Utjecaj položaja His6 privjeska na svojstva proteina, primjer adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije Helicobacter pylori ; O lijekovima kroz predtercijarnu nastavu kemije

Mišković, Marija Zora

Master's thesis / Diplomski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:158502

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marija Zora Mišković

Utjecaj položaja His_6 privjeska na svojstva proteina, primjer adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori;* O lijekovima kroz predtercijarnu nastavu kemije

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb, 2025.

Eksperimentalni dio diplomskog rada izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ivane Leščić Ašler, v. zn. sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec. Voditeljica metodičkog dijela diplomskog rada je izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš Sermek.

Eksperimentalni dio diplomskog rada izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Alosterički komunikacijski putevi u oligomernim enzimima (IP-2019-04-6764).

Zahvale

Izražavam svoju duboku zahvalnost mentorici dr. sc. Ivani Leščić Ašler na prilici za izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada te na neprocjenjivoj prilici za rad i učenje pod njezinim vodstvom. Bez njezine iznimne stručnosti, podrške, strpljenja i nesebične spremnosti da podijeli svoje znanje, ovaj rad ne bi bio moguć. Teško je riječima opisati koliko sve cijenim – od srca Vam hvala!

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Draginji Mrvoš - Sermek, čije je vodstvo bilo ključno za metodički dio rada. Hvala na izdvojenom vremenu, uloženom trudu i neizmjernom strpljenju, ne samo tijekom izrade diplomskog rada, već kroz cijeli moj studijski put.

Zahvaljujem svim kolegama iz laboratorija na Institutu Ruđer Bošković na stvaranju poticajne, ugodne i prijateljske atmosfere koja je rad učinila ljepšim i ispunjenijim.

Neizmjerno sam zahvalna svojoj obitelji, koja mi je bila najveći oslonac kroz sve izazove i koja mi je pružila snagu i motivaciju u najtežim trenucima. Mama, tata – vaša podrška je bila neprocjenjiva i beskrajno vam hvala na svemu!

Posebnu zahvalu upućujem Karli – mojoj vjernoj prijateljici i kumi. Ponosna sam što imam osobu poput tebe uz sebe kroz sve ove godine. Hvala ti na svakom razgovoru, podršci i satima provedenim uz pisanje, koji su nam olakšali ovaj put. Također, veliko hvala malom Davidu, čiji osmijeh uvijek donosi svjetlo i radost.

Zahvaljujem svojim dragim prijateljicama Ani, Antoniji, Ivani, Lei, Petri i Zvonimiri na svakoj kavi, svakom zajedničkom učenju, podršci, savjetima i trenucima koji su ove godine učinili nezaboravnima. Bila je čast, užitak i privilegija studirati s vama.

Zahvaljujem svojoj rodici i krsnoj kumi Angeli. Luce, hvala ti na svim kasnonoćnim radnim sesijama, podršci i zajedničkim trenucima koji su ovaj proces učinili lakšim i ljepšim. Neizmjerno sam sretna što vas imam u svom životu.

Hvala i Luciji, koja je uz mene od prvog dana prvog studija. Tvoje duhovite dosjetke, motivacija i nepokolebljiva podrška učinile su svaki izazov podnošljivijim i svaki cilj dostižnijim. Samo naprijed – ima kraja!

Zahvaljujem svim ostalim prijateljima i članovima obitelji koji su svojim prisustvom i podrškom uljepšali ovo razdoblje mog života.

Posebno hvala posebnoj osobi koja je bila uz mene u svim trenucima, bodrila me, nasmijavala i učinila ovaj prijelaz u novu životnu etapu lakšim. Hvala ti na svakom trenutku i svakoj nezaboravnoj i neprocjenjivoj uspomeni.

I na kraju, zahvaljujem sebi. Jer nisam odustala. Možda ne mora biti savršeno – ali mora biti završeno!

Sadržaj

SAŽETAK XI
ABSTRACT XIII
§ 1. UVOD 1
1.1. Cilj rada 2
§ 2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Pročišćavanje proteina 3
2.2. Metode pročišćavanja 3
2.2.1. Kromatografija 3
2.2.2. Precipitacija 5
2.2.3. Odvajanje pomoću membrana 6
2.2.4. Elektroforeza 6
2.2.5. Magnetska separacija 7
2.3. Pročišćavanje proteinskim privjescima 7
2.4. Tipovi proteinskih privjesaka 8
2.4.1. Polihistidinski privjesak (His-privjesak) 8
2.4.2. FLAG-privjesak 8
2.4.3. Strep-privjesak 9
2.4.4. C-myc-privjesak 9
2.4.5. S-privjesak 9
2.5. Utjecaj histidinskog privjeska 10
2.5.1. Pozitivni učinci His-privjeska na protein 10
2.5.2. Negativni učinci His-privjeska na protein 11
2.6. Adenilosukcinat-sintetaza 12
2.7. Helicobacter pylori 13
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 14
3.1. Materijali i metode 14
3.1.1. Korištene kemikalije 14
3.1.2. Enzimski supstrati i inhibitori 14
3.1.3. Proteinski markeri 14
3.1.4. Bakterijski sojevi i plazmidi 14

3.2. Prekomjerna ekspresija proteina 15
3.2.1. Transformacija bakterija 15
3.2.2. Prekonoćna kultura 15
3.2.3. Prekomjerna ekspresija proteina 15
3.3. Ekstrakcija proteina 16
3.4. Pročišćavanje proteina 16
3.4.1. Afinitetna kromatografija 16
3.4.2. Gel–filtracijska kromatografija, FPLC 17
3.5. Koncentriranje proteina 18
3.6. Mjerenje koncentracije proteina 18
3.7. Elektroforeza na gelu 19
3.8. Izoelektrično fokusiranje 21
3.9. Mjerenje aktivnosti enzima 21
3.10. Utjecaj pH i temperature na stabilnost proteina 22
3.11. Određivanje kinetičkih parametara 23
3.12. Cirkularni dikroizam 24
3.13. Kristalizacija proteina 25
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 28
4.1. Pročišćavanje proteina 28
4.2. Stabilnost enzima N-His-AdSS 32
4.3. Kinetički parametri 34
4.4. Inhibicija N-His-AdSS 38
4.5. Elementi sekundardne strukture 39
4.6. Kristalizacija 41
§ 5. ZAKLJUČAK 44
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 46
§ 7. LITERATURNI IZVORI 47
§ 8. METODIČKI DIO 50
8.1. Uvod 50
8.2. Teorijski okvir 51
8.2.1. Važnost poučavanja kemije 51
8.2.2. Važnost poučavanja farmakologije u sekundarnom obrazovanju 52
8.2.3. Polazni pojmovi i definicije za nastavu o lijekovima 53
8.2.4. Ciljevi nacionalnog kurikuluma u poučavanju kemije 54
8.3. Analiza predmetnog kurikuluma 55
8.4. Usporedba hrvatskog s kurikulumima drugih država 57

8.4.1. Kurikulum kemije u Njemačkoj *57*
8.4.2. Kurikulum kemije u Sloveniji *58*
8.5. Procjena slijeda pojmova i oblikovanja sadržaja udžbenika prema ishodima 60
8.5.1. Srednjoškolski udžbenici kemije danas u optjecaju *60*
8.5.2. Stariji udžbenici *62*
8.6. Analiza udžbeničke literature 63
8.7. Razmatranje inovativnih metoda poučavanja 65
8.7.1. Raznolike nastavne strategije – igre *65*
8.7.2. Učenje temeljeno na istraživanju i otkrivanju *66*
8.7.3. Integracija digitalnih alata *67*
8.8. Prijedlog nastavnog sata 69
8.8.1. Priprema za 90-minutni nastavni sat *69*
8.8.2. Prijedlog radnog lista za učenike *72*
8.9. ZAKLJUČAK 85
8.10. LITERATURNI IZVORI 86
§ 9. DODATAK XV
§ 10. ŽIVOTOPIS XVIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ POLOŽAJA HIS_6 PRIVJESKA NA SVOJSTVA PROTEINA, PRIMJER ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE IZ BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI;* O LIJEKOVIMA KROZ PREDTERCIJARNU NASTAVU KEMIJE

Marija Zora Mišković

Za znanstvena istraživanja nužno je osigurati pročišćene proteine, što se često postiže dodavanjem specifičnih privjesaka poput histidinskog niza na proteinsku sekvencu. Enzim adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije *Helicobacter pylori*, ključan u biosintezi purina, obilježen histidinskim privjeskom na svom N-kraju, pročišćen je afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom. Biokemijska karakterizacija obuhvatila je određivanje molekulske mase, izoelektrične točke, kinetičkih konstanti i stabilnosti enzima pri različitim uvjetima. Istraživanje je pokazalo da histidinski privjesak utječe na stabilnost i aktivnost enzima. Metodički dio rada predlaže nastavne aktivnosti za izbornu temu Znanost o materijalima u 4. razredu gimnazije, s naglaskom na integraciju kemijskih koncepata i kritičko promišljanje o kurikulumu. Inovativne metode poput interaktivnih lekcija i simulacija otkrivanja lijeka razmatrane su kako bi se unaprijedilo poučavanje i potaknulo kritičko promišljanje o uporabi lijekova i zdravstvenim rizicima.

(86 stranica, 24 slike, 18 tablica, 100 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Ključne riječi: aktivnost enzima, enzimi, kurikulum, lijekovi, nastava, afinitetni privjesci, stabilnost enzima

Mentor: dr. sc. Ivana Leščić Ašler, v. zn. sur.
Mentor metod. dijela: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
Ocjenitelji:
1. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
2. izv. prof. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Zamjena: 1. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija
2. prof. dr. sc. Željka Soldin

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

EFFECT OF HIS_6 TAG POSITION ON PROTEIN PROPERTIES, THE EXAMPLE OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE FROM *HELICOBACTER PYLORI*; ABOUT DRUGS THROUGH PRE-TERTIARY CHEMISTRY TEACHING

Marija Zora Mišković

For scientific research, it is necessary to provide purified proteins, which is often achieved by adding specific appendages such as a histidine tag to the protein sequence. The enzyme adenylosuccinate synthetase from the bacterium *Helicobacter pylori*, key enzyme in purine biosynthesis, having a His-tag on its N-terminus, was purified by affinity chromatography and gel filtration. Biochemical characterization included determination of molecular weight, isoelectric point, kinetic constants and enzyme stability under different conditions. Research has shown that the histidine tag affects the stability and activity of the enzyme. The methodological part of the work foresees teaching activities for the optional topic Materials Science in the 4th grade of high school, with an emphasis on the integration of chemical concepts and critical thinking about the curriculum. Innovative methods such as interactive lessons and drug discovery simulations were considered to enhance teaching and encourage critical thinking about drug use and health risks.

(86 pages, 24 figures, 18 tables, 100 references, original in croatian)
Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb
Keywords: affinity tags, enzymes, enzyme activity, enzyme stability, curriculum, medicines, teaching
Mentor: Dr. Ivana Leščić Ašler, Senior Research Associate
Mentor of the methodological part: Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Associate Professor
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Associate Professor
Reviewers:

1. Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Associate Professor
2. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Associate Professor
3. Dr. Mirela Sertić Perić, Associate Professor

Substitute: 1. Dr. Renata Matoničkin Kepčija, Full Professor
2. Dr. Željka Soldin, Full Professor

Date of exam: 21st February 2025

§ 1. UVOD

Za znanstvena istraživanja, ali i za primjenu u industriji ili medicini, potrebno je proizvesti određene količine proteina visoke čistoće. Nekada su se proteini pročišćavali iz prirodnih izvora, no danas se uglavnom koriste rekombinantni proteini, čija je proizvodnja mnogo brža i učinkovitija.

Sustavi za ekspresiju rekombinantnih proteina koriste različite organizme, uključujući bakterije, kvasce, sisavce i stanice inficirane baculovirusom insekata, kako bi sintetizirali protein. Za pročišćavanje rekombinantnih proteina obično se koriste specifični privjesci vezani na protein, koji olakšavaju njihovu izolaciju. Među njima, najčešće korišten je histidinski privjesak (His_6-privjesak), koji se zbog svoje male veličine, jednostavne primjene i visoke selektivnosti vezanja na imobilizirane metalne ione (npr. nikla) koristi u afinitetnoj kromatografiji. Pročišćavanje proteina s His-privjeskom uspješno je provedeno u svim navedenim sustavima.[1]

Polihistidinski afinitetni privjesci mogu se postaviti na N- ili C-kraj rekombinantnog proteina, a optimalna pozicija ovisi o specifičnom proteinu. Naime, neka istraživanja pokazala su da prisutnost privjesaka može utjecati na funkcionalnost, stabilnost i strukturna svojstva proteina, ovisno o njegovom položaju na proteinskoj sekvenci.

Bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira želudac više od 50% svjetske populacije, a njeno prekomjerno razmnožavanje uzrokuje niz problema poput gastritisa, čira i povećanog rizika od razvoja raka želuca. Trenutno se liječenje oslanja na trofaznu antibiotsku terapiju, no zbog prekomjerne upotrebe antibiotika sve više sojeva *H. pylori* razvija otpornost, što stvara potrebu za alternativnim terapijama. Jedan od pristupa je potraga za novim ciljnim enzimima, čija bi inhibicija spriječila rast i razmnožavanje bakterije. Potencijalni ciljni enzimi su npr. enzimi uključeni u sintezu purina, poput adenilosukcinat-sintetaze (AdSS).

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj položaja His_6-privjeska na N-kraju adenilosukcinat-sintetaze (AdSS) iz bakterije *Helicobacter pylori* na njena biokemijska i strukturna svojstva. Dobiveni rezultati usporedit će se sa svojstvima već istraženih varijanti enzima (nativni i enzim s His_6-privjeskom na C-kraju) kako bi se utvrdila važnost položaja privjeska za funkcionalnost enzima te pridonijelo novim spoznajama koje mogu pomoći u razvoju alternativnih terapija protiv *H. pylori*.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Pročišćavanje proteina

Za većinu istraživanja ili primjene, proteini moraju biti pročišćeni. Nekad su se proteini pročišćavali iz svojih prirodnih izvora (stanice, tkiva, krv). Rane metode pročišćavanja proteina oslanjale su se prvenstveno na razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima proteina, poput topljivosti, veličine i naboja. Ove tradicionalne metode obično su uključivale višestruke korake, što je proces pročišćavanja činilo dugotrajnim, neučinkovitim i s nižim prinosima. Primjeri takvih metoda uključuju adsorpcijsku kromatografiju, koja se temelji na afinitetu proteina prema materijalima poput aluminijevog oksida, i ionoizmjenjivačku kromatografiju, gdje se proteini razdvajaju na temelju svog naboja interakcijom s nabijenom matriksom. [2]

U današnje doba uobičajeno je proizvesti rekombinantni protein. To znači da je DNA koja kodira protein klonirana u ekspresijski vektor koji podržava ekspresiju gena i translaciju glasničke RNA (mRNA) u stanicama za ekspresiju. Takav protein zbog specifičnog slijeda te zbog toga što se nalazi u specifičnom, istraživaču dobro poznatom staničnom okolišu je lakše pročistiti. S obzirom na to postoje različite metode pročišćavanja.

2.2. Metode pročišćavanja

Odabir odgovarajuće metode pročišćavanja ovisi o karakteristikama proteina od interesa (topljivost, veličina, naboj, prisutnost afinitetnih oznaka), željenoj čistoći konačnog proizvoda i dostupnim resursima. U praksi se često koristi kombinacija više metoda kako bi se postigla željena čistoća proteina.

2.2.1. Kromatografija

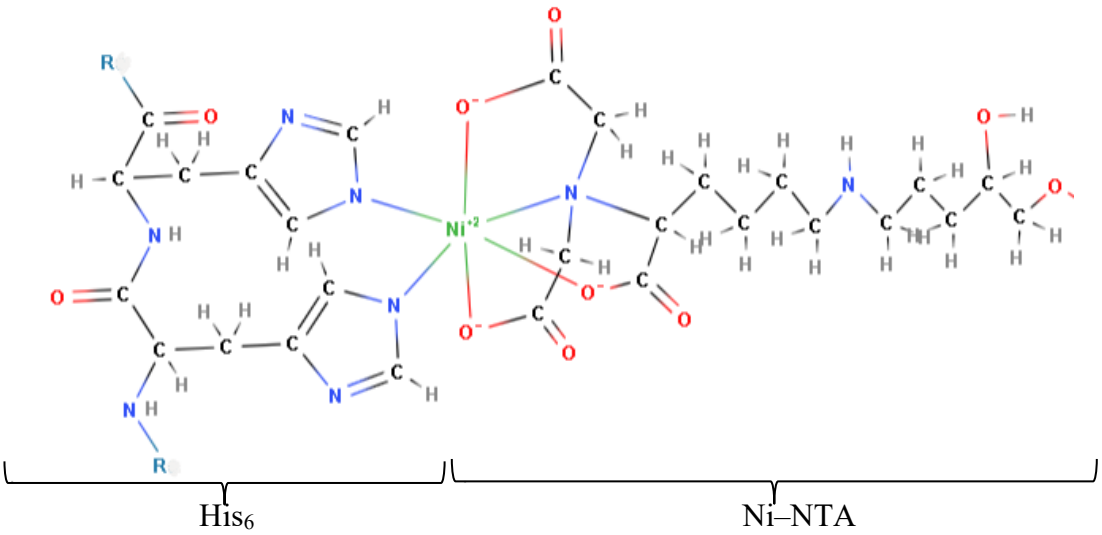
Kromatografija je moćna i svestrana tehnika koja se koristi za odvajanje i pročišćavanje proteina na temelju njihovih različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Postoje različite vrste kromatografije, od kojih svaka koristi različite principe za odvajanje proteina:

- **Afinitetna kromatografija**: IMAC (afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima) je jedna od najčešćih metoda pročišćavanja proteina koja se temelji na specifičnoj interakciji između određenih aminokiselina, odnosno proteinskih

privjesaka (poput histidina) na proteinu i metalnih iona (poput Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) imobiliziranih na matriksu.

Ova metoda se temelji na vezanju nitriloacetatne (NTA) skupine za agarozu kao stacionarnu fazu kolone s jedne strane, te za niklov(II) ion s druge strane koji koordinira s četiri veze (Slika 2.1). Za taj niklov(II) ion veže se histidin iz heksahistidinskog privjeska na proteinu. Time se on imobilizira dok ostali proteini prolaze dalje kroz kolonu. Kako bi se vezani protein odvojio od kolone, eluira se puferom koji sadrži višu koncentraciju imidazola, a koji zbog strukturne sličnosti histidinu njega kompetitivno istiskuje. [3,4]

Osim histidinskih privjesaka u IMAC, u afinitetnoj kromatografiji mogu se koristiti i drugi privjesci (vidi poglavlje 2.3.), koji se vežu na različite specifične molekule vezane na stacionarnu fazu matriksa.



Slika 2.1. Prikaz kompleksa koji nastaje vezanjem heksahistidinskog privjeska (His_6) na proteinu za niklov(II) ion iz nitrilotriacetatne skupine (Ni–NTA) vezane na agarozu (nije prikazana).

- **Kromatografija ionske izmjene**: Ova metoda se temelji na razlikama u naboju između proteina i stacionarne faze. Nepokretna faza može biti pozitivno ili negativno nabijena, a proteini se vežu na matriks ovisno o njihovom neto naboju pri određenom pH. [3,4, 5]

- **Kromatografija utemeljena na hidrofobnoj interakciji**: Ova metoda se temelji na razlikama u hidrofobnosti između proteina i stacionarne faze, koja je hidrofobna, a proteini se vežu na nju ovisno o hidrofobnosti njihove površine. [3]
- **Kromatografija isključenjem veličine**:
  Gel–filtracijska kromatografija odnosno kromatografija isključenjem po veličini molekule (*eng. size exclusion chromatography, SEC*) je metoda koja se bazira na razdvajanju proteina temeljem njihove veličine. Kolona se sastoji od čvrste ili stacionarne faze koju čini porozan materijal. Obično se sastoji od dekstrana, agaroze ili poliakrilamida u čije pore ulaze manje molekule koje nosi otapalo (eluens), odnosno mobilna faza, dok veći proteini ne ulaze u pore i putuju brže. Manje molekule se time dulje zadržavaju na koloni, a veće molekule prolaze te prije silaze s kolone (eluat). [3,6,7]

2.2.2. Precipitacija

Precipitacija ili taloženje proteina je proces izdvajanja proteina iz otopine u obliku netopljivog taloga. To se postiže promjenom topljivosti proteina dodatkom reagensa ili promjenom uvjeta u otopini. Precipitacija se može koristiti kao korak u pročišćavanju proteina, često u kombinaciji s drugim metodama poput kromatografije.

- **Isoljavanje**: Ova metoda se temelji na promjeni topljivosti proteina dodatkom soli, poput amonijevog sulfata. Smanjuje topljivost proteina smanjenjem koncentracije slobodne vode u otopini, što dovodi do interakcije hidrofobnih dijelova proteina i uzrokuje njihovo taloženje. Često je korištena jer je blaga i ne denaturira proteine.
- **Izoelektrično taloženje**: Temelji se na činjenici da proteini imaju najmanju topljivost pri izoelektričnoj točki (pI). Prilagođavanjem pH otopine na pI proteina od interesa, protein će se taložiti dok će ostali proteini ostati u otopini.
- **Taloženje organskim otapalom**: Temelji se na promjeni topljivosti proteina dodatkom organskog otapala, poput etanola ili acetona. Slično kao i kod taloženja soli, organsko otapalo smanjuje dielektričnu konstantu otopine, što dovodi do agregacije i taloženja proteina. [7]

2.2.3. Odvajanje pomoću membrana

Membranska separacija se koristi za odvajanje proteina na temelju njihove veličine i oblika pomoću polupropusnih membrana:

- **Dijaliza**: Ova metoda se koristi za uklanjanje malih molekula, poput soli i deterdženata, iz uzorka proteina. Male molekule difundiraju kroz semipermeabilnu membranu koja ima određenu veličinu pora (eng. *MWCO – molecular weight cutoff*) membranu, dok veliki proteini ostaju na membrani.
- **Ultrafiltracija**: Ova metoda također koristi semipermeabilnu membranu definiranu veličinom pora, sa sličnim principom kao i dijaliza: otopina proteina prolazi kroz membranu pod tlakom, a proteini veći od pora zadržavaju se na membrani, dok manji prolaze. Ultrafiltracija je postupak odvajanja tvari na temelju molekulske mase, ali i na temelju razlike u brzini filtracije različitih komponenti smjese preko membrane pod utjecajem sile pritiska. Koristi se za koncentriranje proteina, izmjenu pufera, isoljavanje, pročišćavanje proteina te uklanjanje virusa i bakterija. [7, 8]

2.2.4. Elektroforeza

Elektroforeza se temelji na migraciji nabijenih molekula u električnom polju kroz gel matricu. Različiti tipovi gelova i uvjeti elektroforeze omogućuju odvajanje proteina na temelju njihovog naboja, veličine i oblika:

- **SDS-PAGE (natrij-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza)**: Gel elektroforeza pri denaturirajućim uvjetima (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, *SDS-PAGE*) je metoda odvajanja denaturiranih proteina na temelju molekulske mase. Proteini imaju određeni naboj, međutim ovdje se prije prolaska proteina kroz gel oni denaturiraju pomoću snažnog deterdženta *natrij-dodecilsulfata.* Ova metoda se temelji na gibanju molekula jednako negativnog naboja u električnom polju kroz poliakrilamidnu mrežu. S obzirom na jednak naboj, gibanje ovisi samo o molekulskoj masi koja se onda ovom metodom može i odrediti. Brzina prolaska molekula kroz gel ovisi i o veličini pora gela što ovisi o koncentraciji poliakrilamida.[9]
- **Dvodimenzijska elektroforeza**: Ova metoda kombinira dvije različite vrste elektroforeze, poput izoelektričnog fokusiranja i SDS-PAGE, kako bi se postigla bolja rezolucija odvajanja proteina. U prvoj dimenziji proteini se razdvajaju na temelju izoelektrične točke, a u drugoj dimenziji na temelju molekulske mase. Ova tehnika se često koristi u proteomici za analizu složenih uzoraka proteina.[3]

- **Izoelektrično fokusiranje (IEF):** Izoelektrično fokusiranje je elektroforetski postupak koji koristi električno polje i naboj proteina kao temelj analize sastava otopine ili za određivanje pI točke nekog uzorka. Funkcionira na principu naboja proteina, odnosno ako protein nije pri svojoj pI točci njegov naboj će ovisiti o okolnom pH. Kada se primijeni električno polje, protein se kreće prema jednoj ili drugoj elektrodi ovisno o polarnosti naboja, što ovisi o okolnom pH. Ako se uspostavi pH gradijent između dvije elektrode, molekula će putovati prema elektrodi suprotnog naboja od onog na toj molekuli. Kako se molekula kreće kroz pH gradijent, nabijene skupine odgovorne za ukupni naboj postat će neutralizirane kako se povećava koncentracija suprotno nabijenih iona iz okolne otopine.[15] Ukratko, proteini se stavljaju u gel s pH gradijentom. Proteini će migrirati kroz gel dok ne dođu do područja gdje je pH jednak njihovom pI. U tom trenutku će se zaustaviti jer više nemaju neto naboj. [4]
- **Kapilarna elektroforeza (CE)**: CE je tehnika visoke razlučivosti koja koristi uske kapilare za razdvajanje nabijenih molekula u električnom polju. CE ima nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalnu gel elektroforezu, uključujući brže vrijeme analize, veću osjetljivost i manju potrošnju uzorka. CE se može koristiti za analizu različitih vrsta molekula, uključujući proteine, peptide, nukleinske kiseline i male molekule.[3]

2.2.5. Magnetska separacija

Ova metoda koristi magnetske kuglice obložene ligandom specifičnim za protein od interesa. Kuglice se dodaju u uzorak proteina, a zatim se magnetski izdvajaju zajedno s vezanim proteinima. Nakon ispiranja, proteini se eluiraju s kuglica promjenom pH ili ionske snage.[4]

2.3. Pročišćavanje proteinskim privjescima

Afinitetno označavanje, gdje se proteinima dodaju kratki privjesci na N- ili C-kraj, pojednostavnilo je proces pročišćavanja proteina, omogućujući brže i učinkovitije pročišćavanje s većim prinosima. Najčešći privjesak je histidinski privjesak (eng. *His-tag*), ali se koriste i drugi poput *FLAG*, *c-myc*, *Strep II*, i *poli-Arg*.

