±0,10	3,03±0,17	2,53±0,02
1 mmol/l HI-6 fiz. r. (n = 3)	5,27±0,36	3,77±0,11	3,03±0,14	2,55±0,08
10 μmol/l soman (n = 7)	4,47±0,52	3,36±0,09	2,73±0,09	2,35±0,07

n = broj uzoraka

lacionom vremenu. Međutim, 2-PAM ili HI-6, kao općepoznati reaktivatori, ne utiču na spomenutu dinamiku lipida. U toku su ispitivanja koja će pokazati da li reaktivatori i protektori štite membranu od nespecifičnog djelovanja somana. Za ta ispitivanja propilenglikol je kao medij neupotrebljiv jer uzrokuje značajne promjene u fluidnosti membrane. Istraživanja nespecifičnih efekata holinergičnih supstancija potvrdila su da neki ireverzibilni inhibitori acetilholinesteraze mogu ne samo uticati na encim nego i indukovati nespecifične promjene u celičnoj strukturi, među kojima su promjene u membrani veoma značajne.

ZAHVALA: Rad je djelomično finansirala Raziskovalna skupnost Slovenije. Na tehničkoj pomoći autori najtoplije zahvaljuju drugarici Cvetki Janc-Juršič i drugarici Marjani Nemec.

SUMMARY

ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE AND ITS POSSIBLE USE IN THE PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF DRUGS

Electron paramagnetic resonance is a spectroscopic method which can be also used in the study of different pharmacological and toxicological properties of drugs, such as drug resorption, distribution, excretion and metabolism. Further, various effects mediated via receptors or enzymes and effects not mediated via receptors, i. e. nonspecific effects on membrane due to physical and/or chemical properties of drug can be investigated. Some essential results of our own studies concerning the properties of acetylcholinesterase and cholinoreceptor are presented. Beside this, the influence of cholinergic substances on membrane fluidity is described.

LITERATURA

(1) Chignell, C. F. (1979): *Spin labeling in pharmacology.* U: Berliner, L. J. (ed.) Spin labeling II — theory and applications, Academic Press, New York, p. 223.

(2) Gilmer Kury, P., Ramwell, P. W. and McConell, H. M. (1974): *The effect of prostaglandins E_1 and E_2 on the human erythrocyte as monitored by spin labels.* Biochem. Biophys. Res. Commun. *56,* 478—483.

(3) Janzen, E. G. and Blackburn B. J. (1971): *Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping.* Acc. Chem. Res. *4,* 31—40.

(4) Leute, R. K., Ullman, E. F., Goldstein, A. and Herzenberg, L. A. (1972): *Spin immunoassay technique for determination of morphine.* Nature new biol. *236,* 93—94.

(5) Montgomery, M. R., Holtzman, J. L., Leute, R. K., Dewees, J. S. and Bolz, A. (1975): *Determination of diphenylhidantoin in human serum by spin immunoassay.* Clin. Chem. *21,* 221—226.

(6) Pečar, S., Šentjurc, M., Schara, M., Nemec, M., Sorg, B. and Hecker, E. (1982): *Spin-labeled phorbol ester and their interaction with cellular membranes.* U: Hecker, E. (ed.) Carcinogenesis 7, Raven Press, New York, p. 541.

(7) Schara, M., Pečar, S., Nemec, M. and Šentjurc, M. (1983): *Spin probe and spin label binding to bovine serum albumin.* Farm. vestnik *34,* 139—149.

(8) Swartz, H. M., Bolton, J. R. and Borg, D. C. (1972): *Biological application of electron spin resonance.* Wiles-Interscience, New York.

(9) Šentjurc, M., Schara, M., Nemec, M., Sava, G. and Giraldi, T. (1983): *The influence of antimetastatic drugs on L-1210 cell membranes.* Farm. vestnik *34,* 228—238.

(10) Šentjurc, M., Schara, M. and Nemec, M. (1984): *Interaction of liposomes with other lipid lilayers.* Studia biophys *103,* 81—87.

(11) Šentjurc, M. in Štalc, A. (1976): *Uporaba elektronske paramagnetne resonance v biologiji in meidcini.* Med. razgl. 15, 259—279.

(12) Šentjurc, M., Štalc, A. and Župančić, A. O. (1976): *On the location of active serine of membrane acetylcholinesterase studied by the EPR method.* Biochim. Biophys. Acta *438,* 131—137.

(13) Šentjurc, M. and Štalc, A. (1985): *The influence of cholinergic substances on the membrane fluidity.* Period. biol. *87* 314—316.

(14) Šentjurc, M., Štalc, A., Pečar, S. and Schara, M.: *Covalent spin labeling in acetylcholinesterase studies.* U: Zhdanov, R. I. (ed.) Paramagnetic models of drugs and biochemicals. CRC Press INC, Florida (u štampi).

(15) Štalc, A., Sojer, J., Šentjurc, M., Pečar, S. and Župančič, A. O. (1984): *An introduction to the study of the microgeography of the cholinoreceptor active site by structural analogs of acetylcholine.* Farm. vestnik *35,* 5—12.

(16) Wee, V. T., Feldman, R. J., Tanis, R. J. and Chignell, C. I. (1976): *A comparative study of mammalian erythrocyte carbonic anhydrases employing spin-labeled analogs of inhibitory sulfonamides.* Mol. Pharmacol. *12,* 832—843.

(17) Weiland, G., Georgia, B., Wee, V. T., Chignell, C. F. and Taylor, P. (1976): *Ligand interactions with cholinergic receptor-enriched membranes from Torpedo: Influence of agonist exposure on receptor properties.* Mol. Pharmacol. *12,* 1091—1105.

ANU BiH АНУ БиХ