Afinitetni privjesci zahtijevaju specifične uvjete pročišćavanja koji mogu utjecati na protein, pa su razvijene različite strategije. Prva uključuje male peptidne privjeske koji ne utječu značajno na strukturu i funkciju proteina, dok druga strategija koristi veće proteine za povećanje

topljivosti, iako ih kasnije treba ukloniti za određene eksperimente, poput kristalizacije ili proizvodnje antitijela.

Ove metode pružaju fleksibilnost u izboru pristupa za optimizaciju pročišćavanja, prilagođavajući se specifičnim potrebama istraživanja.[10]

2.4. Tipovi proteinskih privjesaka

2.4.1. Polihistidinski privjesak (His-privjesak)

Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalima (IMAC, već spomenuta u poglavlju 2.2.1.) koristi se za pročišćavanje rekombinantnih proteina označenih polihistidinskim privjeskom, poznatim kao His-privjesak. His-privjesak sastoji se od nekoliko histidinskih ostataka, obično šest (His_6), koji se dodaju na N- ili C-kraj proteina. Ova oznaka omogućuje ciljanom proteinu da se specifično veže za metalne ione poput nikla (Ni^{2+}), kobalta (Co^{2+}), bakra (Cu^{2+}) ili cinka (Zn^{2+}) koji su imobilizirani na stacionarnoj fazi unutar kromatografske kolone.

Histidin ima imidazolni prsten u svojoj strukturi, što omogućuje stvaranje koordinacijskih veza s prijelaznim metalima. Zbog toga, His-privjesak ima visok afinitet prema ovim metalima, što ga čini idealnim za afinitetnu kromatografiju. Njegova primjena omogućuje brzo i jednostavno pročišćavanje ciljanih proteina iz složenih smjesa poput bakterijskih staničnih ekstrakata. Nakon vezivanja na smolu, proteini označeni His-privjeskom mogu se eluirati promjenom vrijednosti pH ili dodatkom slobodnog imidazola, koji konkurira za vezna mjesta na metalu.

IMAC metoda prvi put je opisana 1987. godine kada je Hochuli razvio nitrilotrioctenu kiselinu (NTA) kao kelatnu smolu koja veže metalne ione [10]. Ubrzo nakon toga, IMAC je korišten za uspješno pročišćavanje dihidrofolat reduktaze, proteina označenog His-privjeskom. Tijekom vremena razvijeni su različiti metalni nosači, a jedna od najpoznatijih alternativa NTA je TALON smola, koja koristi kobaltov(II) ion Co^{2+} vezan za karboksimetilaspartat (CMA). TALON smola omogućuje pročišćavanje proteina u blagim uvjetima, s manjim nespecifičnim vezanjem u usporedbi s Ni^{2+}-NTA smolom, čime se postiže veća čistoća eluata.[10]

2.4.2. FLAG-privjesak

FLAG-privjesak je kratki, hidrofilni peptid od 8 aminokiselina (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Veže se na specifična monoklonska antitijela s visokom specifičnošću. To omogućuje učinkovito pročišćavanje proteina označenih FLAG-oznakom iz složenih smjesa.

Može se ukloniti s proteina nakon pročišćavanja pomoću enzima enterokinaze, koji specifično prepoznaje i cijepa sekvencu na C-kraju FLAG-peptida. [10]

2.4.3. Strep-privjesak

Strep-privjesak je peptidna oznaka od osam aminokiselina (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) koja ima visok afinitet za streptavidin, protein iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Može se eluirati s kolone streptavidina u blagim uvjetima, dodatkom biotina ili derivata biotina što pomaže u očuvanju aktivnosti proteina. [10]

2.4.4. C-myc-privjesak

C-myc-privjesak je peptidna sekvenca od 11 aminokiselina (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) izvedena iz protoonkogena c-myc. C-myc označeni proteini mogu se pročišćavati afinitetno pomoću protutijela Mab 9E10 vezanog na agarozu, no elucija pri niskom pH može smanjiti aktivnost proteina. Iako se koristi za detekciju, rjeđe se primjenjuje za pročišćavanje. [10]

2.4.5. S-privjesak

S-privjesak je peptidna oznaka koja se koristi u istraživanju proteina za detekciju i pročišćavanje. Sastoji se od 15 aminokiselina i temelji se na snažnoj interakciji s S-proteinom, oba izvedena iz ribonukleaze A. [10]

Postoji još privjesaka od kojih treba spomenuti vezujući peptid kalmodulina, modulatorskog proteina ovisnog o kalciju (CBP), veznu domenu celuloze (CBD) – koristi se za pročišćavanje proteina snažnim vezanjem na celulozu, streptavidin-vezni peptid (SBP privjesak) od 38 aminokiselina – omogućuje jednostavno pročišćavanje proteina eluiranjem s biotinom, hitin veznu domenu, glutation *S*-transferaza (GST-privjesak) koja povećava topljivost proteina i omogućuje pročišćavanje vezanjem na glutation u nedenaturirajućim uvjetima, uz eluciju reduciranom glutationom, maltoza vezujući protein (MBP-privjesak), NusA, TrxA i DsbA privjesci koje povećavaju topljivost proteina u *E. coli* i sprječavaju agregaciju.[10]

2.5. Utjecaj histidinskog privjeska

Polihistidinski (His) privjesci su popularni afinitetni privjesci koji se koriste za pročišćavanje rekombinantnih proteina pomoću metode afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalima (IMAC). Iako omogućuju jednostavno i učinkovito pročišćavanje, mogu imati različite pozitivne i negativne učinke na proteine.

Polihistidinski privjesci olakšavaju pročišćavanje proteina putem IMAC-a, no njihova duljina i pozicija mogu utjecati na svojstva proteina. Pokazalo se da duljina privjeska, specifično heksa- i dekahistidinski privjesci na N- i C-kraju više proteina *E. coli* više utječe na iskorištenje nego pozicija. Ni duljina ni pozicija nisu značajno utjecale na topljivost proteina, ali duljina privjeska utjecala je na oligomerizaciju i kromatografska svojstva pročišćenih proteina.[11]

2.5.1. Pozitivni učinci His-privjeska na protein

1. Jednostavno pročišćavanje: His-privjesci omogućuju selektivno vezanje proteina na metalne ione (najčešće Ni^{2+}), što omogućuje brzo i jednostavno pročišćavanje proteina, čak i iz složenih smjesa poput bakterijskih lizata.
2. Široka primjena i kompatibilnost: His-privjesci se mogu koristiti u različitim ekspresijskim sustavima, uključujući bakterije, kvasce i stanice sisavaca. Ova fleksibilnost omogućuje lako planiranje eksperimenata i proizvodnju rekombinantnih proteina.
3. Minimalni učinak na strukturu: Zbog male veličine (6-10 histidinskih ostataka), His privjesci obično ne ometaju sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina, što omogućuje očuvanje njihove biološke funkcije. Ovo je slučaj kod Buforina I, antimikrobnog peptida, koji zadržava svoju antimikrobnu aktivnost i nakon dodavanja His-privjeska. Ovakav rekombinantni Buforin I mogao bi se koristiti kao alternativa nekim trenutno korištenim antibioticima, budući da zadržava strukturnu stabilnost i antimikrobnu efikasnost dok ga je istovremeno isplativo proizvoditi.[12]
4. Poboljšanje proizvodnje proteina: U nekim slučajevima, dodavanje His-privjeska može povećati proizvodnju proteina. Primjerice, u bakteriji *Bacillus subtilis*, His-privjesak na N-kraju proteina EGFP (eng. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) povećao je njegovu ekspresiju do 15 puta, poboljšavajući inicijaciju translacije kod gena s niskom

ekspresijom. [13] Ovaj učinak His-privjeska može biti vrlo koristan u biotehnologiji za proizvodnju proteina sa slabom ekspresijom.

5. 5. Stabilnost i isplativost: His-privjesci omogućuju stabilnu proizvodnju proteina, a njihova proizvodnja je ekonomična, što je korisno za industrijsku proizvodnju proteina.[14,15]

2.5.2. Negativni učinci His-privjeska na protein

1. Široka primjena i kompatibilnost: His-privjesci se mogu koristiti u različitim ekspresijskim sustavima Utjecaj na inhibicijsku aktivnost: His-privjesak može utjecati na inhibicijsku aktivnost proteina ovisno o svom položaju. Proučavan je utjecaj položaja His-privjeska na aktivnost inhibitora proteaze leukocita sekreta (SLPI) koji inhibira enzim elastazu iz svinjske gušterače (PPE). NSLPI je imao veću inhibitornu aktivnost od CSLPI, što znači da bi His-privjesak mogao sterički blokirati aktivno mjesto ili utjecati na elektrostatske interakcije između SLPI i PPE enzima.[1]
2. Utjecaj na strukturnu dinamiku: His-privjesci mogu narušiti dinamiku proteina kod proteina čije funkcije ovise o preciznim konformacijskim promjenama. Primjerice, kod mioglobina, prisutnost His-privjeska povećava fleksibilnost proteina, što narušava molekulske pokrete važne za vezanje liganada. Zbog toga može doći do promjena u afinitetu za vezanje kisika, što je ključna funkcija mioglobina.[16]
3. Smanjena ekspresija kod gena visoke ekspresije: Iako je His-privjesak koristan za proteine s niskom ekspresijom, kod proteina s visokom ekspresijom može inhibirati inicijaciju translacije, smanjujući ukupnu proizvodnju.Tako je dodavanje His-privjeska na N-kraj BgaB enzima (β-galaktozidaza iz *Bacillus* subtilis) rezultiralo smanjenom razinom proizvodnje proteina.[13]
4. Promjene u strukturi i funkciji proteina: His-privjesak može izazvati lokalne konformacijske promjene ili promijeniti interakcije proteina s ligandima i drugim proteinima, smanjujući aktivnost, topljivost ili stabilnost proteina. [53] Međutim, može utjecati čak i kada nije blizu aktivnog mjesta. [54]
5. Nespecifične interakcije: His-privjesci mogu izazvati nespecifične interakcije kod metaloproteina, jer His-privjesak veže metalne ione. To može narušiti funkciju metaloproteina koji ovise o vezanju specifičnih metalnih iona. Ovakve interakcije ometaju normalnu funkcionalnost enzima i otežavaju analizu pročišćenog proteina.[17]

6. Utjecaj na stabilnost i kinetičke parametre: U nekim slučajevima His-privjesak može smanjiti stabilnost proteina ili utjecati na njegove kinetičke parametre (npr. K_M i V_{max}), što može promijeniti enzimsku aktivnost. Premještanje afinitetne oznake na suprotni kraj ili provođenje pročišćavanja u denaturirajućim uvjetima često rješava ovaj problem.[10]

2.6. Adenilosukcinat-sintetaza

Adenilosukcinat-sintetaza (AdSS) je enzim koji katalizira prvi korak u konverziji inozin-monofosfata (IMP) i aspartata u adenozin-monofosfat (AMP) u biosintezi purinskih nukleotida. Ova reakcija uključuje dodavanje aspartata na IMP, uz GTP kao izvor energije, tvoreći adenilosukcinat, GDP i anorganski fosfat, što je opisano jednadžbom kemijske reakcije (1). [18]

$$\text{IMP} + \text{Asp} + \text{GTP}\ (Mg^{2+}) \leftrightarrow \text{adenilosukcinat} + \text{GDP} + P_i \qquad (1)$$

Aktivno mjesto mora primiti tri supstrata (IMP, aspartat i GTP) i magnezijev ion (Mg^{2+}). Vezivanje supstrata u aktivnom mjestu je kooperativno, što znači da vezivanje jednog supstrata olakšava vezivanje ostalih. Ova kooperativnost je posljedica konformacijskih promjena u enzimu induciranih vezivanjem supstrata. Naime, vezivanje IMP-a inducira značajne konformacijske promjene u aktivnom mjestu, što stvara vezno mjesto za GTP.[19]

Mg^{2+} ion igra ključnu ulogu u katalizi, koordinirajući se sa svim trima supstratima i stabilizirajući prijelazno stanje.[19]

AdSS postoji kao homodimer, što znači da se sastoji od dvije identične podjedinice. Formiranje dimera je neophodno za formiranje funkcionalnog enzima jer ostatak arginina (Arg135 u *Helicobacter pylori* AdSS, Arg143 u *Escherichia coli* AdSS) iz jednog monomera sudjeluje u vezivanju IMP-a u aktivnom mjestu drugog monomera.[19]

Ovaj enzim je karakteriziran iz različitih izvora, uključujući bakteriju *Escherichia coli* (gen *purA*) i tkiva kralježnjaka. Kod kralježnjaka su prisutna dva izoenzima – jedan je uključen u biosintezu purina, dok je drugi dio ciklusa purinskih nukleotida. [20]

2.7. Helicobacter pylori

Helicobacter pylori je gram-negativna, mikroaerofilna, spiralna bakterija koja kolonizira sluznicu želuca i prisutna je u otprilike polovici svjetske populacije.[21,22]
Za razliku od mnogih drugih patogenih bakterija koje mogu postojati u različitim okolišnim nišama, *H. pylori* može održivo rasti samo unutar svog ljudskog domaćina.[22]

H. pylori nema funkcionalne enzime za *de novo* sintezu purina, što znači da se oslanja na put recikliranja purina za stvaranje purinskih nukleotida.[21]

Ova metabolička karakteristika čini put recikliranja purina potencijalnom metom za nove terapije, jer bi ciljanje ovog puta moglo onesposobiti bakteriju. *H. pylori* predstavlja značajnu opasnost za ljudsko zdravlje jer je povezana s raznim želučanim bolestima, uključujući kronični gastritis, peptički ulkus, adenokarcinom želuca i limfom želuca.[22]

Trenutno liječenje infekcije *H. pylori* uključuje kombinaciju antibiotika (poput klaritromicina i amoksicilina) i inhibitora protonske pumpe (IPP). Međutim, sve veća otpornost na antibiotike predstavlja ozbiljan problem u terapiji, što otežava postizanje uspješne eradikacije infekcije i naglašava potrebu za razvojem novih strategija liječenja.[23]
Istraživanje novih terapijskih strategija ključno je za poboljšanje stope eradikacije infekcije, smanjenje nuspojava povezanih s trenutnim liječenjem i suzbijanje širenja sojeva rezistentnih na antibiotike. Razumijevanje metaboličkih jedinstvenosti *H. pylori*, poput oslanjanja na put recikliranja purina, nudi nove smjerove za istraživanje i razvoj ciljanih terapija.[23]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Korištene kemikalije

akrilamid/Bis–otopina 30(29:1) (*Roth*), amonijev persulfat, APS (*Roth*), amonijev sulfat (*Sigma*), bakrov(II) sulfat (*Sigma*), borna kiselina (*Sigma*), Coomassie Brilliant Blue R–250 (*Cytiva*), fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (*Sigma*), fosforna kiselina (*Kemika*), glicin (*Roth*), pufer HEPES (*Roth*), imidazol (*Roth*), izopropil–β–tiogalaktopiranozid, IPTG (*Roth*), kanamicin (*Sigma*), Luria–Bertani, LB medij (*Sigma*), magnezijev(II) klorid tetrahidrat (*Aldrich*), 2–merkaptoetanol (*Sigma*), metanol (*Kemika*), natrijev dihidrogen fosfat (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Roth*), natrijev hidrogen fosfat (*Sigma*), natrijev klorid (*Kemika*), natrijeva lužina (*Kemika*), Ni–NTA agaroza (*Macherey–Nagel*), octena kiselina (*Kemika*), politilen glikol 3350 (PEG 3350) (*Sigma*), TEMED (*Alfa Aesar*), Tris–baza za pufer (*Sigma*)

3.1.2. Enzimski supstrati i inhibitori

Adenilosukcinat (*Sigma*), L–asparaginska kiselina, Asp (*Alfa Aesar*), gvanozin 5′–difosfat, GDP (*Sigma*), gvanozin 5′–trifosfat, GTP (*Sigma*), hadacidin (*Anji Biosciences*), inozin 5′–monofosfat, IMP (*Sigma*)

3.1.3. Proteinski markeri

Marker molekulskih masa, Cozy™ Prestained Protein Ladder (*HighQu*), IEF marker 3–10 (*Serva*)

3.1.4. Bakterijski sojevi i plazmidi

Plazmid *pET28c–HPpurAHisN* koji sadrži gen za enzim AdSS s afinitetnim privjeskom (His_6) na N–kraju proteina prethodno je priređen na Sveučilištu u Varšavi (Poljska). Navedeni plazmid transformiran je u soj BL21–CodonPlus(DE3)RIL bakterije *Escherichia coli* radi prekomjerne ekspresije.

3.2. Prekomjerna ekspresija proteina

3.2.1. Transformacija bakterija

Transformacija bakterija je unos strane DNA kroz staničnu stijenku te umetanje genetskog materijala u genom bakterije ili replikacija kao zasebnog plazmida. [24]

Inkubira se 1 mL LB medija koncentracije 25 g L^{-1} tijekom 1 h na 37 °C. U kivetu za elektroporaciju (prethodno ohlađenu na –20 °C te držanu na ledu) stavlja se 40 µL bakterijskih stanica (odmrznutih s –80 °C) i 2 µL plazmida (odmrznutog s –20 °C) koncentracije 73,6 ng μL^{-1}.

U bakterije *Escherichia coli* soja BL21–CodonPlus(DE3)RIL unosi se plazmid *pET28c–HPpurAHisN* elektroporacijom na elektroporatoru *Gene Pulser Xcell*, *Bio Rad*, program Bacterial 1, 2,5 kV. Odmah nakon elektroporacije ulije se u kivetu 1 mL prethodno inkubiranog LB medija za oporavak bakterijskih stanica.

Smjesa se prelije u epruveticu i inkubira 1 h na 37°C i 350 rpm, a zatim centrifugira 1 min na 5000×*g*. Otopina iznad taloga se odlije, a talog se pomiješa sa 100 µL LB medija. Suspenzija bakterijskih stanica potom je nanesena na LBA ploču (LB medij s 1,8 % agara) s kanamicinom konačne koncentracije 50 µg mL^{-1}. Sve se radi uz plamenik radi održavanja sterilnih uvjeta. Ploča je zatim stavljena na inkubaciju 16 h na 37 °C preko noći te nakon toga spremljena na +4 °C.

3.2.2. Prekonoćna kultura

Prekonoćna kultura pripremljena je uzimanjem jedne bakterijske kolonije s LBA ploče sterilnim nastavkom pipete te stavljanjem iste u 10 mL sterilnog LB medija, konačne koncentracije 25 g L^{-1} s kanamicinom konačne koncentracije 50 µg mL^{-1}. Zatim je otopina stavljena na prekonoćnu inkubaciju na tresilici tijekom 17h na 37°C i 220 rpm.

3.2.3. Prekomjerna ekspresija proteina

Rast bakterija može se pratiti mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm, odnosno OD_{600}. Optimalna vrijednost je od 0,5 do 0,8 jer u log fazi koju označava ovaj raspon, broj bakterija eksponencijalno raste te su u fazi maksimalne metaboličke aktivnosti što je bitno za sintezu proteina.[2] Cilj je pritom da se poveća produkcija proteina što je prekomjerna ekspresija

proteina. Princip metode je da se vidljiva svjetlost valne duljine 600 nm raspršuje s nasumičnom distribucijom ovisno o obliku i veličini stanica te koncentraciji. [25]

U tikvicu volumena 2 L dodano je 500 mL LB medija i 500 µL kanamicina koncentracije 50 mg mL^{-1}. U otopinu je zatim dodano 10 mL prekonoćne kulture. Tikvica je stavljena na tresilicu za rast bakterija na 37 °C i 140 rpm.

Kada je OD_{600} dosegao 0,637, u otopinu je dodano 250 µL IPTG–a koncentracije 1 mol L^{-1}, do konačne koncentracije od 0,5 mmol L^{-1}. Zatim je smjesa stavljena na inkubaciju tijekom 16 h na 18 °C i 110 rpm.

Nakon ekspresije, dobivena suspenzija stanica centrifugirana je 30 min na 4080 × *g*. Zatim se odlije supernatant, a talog (stanice) se izvaže te se resuspendira s 5 mL deionizirane vode. Suspenzija je ponovno centrifugirana 20 min na 6000 × *g*. Talog stanica je spremljen na -20 °C.

3.3. Ekstrakcija proteina

Bakterijski talog je resuspendiran s 5 mL pufera A (Tablica 3.1.) te nadopunjen istim puferom do 25 mL. Dodan je inhibitor proteaza fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) volumena 25 µL, koncentracije 100 mmol L^{-1}, konačne koncentracije 100 µmol L^{-1}. Uzorak i pufer su zatim stavljeni na led. Stanična suspenzija je zatim stavljena u visokotlačni homogenizator *Avestin Emulsiflex C3* na 1300 bara. Uzorak je pušten kroz homogenizator dva puta, a zatim centrifugiran 45 min pri 13 °C na 15 000 × *g*, čime je odvojen ostatak razbijenih stanica od ekstrakta proteina.

3.4. Pročišćavanje proteina

Nakon ekstrakcije proteina iz bakterijskih stanica, potrebno je isti pročistiti za daljnje eksperimente. Pročišćavanje proteina, odnosno enzima mora biti efikasno jer je cilj dobiti enzim visoke čistoće i katalitičke aktivnosti kako bi se njime mogla provesti daljnja istraživanja. Za to je potrebno proizvesti i nekoliko miligrama enzima.

3.4.1. Afinitetna kromatografija

Pripremljeni su puferi za afinitetnu kromatografiju čiji je sastav naveden u Tablici 3.1. Pripremljeno je 100 mL pufera A, 50 mL pufera B za ispiranje kolone te 30 mL pufera C za eluiranje proteina s kolone.

Tablica 3.1. Sastav pufera za afinitetnu kromatografiju.

Kemikalije	Pufer A	Pufer B	Pufer C	pH
c ($NaPO_4$) / mmol L^{-1}	50	50	50	7,5
c (imidazol)/ mmol L^{-1}	10	20	300	
c (NaCl) / mmol L^{-1}	500	500	500	
glicerol	10 %			

Afinitetna kromatografija provedena je na Ni–NTA koloni volumena 1 mL (*Protino Ni–NTA, Macherey – Nagel*). Kolona je prvo isprana s 10 mL deionizirane vode pri čemu je namješten protok na 0,5 mL min^{-1} , a zatim je ekvilibrirana s 10 mL pufera A. Zatim se kroz kolonu pušta uzorak (ekstrakt proteina) te se skuplja nevezana frakcija, 35 mL. Potom se kolona ponovno ispire s 10 mL pufera A, a potom s 10 mL pufera B. Nakon toga se eluira protein puferom C u 20 frakcija od 0,5 mL. Kolona se ispere s 1 mol L^{-1} imidazolom i vodom, te čuva u 20%–tnom etanolu.

3.4.2. Gel–filtracijska kromatografija, FPLC

FPLC (*eng. Fast protein liquid cromatography*, prije *Fast performance liquid chromatography*) ili brza proteinska tekućinska kromatografija je oblik kromatografije koji se provodi pri povišenom tlaku, prvotno razvijen za pročišćavanje proteina, a karakterizira ju visoka razlučivost i ponovljivost što ju razlikuje od ostalih kromatografskih metoda. [26]

U svrhu pročišćavanja uzorka korišten je uređaj *ÄKTA Pure (Cytiva)* i kolona *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (*UNICORN, Cytiva*) volumena 23,562 mL. Pripremljen je pufer i deionizirana voda koji su profiltrirani te deaerirani. Kolona je isprana vodom i puferom pri protoku 0,750 mL min^{-1}. Tlak na pretkoloni je 5MPa, a na koloni 2,60 MPa. Na kolonu su u 2 navrata nanesene frakcije pročišćene afinitetnom kromatografijom i koncentrirane u Amicon Ultra 4 uređaju (s NMWL od 30 000, vidi poglavlje 3.5.) do 1 mL. Protok je zatim namješten na 0,5 mL min^{-1} , u programu metoda *SEC 200y Inc GL 10/300 AdSS_run.* Pritom je mjerena promjena apsorbancije UV zračenja pri 280 nm. Skupljane su frakcije od 1 mL.

Tablica 3.2. Sastav pufera za gel filtracijsku kromatografiju, pH=7.

Sastav pufera	NaCl	HEPES	2–merkaptoetanol
Koncentracija/ mmol L^{-1}	150	20	1

3.5. Koncentriranje proteina

U ovu svrhu korišteni su koncentratori *Amicon Ultra 4 (Merck Millipore)* s celuloznom membranom veličine pora 30 000 NMWL (engl. *nominal molecular weight limit, NMWL*) i najvećim volumenom uzorka od 4 mL na centrifugi *Universal 320 R (Hettich)*. Protein ima veću masu od 30 000 kDa pa ne prolazi kroz membranu, već zaostaje kao retentat iznad filtera, dok ostale tvari i proteini manji od 30 000 kDa prelaze u filtrat. Ovakve membrane zadrže i preko 90% željenog proteina čime je njegovo ugušćivanje veoma uspješno. [27] Ugušćivanje konačnog uzorka proteina je odrađeno na 4500 × *g* u trajanju od 20 min do 1,5 mL.

3.6. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija pročišćenog i ugušćenog proteina određivana je mjerenjem apsorbancije pri 280nm na spektrofotometru *BioDrop DUO (BioDrop)* i metodom po Bradfordu na spektrofotometru CamSpec M509T (*Spectronic Camspec Ltd*).[28]

Apsorbancija uzorka na spektrofotometru Bio Drop mjeri se pri 280 nm, a molarni ekstinkcijski koeficijent dobiven je pomoću programa *ProtParam* te iznosi 38850 mol^{-1} L cm^{-1}. Za svako mjerenje naneseno je 3 μL proteina. Koncentracija proteina izračunata je pomoću Beer–Lambertovog zakona.

Test po Bradfordu je kolorimetrijska analiza koja se temelji na vezanju Coomassie boje za protein, specifično za bazične i aromatske aminokiseline.
Što je više proteina, više se boje može vezati te otopina postaje tamnija. Tako obojena otopina apsorbira pri 595 nm što je proporcionalno koncentraciji proteina. Koncentracija proteina se računa tako da se uspoređuje s proteinskim standardom koji pouzdano i reproducibilno daje linearnu apsorbanciju, što je najčešće goveđi serumski albumin (engl. *BSA, bovine serum albumin*). Protein se dodaje u veoma maloj količini odnosno razrjeđuje upravo kako bi apsorbancija pala u to linearno područje.[29]

Pri mjerenju koncentracije Bradford metodom koristi se 9 epruveta, od kojih su 3 slijepa proba s vodom (100 μL), 3 početni uzorak proteina, a u 3 je dodan pročišćeni N–His-AdSS (uzorci proteina razrijeđeni su vodom do 100 μL kako bi apsorbancija uzorka pala u linearno područje baždarnog pravca). U sve epruvete je dodan 1 mL *Coomassie Brilliant Blue G–250* boje (0,1 gL^{-1} u 8,5% v/v fosfatnoj kiselini i 4,7% v/v etanolu). Epruvete su prekrivene aluminijskom folijom i stavljene na tamno mjesto 45 minuta na inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija svake otopine pri 595 nm. Izračunata je srednja

vrijednost apsorbancije u programu Excel, te pomoću inverznog nagiba baždarnog pravca f =15,70 mg koncentracija proteina prema sljedećoj formuli

$$\gamma(\mathrm{mg\ mL^{-1}}) = \frac{\Delta A \cdot f}{V(protein)}$$

3.7. Elektroforeza na gelu

Gel za elektroforezu proteina nastaje polimerizacijom akrilamida i N,N'– metilenbisakrilamida. Međutim, za početak reakcije potreban je inicijator reakcije APS (*amonijev peroksodisulfat*) te TEMED (*N,N,N',N'–tetrametilendiamid*) kao katalizator. Njihovim dodatkom reakcija brzo započinje pa se oni dodaju posljednji. [30]

Zatim se pripremljeni separacijski gel (Tablica 3.3.) brzo pipetom nanosi u prostor između 2 stakalca do 1,5 cm ispod ruba, pritom pazeći da se ne unesu mjehurići zraka. Na površinu se oprezno doda 0,5 mL deionizirane vode. Ovo onemogućuje stvaranje meniskusa na površini što dovodi do zakrivljenja gela i krivog putovanja uzoraka te sprječava kontakt gela i zraka, odnosno inhibitora reakcije polimerizacije, kisika. Gel se pusti da polimerizira 45 minuta. Potom se odlije voda s površine gela, a gore se nanosi sabijajući gel (Tablica 3.3.).

Tablica 3.3. Sastav gela za elektroforezu.

	Separacijski gel 10 mL (12,5 %) / µL	Sabijajući gel 4 mL (4 %) / µL
Akrilamid	4167	536
MQ voda	3200	2400
Tris–HCl (1,5 mol L^{-1}, pH 8,8)	2500	–
Tris–HCl (0,5 mol L^{-1}, pH 6,8)	–	1000
APS 10%	70	30
TEMED	7	4

U njega se oprezno umetne češljić za oblikovanje jažica te se ostavi 30–45 minuta da polimerizira. Nakon toga se češljić nježno ukloni, a ploča s gelom stavi se u uređaj za elektroforezu te se ulije pufer za gel elektroforezu (Tablica 3.4.).

Tablica 3.4. Sastav pufera za gel elektroforezu, ukupni volumen 1 L.

	SDS	Glicin	Tris–HCl
c / mol L^{-1}	8,75 10^{-4}	$4,8 \cdot 10^{-2}$	$6,25 \cdot 10^{-3}$
m / g	1	14,4	3,025

Zatim se na gel nanose uzorci prethodno tretirani puferom za obradu uzorka inkubacijom 10 min na 98°C i 300 rpm. U epruveticama je pomiješano 10 µL uzorka te 10 µL pufera za obradu uzorka (Tablica 3.5). Ovaj pufer je potreban jer 2–merkaptoetanol reducira disulfidne mostove pri čemu protein gubi tercijarnu strukturu, a zatim ga okružuju molekule SDS–a pri čemu se gubi i sekundarna struktura proteina, a ukupni naboj postaje negativan te proporcionalno jednak za sve proteine. Pipetom se na gel nanese 15 µL uzorka uranjanjem nastavka pipete u jažicu. Osim uzoraka potreban je i standard/marker koji će kasnije omogućiti određivanje molekulske mase proteina. U tu svrhu korišteno je 4 µL proteinskog standarda *Cozy™ Prestained Protein Ladder* (*HighQu*).

Elektroforeza je provedena na uređaju *Mini–PROTEAN Tetra Cell (BioRad)* 15–20 min na 150 V, zatim 45 minuta na 180 V.

Tablica 3.5. Sastav pufera za obradu uzorka za gel elektroforezu.

Tris–HCl (0,5 mol dm^{-3}, pH 6,8)	1,25 mL
SDS 10 %	2 mL
Glicerol 20%	1 mL
2–merkaptoetanol 2 %	0,1 mL
deionizirana voda	0,65 mL
Bromfenol modrilo 0,03 mM	0,1 mL

Nakon provedene elektroforeze, gel je prenesen u Petrijevu zdjelicu u koju je dodana otopina *Coomassie Brilliant Blue R–250* boje (0,1% w/v), octene kiseline (φ = 0,10) i metanola (φ = 0,30) tako da je gel potpuno uronjen. Ovim postupkom se gel boja 15 minuta na sobnoj temperaturi uz protresanje. Kako bi se uklonio višak boje, gel je stavljen 15 minuta u posudu s vrućom destiliranom vodom.

Nakon ovog postupka može se analizirati gel, odnosno odrediti razina pročišćenosti proteina i molekulska masa proteina pomoću markera molekulskih masa.

3.8. Izoelektrično fokusiranje

Za ovu metodu korišten je uređaj *PhastSystem (Cytiva*) te kupovni gel *(PhastGel IEF 3–9).* Naneseno je po 4 µL uzorka koncentracije 5 mg mL^{-1}. IEF se provodio 35 min do 527 AVh na 15°C. Za bojanje je korištena Coomassie Brilliant Blue R–250 boja (0,02% w/v) u otopini sljedećeg sastava: metanol (φ = 0,30), octena kiselina (φ = 0,10), voda (φ = 0,60), bakrov (II) sulfat (φ = 0,001).

3.9. Mjerenje aktivnosti enzima

Enzimi su biokatalizatori koji smanjuju energiju aktivacije i omogućuju odvijanje kemijske reakcije u željenom smjeru. Za mjerenje aktivnosti koristi se standardna jedinica enzimske aktivnosti (U) koja se definira kao količina enzima potrebna da se katalizira pretvorba 1 µmol supstrata u produkt u jednoj minuti, u danim uvjetima reakcije. No ovako definirana aktivnost ovisi o količini enzima dodanog u reakciju.

Stoga se za karakterizaciju enzima najčešće koristi specifična aktivnost enzima, definirana kao broj jedinica *U* po mg dodanog enzima, odnosno mjerna jedinica bila bi U mg^{-1}.
Specifična aktivnost se koristi i kako bi se provjerila čistoća enzimskog uzorka što je posebice korisno prilikom procesa pročišćavanja proteina te usporedbe aktivnosti različitih enzima ili različitih uzoraka istog enzima.

Aktivnost AdSS se mjeri promjenom apsorbancije pri 280nm u određenom vremenu. Mjeri se pri 280nm jer pri toj valnoj duljini apsorbira produkt reakcije – adenilosukcinat.

Aktivnost N–His-AdSS mjerena je spektrofotometrom *Camspec M509T (Camspec)* mjerenjem promjene apsorbancije UV zračenja pri 280nm tijekom 3 minute pri sobnoj

temperaturi. Za eksperiment je korištena standardna otopina od 1 mL (Tablica 3.6). Za svaki uzorak volumena 4 μL napravljena su 3 mjerenja radi točnosti podataka.

Tablica 3.6. Sastav standardne otopine za mjerenje aktivnosti enzima N–His-AdSS.

Supstrati/Reagensi	*V*/μL
deionizirana voda	860
0,2 mol L^{-1} HEPES pufer pH=7,6	100
Asp 0,5 mol L^{-1}	10
$MgCl_2$ 0,1 mol L^{-1}	10
IMP 15 mmol L^{-1}	10
GTP 6 mmol L^{-1}	10

3.10. Utjecaj pH i temperature na stabilnost proteina

Temperaturna, ali i pH stabilnost proteina odnosi se na njegovu otpornost da poprimi ireverzibilno denaturirani oblik. [31]

Aktivnost enzima ovisi o njihovom smatanju što je pak osjetljivo na pH, temperaturu, koncentraciju supstrata i soli u njihovoj okolini. Ako se želi povećati aktivnost enzima, mijenjaju se pH, temperatura i ostali uvjeti tako da se poboljša aktivnost. Ako se pak želi onemogućiti pravilno funkcioniranje enzima, onda se mijenjaju uvjeti izvan tolerabilnog područja enzima čime mu se znatno smanji aktivnost ili ga se pak nepovratno denaturira. [32]

Eksperiment je proveden mjerenjem promjene apsorbancije UV zračenja na 280 nm tijekom 3 minute, pri sobnoj temperaturi na spektrofotometru *Camspec M509T (Camspec)*. Korištene su kvarcne kivete volumena 1,4 mL i širine 1 cm.

Za eksperiment određivanja temperaturne stabilnosti proteina korištena je standardna otopina za mjerenje aktivnosti enzima N-His-AdSS od 1 mL čiji je sastav prikazan u Tablici 3.6.

Otopine s enzimom (5,02 mg mL^{-1}, 10 μL), 10 μL HEPES pufera koncentracije 0,2 mol L^{-1} i pH=7,6 i 80 μL deionizirane vode su inkubirane 1 sat na 25 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C, te 50 °C, nakon čega je izmjerena preostala enzimska aktivnost. Supstrati su držani na ledu, dok su voda i pufer držani pri sobnoj temperaturi. Za svaku temperaturu napravljena su 3 mjerenja radi

točnosti podataka. Volumen inkubirane otopine enzima za mjerenje aktivnosti je 4 μL, dok su pri višim temperaturama korišteni veći volumeni inkubirane otopine enzima, od 50–100 μL, jer je došlo do znatnog smanjenja aktivnosti.

Za mjerenje utjecaja pH na stabilnost proteina korišten je Britton–Robinson pufer[33] koji sadrži po 40 mmol L^{-1} borne, fosforne i octene kiseline. Pripremljeno je 10 epruveta s po 20 mL Britton–Robinson pufera koje su titrirane s 3 mol L^{-1} NaOH do željenog pH u rasponu od 5 do 9,5, pri sobnoj temperaturi.

Iz svake epruvete uzeto je 225 μL pufera, dodano je 25 μL enzima koncentracije 5,02 mg mL^{-1} te inkubirano 1 h na 25 °C. Nakon toga mjerena je aktivnost kako je opisano u poglavlju 3.9.

3.11. Određivanje kinetičkih parametara

Enzimska kinetika je disciplina koja određuje brzinu kemijske reakcije te kako se ona mijenja kao odgovor na promjene u eksperimentalnim parametrima.

Brzina jednosupstratne enzimske reakcije može se opisati Michaelis–Menten jednadžbom:

$$V_o = \frac{V_{max} + [S]}{K_M + [S]}$$

koja označava kvantitativni odnos između početne brzine kemijske reakcije V_o, maksimalne brzine V_{max}, početne koncentracije supstrata [S], sve međusobno povezane Michaelisovom konstantom K_M.[13,34]

Adenilosukcinat–sintetaza katalizira sintezu adenilosukcinata iz IMP–a i aspartata, uz hidrolizu jedne molekule GTP–a:

$$\text{IMP} + \text{Asp} + \text{GTP}\ (Mg^{2+}) \leftrightarrow \text{adenilosukcinat} + \text{GDP} + P_i$$

Budući da Michaelis–Menten jednadžba vrijedi za jednosupstratnu reakciju, a AdSS ima tri supstrata, kinetički parametri određivali su se za svaki supstrat posebno. To je izvedeno tako da je mijenjana koncentracija jednog supstrata, dok su ostale dvije držane konstantnima, i to u području zasićenja enzima (c(GTP)= 0,06 mmol L^{-1}, c(IMP)= 0,15 mmol L^{-1}, c(Asp) = 5 mmol L^{-1}).

Kod određivanja kinetičkih konstanti za Asp, aktivnost AdSS je mjerena pri sljedećim koncentracijama Asp: 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,03 mmol L^{-1}.

Kod određivanja kinetičkih konstanti za IMP, aktivnost AdSS je mjerena pri sljedećim koncentracijama IMP: 225, 150, 75, 30, 15, 7,5 μmol L^{-1}.

Kod određivanja kinetičkih konstanti za GTP, aktivnost AdSS je mjerena pri sljedećim koncentracijama GTP: 120, 60, 30, 15, 9, 3 μmol L^{-1}.

Podaci su obrađeni u programima *Excel* te *GraphPad Prism*.

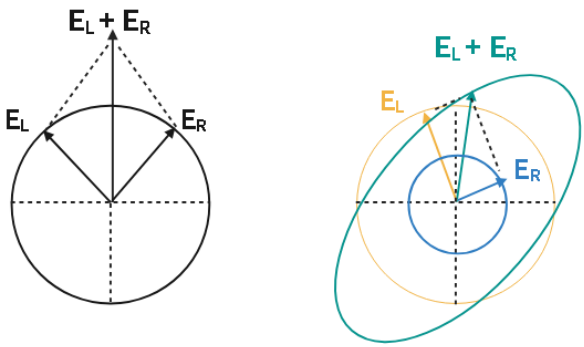
Također je određena inhibicija N–His-AdSS. Inhibicija je izmjerena za svaki inhibitor posebno dodavanjem 20 μM GDP, adenilosukcinata ili hadacidina u standardnu otopinu za mjerenje aktivnosti enzima N-His-AdSS. Sva mjerenja odrađena su pri sobnoj temperaturi.

3.12. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja mjeri razliku u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polarizirane svjetlosti od strane kiralnih molekula. [35] Kiralnost je ključna karakteristika većine bioloških molekula, poput proteina i nukleinskih kiselina.

CD koristi se primarno za analizu sekundarne strukture proteina i konformacija DNA. Proteini s različitim strukturama (α-uzvojnice, β-ploče i nasumične petlje) daju specifične CD spektre, dok različite konformacije DNA također stvaraju jedinstvene profile. [35 36]
Pri vezanju liganda ili interakcijama između proteina i DNA, mogu se primijetiti promjene u CD spektru. Te promjene omogućuju praćenje konformacijskih promjena i procjenu ravnotežnih konstanti. [36]

U instrumentu generira se lijevo i desno polarizirano svjetlo koje prolazi kroz uzorak. Ako uzorak jednako apsorbira oba oblika, izlazno svjetlo ostaje linearno polarizirano. Međutim, ako je apsorpcija različita, vektori polarizacije se kombiniraju i nastaje eliptično polarizirano svjetlo**.** Eliptičnost je proporcionalna razlici u apsorpciji i koristi se za izračun molarne eliptičnosti ili molarne cirkularne apsorpcije**.** Eliptičnost, kao mjera ove promjene, izračunava se pomoću razlike u apsorpciji i pretvara u molarni cirkularni dikroizam (Δε). [35 36 37]



Slika 3.1. Eliptično polarizirano svjetlo (desno) koje je superpozicija desno i lijevo cirkularno polariziranog svjetla (lijevo), izrađeno u programu *BioRender*.

Provedena je analiza enzima AdSS s histidinskim privjeskom na C– i N–kraju te s nativnim AdSS bez histidinskog privjeska, koncentracije 40 μmol L^{-1} .

Korištena je kvarcna kiveta s duljinom puta 0,02 mm. Za baznu liniju korišten je pufer za gel-filtraciju. Nakon toga je snimana absorpcija uzoraka, odnosno CD spektri pri rasponu valnih duljina 260-190 nm, brzinom snimanja 50 nm/min i s razlučivošću 0,2 nm. Mjerenje je provedeno na spektrometru *Jasco J–815* pri 25°C. Spektri su prikazani programom *OriginPro7.5G*, a udio elemenata sekundarne strukture proteina je izračunat programom *BeStSel*.

3.13. Kristalizacija proteina

Kristalizacija proteina provodi se u prezasićenoj otopini uz prilagodbu uvjeta poput ionske jakosti, pH, temperature i dodatka precipitirajućih tvari poput soli ili polimera. Budući da enzimi zahtijevaju stabilan vodeni okoliš, osjetljivi su na promjene ovih uvjeta. Ključan faktor kristalizacije ovdje je dodirna površina među molekulama, gdje proteini, u odnosu na molekule soli ili manje molekule, ostvaruju znatno manje vodikovih veza i hidrofobnih interakcija, što utječe na stabilnost kristalne strukture.[38]

Makromolekularni kristali, za razliku od kristala soli ili malih molekula, ograničeni su veličinom, mekani, osjetljivi na temperature i lako se lome pri dehidraciji. Imaju slabija optička svojstva i slabiju difrakciju zbog visokog udjela otapala (oko 50 %) koje ispunjava kanale i šupljine. [39] To povećava udaljenost među proteinima, slabi interakcije te otežava optimalnu orijentaciju molekula. Inhibitori i metalni ioni također mogu značajno utjecati na strukturno stanje proteina i proces kristalizacije. Kvaterna struktura proteina ključna je za razumijevanje

njegove funkcije, konformacije i uloge u organizmu. Od prve kristalizacije hemoglobina 1840., preko inzulina 1927. i lizozima 1937., kristalizacija proteina uz analizu rendgenskom difrakcijom bila je najčešća metoda za određivanje njihove 3D-strukture. Iako ove metode rezultiraju najtočnijom strukturom, zahtijevaju puno vremena, specifične uvjete i često su tehnički zahtjevne.

Od kraja 20. stoljeća pa sve do danas izlazi sve više računalnih alata koji mogu s određenom preciznošću predvidjeti 3D strukturu proteina od kojih je zasad najnoviji *AlphaFold*.
Uz kristalizaciju proteina, korišteni su alati za predviđanje 3D-strukture proteina *SwissModel, Phyre2, AlphaFold* s ciljem predviđanja utjecaja His-privjeska na N-kraju na aktivno mjesto enzima.

Tehnika koja je ovdje korištena za kristalizaciju N–His-AdSS je difuzija para iz viseće kapi. Metoda se temelji na principu razlike koncentracija precipitanta u otopini u rezervoaru te u visećoj kapi koja je smjesa otopine proteina i precipitanta. Voda zbog razlike koncentracija isparava iz kapi sve do postizanja ravnoteže između ovih otopina. Zbog smanjenja udjela vode u visećoj kapi povećava se koncentracija proteina i precipitanta, odnosno postiže se prezasićena otopina što omogućuje kristalizaciju. Ovo se odvija pri strogo kontroliranim uvjetima, odnosno rezervoar i pokrovno stakalce na kojem je viseća kap su spojeni slojem silikonskog premaza koji onemogućuje prolaz zraka u i iz rezervoara sprečavajući isušivanje kapi. [39]

Temperatura je konstantna od 18°C. Za kristalizaciju pripremljene su otopine s različitim koncentracijama amonijevog sulfata i polietilen glikola 3350 (PEG 3350), u puferu Tris–HCl 8,5 pH i 6,8 pH. (Tablica 3.7.)

Tablica 3.7. Otopine korištene za pripremu kristalizacijskih otopina.

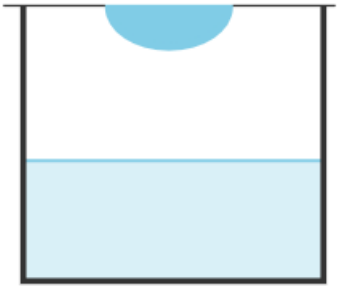
$(NH_4)_2SO_4$	4 mol L^{-1}
Tris-HCl	1 mol L^{-1}
PEG 3350	50 %
deionizirana voda	

Korištena je 4x6 kristalizacijska ploča (Slika 3.2.) U svakom od 24 pripremljena rezervoara je 700 µL kristalizacijske otopine (Tablica 3.8).

Tablica 3.8. Raspored i sastav otopina pripremljenih za kristalizaciju.

Rezervoari	Pufer	$(NH_4)_2SO_4$	PEG 3350
A_1–A_6	Tris-HCl, pH = 8,5	0,14 – 0,24 mol L^{-1}	25 %
B_1–B_6		0,2 mol L^{-1}	19–29 %
C_1–C_6	Tris-HCl, pH = 6,8	0,14 – 0,24 mol L^{-1}	25 %
D_1–D_6		0,2 mol L^{-1}	19–29 %

Na stakalce se stavlja 1 µL otopine proteina u kompleksu sa supstratima Mg^{2+}, GTP i IMP te inhibitorom hadacidinom (Tablica 3.9.) i 1 µL kristalizacijske otopine.



Slika 3.2. Shematski prikaz rezervoara na kristalizacijskoj ploči za metodu difuzije para iz viseće kapi.

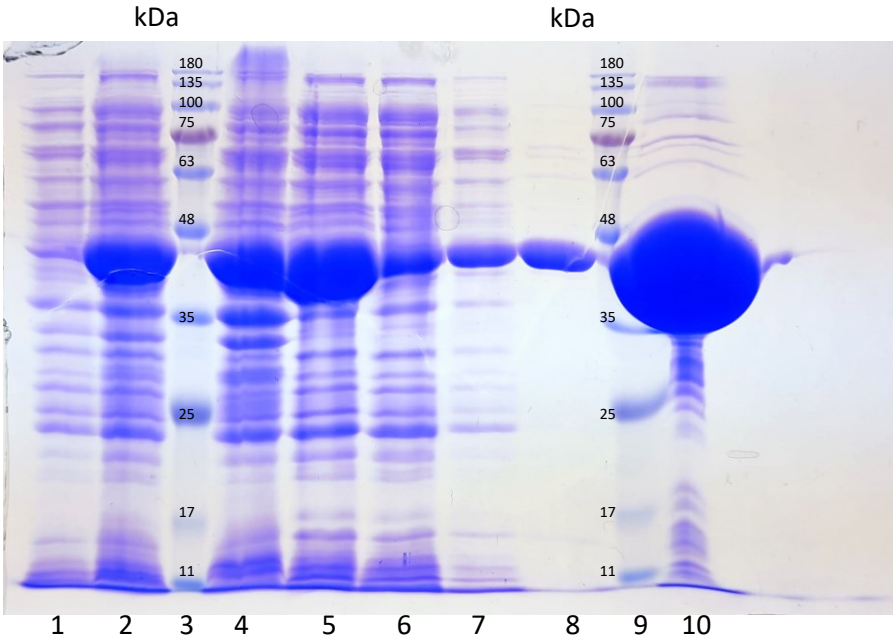
Tablica 3.9. Sastav otopine enzima N-His-AdSS korištene za kristalizaciju.

	c/ mmol L^{-1}	V/ µL
$MgCl_2$	100	1
IMP	50	2
GTP	50	2
hadacidin	100	1
N-His-AdSS	0,2	44

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

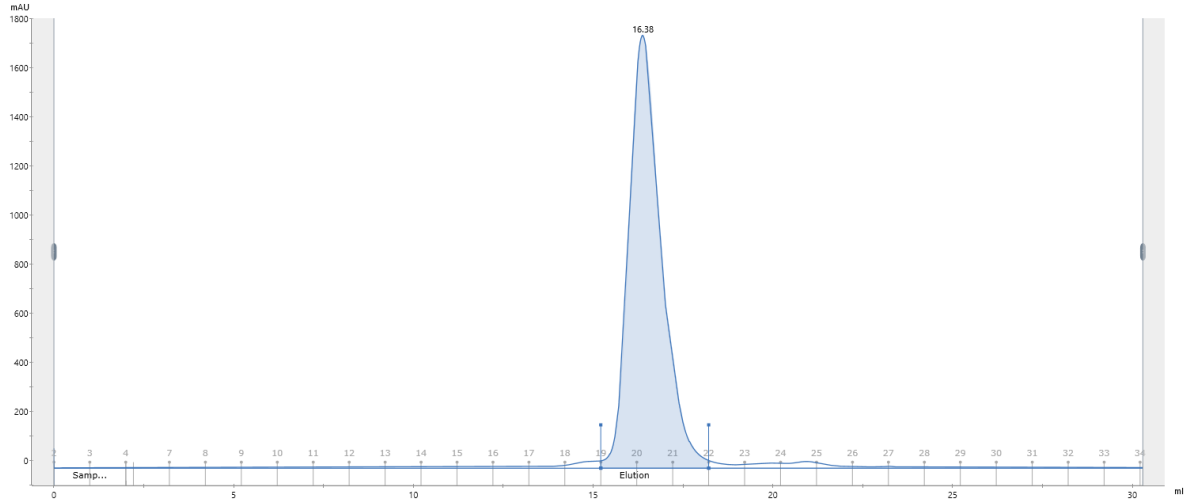
4.1. Pročišćavanje proteina

Prvi korak u pročišćavanju enzima N-His-AdSS bila je afinitetna kromatografija na Ni – NTA koloni. Koncentracija proteina mjerena je u elucijskim frakcijama 3-7, temeljem prethodnog iskustva koje je pokazalo da se u tim frakcijama nalazi najveća količina proteina. Razina čistoće enzima provjerena je gel-elektroforezom (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) uzoraka nakon afinitetne kromatografije, provedena na 12,5 % poliakrilamidnom gelu. Na gelu su redom prikazani: 1. stanice prije indukcije, 2. stanice nakon indukcije, 3. i 9. *Cozy prestained protein ladder* marker (molekulske mase (u kDa) navedene na gelu), 4. talog razbijenih bakterijskih stanica, 5. početni uzorak za afinitetnu kromatografiju, 6. nevezana frakcija nakon afinitetne kromatografije, 7. ispir puferom A, 8. ispir puferom B, 10. eluat

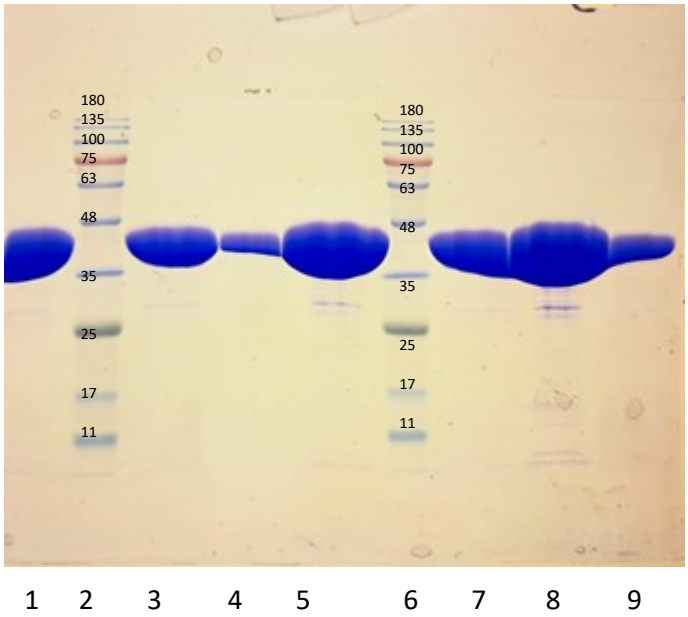
Spojene frakcije eluata s afinitetne kromatografije su koncentrirane pomoću filter membrane veličine NMWL od 30 000 kDa. Nakon ugušćivanja protein je dodatno pročišćen gel-filtracijom, brzom proteinskom tekućinskom kromatografijom na uređaju *ÄKTA FPLC* i koloni *Superdex 200 Increase 10/300 GL*. Kako volumen uzorka nanesen na kolonu ne bi bio prevelik i time se onemogućilo optimalno razdvajanje proteina, uzorak je pročišćen u dvije kromatografije (rezultat jedne prikazan na Slici 4.2.).



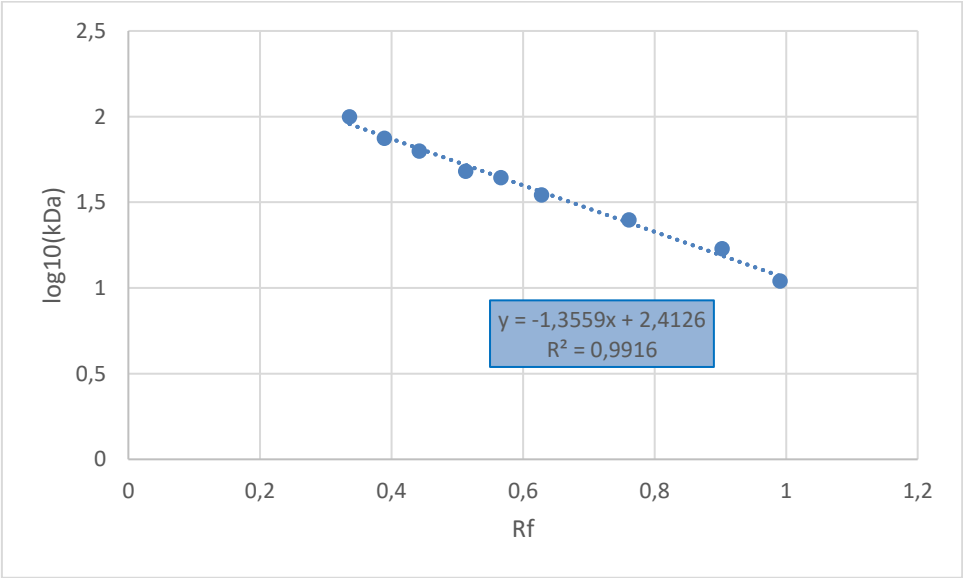
Slika 4.2. Kromatogram gel-filtracije enzima N-His-AdSS provedene na uređaju *ÄKTA FPLC*. Enzim je eluiran u frakcijama 19-21.

Razina pročišćenosti proteina nakon gel-filtracije provjerena je *SDS-PAGE* elektroforezom (Slika 4.3.). Na temelju iscrtavanja logM_r, iz markera molekulskih masa i relativne migracijske udaljenosti (R_f) dobiven je baždarni pravac (Slika 4.4). Pomoću toga izračunata je molekulska masa N-His-AdSS koja iznosi 44,1 kDa što se relativno dobro slaže s teoretskom masom izračunatom pomoću alata *ProtParam*, a koja iznosi 47,9 kDa.

Protein nije pročišćen do homogenosti, ali je čistoća zadovoljavajuća za provođenje daljnjih eksperimenata.



Slika 4.3. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) uzoraka nakon gel-filtracije, provedena na 12,5 % poliakrilamidnom gelu. Uzorci redom: 1. početni uzorak za gel-filtraciju, 2. i 6. *Cozy prestained protein ladder* marker (kDa), 3. – 5. frakcije 19-21 prve gel-filtracije, 7. – 9. frakcije 19-21 druge gel-filtracije.



Slika 4.4. Graf ovisnosti logaritma molekulske mase o relativnoj migracijskoj udaljenosti (R_f).

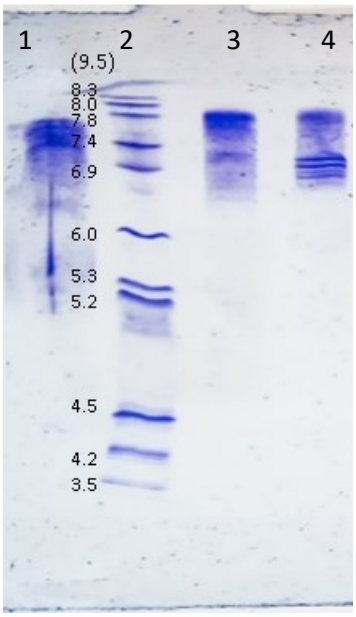
Navedene frakcije su spojene te je izmjerena koncentracija Bradfordovom metodom pri čemu je iznosila 4,39 mg mL^{-1} i mjerenjem apsorbancije na 280 nm pri čemu je iznosila 3,85 mg mL^{-1}. Konačni uzorak proteina je dodatno ugušćen pomoću *Amicon Ultra* koncentratora do 1,5 mL, nakon čega je koncentracija ponovno izmjerena na uređaju *BioDrop DUO* te je nova izmjerena koncentracija enzima iznosila 11,73 mg mL^{-1}. Stajanjem na +4 °C došlo je do taloženja enzima, pa je uzorak enzima centrifugiran, te mu je ponovno izmjerena koncentracija mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 280nm. Dobivena je vrijednost od 10,60 mg mL^{-1}, koja je korištena u svim daljnjim računima.

Eksperimentalno dobivena specifična aktivnost svježe pročišćenog proteina N-His-AdSS iznosi 0,565 U/mg te je znatno niža u odnosu na specifične aktivnosti C-His-AdSS (1,04 ± 0,12 U/mg) i nativnog, WT-AdSS (1,10 ± 0,02 U/mg).

Ovo pokazuje da N-His-AdSS ima značajno nižu specifičnu aktivnost u usporedbi s C-His-AdSS i WT-AdSS. [38,40]

Također je izvedeno izoelektrično fokusiranje na uređaju *PhastSystem* u trajanju od 35 min na 15°C i 527 Avh, u svrhu određivanja pI točke enzima.

Pomoću gela izračunata je pI točka N-His-AdSS koja eksperimentalno iznosi 7,8 za sami N-His-AdSS (Slika 4.5., uzorak 3), 7,9 za N-His-AdSS vezan sa supstratima, uz pojavu dodatnih traka na pI~6,9 (Slika 4.5. uzorak 4) te oko 7,4 za C-His-AdSS (Slika 4.5., uzorak 1). Teoretski pI izračunat pomoću programa *ProtParam* za N-His-AdSS iznosi 7,94 [41], što se gotovo savršeno poklapa s eksperimentalnim vrijednostima, dok za C-His-AdSS iznosi 7,22, dakle dolazi do malog odstupanja eksperimentalne vrijednosti od teoretske.



Slika 4.5. Izoelektrično fokusiranje na *Phast gel* pI 3-9. Uzorci: 1 – C-His-AdSS , 2 – IEF marker SERVA 3-10, 3 – N-His-AdSS, 4 – N-His-AdSS uzorak za kristalizaciju

Uzorak je razdijeljen u male epruvetice te pohranjen na – 80 °C. Molekulska masa podjedinice AdSS enzima kod bakterije *E.coli* iznosi 48,000 kDa što je blizu enzimu iz bakterije *H. pylori*. [9]

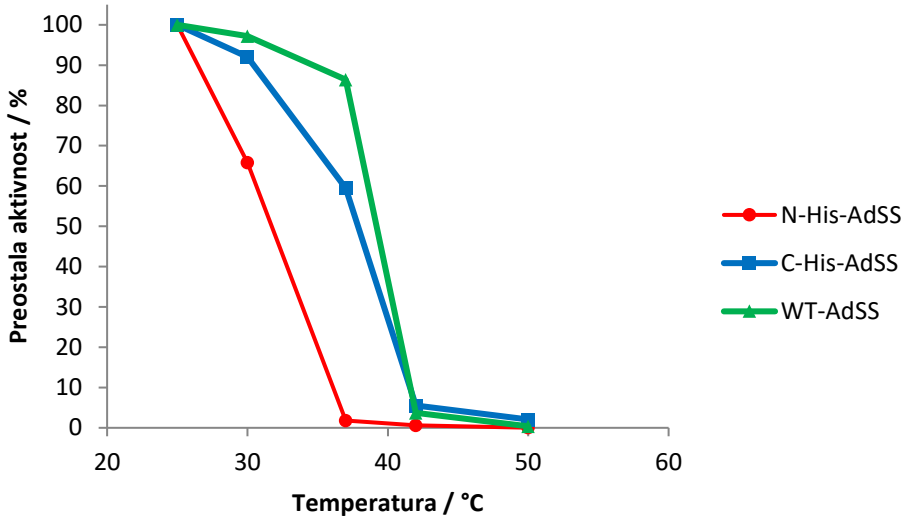
Za termofilnu arheju *Methanocaldococcus jannaschii* molekulska masa podjedinice iznosi 37,855 kDa, što je manje od adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *H. pylori*.[1] dok je AdSS iz bakterije *Azotobacter vinelandii* veća, 54 000 Da.[42]

Različiti organizmi proizvode verzije adenilosukcinat-sintetaze koje su slične po molekulskoj masi, pri čemu većina enzima ima molekulsku masu između 102 000 i 110 000 daltona i postoji kao dimer. Jedina značajna iznimka je enzim iz parazita *Leishmania donovani*, čija je molekulska masa veća od 250 000 daltona, znatno veća od ostalih verzija ovog enzima.[43]

4.2. Stabilnost enzima N-His-AdSS

Zbog taloženja proteina navedenog u prethodnom poglavlju, istražena je njegova stabilnost pri različitim temperaturama i pH, te uspoređena s druge dvije varijante enzima.

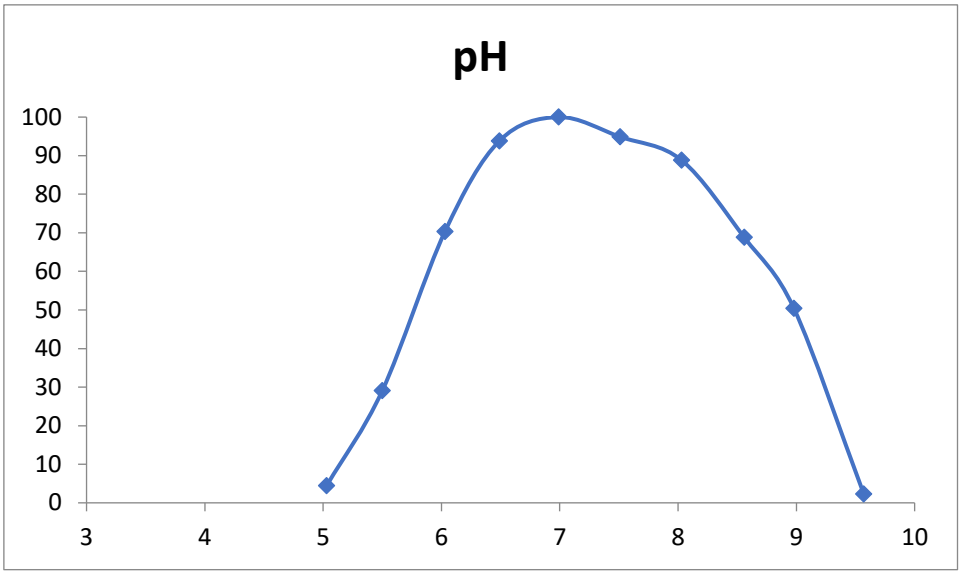
Mjerena je temperaturna stabilnost za sva tri enzima, odnosno nativni AdSS (WT-AdSS) [20], N-His-AdSS i C-His-AdSS[44] što je prikazano na Slici 4.6. Mjerenja su provedena inkubacijom enzima 1 h na temperaturama od 25 – 50 °C, a zatim mjerenjem preostale aktivnosti pri 280 nm.



Slika 4.6. Grafički prikaz temperaturne stabilnosti za nativni AdSS (WT-AdSS), N-His-AdSS i C-His-AdSS dobiven mjerenjem preostale aktivnosti pri 280 nm nakon 1 h inkubacije pri temperaturama 25 – 50 °C.

Mjerenje temperaturne stabilnosti sva tri oblika enzima pokazalo je da su sva tri enzima najstabilnija pri 25 °C. Nativni je AdSS najstabilniji te zadržava većinu aktivnosti do 37°C (85 %), dok aktivnost C-His-AdSS počinje opadati pri 30 °C te na 37 °C padne na 60 %. Najveća razlika vidljiva je kod N-His-AdSS kojemu aktivnost pada već pri 30°C dok na ostalim temperaturama više nema aktivnosti što ukazuje na najmanju temperaturnu stabilnost. Iznad 40 °C niti jedan enzim ne zadržava aktivnost.

Mjerena je pH stabilnost N-His-AdSS, nakon inkubacije 1 h u Britton–Robinson puferu različitih pH vrijednosti pri 25 °C. N-His-AdSS zadržava preko 80% aktivnosti pri vrijednostima pH 6,5-8. (Slika 4.7.) Prethodno je mjerena pH stabilnost i C-His-AdSS i WT-AdSS, te je eksperimentalno utvrđeno da su vrijednosti slične za sve tri varijante enzima.



Slika 4.7. Grafički prikaz utjecaja pH na stabilnost enzima N-His-AdSS u puferu Britton-Robinson.

Za očekivati je da je enzim stabilan u neutralnom pH području jer iako bakterija živi u kiselom pH, unutar bakterije je neutralan pH što ona nastoji održati kao i u neposrednoj okolini. U svakom slučaju, N-His-AdSS se pokazao manje stabilan od druge dvije varijante enzima. Unatoč držanju na ledu ili pri +4°C i – 20°C između mjerenja, nerijetko je dolazilo do precipitacije zbog čega je nakon nekoliko centrifugiranja i ponovnih mjerenja koncentracije odlučeno za svaku seriju mjerenja uzeti novi alikvot enzima s – 80°C.

4.3. Kinetički parametri

Kinetički parametri za enzim N-His-AdSS određeni su tako da je mijenjana koncentracija jednog supstrata, dok su ostale dvije držane konstantnima (c(GTP)= 0,06 mmol L^{-1} , c(IMP)= 0,15 mmol L^{-1}, c(Asp) = 5 mmol L^{-1}).

S obzirom na rezultate ostalih eksperimenata te općenito manju aktivnost i stabilnost N-His-AdSS, zanimljivo je da su dobivene generalno nešto niže K_M vrijednosti, time i viši afinitet prema supstratima nego za druge dvije varijante enzima. Vrijednost K_M za aspartat (103,0 mol L^{-1}) je veća, nego za IMP (20,63 µmol L^{-1}) i GTP (8,387 µmol L^{-1}), što sugerira da ova varijanta enzima ima niži afinitet prema aspartatu u usporedbi s IMP-om i GTP-om (Tablica 4.1., Slika 4.8.). V_{max} za sve supstrate (od 0,342 do 0,421 U/mg) je relativno nizak za N-His-AdSS, što ukazuje na nižu katalitičku učinkovitost ovog enzima u usporedbi s drugim varijantama.

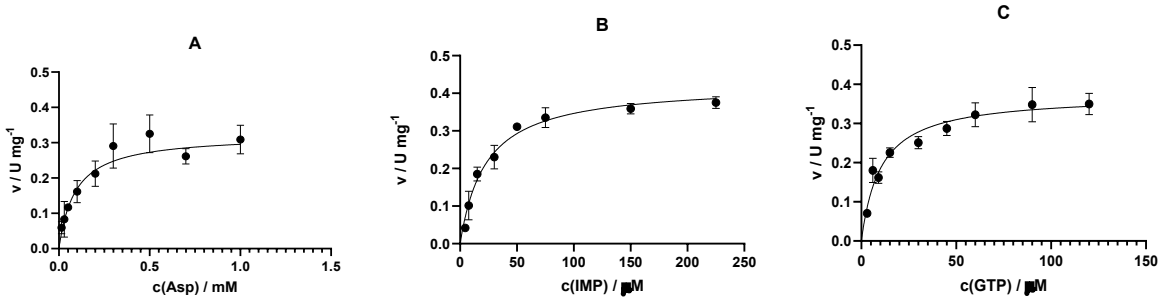
C-His-AdSS ima viši K_M za aspartat (176,3 μmol L^{-1}), što pokazuje da ima niži afinitet za ovaj supstrat u odnosu na druge varijante, dok je K_M za IMP (35,9 μmol L^{-1}) viši nego kod varijante N-His-AdSS, ali još uvijek niži nego kod nativnog AdSS. Također ima znatno viši V_{max} za sve supstrate (od 0,894 do 0,956 U/mg), što sugerira bolju katalitičku učinkovitost ove varijante u usporedbi s varijantom N-His-AdSS, iako nije na razini nativnog enzima.

Nativni AdSS ima najniži K_M za IMP (15,6 μmol L^{-1}) i GTP (8,7 μmol L^{-1}), što ukazuje na najviši afinitet prema tim supstratima. Ovo pokazuje da nativni enzim bolje veže svoje prirodne supstrate u usporedbi s obilježenim varijantama. Ima najviši V_{max} za sve supstrate (od 1,103 do 1,418 U/mg), što pokazuje da nativni enzim ima najveću katalitičku učinkovitost među sve tri varijante.

N-His-AdSS pokazuje nešto viši afinitet prema svim supstratima u usporedbi s nativnim i C-His-AdSS, posebno za aspartat, gdje je K_M najniži (103,0 μmol L^{-1}). Međutim, to svejedno ne govori o stabilnosti i aktivnosti enzima. Ako enzim veže svoj supstrat previše čvrsto (zbog previsokog afiniteta), to može ometati daljnje katalitičke korake koji zahtijevaju kontinuirano oslobađanje i ponovno vezanje supstrata. Čak i ako enzim dobro (ili slabo) veže supstrat, njegova stabilnost određena je strukturnim integritetom i otpornošću na denaturaciju u uvjetima u kojima djeluje. Ova varijanta enzima ima najniže vrijednosti V_{max}, što ukazuje na smanjenu katalitičku učinkovitost. To sugerira da dodavanje His-privjeska na N-kraj značajno negativno utječe na funkcionalnost enzima, smanjujući maksimalnu brzinu reakcije. Ovi rezultati naglašavaju važnost pažljivog odabira mjesta dodavanja proteinskog privjeska.

Tablica 4.1. Kinetički parametri za enzim N-His-AdSS iz *H. pylori*, dobiveni nelinearnom regresijom prema Michaelis-Menten modelu u programu *GraphPad Prism 8*. Podaci za nativni AdSS i C-His-AdSS preuzeti su iz literature. [20, 45]

	Supstrati	Konstantna koncentracija / mmol L^{-1}	K_M / µmol L^{-1}	V_{max} / U mg^{-1}
N-His-AdSS	Asp	IMP – 0,15, GTP – 0,06	103,0 ± 16,12	0,358 ± 0,016
	IMP	Asp – 5, GTP – 0,06	20,63 ± 3,490	0,421 ± 0,020
	GTP	Asp – 5, IMP – 0,15	8,387 ± 1,676	0,342 ±0,017
C-His-AdSS[20]	Asp	IMP – 0,15, GTP – 0,06	176,3 ± 18,9	0,894 ± 0,030
	IMP	Asp – 5, GTP – 0,06	35,9 ± 4,6	0,956 ± 0,040
	GTP	Asp – 5, IMP – 0,15	15,6 ± 1,9	1,103 ± 0,040
Nativni AdSS[45]	Asp	IMP – 0,15, GTP – 0,06	125.4 ± 7.7	1.103 ± 0.016
	IMP	Asp – 5, GTP – 0,06	40.1 ± 2.9	1.456 ± 0.036
	GTP	Asp – 5, IMP – 0,15	8.7 ± 0.6	1.418 ± 0.023



Slika 4.8. Grafovi ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, Asp (A), IMP (B) i GTP (C) dobiveni nelinearnom regresijom prema Michaelis-Menten modelu u programu *GraphPad Prism 8*.

Prema autorima Bass i sur. (1987), Michaelisove konstante za supstrate enzima AdSS iz *E. coli* iznose 38 µmol L^{-1} za GTP, 54 µmol L^{-1} za IMP i 980 µmol L^{-1} za L-aspartat. U usporedbi s AdSS iz *H. pylori* vidljivo je da enzim iz *H. pylori* ima znatno veći afinitet za vezanje svih supstrata.[9]

Kinetički parametri (K_M) termofilne arheje *Methanocaldococcus jannaschii* (IMP, 75,5 µmol L^{-1} GTP, 42,6 µmol L^{-1} aspartat, 1079 µmol L^{-1}) pokazuju da inačica AdSS iz ovog organizma također ima manji afinitet vezanja supstrata.[46]

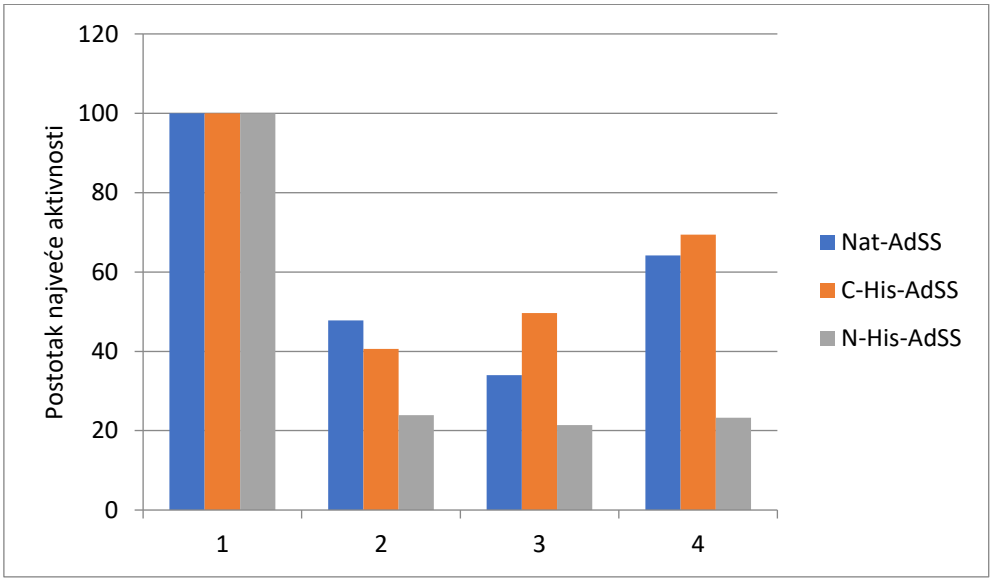
Kinetički parametri (K_M) za AdSS iz *Saccharomyces cerevisiae* su 160 μmol L^{-1} za GTP, 1700 μmol L^{-1} za IMP i 6300 μmol L^{-1} za L-aspartat, a znatno veće vrijednosti pokazuju da je afinitet vezanja supstrata znatno manji nego što je to u slučaju AdSS iz *H. pylori.* [43, 47]

Također su određene K_M vrijednosti za enzim AdSS iz *Azotobacter vinelandii* 13 μmol L^{-1} za IMP, 15 μmol L^{-1} za GTP te 500 μmol L^{-1} za aspartat, prema čemu *A. vinelandii* ima veći afinitet vezanja IMP-a od *H. pylori*. [42]

Ove informacije nisu samo korisne za karakterizaciju enzima, već i za dizajn lijekova protiv određenih bolesti. Istraživači su otkrili da je mehanizam vezanja supstrata AdSS-a u parazitu *Plasmodium falciparum*, uzročniku malarije, jedinstven i drugačiji od onog u drugim vrstama. Dok je navedeni mehanizam za AdSS u većini organizama slučajnog tipa, za AdSS iz *P. falciparum* je uređenog tipa, što znači da se supstrati vežu na enzim u određenom redoslijedu. Ova spoznaja može biti korisna za razvoj novih lijekova protiv malarije koji bi specifično ciljali na AdSS u *P. falciparum*, a ne bi utjecali na AdSS u čovjeku.[48]

4.4. Inhibicija N-His-AdSS

Također je provedena inhibicija N-His-AdSS. Inhibicija je određena za svaki inhibitor posebno dodavanjem inhibitora (analoga pojedinih supstrata): 20 µM GDP, adenilosukcinata (AMPS) i hadacidina, u standardnu otopinu za mjerenje enzimske aktivnosti AdSS. Sva mjerenja odrađena su pri sobnoj temperaturi.



Slika 4.9 Inhibicija nativnog AdSS te N-His- i C-His-obilježenog AdSS 20 µM adenilosukcinatom (2), hadacidinom (3) i GDP – om (4). Stupac 1 – Aktivnost AdSS bez dodanog inhibitora.

Tablica 4.2. Učinci različitih inhibitora (adenilosukcinata, AMPS; hadacidina, Had i gvanozin-difosfata, GDP) na aktivnost nativnog, N-His- i C-His-označenog AdSS.

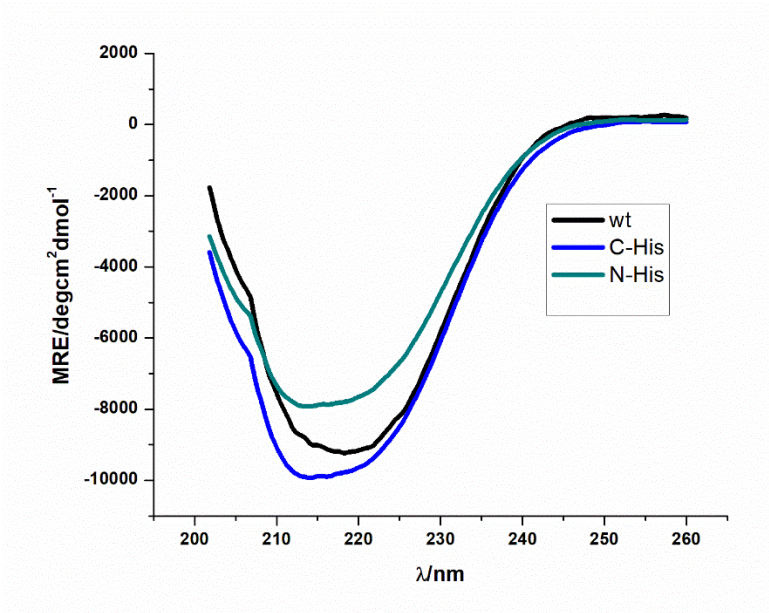
Inhibitori	% aktivnosti WT-AdSS	% aktivnosti N-His-AdSS	% aktivnosti C-His-AdSS
/	100,0	100,0	100,0
AMPS	47,8	23,9	40,6
Had	34,0	21,4	49,6
GDP	64,1	23,3	69,4

N-His-AdSS pokazuje znatno smanjenje aktivnosti u prisutnosti svih inhibitora u odnosu na nativni i C-His-AdSS. Posebno je vidljiva razlika za GDP. GDP je analog GTP-a te se veže blizu N-kraja proteina gdje je aktivno mjesto za GTP. To sugerira da pozicioniranje His-privjeska na N-kraju značajno narušava funkciju enzima, vjerojatno zbog steričkih ili elektrostatičkih efekata na katalitičko mjesto ili na konformaciju enzima, što smanjuje njegovu otpornost na inhibitore.[49]

Sličan primjer postoji u istraživanju iz 2011. koje je pokazalo da pozicija His-privjeska značajno utječe na inhibicijsku aktivnost inhibitora sekrecijske leukocitne proteaze (SLPI) protiv elastaze iz svinjske gušterače (*eng. porcine pancreatic elastase*, PPE). His-privjesak na N-kraju (NSLPI) je pokazao veću inhibicijsku aktivnost (66,7 %) u usporedbi s His-privjeskom na C–kraju (CSLPI) koji je imao inhibicijsku aktivnost od 44,4 %.[1]

4.5. Elementi sekundardne strukture

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda koja pruža informacije o sekundarnoj strukturi proteina i nukleinskih kiselina te o vezanju liganada za ove vrste makromolekula. Spektri sve tri varijante enzima AdSS snimljeni su pri temperaturi od 25°C (Slika 4.10.).



Slika 4.10. CD spektri 3 ispitivane varijante enzima: nativni AdSS (crno), C-His-AdSS (plavo) i N-His-AdSS (zeleno).

S obzirom na to da se pojedinačni spektri (Tablica 4.3.) mogu razlikovati za više od 12 % zbog ljudske pogreške, može se smatrati da su promjene u prosječnom postotku sekundarne strukture do 15 % zanemarive. U ovim uvjetima, C-His-AdSS prilično je sličan nativnom AdSS osim blagog smanjenja antiparalelne ploče. Za N-His-AdSS promjene su značajnije što je vidljivo u smanjenju zavojnica za 26,2 % i povećanju okreta za 29,5 %. Promjene u sekundarnoj strukturi enzima (manji udio α-zavojnica, dakle uređene strukture) vjerojatno su povezane sa smanjenom stabilnosti N-His-AdSS, a i sa smanjenom aktivnosti (V_{max}) ove varijante enzima. Nasuprot tome, C-His-AdSS pokazuje minimalne strukturne promjene (blago smanjenje antiparalelne ploče) i funkcionalno je sličan nativnom AdSS, sugerirajući da je položaj His-privjeska manje invazivan.

Tablica 4.3. Izračunate sekundarne strukture za prosječni pojedinačni spektar nativnog AdSS te AdSS s histidinskim privjeskom (C-His-AdSS i N-His-AdSS). Podaci dobiveni pomoću programa *BeStSel*. Strelica ↑ označava povećanje udjela određene strukture, dok strelica ↓ označava smanjenje udjela određene strukture, izraženo u postotcima.

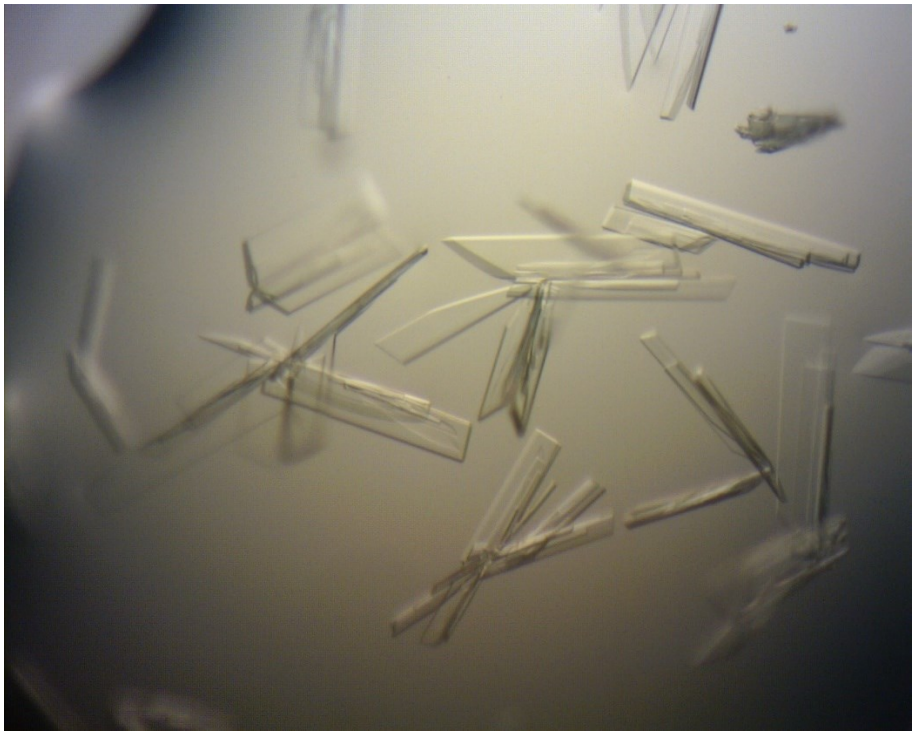
	WT-AdSS	C-His-AdSS	C-His-AdSS (%)	N-His-AdSS	N-His-AdSS (%)
Zavojnica	23,7	27,4	15,6 ↑	17,5	26,2 ↓
Antiparalelna ploča	16,8	13,4	20,2 ↓	18,4	9,5↑
Paralelna ploča	8,8	9,6	9,1↑	8,0	9,1 ↓
Okreti	9,5	10,1	6,3↑	12,3	29,5 ↑
Neuređeno/Ostalo	41,3	39,5	4,4↓	43,8	6,1 ↑

4.6. Kristalizacija

Tehnikom difuzije para iz viseće kapi, dobiveni su kristali proteina N-His-AdSS u rezervoarima C (Tris-HCl pufer pH 6,8 , 0,14-0,24 mol L^{-1} $(NH)_4SO_4$, 25% PEG 3350) i D (Tris-HCl pufer pH 6,8 , 0,2 mol L^{-1} $(NH)_4SO_4$, 19-29 % PEG 3350) (Tablica 3.8.)

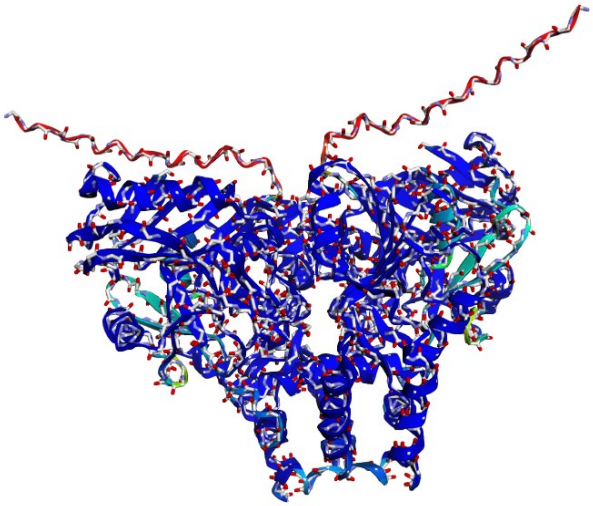
Kristalizacija N-His-AdSS je uspješna u uvjetima korištenima i za C-His-AdSS (Slika 4.11. i Slika 4.12.), što je prvi korak prema određivanju trodimenzijske strukture ove varijante enzima metodom difrakcije X-zraka.

Slika 4.11. Kristali nastali tehnikom difuzije para iz viseće kapi pri 18°C u rezervoaru C5 (Tablica 3.8.) s 1 µL otopine proteina N-His-AdSS (sastav i koncentracija u Tablici 3.9.) i 1 µL kristalizacijske otopine (sastav i koncentracije u Tablici 3.8.), slikano *Olympus* svjetlosnim mikroskopom, uvećanje 292×.



Slika 4.12. Kristali nastali tehnikom difuzije para iz viseće kapi pri 18°C u rezervoaru D3 (Tablica 3.8.) s 1 µL otopine proteina N-His-AdSS (sastav i koncentracija u Tablici 3.9.) i 1 µL kristalizacijske otopine (sastav i koncentracije u Tablici 3.7.), slikano *Olympus* svjetlosnim mikroskopom, uvećanje 292×.

U očekivanju rezultata eksperimentalnog određivanja trodimenzijske strukture N-His-AdSS, korišteni su alati za predviđanje 3D-strukture proteina kako bi se vidjelo mogu li oni predvidjeti utjecaj His-privjeska na N-kraju ovog enzima na proteinsku strukturu i/ili konformaciju aktivnog mjesta. Od korištenih alata za predviđanje 3D-strukture proteina (*SwissModel, Phyre2, AlphaFold*), niti jedan od alata nije uspio pouzdano predvidjeti položaj histidinskog privjeska. Program AlphaFold je jedini koji daje model His-privjeska, no s niskom pouzdanošću i bez doticaja sa strukturom samog enzima (Slika 4.13.).



A

Pouzdanost modela

Jako niska (pLDDT < 50)
Niska (70 > pLDDT > 50)
Pouzdana (90 > pLDDT > 70)
Jako visoka (pLDDT > 90)

B

Slika 4.13. 3D-struktura N-His-AdSS dobivena pomoću programa *AlphaFold*[50], narančastom bojom označen His-privjesak (A). Prikazana je i pouzdanost modela iz programa *AlphaFold* pomoću testa predviđene razlike lokalne udaljenosti (pLDDT). Viši rezultati ukazuju na veću pouzdanost i točnije predviđanje (B).

Tijekom pisanja ovog diplomskog rada riješena je 3D-struktura N-His-AdSS [40]. U strukturi sam His-privjesak nije vidljiv, što ukazuje na to da nije strukturno stabiliziran (npr. vodikovim vezama s aminokiselinama enzima). Ovo opažanje u skladu je s predikcijom programa *AlphaFold* da se His-privjesak nalazi izvan strukture samog enzima. Uzevši u obzir rezultate smanjene stabilnosti i kinetičke efikasnosti enzima, a uz samo manje promjene u afinitetu prema supstratima, te 2D- i 3D-strukturi, možemo pretpostaviti da His-privjesak na N-kraju enzima AdSS ne utječe na enzim mehanički (promjenom strukture ili blokiranjem aktivnog mjesta), već dinamički – ometajući dimerizaciju i/ili vezanje supstrata zbog slobodnog kretanja u otopini.

Rješavanje strukture N-His-AdSS potvrđuje da su takva eksperimentalna istraživanja ključna za razumijevanje utjecaja modifikacija poput His-privjeska na enzimsku funkciju.

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je okarakterizirati enzim adenilosukcinat-sintetazu (AdSS) iz bakterije *Helicobacter pylori*, obilježen afinitetnim privjeskom $(His)_6$ na N−kraju proteina, u svrhu proučavanja utjecaja ovog afinitetnog privjeska na enzim temeljem usporedbe s prethodno istraženim varijantama, C-His-AdSS te nativnim AdSS.

Enzim NHis-AdSS je pročišćen u dva koraka, afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) i gel filtracijom, čime je dobiven uzorak visoke čistoće.

Eksperimentalno određena molekulska masa N-His-AdSS iznosi 44,1 kDa, dok teoretski izračunata masa iznosi 47,9 kDa (programom *ProtParam*). Određena je izoelektrična točka N-His-AdSS, pI = 7,9, što se u potpunosti slaže s teorijski izračunatom (programom *ProtParam*) 7,94.

Spektri cirkularnog dikroizma obilježenog i nativnog AdSS ukazuju na to da uvođenje histidinskog privjeska ima utjecaja na elemente sekundarne strukture. Udjeli elemenata sekundarne strukture se za N-His-AdSS razlikuju u odnosu na C-His-AdSS te nativni AdSS.

Određivanjem kinetičkih parametara pokazano je da enzimska reakcija za svaki od supstrata N-His-AdSS slijedi Michaelis-Menten kinetiku. Vrijednosti V_{max} za obilježeni AdSS se neznatno razlikuju za sva tri supstrata (0,342-0,421 U mg^{-1}). Vrijednosti K_M iznose 103,0 µmol L^{-1} za Asp, 20,63 µmol L^{-1} za IMP i 8,387 µmol L^{-1} za GTP. Dakle, N-His-AdSS će manjim afinitetom vezati Asp nego GTP ili IMP. Kinetički parametri ove varijante enzima se razlikuju od prethodno određenih parametara za C-His-AdSS i nativni AdSS (vrijednosti K_M su nešto niže za N-obilježeni enzim).

Ispitivanje inhibicije N-His-AdSS pokazalo je kako ova varijanta enzima znatno gubi svoju aktivnost u odnosu na ostale dvije varijante prilikom inhibicije poznatim kompetitivnim inhibitorima za AdSS.

Temperaturna stabilnost N-His-AdSS niža je u odnosu na ostale dvije varijante enzima. N-His-AdSS stabilan je samo do 25°C, dok mu na 30°C aktivnost počinje znatno opadati, ispod 65%, dok nativni AdSS i C-His-AdSS zadržavaju preko 90 % aktivnosti na ovoj temperaturi. Kod određivanja pH stabilnosti nije pokazana znatna razlika u odnosu na ostala dva enzima, te ostaje u rasponu 6,5 – 7,5.

Uspješno su dobiveni kristali obilježenog AdSS koji su kasnije korišteni za određivanje kristalne strukture N-His-AdSS. Analiza kristalne strukture pokazala je da His-privjesak nije vidljiv u kristalnoj strukturi, što je u skladu s predikcijom programa *AlphaFold* da se His-privjesak nalazi izvan glavne strukture.

Zaključno, ovi rezultati naglašavaju važnost pažljivog odabira mjesta dodavanja proteinskog privjeska kako bi se izbjegli negativni učinci na dinamiku enzima i njegovu aktivnost. Histidinski privjesci nude značajne prednosti u smislu pročišćavanja i poboljšanja ekspresije proteina, ali mogu imati negativan utjecaj na katalitičku funkciju, stabilnost i dinamiku proteina. Njihov učinak ovisi o specifičnom proteinu, položaju privjeska (N- ili C-kraj), duljini privjeska te uvjetima ekspresije i pročišćavanja. Stoga je ključno pažljivo optimizirati poziciju i duljinu His-privjeska te analizirati njezin utjecaj na funkciju i stabilnost ciljanog proteina. Odabir odgovarajuće strategije osigurat će najbolje rezultate za specifične rekombinantne proteine.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AdSS – adenilosukcinat–sintetaza

APS – amonijev peroksodisulfat

Asp – L–asparaginska kiselina

CD – cirkularni dikroizam

CE – kapilarna elektroforeza

FPLC – brza proteinska tekućinska kromatografija, engl. *Fast Protein Liquid Chromatography*

GDP – gvanozin 5´–difosfat

GTP – gvanozin 5´–trifosfat

HEPES – N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

His6 – heksahistidin

IEF – izoelektrično fokusiranje

IMAC – afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima, engl. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IMP – inozin 5´–monofosfat

MWCO – granična vrijednost molekulske mase, engl. *Molecular Weight Cutoff*

Ni–NTA – nikal nitrilotriacetatna kiselina

NMWL – engl. *Nominal Molecular Weight Limit*

PEG 3350 – polietilen glikol molekulske mase 3350 g mol^{-1}

SEC – kromatografija isključenjem po veličini, engl. *Size Exclusion Chromatography*

SDS–PAGE – natrij-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza ili gel elektroforeza pri denaturirajućim uvjetima, engl. *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TEMED – N,N,N',N'–tetrametilendiamid

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Munadziroh, E. U. Ulfa, A. Labiqah, O. Asmarani, N. N. T. Puspaningsih, *Avicenna JMed Biotech,* **12** (2020), 32-36.
2. H. E.A. Amer u I. Abdurakhmonov (ur.), *Proteomics Technologies and Applications*, Vol. 1, Intech Open, Uzbekistan, 2019, str. 1-13.
3. S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong*, Adv Colloid Interface Sci*, **284** (2020)
4. M. H. M. Salleh, A. F. Peli, M. S. Ngalimat, K. J. Sim, *Biol. Life Sci,* **20**(2022) 12.
5. H. G. Pontis u H. G. Pontis (ur.), *Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms*, Academic Press, London, 2017, str. 45-63.
6. R. Kummari, K. Bose u K. Bose. (ur) *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*, Springer, Singapur, 2022, str. 199-219.
7. D. R. H. Evans, J. K. Romero, M. Westoby u R. R. Burgess, M. P. Deutscher(ur.)*, Methods in Enzymology*, Vol. 2, Academic Press, San Diego, 2009, str. 97-120.
8. R. van Reis, A. L. Zydney, urednik M. C. Flickinger*, Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, str.1-20.
9. M. B. Bass, H. J. Fromm, M. M. Stayton, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1** (1987) str. 335-342.
10. K. Terpe, *Appl Microbiol Biotechnol,* **60** (2003) 523-533.
11. A. K. Mohanty, M. C. Wiener, *Protein Expr Purif,* **2** (2004) 311–325.
12. S. Roshanak, H. Yarabbi, F. Shahidi, F. T. T. Yazdi, J. Movaffagh, A. Javadmanesh*, Sci Rep* **1**(2023) 5508.
13. N. T. P. Le, T. T. P. Phan, H. T. T. Phan, T. T. T. Truong, W. Schumann, H. D. Nguyen, *Biotechnol. Rep.,* **35** (2022) 0-0.
14. A. C. Freydank, W. Brandt, B. Dräger, *Proteins,* **1** (2008) 173–183.
15. M. D. R. Brasher, R. Thorpe u P. J. Delves (ur.), *Encyclopedia of Immunology,* Vol. 1., Academic Press, Oxford, 1998, str. 1510–1514.
16. M. C. Thielges, J. K. Chung, J. Y. Axup, M. D. Fayer*, Biochemistry*, **25** (2011) 5799–805.

17. V. P. Kutyshenko, G. V. Mikoulinskaia, S. V. Chernyshov, A. Y. Yegorov, D. A. Prokhorov, V. N. Uversky, *Int. J. Biol. Macromol.* ,**124** (2019) 810–818.
18. W. Wang, A. Gorrell, R. B. Honzatko, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.*, **11** (1997)7078–7084.
19. Z. Hou, W. Wang, H. J. Fromm, R. B. Honzatko. *J. Biol. Chem*., **8** (2002) 5970–5976.
20. A. Bubić, M. Narczyk, A. Petek, M. I. Wojtyś, W. Maksymiuk, B. Wielgus-Kutrowska, M. Winiewska-Szajewska, T. Pavkov-Keller, B. Bertoša, Z. Štefanić, M. Luić, A. Bzowska, I. Leščić Ašler, *Int J Biol Macromol.* **226** (2023) 37–50.
21. G. Liechti, J. B. Goldberg, *J Bacteriol.*, **4** **(**2012) 839–854.
22. B. E. Dunn, H. Cohen, M. J. Blaser*, Clin Microbiol Rev.,* **4** (1997) 720–741.
23. S. D. Georgopoulos, V. Papastergiou, *Expert Opin Pharmacother.*, **6 (**2021) 729-741.
24. M. G. Lorenz, W. Wackernagel*, Microbiol Rev.*, **3** (1994) 563-602.
25. *Is Your Bacterial Culture Still Growing? A Primer on OD_{600} Measurements,* 12. rujna 2024., *Cells and model organisms*, https://bitesizebio.com/41100/is – your – bacterial – culture – still – growing/ (datum pristupa 25. rujna 2024.)
26. A. Madadlou, S. O'Sullivan, D. Sheehan u D. Walls, S. T. Loughran (ur.) *Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 681, Humana Press, Totowa, 2011, str. 439–447.
27. https://www.merckmillipore.com (datum pristupa 25.rujna 2024.)
28. M. M. Bradford*, Anal. Biochem.,* **1-2** (1976) 248-254.
29. https://williams.chemistry.gatech.edu/course_Information/4581/techniques/bradford/bradford.html (datum pristupa 25. rujna 2024.)
30. L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko, *Biokemija,* Vol 6., Školska knjiga, Zagreb, 2013. str. 70.
31. A. A. N. Saqib, K. S. Siddiq*, Biochem Mol Biol Educ.,* **4** (2018) 398-402.
32. D. W. Piper, B. H. Fenton, *Gut,* **5 (**1965) 506–508.
33. H. T. S. Britton, R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **0** (1931) 1456–1462.
34. D. Nelson, M. Cox*, Lehninger Principles of Biochemistry*, Vol 4. ,Freeman and Company, New York, 2005, str. 202–204. 35. R. W. Woody u K. Sauer(ur.), *Methods in Enzimology*. Vol 246., Academic Press, Inc. ,1995, str. 34-71.
36. https://www.creative – proteomics.com/pronalyse/the – principle – of – circular – dichroism.html (datum pristupa 25. rujna 2024.)

37. https://chem.libretexts.org (datum pristupa 25. rujna 2024.)
38. P. G. Vekilov, A. A. Chernov u H. Ehrenreich, F. Spaepen (ur.) *Solid State Physics – Advances in Research and Applications*, Vol 57. Academic Press, 2003, str. 17-147.
39. A. McPherson, J. A. Gavira *, Acta Crystallogr F Struct Biol Commun ,* **70** (2014). 2–20.
40. M. Z. Mišković, M. Wojtyś, M. Winiewska-Szajewska, B. Wielgus-Kutrowska, M. Matković, D. Domazet Jurašin, Z. Štefanić, A. Bzowska, I. Leščić Ašler , *Int J Mol Sci.,* **14** (2024) 7613.
41. https://web.expasy.org/cgi – bin/protparam/protparam (datum pristupa 21. ožujka 2024)
42. Markham2 GD, Reed3 GH. *Arch Biochem Biophys,* **1** (1977) 24-35.
43. T. Spector, T. E. Jones, G. B. Elion*, J Biol Chem.,* **17** (1979) 8422-8426.
44. A. Petek *Utjecaj afinitetnog privjeska na svojstva adenilosukcinat – sintetaze iz bakterije Helicobacter pylori* , Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 41.
45. A. Bubić, N. Mrnjavac, I. Stuparević, M. Łyczek, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, I. Leščić Ašler, *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **1** (2018) 1405–1414.
46. S. Mehrotra, H. Balaram*, Biochemistry*, **44** (2007) 12821–12832.
47. G. Lipps, G. Krauss*, Biochem. J.*, **341** (1999) 537–543.
48. J. Raman, S. Mehrotra, R. P. Anand, H. Balaram*, Mol Biochem Parasitol*., **1 (**2004) 1-8.
49. A. Sayari,H. Mosbah, Y. Gargouri, *Mol Biotechnol* **36** (2007) 14–22.
50. M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L.Heo, S.Ovchinnikov, M. Steinegger, *Nat Methods* **19** (2022) 679–682.
51. *Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design*, 11. ožujka 2019. *Biomol GmbH,* https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design (datum pristupa 25. rujna 2024.)
52. https://www.bmglabtech.com (datum pristupa 25. rujna 2024.)
53. W. T. Booth, C. R. Schlachter, S. Pote, N. Ussin, N. J. Mank, V. Klapper, L. R. Offermann, C. Tang, B. K. Hurlburt, M. Chruszcz *, ACS Omega*, **1** (2018) 760–768.
54. Y. Aslantas, N. B. Surmeli, *Bioinorg Chem Appl,* **1** (2019) 1-8.

§ 8. METODIČKI DIO

8.1. Uvod

Kemija se u obrazovnom sustavu često percipira kao težak i apstraktan predmet, što rezultira niskom motivacijom i interesom učenika. Prema istraživanju 2021.[1], manje od polovine učenika osnovne škole smatra da razumije kemiju, a samo 41% vidi primjenu kemijskih znanja u svakodnevnom životu. Ove statistike ukazuju na potrebu za promjenama u pristupu poučavanju kemije kako bi se povećala angažiranost učenika.

Kemija je ključna za svakodnevni život, sa širokom primjenom u područjima kao što su prehrana, medicina, industrija i zaštita okoliša. Razvija kritičko razmišljanje i omogućava stjecanje vještina koje su primjenjive u raznim životnim situacijama i profesionalnim kontekstima. Nacionalni kurikulum za kemiju naglašava važnost stjecanja znanja i vještina koje potiču znatiželju, pozitivne stavove prema znanosti te sposobnost kritičkog mišljenja i rješavanja problema. Jedan od inovativnih pristupa poučavanju kemije je integracija farmakologije u nastavni plan. Farmakologija, kao disciplina koja proučava lijekove i njihove učinke na organizam, nudi relevantne i praktične primjere koji mogu povećati interes učenika za kemiju. Kroz proučavanje farmakodinamike, farmakokinetike i drugih segmenata farmakologije, učenici mogu bolje razumjeti kemijske koncepte i njihovu primjenu u stvarnom životu.

Ovaj rad istražuje metodičke pristupe u poučavanju kemije s fokusom na integraciju farmakologije, analizirajući kako ovaj pristup može poboljšati razumijevanje i motivaciju učenika. Cilj je razviti nastavni model koji ne samo da obuhvaća teoretske aspekte kemije, već i praktične primjere koji su relevantni za učenike, potičući tako njihovu intrinzičnu motivaciju za učenje.

8.2. Teorijski okvir

8.2.1. Važnost poučavanja kemije

Kemiju se nerijetko percipira kao težak, dosadan, zamoran i nezanimljiv predmet. Tomu su brojni razlozi, a najčešće polazi od nezgrapnog objašnjavanja apstraktnih koncepata, naročito u početnim stadijima školovanja. Alarmantan je podatak da manje od pola, točnije 48% učenika osnovne škole smatra da ne razumiju kemiju, 41% učenika smatra da su kemijski nastavni sadržaji primjenjivi u svakodnevnom životu, a 42% smatra kemijske sadržaje korisnim.[1] Niti jedna od ovih brojki ne prelazi 50%.

Zašto bi učenici uopće učili kemiju? Odgovor leži u jednostavnoj činjenici – kemija je neizostavni dio našeg svakodnevnog života. Susrećemo je, udišemo, osjećamo, koristimo dok kuhamo, čistimo ili uzimamo lijekove. Čak i u našem tijelu, svakodnevno se odvijaju kemijske reakcije bez kojih život ne bi bio moguć. Kemija je ključna za svakodnevni život te ima primjenu u prehrani, medicini, industriji, okolišu. Učenjem kemije se razvija kritičko razmišljanje te učenici stječu vještine deduktivnog i induktivnog zaključivanja, rješavanja problema te komunikacije. Vještine koje se nauče u kemiji lako su prenosive na ostale segmente života i karijere/područja.[1]

Da bi poučavanje kemije i usvajanje njezinih koncepata bilo uspješno, ključno je motivirati učenike intrinzično, povezujući gradivo s temama iz stvarnog života. Suvremena nastava temelji se na povezivanju naučenih sadržaja i vještina s njihovom praktičnom primjenom, a u Hrvatskoj je određena kurikulumom.[2] Njime se nastoji usmjeriti nastavu te potaknuti kritičko razmišljanje kako bi primijenili znanje u stvarnom životu, u čemu glavnu ulogu ima nastavnik.[3] Kada shvate kako se kemija očituje u svakodnevnim aktivnostima, postaju motiviraniji i lakše usvajaju znanja. [4] Jedna od tema koja posebno doprinosi razumijevanju kemije u stvarnom kontekstu jest farmakologija. Budući da je interdisciplinarna, farmakologija može poboljšati razumijevanje kemijskih i bioloških principa, a njezina nastava obuhvaća širok raspon tema, od farmakodinamike do farmakokinetike, prilagođenih različitim stupnjevima složenosti.[5]

8.2.2. Važnost poučavanja farmakologije u sekundarnom obrazovanju

Svaki dan svjedočimo brojnim zdravstvenim problemima uzrokovanim nepravilnim uzimanjem lijekova. Zašto je ova tema od velike važnosti, govore zabrinjavajući podaci o odnosu šire populacije prema lijekovima te praksama samoliječenja.

Obrasci odnosa prema lijekovima prenose se s odraslih na mlade i često se učvršćuju tijekom adolescencije te se nastavljaju i u odrasloj dobi, utječući na stavove i navike u primjeni terapije, samoliječenju i pridržavanju preporuka liječnika.

Neki od tih su polifarmacija, upotreba pet ili više lijekova od strane jednog pacijenta. U porastu je te se očekuje da će rasti kako se očekivani životni vijek povećava i svjetska populacija stari. Starije osobe ne samo da uzimaju više lijekova, već se također suočavaju s većim rizikom od ozbiljnih nuspojava jer njihova jetra obično manje učinkovito metabolizira i uklanja lijekove iz krvotoka. Ovaj rizik je dodatno pojačan činjenicom da interakcije između nekih lijekova mogu biti štetne, a do polovine pacijenata koji uzimaju četiri ili više lijekova ne uzima ih prema uputama.[6] Ovo dovodi do nepravilnog uzimanja propisanih lijekova koji djeluju na središnji živčani sustav (CNS), poput opioida, antidepresiva, benzodiazepina, antipsihotika i antiepileptika, što je među glavnim uzrocima trovanja kod osoba starijih od 25 godina.[7] Način pohranjivanja lijekova je također mogući rizičan faktor. Znatan broj roditelja lijekove pohranjuje u prostorijama poput kuhinje ili spavaće sobe što može doprinijeti ranjivosti djece i trovanju lijekovima.[8]

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, otpornost na antibiotike zbog prekomjerne i nepravilne upotrebe antibiotika predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem širom svijeta.[9] Uzimanje antibiotike bez recepta ili prijevremeni prestanak uzimanja propisanih antibiotika dovodi do razvoja rezistencije na antibiotike.[10]

Lijekovi koje adolescenti često koriste bez recepta su analgetici, antipiretici, lijekovi za kašalj i prehladu. Neki od njih uzimaju dvostruku dozu lijeka ako su zaboravili uzeti prethodnu ili prestaju uzimati lijekove prije nego što su završili s propisanom dozom, čim su osjetili olakšanje simptoma. [10] Velik broj adolescenata se samoliječi, bez da imaju dovoljno znanja o tome te njegovim posljedicama. [11,12] Neki konzumiraju lijekove u kombinaciji s alkoholom za što je povod opuštanje i zabava, dok neki kao razlog navode opterećenost učenjem i ispitne rokove.[13]

Ova istraživanja naglašavaju važnost edukacije adolescenata o lijekovima s ciljem prevencije neželjenih posljedica, s posebnim fokusom na rizike samoliječenja, pravilno doziranje, moguće nuspojave, sigurno skladištenje te opasnosti kombiniranja različitih

supstanci. Kako bi se osigurala odgovorna upotreba lijekova među mladima, ključno je poboljšati njihovu informiranost, pri čemu nastavnici imaju značajnu ulogu. [14]

Kako bi nastavnici učinkovito educirali mlade o odgovornoj upotrebi lijekova, važno je da i sami imaju jasno razumijevanje temeljnih pojmova vezanih uz farmakologiju i farmaceutiku. Stoga je potrebno definirati osnovne koncepte koji će služiti kao polazište za nastavu o lijekovima.

8.2.3. Polazni pojmovi i definicije za nastavu o lijekovima

Lijek se prema *Zakonu o lijekovima* definira kao *svaka tvar ili kombinacija tvari prikazana sa svojstvima liječenja ili sprječavanja bolesti kod ljudi* ili *svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze*.[15]

Lijek može biti **prirodni** (ljudskog, životinjskog ili biljnog podrijetla) ili **sintetski** (dobiven kemijskom sintezom). Glavni dio svakog lijeka je **aktivna tvar**, odnosno djelatni sastojak lijeka koji ima farmakološko, imunološko ili metaboličko djelovanje. Osim aktivne tvari, lijek može sadržavati **pomoćnu tvar**, koja olakšava primjenu lijeka (na primjer okus za oralnu primjenu) ili apsorpciju lijeka u organizmu. [15]

Lijek se može izdati na recept preko liječnika i bez recepta, ako se smatraju sigurnima za upotrebu bez liječničkog nadzora .[16]

Svaki lijek zapravo je molekula, odnosno kemijski spoj s precizno definiranim nazivom prema sustavu Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC). Kada se određeni lijek razvije i proizvede, farmaceutska tvrtka koja ga je osmislila registrira ga pod zaštićenim imenom i stavlja ga na tržište pod patentnom zaštitom. Primjer takvog lijeka je Sumamed, koji je originalno razvila hrvatska farmaceutska tvrtka Pliva.

Nakon isteka patenta, druge farmaceutske tvrtke mogu proizvoditi isti lijek, ali pod generičkim nazivom (azitromicin), koji se odnosi na djelatnu tvar lijeka. Generički lijekovi imaju isti aktivni sastojak, oblik, doziranje i farmakološko djelovanje kao originalni, što znači da su jednako učinkoviti i sigurni. Razlike između originalnih i generičkih lijekova mogu postojati samo u pomoćnim tvarima, koje ne utječu na terapijski učinak. Farmaceutika je znanost koja se bavi razvojem lijekova, a farmakologija proučava učinak lijekova na organizam, istražujući njihove farmakodinamičke i farmakokinetičke osobine, odnosno način na koji kemijske tvari, bilo prirodne ili sintetske, djeluju na biološke sustave.[18,19]

Lijekovi se općenito dijele u kategorije prema svojim svojstvima i namjeni, a neke od njih su: analgetici (lijekovi protiv boli), antipiretici (lijekovi koji snižavaju temperaturu), antibiotici (lijekovi protiv bakterijskih infekcija), citostatici (lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori), sedativi (lijekovi s djelovanjem na živčani sustav) itd.[20]

Ovako definirani lijekovi mogu poslužiti kao model za objašnjavanje različitih kemijskih koncepata, poput funkcijskih skupina, međumolekulskih interakcija te utjecaja kemijskih svojstava i struktura spojeva na biološke procese. Ovo nastavnici mogu napraviti kroz nastavne sadržaje koji su određeni kurikulumom.

8.2.4. Ciljevi nacionalnog kurikuluma u poučavanju kemije

Kurikulum za osnovne škole i gimnazije u Republici Hrvatskoj [2] kojeg propisuje Ministarstvo znanosti i obrazovanja je okvir za poučavanje kemije u kojemu su obvezni odgojno – obrazovni ishodi.[2] Temelje se na eksperimentalnom proučavanju svojstava i promjene svojstava tvari te na učenju otkrivanjem.

Odgojno-obrazovni ciljevi učenja i poučavanja kemije obuhvaćaju poticanje znatiželje, pozitivnog stava i interesa za kemiju i prirodoslovlje, kao i razumijevanje temeljnih kemijskih koncepata te učinkovitu komunikaciju o njima. Osim toga, učenici usvajaju i primjenjuju kemijsko nazivlje i simboliku te razvijaju znanstveni i etički pristup istraživanju i rješavanju kemijskih problema. Također, važan aspekt nastave kemije jest stjecanje metakognitivnog znanja, koje doprinosi razvoju samostalnosti, samopouzdanja, inovativnosti, odgovornosti i kreativnosti.[2]

Kritičko mišljenje doprinosi višim razinama usvojenosti i razumijevanja nastavnog sadržaja, pomaže učenicima da lakše prate nastavni sadržaj i da ga kritički vrednuju, pospješuje razvoj samoreguliranog učenja, potiče samoevaluaciju procesa učenja te od učenika zahtijeva samostalnost u donošenju zaključaka, što u konačnici dovodi do težeg zaboravljanja postignutog znanja. Istraživanja pokazuju da nastavnik ima ključnu ulogu u poticanju razvoja kritičkog mišljenja učenika kroz primjenu metoda i oblika rada aktivnog učenja i poučavanja te drugih aktivnosti u nastavi poput postavljanja izazovnih pitanja i uvažavanja stila mišljenja učenika.[3,4]

8.3. Analiza predmetnog kurikuluma

Nastavna cjelina o lijekovima i farmaceutskoj industriji stavljena je u kurikulumu pod temu *Znanost o materijalima.*[2] Kao što i sam kurikulum predlaže, u njoj su navedeni preporučeni sadržaji koje nastavnik bira prema programu škole i interesu učenika. Glavni koncepti po kojima su imenovani ishodi od 1. do 4. razreda gimnazije su **A.** Tvari, **B.** Promjene i procesi, **C.** Energija, **D.** Prirodoznanstveni pristup. Svaki ishod šifriran je prema predmetu na koji se odnosi, stupnju obrazovanja (razredu) i konceptu, čime se jasno prikazuje različita razina znanja te olakšava praćenje ishoda unutar kurikuluma.

predmet(kemija) stupanj obrazovanja (srednja škola) koncept (energija)

KEM SŠ C.4.18.

razred (4. gimnazije) broj ishoda u konceptu

U 4. razredu gimnazije kurikulum se razdjeljuje na *Teme*: *Elektromagnetsko zračenje i tvari*, *Kemija okoliša*, *Kemija odabranih biomolekula*, *Znanost o materijalima* i *Kemija koloida*. Farmaceutika kao nastavna cjelina, odnosno farmaceutska industrija i lijekovi stavljeni su pod temu *Znanost o materijalima*. Učenici četvrtog razreda srednje škole posjeduju solidnu osnovu iz kemije te su upoznati s većinom pojmova i konceptima potrebnima za razumijevanje ove nastavne cjeline. U Tablici 1. napravljen je pregled odgojno – obrazovnih ishoda na temelju kurikuluma koji je trenutno na snazi.

Tablica 1. Pregled kurikuluma iz 2019. godine za nastavni predmet kemije za 4. razred gimnazije u Republici Hrvatskoj odobren od Ministarstva znanosti i obrazovanja [2].

Odgojno – obrazovni ishod	Razrada ishoda	Preporučene teme
KEM SŠ C.4.18. Predviđa promjene energije tijekom kemijskih promjena. **KEM SŠ B.4.19.** Analizira kemijske promjene odabranih tvari. **KEM SŠ AB.4.20.** Povezuje svojstva odabranih tvari s njihovom primjenom. **KEM SŠ A.4.21.** Kritički razmatra informacije o materijalima. **KEM SŠ D.4.22.** Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama. **KEM SŠ D.4.23.** Primjenjuje matematička znanja i vještine. **KEM SŠ D.4.24.** Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima.	Analizira promjene energije tijekom kemijskih promjena u kojima sudjeluju odabrane tvari koristeći se reakcijskim entalpijama. Analizira reakcije sinteze i primjene materijala te kemijsku reaktivnost odabranih tvari. Povezuje svojstva materijala s reaktivnošću i uporabom. Kritički vrednuje utjecaj materijala na čovjeka i okoliš. Kritički razmatra informacije o materijalima te procjenjuje njihovu važnost. Izvodi pokuse u okviru teme. Primjenjuje stehiometrijske odnose množine tvari na temelju jednadžbe kemijskih reakcija u okviru teme. Primjenjuje stehiometrijske odnose množine tvari na temelju jednadžbe kemijskih reakcija u okviru tema. Prikazuje modelima čestičnu građu tvari. Grafički prikazuje i analizira podatke dobivene fizikalno – kemijskim mjerenjima (kiselinsko – bazne titracije, kinetička mjerenja, kalorimetrijska mjerenja...).	Osnove razvoja farmaceutske industrije: spoj kao lijek i otrov, biološko djelovanje odabranih lijekova koji imaju povijesno značenje za čovječanstvo: sedativi (npr. talidomid), antipiretici (npr. acetilsalicilna kiselina), antibiotici (npr. penicilin, azitromicin), citostatici (npr. cisplatin).

Prije uvođenja kurikuluma, nastava se temeljila na nastavnom planu i programu te sadržajima, dok s kurikulumom iz 2019. dolaze jasno definirani ishodi učenja. Time se osigurava kontinuitet i progresija u odnosu na prethodne godine. Uvođenjem i razradom ishoda, plan nastave postaje detaljniji, posebno u vezi s izvedbom pokusa i primjenom matematičkih znanja, što može poboljšati razumijevanje i praktične vještine učenika. Naglašava se važnost kritičkog razmišljanja, vrednovanja informacija i procjene utjecaja materijala na okoliš i društvo. Kurikulum daje odgojno-obrazovne ishode za tematsku cjelinu, međutim ne i za nastavnu temu. Time se mnogo toga ostavlja nastavniku na izbor, dok ga se istovremeno ograničava, pa glavna nit vodilja i oslonac u nastavi postaju literatura i školski udžbenici.

8.4. Usporedba hrvatskog s kurikulumima drugih država

Nažalost, kurikulume koji bi se lako mogli usporediti s našim nije jednostavno pronaći, a još ih je zahtjevnije precizno prevesti. Obrazovni sustavi značajno se razlikuju od države do države, a nastavne cjeline iz kemije nisu nužno ovako odijeljene u srednjim školama. Dodatno, mnoge srednje škole u inozemstvu već su specijalizirane za određena područja (primjerice, farmaceutski tehničari u strukovnim školama), što otežava izravnu usporedbu s našim kurikulumom. Iz tih razloga, odlučila sam se za dva europska kurikuluma koji, s obzirom na sličnosti u obrazovnim sustavima, mogu poslužiti kao inspiracija za proširenje i poboljšanje hrvatskog kurikuluma.

8.4.1. Kurikulum kemije u Njemačkoj

Organizacija školovanja u Njemačkoj je ponešto slična organizaciji školovanja u Hrvatskoj. Učenici se nakon osnovne škole opredjeljuju za određeni tip srednje škole između kojih postoji i gimnazija. Ovdje je naveden plan učenja za jednu od gimnazija.[21]

Aktivnosti:

- istraživanje sastava i potrošnja lijekova protiv bolova na internetu (npr. acetilsalicilna kiselina, ibuprofen, paracetamol)
- procjena primjene lijekova informirajući se o kemiji molekula djelatnih tvari
- primjena mehanizma reakcija kondenzacije za opisivanje nastanka estera i amida karboksilnih kiselina
- retrosintetsko izvođenje produkata i tipa reakcije iz strukturnih formula odabranih molekula aktivnog sastojka
- planiranje eksperimenta ekstrakcije acetilsalicilne kiseline iz lijekova protiv bolova za usporedbu svojstava s acetilsalicilnom kiselinom proizvedenom u školskom eksperimentu (Ekstrakcija i sinteza acetilsalicilne kiseline; ispitivanje čistoće: kromatografija (retencijsko vrijeme, Rf vrijednost), određivanje tališta, određivanje sadržaja titracijom
- evaluacija pokusa za kvalitativno i kvantitativno određivanje aktivnih sastojaka u lijekovima protiv bolova koji se izdaju bez recepta kako bi se usporedio njihov sastav

- opis razvoja boli i objašnjavanje djelovanja lijekova protiv bolova na enzim ciklooksigenazu (Interakcija djelatnih tvari s enzimima ili receptorima: razvoj boli, inhibicija ciklooksigenaza analgeticima, različiti učinci ibuprofena i acetilsalicilne kiseline, računalno modeliranje enantiomernih molekula ibuprofena)
- usporedba i vrednovanje različitih oblika lijekova s obzirom na početak i trajanje djelovanja (utjecaj početka i trajanja djelovanja lijekova prema obliku doziranja: temeljni kemijski principi npr. brzina otapanja, povećanje površine, inhibicija difuzije)

Njemački kurikulum fokusira se na detaljno istraživanje kemije molekula djelatnih tvari u lijekovima protiv bolova, uključuje retrosintetske analize i planiranje eksperimenata ekstrakcije aktivnih sastojaka, obuhvaća evaluaciju kvalitativnih i kvantitativnih pokusa, naglašava mehanizme djelovanja lijekova na ciklooksigenaze i njihov utjecaj na bol, procjenjuje različite oblike lijekova prema početku i trajanju djelovanja. Ima detaljniji pristup retrosintezi i kemijskim mehanizmima te koristi računalno modeliranje.

8.4.2. Kurikulum kemije u Sloveniji

U slovenskom kurikulumu za opće gimnazije (*Učni načrt KEMIJA Gimnazija; Splošna gimnazija*)[22] pod odabranim temama za lijekove (*3.2. Izbirni program, 3.2.2. Zdravila*) navode se sljedeći ciljevi:

- razlikovati važnije skupine lijekova, kao što su antacidi, analgetici, antimikrobni lijekovi (protiv bakterija i virusa), citostatici, lijekovi za liječenje emocionalnih poremećaja i duševnih bolesti;
- prepoznati glavne kemijske skupine lijekova i bitne strukturne elemente odabranih spojeva
- upoznati načine djelovanja pojedinih vrsta droga u organizmu
- znati definirati načine uzimanja lijekova i pojave vezane uz njih, kao što su tolerancija na lijek, nuspojave lijeka, rezistencija mikroorganizama (na antibiotike)
- upoznati povijesni razvoj pojedinih vrsta droga te dobre i loše strane njihove (prekomjerne) uporabe
- proučiti nove smjernice u području razvoja lijekova
- proučavati upotrebu i zlouporabu aktivnih tvari kao što su spolni hormoni i lijekovi

Predloženi sadržaj:

- Metode klasifikacije lijekova
- Analiza strukturnih formula u odabranim slučajevima pojedinih vrsta lijekova s naglaskom na njihove karakteristične funkcijske skupine i izomeriju
- Antacidi: na primjer aluminijeve i magnezijeve soli, natrijev bikarbonat
- Analgetici: paracetamol, acetilsalicilna kiselina
- Antimikrobni lijekovi: antibiotici, citostatici, antidepresivi
- Analiza djelovanja odabranih lijekova na organizam: djelovanje na fiziološke procese, osjetila, volju i emocije
- Proces liječenja: tolerancija na lijekove, odbacivanje lijeka, uništavanje zdravog tkiva i primjena citostatika, razvoj rezistencije mikroorganizama na antibiotike i njihovi uzroci
- Otkriće penicilina, njegova prekomjerna uporaba, borba protiv rezistencije, biotehnološki "modificirani" penicilini i njihove prednosti
- Ciljani lijekovi, primjerice novi oblici citostatika
- Zlouporaba spolnih hormona u sportu
- LSD, meskalin, psilocibin, tetrahidrokanabinol
- Problemi legalizacije droga

Slovenski kurikulum donosi izuzetno detaljan pregled ove cjeline, obuhvaćajući ključne aspekte lijekova, njihove kemijske značajke i analitičke metode za procjenu kvalitete i čistoće, poput kromatografije. Fokusira se na društvene aspekte, uključujući zlouporabu droga, legalizaciju i njihove društvene posljedice, što doprinosi širem razumijevanju kemije lijekova u kontekstu suvremenih izazova. Ovaj sveobuhvatan i praktično orijentiran pristup daje šaroliku bazu znanja i konkretne primjere za poučavanje, što ga čini uzorom za daljnji razvoj hrvatskog kurikuluma.

8.5. Procjena slijeda pojmova i oblikovanja sadržaja udžbenika prema ishodima

8.5.1. Srednjoškolski udžbenici kemije danas u optjecaju

S obzirom na smjernice kurikuluma, razvijeni su udžbenici kemije za srednju školu. U kontekstu teme Znanost o materijalima i nastavne cjeline farmaceutske industrije, analizirana su tri udžbenika kemije[23,24] [25]za srednje škole (Tablica 2.). Analizirana je struktura i sadržaj udžbenika, usklađenost s nacionalnim kurikulumom, te način na koji se prezentiraju ključni kemijski koncepti i praktične vještine. Usporedbom ovih udžbenika želi se utvrditi koliko učinkovito svaki od njih pomaže učenicima u postizanju obrazovnih ishoda definiranih nacionalnim kurikulumom.

Tablica 2. Pregled strukture i sadržaja tri udžbenika kemije za srednje škole u kontekstu teme *Znanost o materijalima, farmaceutska industrija*, odobrenih od Ministarstva znanosti i obrazovanja.

Udžbenici – slijed pojmova i sadržaj	UDŽBENIK 1[23]	UDŽBENIK 2[24]	UDŽBENIK 3[25]
Povijesni kontekst	✓	✓	✓
Dizajn lijeka	✓	✓	✓
Faze razvoja lijeka	✓	✓	x
Farmakologija i farmacija	✓	✓	✓
Izvori lijekova	✓	✓	x
Sastav lijeka (pomoćna, aktivna tvar)	x	✓	x
Kategorizacija lijekova (tablica)	✓	x	x
Lijekovi i strukture: Antipiretici i analgetici (aspirin, ibuprofen, paracetamol)	✓	✓	✓
Antibiotici (penicilin)	✓	✓	✓
Sedativi	x	✓	x
Imunomodulatori	✓	✓	✓
Citostatici	✓	✓	✓
Eksperimenti i primjeri/prijedlozi pokusa	x	✓	x
Farmaceutska regulativa (patentno pravo, generički naziv, rok trajanja…)	x	✓	x

Nastavak Tablice 2.

Dodatno	Autokoidi, placebo, detaljna razrada faza razvoja lijeka, toksikologija, terapeutski indeks	Važnost IR i NMR spektroskopije u analizi lijekova. Interpretacija spektra za identifikaciju funkcionalnih skupina. Važnost patenata i regulatornih tijela (HALMED, EMA, FDA).	Međudjelovanje lijeka i receptora kao zasebno poglavlje, toksikologija, terapeutski indeks, opiodi i alkaloidi
Ishodi po udžbenicima	**KEM SŠ B 4.19** Analizirati sintezu i primjene materijala **KEM SŠ B 4.20** Povezati svojstva odabranih tvari s njihovom primjenom – Upoznati osnove razvoja farmaceutske industrije: spoj kao lijek i otrov, biološko djelovanje odabranih lijekova koje imaju povijesno značenje za čovječanstvo. **KEM SŠ A 4.22** Povezati rezultate eksperimenata s konceptualnim znanjem **KEM SŠ D 4.23** Primijeniti matematička znanja i vještine **KEM SŠ D.24:** Uočiti zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima.	**KEM SŠ B 4.19** Analizirati reakcije sinteze i primjene materijala te kemijsku reaktivnost tvari obrađenih u pojedinim nastavnim temama. **KEM SŠ A4.21** Kritički vrednovati utjecaj materijala na čovjeka i okoliš. – Kritički razmatrati informacije o materijalima te procijeniti njihovu važnost. **KEM SŠ D 4.23** Primijeniti stehiometrijske odnose množine tvari na temelju jednadžbi kemijskih reakcija u okviru nastavnih tema. **KEM SŠ D 4.24** Interpretirati, grafički prikazati i analizirati podatke dobivene fizikalno – kemijskim mjerenjima.	**KEM SŠ B 4.19:** Analizirati reakcije sinteze i primjene materijala te kemijsku reaktivnost tvari. **KEM SŠ B 4.20:** Povezivati svojstva odabranih tvari s njihovom primjenom. **KEM SŠ A 4.21:** Kritički razmatrati informacije o materijalima. **KEM SŠ A 4.22:** Povezati rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama. **KEM SŠ D 4.23:** Primjenjivati stečena matematička znanja i vještine. **KEM SŠ D.24:** Iz prikupljenih podataka iz pokusa i/ili radom na tekstu poopćiti ih, povezati ih i interpretirati prenoseći jednu vrstu prikaza drugom – crteži, modeli, tablice, grafovi.

8.5.2. Stariji udžbenici

Prije uvođenja jedinstvenog nacionalnog kurikuluma 2019. godine, hrvatski obrazovni sustav temeljio se na nastavnim planovima i programima koji su definirali sadržaje i ciljeve obrazovanja za osnovne i srednje škole. Ovi dokumenti pružali su okvir za poučavanje, ali su ostavljali određenu fleksibilnost školama i nastavnicima u prilagodbi sadržaja i metoda poučavanja prema specifičnim potrebama učenika i lokalne zajednice, primjerice, Nacionalni okvirni kurikulum, objavljen 2011. godine.[26] Također, raniji udžbenici imali su slobodniju strukturu. U njima su teme poput lijekova i farmaceutike bile razmještene prema autorovoj procjeni o prikladnosti, bez jedinstvenog standarda.

Udžbenik 4[27] obrađuje lijekove u zasebnom poglavlju nazvanom Kratke priče – Od prirodnog do sintetskog lijeka. U njemu se ukratko iznosi povijesni kontekst i razvoj aspirina, koji se također spominje u Udžbenicima 1, 2 i 3. Međutim, ne predlažu se eksperimenti niti se razmatraju ostale kategorije lijekova; fokus je isključivo na aspirinu. Učenicima su ponuđeni zadaci poput imenovanja spojeva prema IUPAC nomenklaturi i zapisivanja jednadžbe reakcije esterifikacije.

Udžbenik 5[28] posvećuje poglavlje heterocikličkim spojevima, obuhvaćajući vitamine, alkaloide i antibiotike. Alkaloidi se definiraju kao bazični spojevi, nazvani prema svojoj sličnosti s alkalijama. Udžbenik prikazuje strukture brojnih spojeva, uključujući kinin – lijek protiv malarije – te poznate alkaloide poput morfina, heroina i kokaina. Naglašava da se droge u širem smislu odnose na osušene dijelove biljaka od kojih se proizvode lijekovi. Alkohol se navodi kao opojna droga, dok su stimulansi poput kofeina, nikotina i kokaina opisani kroz njihovo djelovanje. Spominje se i toksičnost nikotina, uključujući smrtonosnu dozu za čovjeka.

Smirujuće droge, poput benzodiazepina (diazepam, lorazepam), karakteriziraju se sedmeročlanim prstenom s dva atoma dušika, dok su psihodelici poput LSD – a, PCP – a i tetrahidrokanabinola (THC) iz marihuane opisani s pripadajućim strukturnim formulama. Narkotici, kao što je morfin, ublažavaju bolove, dok se derivacijom morfina dobivaju lijekovi poput kodeina (za liječenje kašlja) i heroina, koji se ističe kao opasna opojna droga. Autor naglašava opasnosti i posljedice zlouporabe droga, što odražava duh tog vremena.

Antibiotici su obrađeni u zasebnom poglavlju s naglaskom na kemiju pojedinih spojeva. Primjerice, penicilin je opisan kao ciklički amid s tri kiralna centra. Objašnjeno je da različite vrste penicilina (Penicilin O, G, V, amoksicilin) razlikuju R – skupine. Penicilin djeluje sprječavanjem stvaranja polimera u staničnoj stijenci bakterija, no nije učinkovit protiv svih bakterija, posebno onih koje luče enzim penicilinazu koji hidrolizira beta – laktamski prsten.

Navedeni su i drugi antibiotici te mehanizmi njihova djelovanja. Streptomicin, primjerice, djeluje na ribosome prokariota uzrokujući pogrešno čitanje mRNA, dok azitromicin, lipofilna tvar koja lako prolazi kroz stanične membrane, inhibira biosintezu proteina vezanjem na ribosomske podjedinice.

Poglavlje je obogaćeno zanimljivostima poput statistike o alergijama na penicilin (manje od 5% ljudi), troškovima liječenja pušača u usporedbi s prihodima od poreza na duhan te podacima o globalnim troškovima za drogu u odnosu na hranu. Zaključno, autor ističe raznolikost heterocikličkih alkaloida, vitamina i antibiotika, napominjući da je njihova klasifikacija moguća samo prema fiziološkim učincima zbog opsega i raznolikosti ovih spojeva.

8.6. Analiza udžbeničke literature

Na temelju sadržaja ovih udžbenika provedena je njihova usporedba kako bi se jasno istaknuli ključni pojmovi koji su zajednički svim izvorima. Cilj je bio izdvojiti najvažnije koncepte, zaključke i ishode, te na temelju toga oblikovati optimalan nastavni sat posvećen farmaceutskoj industriji.

Ono što je zajedničko svim udžbenicima je da svaki udžbenik započinje uvodom u temeljne koncepcije medicinske kemije i farmaceutske industrije. Svi uključuju povijesni pregled razvoja lijekova i farmaceutske industrije, s posebnim naglaskom na ključne inovacije i važne događaje poput slučaja talidomida. Svi udžbenici pokrivaju osnovne pojmove iz farmaceutske industrije i medicinske kemije, uključujući sintezu lijekova te pružaju detaljne prikaze specifičnih lijekova, njihove sinteze i mehanizama djelovanja na molekularnoj razini. Penicilin je detaljno obrađen u sva tri udžbenika kao prvi antibiotik.

Udžbenik 1[23] naglašava povijesni razvoj lijekova, prirodne spojeve i njihove izvore, te detaljno objašnjava placebo efekt i autokoide. Fokusira se više na biološke aspekte i opća farmakološka načela, s manje kemijskih detalja. Pristupa temama kroz povijesne anegdote i biološke perspektive. Fokusira se na razvoj farmaceutskih proizvoda iz prirodnih spojeva. Obuhvaća moderne primjere lijekova poput paklitaksela i uključuje teme poput *placebo efekta*, faza kliničkih ispitivanja i nuspojava lijekova. Koristi grafičke prikaze i dijagrame za bolje razumijevanje faza razvoja lijeka. Integrira povijest i suvremene prakse, što pruža sveobuhvatniji pogled na farmaceutsku industriju. Međutim, nedostaje praktičnih zadataka i primjera za učenike. Udžbenik 1[23] i 3[25] spominju toksikologiju i terapeutski indeks.

Udžbenik 2[24] pruža širi povijesni kontekst farmacije, uključujući ulogu farmakopeje i Paracelsusa. Također se detaljno bavi kemijskim strukturama i sintezom salicilne i acetilsalicilne kiseline. Detaljno opisuje kemijske reakcije, sintezu i spektroskopske metode za analizu spojeva. Integrira teoriju s eksperimentalnim metodama i pruža detaljne kemijske jednadžbe i sinteze. Prikazuje širi pregled povijesti farmaceutske industrije i razlika između farmacije i farmakologije. Detaljno opisuje sintezu salicilne kiseline i acetilsalicilne kiseline (aspirina), uključujući kemijske reakcije i procese. Uvodi koncept patenata, faze razvoja lijeka i temeljne procese od otkrića do tržišta. Ono što je posebno istaknuto kod Udžbenika 2 osim posvećivanja pažnje IR i NMR spektroskopskim metodama koje su danas itekako relevantne, naročito organskoj kemiji, je da kroz poglavlje postavlja pitanja koja potiču učeničko razmišljanje te odvaja poseban dio za samovrednovanje učenika. Također daje nekoliko primjera i nudi protokole za pokuse sinteze i ispitivanja svojstava salicilne kiseline i njezinih derivata. Pruža više praktičnih primjera i zadataka za učenike, što ga čini pogodnim za obrazovne svrhe. Upravo zbog svog detaljnog pristupa spektroskopiji, može biti previše detaljan za većinu učenika.

Udžbenik 3[25] fokusira se na specifične lijekove kao što su penicilin, azitromicin, cisplatin, te detaljno objašnjava mehanizme djelovanja i farmakokinetiku. Daje duboke tehničke detalje o kemijskim reakcijama i mehanizmima djelovanja lijekova, posebno o cisplatinu. Detaljno obrađuje citostatike poput cisplatina, uključujući kemijske procese sinteze i mehanizme djelovanja. Kao zasebno poglavlje izdvaja međudjelovanje lijeka i receptora. Nedostaju neke sinteze i kemijske reakcije koje su navedene u druga dva udžbenika te bi bilo dobro dodati više tehničkih detalja kao i primjere pokusa ili zadataka za promišljanje.

Odobreni udžbenici pokrivaju širok spektar tema vezanih uz lijekove i farmaceutiku, no njihova analiza sugerira da bi optimalno poučavanje zahtijevalo kombinaciju najboljih aspekata svakog od njih. Povijesni kontekst iz Udžbenika 1 i 2 izvrsno balansira povijesne činjenice s inspirativnim pričama o otkriću poznatih lijekova, što učenike motivira i povezuje kemiju sa stvarnim svijetom. Udžbenik 2 posebno se ističe jasno definiranim pojmovima farmaceutike i farmakologije, razlikom između aktivne i pomoćne tvari, generičkog i zaštićenog imena te fazama razvoja lijekova.

Ako se u nastavi planiraju pokusi s aspirinom, Udžbenik 2 je najbolji izbor zbog detaljnog objašnjenja sinteze salicilne i acetilsalicilne kiseline, obrade IR i NMR spektroskopskih metoda, kao i brojnih prijedloga eksperimenata i pitanja koja potiču učeničko razmišljanje. Za razumijevanje mehanizma djelovanja lijekova, Udžbenici 3 i 5 su idealni jer pružaju detaljna

objašnjenja za specifične lijekove poput penicilina, azitromicina i cisplatina, s naglaskom na kemijske reakcije i interakcije lijekova s receptorima.
Kombinacija sadržaja ovih udžbenika uz inovativne metode poučavanje omogućila bi učenicima ne samo bolje razumijevanje kemijskih koncepata, već i njihovu primjenu u stvarnom životu.

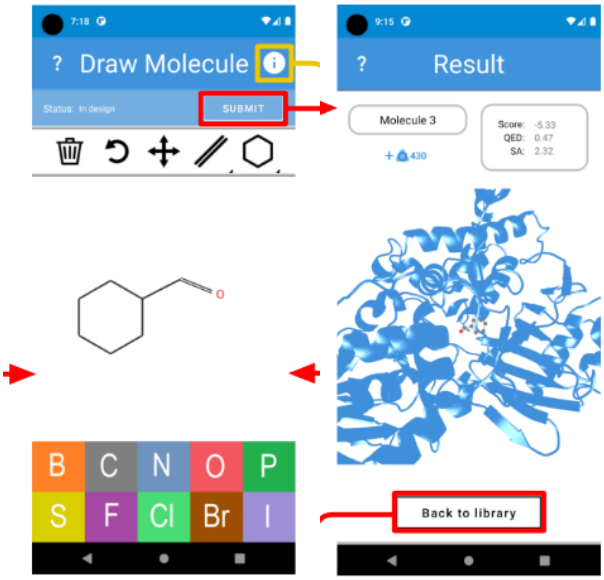
8.7. Razmatranje inovativnih metoda poučavanja

Za ove sadržaje dostupni su edukacijski programi koji pružaju strategije za motiviranje učenika na satovima kemije kroz zanimljive teme iz farmakologije. Postoji relevantna literatura koja detaljno opisuje ove pristupe te može poslužiti kao vrijedan izvor inspiracije i materijala za nastavu. [29]

8.7.1. Raznolike nastavne strategije – igre

U nastavi koristiti različite metode poučavanja, kao što su multimedijske prezentacije, demonstracije, diskusije i simulacije, učenje kroz igre kako bi se zadovoljili i pokrili različiti stilovi i preferencije učenja. U kontekstu ovog nastavnog sata može se koristiti *MedChem Game*[30], aplikacija za Android koja koristi alat za crtanje molekula koji se koristi za predlaganje novih kandidata za lijekove.

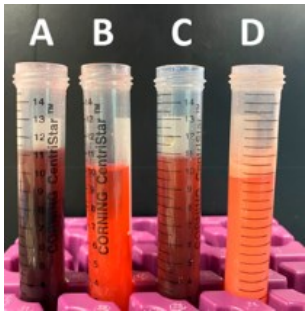
Predloženi kandidati mogu se zatim spojiti na jedan od četiri ciljana proteina trenutno implementirana u igri. Učenici nakon toga mogu vidjeti rezultate svoga ligand – protein spajanja, a svi dizajnirani spojevi pohranjuju se u bazu podataka. Aplikacija je testirana na učenicima i studentima od kojih je 97,5 % izjavilo kako se osjećalo motiviranije, a 87,5 % učenika kaže da su ovakva predavanja zanimljivija od tipičnih predavanja temeljenih isključivo na znanju iz knjiga. Nastavnik može ovime dopuniti svoja predavanja, pružiti učenicima praktično iskustvo s dizajnom lijekova i potaknuti ih da se više uključe u temu.



Slika. 3.1. Prikaz začelja Android aplikacije MedChem Game, crtanje molekule te rezultati spajanja molekule s proteinom[30].

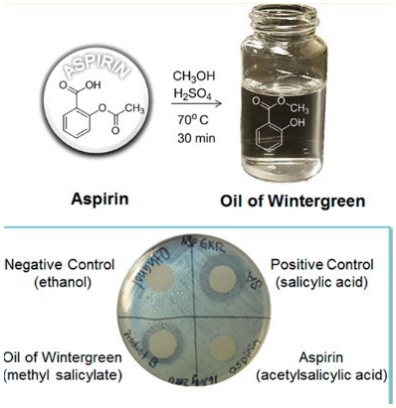
8.7.2. Učenje temeljeno na istraživanju i otkrivanju

Potruditi se u što većoj mjeri omogućiti učenicima sudjelovanje u praktičnim eksperimentima i istraživačkim aktivnostima koje im omogućuju istraživanje i primjenu kemijskih pojmova na opipljiv način. Jedan od ovakvih primjera je identificiranje četiri nepoznata lijeka u prahu: Aspirin, Tums, Tylenol i Pepto – Bismol. Cilj eksperimenta je da učenici osmisle i provedu tri eksperimenta koristeći dane materijale i informacije o lijekovima kako bi ih točno identificirali.[31]



Slika 3.2. Prikaz rezultata eksperimenta identifikacije nepoznatih spojeva u otopini željezovih(III) iona (A – Pepto Bismol, B – Tylenol, C – Aspirin, D – Tums).[32]

U eksperimentu sinteze ulja zimzelena (metil salicilat) iz aspirina, učenici preuzimaju višestruke uloge znanstvenika unutar procesa otkrivanja lijekova: identificiraju medicinski problem, provode kemijsku sintezu kako bi stvorili novu molekulu, karakteriziraju novu molekulu i izvode biološki test uspoređujući svoj početni materijal s produktom. Učenici uspoređuju antibakterijska svojstva aspirina i metil salicilata koristeći test inhibicije zone. Ovaj eksperiment pokazuje da male promjene u molekularnoj strukturi mogu značajno utjecati na svojstva i biološku aktivnost molekula.[33]



Slika 3.3. Prikaz pokusa sinteze ulja zimzelena (metil salicilata) iz aspirina te testiranje antibakterijskih svojstava pomoću testa inhibicije zone.[33]

8.7.3. Integracija digitalnih alata

Korištenjem raznih digitalnih alata poput sustava za odgovaranje publike[16] (*eng. Audience Response System*, ARS kao što je Kahoot), društvenih mreža (TikTok, Instagram, Facebook), online platformi (YouTube) može se zainteresirati učenike korištenjem suvremene tehnologije koja je njima bliska. Time im se u malim odlomcima skreće pažnja na temu sata te im time poboljšava angažiranost, motivaciju i aktivnost. [34]

Također se može upotrijebiti *Aspirin screen experiment*, slobodno dostupan digitalni resurs sa stranica Kraljevskog kemijskog društva (*Royal society of chemistry*).[35] Dizajniran je za poboljšanje razumijevanja organske kemije kod učenika i unapređenje praktičnih vještina. Interaktivni ekran omogućuje učenicima da provedu sintezu aspirina, provedu rekristalizaciju, tankoslojnu kromatografiju i modificiraju eksperimentalne uvjete kako bi odredili učinak na prinos reakcije.[34]

Slika 3.4. Primjer jednog od zadataka razine 3 u sklopu digitalnog alata *Aspirin screen experiment.*[35]

Razine 1 i 2 idealne su aktivnosti prije laboratorijskih vježbi koje imaju prednost uvođenja eksperimenta učenicima, kako bi olakšala sudjelovanje u stvarnim praktičnim vježbama u razredu, koje bez ovog prethodnog znanja mogu djelovati užurbano i s nejasnim ciljem.

Razine 3 i 4 osmišljene su kao idealne aktivnosti nakon laboratorijskih vježbi koje omogućuju učenicima da istraže učinke variranja uvjeta i reagensa kako bi optimizirali reakciju, a temeljene su na stvarnim eksperimentalnim podacima.

Ovaj alat omogućuje učenicima izvođenje vlastitog eksperimenta sinteze na računalu ili tabletu prije nego što izvedu eksperiment u učionici. Prednosti ovog pristupa je sigurnost i upoznavanje učenika s postupcima u labosu u slučaju nedostatka pribora i kemikalija. Nakon korištenja ovog izvora, povratne informacije sugeriraju da ima više vremena u razredu za fokusiranje na praktične vještine i razvijanje razumijevanja.

Ostale uvriježene metode poučavanja koje vrijedi istaknuti su suradničko učenje, povratne informacije i refleksija te prilagodba nastave temeljem tih povratnih informacija. Navedene metode doprinose:

- većoj motivaciji, razvoju komunikacijskih vještina i timskom radu kroz grupne aktivnosti, eksperimente, rješavanje problema i rasprave
- poticanju učenika na kritičko promišljanje i dublje razumijevanje gradiva
- poboljšanju nastavnih metoda s naglaskom na potrebe i preferencije učenika. [34]

Korištenjem ovih strategija, satovi kemije mogu postati angažiraniji i interaktivniji, koristeći integrativnu prirodu tema iz farmakologije za poboljšanje učenja i sudjelovanja učenika.

8.8. Prijedlog nastavnog sata

Svi udžbenici nude vrijedne resurse za razumijevanje farmaceutske industrije i medicinske kemije, ali svaki ima svoje specifične prednosti i nedostatke. Integracija najboljih aspekata iz svakog udžbenika, zajedno s kontinuiranim ažuriranjem i uključivanjem praktičnih zadataka i multimedijalnih sadržaja, može značajno poboljšati obrazovne resurse u ovom području.
Obraditi ovako složenu temu na sažet i jasan način, a istovremeno obuhvatiti sve ključne aspekte farmacije i lijekova koji su bitni učenicima u kontekstu kemije kao predmeta i kemije u svakodnevnom životu, zaista nije jednostavno. Ipak, ovo je idealna prilika da učenici prenesu znanje iz učionice u stvarni svijet. Važno je da im damo osnovne smjernice i pojmove koji će ih potaknuti na daljnje istraživanje kod kuće.

Na temelju prethodne analize kurikuluma, trenutno dostupnih udžbenika kao i onih prijašnjih predlažem sljedeći 90-minutni sat za obradu sadržaja u nastavi.
U svrhu prijedloga unapređenja nastave kemije kroz temu farmakologije, osmišljen je radni list te PowerPoint prezentacija (Dodatak 9.). Po potrebi se dijelovi radnog listića mogu kombinirati, suvišni izuzeti, neki pokusi prenamijeniti.

8.8.1. Priprema za 90-minutni nastavni sat

Nastavna cjelina: Znanost o materijalima, Osnove razvoja farmaceutske industrije
Nastavna jedinica: Kemija lijekova u svakodnevnom životu
Cilj: Povezati kemijske koncepte poput kiselosti, bazičnosti, topljivosti i funkcijskih skupina s apsorpcijom, djelovanjem i dizajnom lijekova. Kroz analizu farmakologije, računalne simulacije i kritičko promišljanje, razmotriti kako kemijska svojstva utječu na učinkovitost i sigurnost lijekova u organizmu.
Potrebna predznanja i vještine:

- razlikovati kiseline i baze te razumjeti njihove kemijske reakcije
- imenovati i prikazati organske spojeve prema IUPAC nomenklaturi
- prepoznati osnovne funkcijske skupine (npr. karboksilne kiseline, alkoholi, amini, esteri)
- povezati strukturu organskih spojeva s njihovim osnovnim kemijskim svojstvima (npr. polarnost, topljivost)
- primijeniti vještine za izvođenje pokusa - mjerenje, opažanje i bilježenje rezultata.

Tablica 3. Prijedlog hodograma 90-minutnog sata na temu *Kemija lijekova u svakodnevnom životu* te ciljanih obrazovnih ishoda za koje se očekuje ostvarenost kroz aktivnosti predložene u Radnom listiću (poglavlje 9).

Etape nastavnog sata	Aktivnosti nastavnika i učenika	Ishodi
Uvodni dio (10 minuta)	Nastavnik započinje sat pitanjem: „ Što je lijek? te potiče učenike na iznošenje svog viđenja pojma.. Učenicima se prikazuje slika procesa razvoja lijeka (slajd 2). Nastavnik postavlja pitanje: „Što mislite, zašto je struktura lijeka važna za njegovo djelovanje?“ Učenici sudjeluju u raspravi i nude odgovore. Nastavnik navodi i naglašava učenicima cilj ovakvih procesa, odnosno razvoj ciljanih lijekova (slajd 2) te najavljuje zadatke koji će učenici raditi tijekom sata.	**KEM SŠ A 4.21:** Kritički razmatrati informacije o materijalima. • Kritički vrednovati podatke o lijekovima, poput njihovih farmaceutskih svojstava, sigurnosti i nuspojava. • Diskutirati o utjecaju nepravilne uporabe lijekova (npr. antibiotika) na pojavu otpornosti bakterija.
Središnji dio (65 minuta)	Učenici rade u grupama. Središnji dio sata obuhvaća problemsko rješavanje putem radnog lista i PowerPoint prezentacije. Učenici imaju u Tablici M4 pojmove i definicije za lakše snalaženje. Na svakoj klupi učenici na raspolaganju imaju laptop za računalnu aktivnost pomoću čega se simulira računalno modeliranje lijeka, tablicu s definicijama kao pomoć u radu. Nastavnik na ppt prezentaciji istovremeno daje upute. Učenici samostalno rješavaju radni list koji uključuje otkrivanje svojstava lijekova: topljivost (Zadatak 1 i 2, Računalna aktivnost 1 - Upute u dodatku Radnom listu te na prezentaciji, slajd 3 i 4), apsorpcija i izlučivanje lijeka (Zadatak 3, Pitanje 1 i 2), međudjelovanje receptora i lijeka (Zadatak 4 i 5, Računalna aktivnost 2 - upute u dodatku Radnom listu te na prezentaciji, slajd 5 i 6), dizajn i sinteza lijeka (Zadatak 6), postojanost lijeka (Pokus 1, Zadatak 7, Pitanje 3, Zadatak 8). Nastavnik zatim s učenicima kroz prezentaciju analizira radni list. Učenici po grupama daju svoja rješenja te istovremeno nadopunjuju tablicu M5. Raspravom s učenicima informira dodatno o drugim kategorijama lijekova (antacidi, imunomodulatori, citostatici, slajd 19-21). Učenici organiziraju lijekove u tablicu prema djelovanju (antipiretici, analgetici, antibiotici, slajd 22).	**KEM SŠ A 4.22** Povezati rezultate eksperimenata s konceptualnim znanjem • Analizirati rezultate pokusa (npr. reakciju aspirina s $FeCl_3$ za identifikaciju fenolne skupine) i povezati ih s kemijskim konceptima poput funkcionalnih skupina i kemijskih reakcija. • Zaključiti zašto određeni lijekovi zahtijevaju specifične uvjete za čuvanje (utjecaj vlage i temperature na aspirin). **KEM SŠ B 4.19:** Analizirati reakcije sinteze i primjene materijala te kemijsku reaktivnost tvari obrađenih u nastavnim temama. • Analizirati kemijske reakcije sinteze lijekova, poput reakcije esterifikacije ili reakcije između antacida i želučane kiseline. • Razumijeti osnovne kemijske promjene koje se događaju u tijelu tijekom metabolizma lijekova. **KEM SŠ B 4.20:** Povezivati svojstva odabranih tvari s njihovom primjenom. • Povezati svojstva lijekova, poput topljivosti, polarnosti ili otpornosti na kiseline, s njihovom apsorpcijom i djelovanjem u organizmu • Objasniti kako strukturne modifikacije molekula mogu poboljšati farmakokinetička svojstva lijeka..

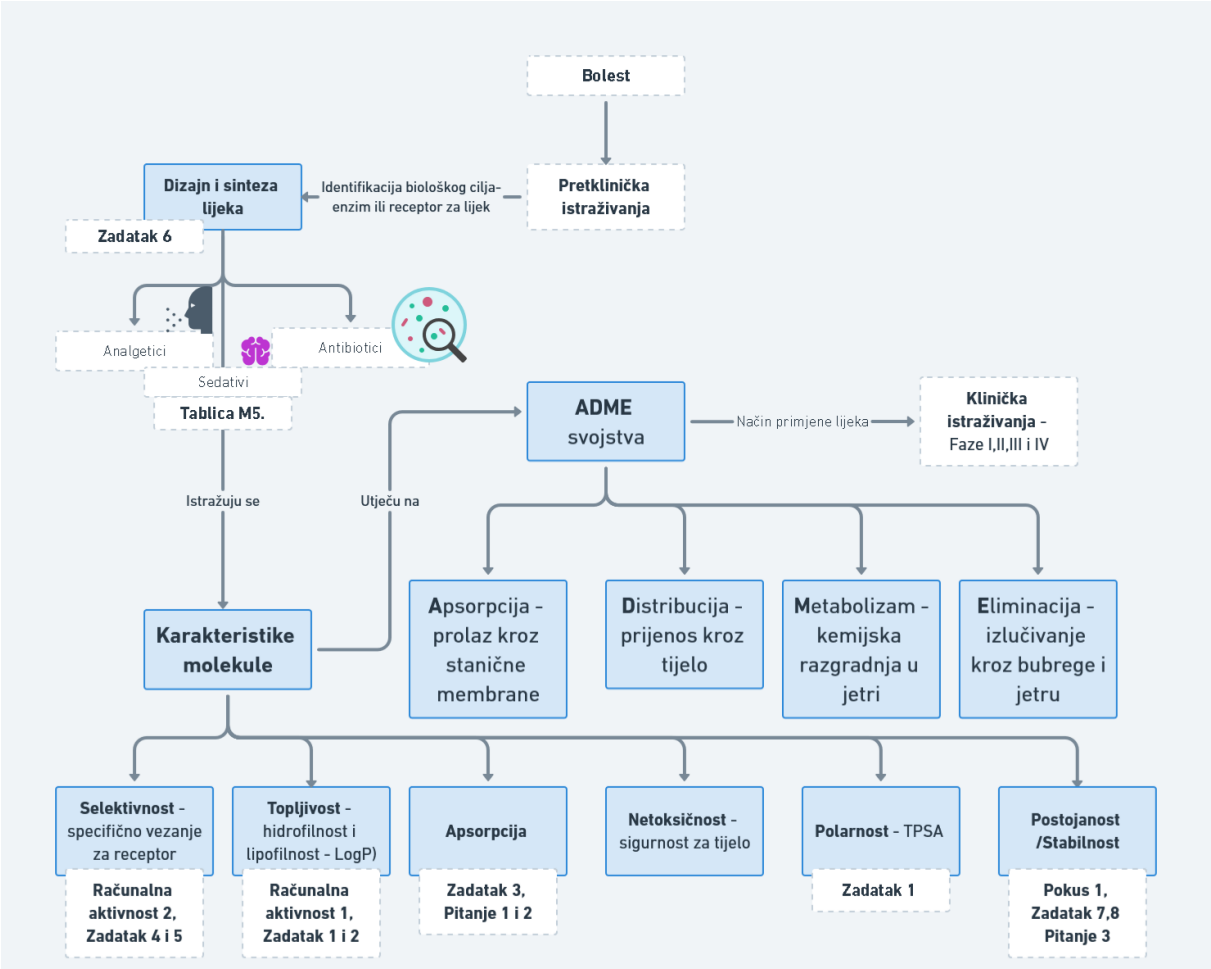
Nastavak Tablica 3.

Završni dio (15 minuta)	Nastavnik za kraj sata s učenicima kroz diskusiju ponavlja ključne pojmove, upućuje na važnost znanja o lijekovima i uzimanju lijekova (nudi dodatne alate za informiranje – HALMED i aplikacija *Mediately,* slajd 23), prolazi kroz ključne karakteristike spojeva kao lijekova – topljivost, polarnost, apsorpcija. Raspravlja s učenicima zašto je važno pridržavati se doze i trajanja terapije antibiotika te povezuje to s aktualnim problemima rezistencije.	**KEM SŠ D.24:** Iz prikupljenih podataka iz pokusa i/ili radom na tekstu poopćiti ih, povezati ih i interpretirati prenoseći jednu vrstu prikaza drugom – crteži, modeli, tablice, grafovi. • Analizirati molekularnu strukturu lijekova pomoću računalnih alata (npr. SwissDock, SwissADME). • Koristiti modele i tablice za kategorizaciju lijekova (antibiotici, analgetici, antacidi) i analizirati njihova svojstva

8.8.2. Prijedlog radnog lista za učenike

Radni list na temu *Kemija lijekova u svakodnevnom životu*. Shema procesa razvoja lijeka izrađena je programom *Whimsical*.[37] Prikaz apsorpcije lijeka preko staničnih membrana izrađen je u programu *BioRender*.[38] Sve strukture molekula izrađene su u digitalnom alatu *SwissDock* i analizirane pomoću *SwissADME*.[39,40] Slike vezanja aspirina i ibuprofena u aktivno mjesto enzima preuzete su i prilagođene iz izvora.[41,42,46]

Pročitaj tekst:
Slika M1. prikazuje shemu procesa razvoja lijeka od dizajna i sinteze do kliničkih istraživanja. Plavi pravokutnici te pridružene aktivnosti (zadatak, pokus, računalne aktivnosti) označuju dijelove ovog procesa kojih ćemo se dotaknuti kroz ovaj radni list i nastavni sat. Rješavajući radni list obrati pozornost na dijelove gdje je naznačen slajd i broj. Nastavnica će putem PowerPoint prezentacije prikazati dodatne upute za rad prilikom Računalnih aktivnosti.



Slika M1. Shema procesa razvoja lijeka od dizajna do kliničkih istraživanja.

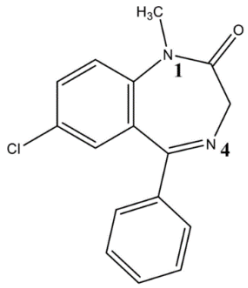
TOPLJIVOST

ZADATAK 1 Usporedi topljivost dva lijeka iz skupine sedativa na temelju strukturnih formula molekula djelatne tvari .

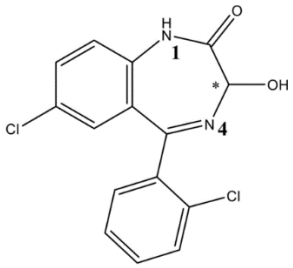
*Generičko ime – **diazepam** je na snazi,*
ali pod zaštićenim imenom Normabel,
svatko me opazi.
*Prijatelj moj vjerni, **lorazepam** se zove,*
zajedno donosimo opuštene dane,
i mirne snove nove.

Put nam je dug, pun prepreka svuda,
od usta, kroz želudac – prava je zbrka luda!
No kad stignemo do mozga, to je naša strana,
jer fosfolipidne membrane nisu nam brana.
Naše vrline i mane ključ su te priče,
a tko ih otkriti želi – neka SwissADME klikne.

(a) Promotri i usporedi strukturne formule molekula diazepama i lorazepama pa zaključi o njihovoj topljivosti u vodi i mastima. Obrazloži odgovor.



Diazepam



Lorazepam

Diazepam ima veću lipofilnost od lorazepama. Između ostalog, molekule diazepama nemaju hidroksilnu skupinu koja omogućuje stvaranje vodikovih veza što povećava topljivost u vodi.

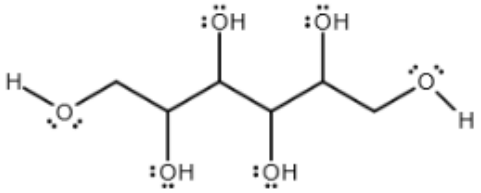
(b) Slijedi upute za korištenje online alata *SwissADME* (Dodatak Računalna aktivnost 1)*, analiziraj dobivene informacije* i provjeri svoje pretpostavke. U Tablicu M1 unesi podatke koji će ti postati dostupni alatom *SwissADME, a upućuju na fizikalna i kemijska svojstva navedenih spojeva.*

Tablica M1. Svojstva diazepama i lorazepama. Podaci dobiveni online alatom *SwissADME.*

Svojstvo	**Diazepam**	**Lorazepam**
TPSA/ Å²*	32,67	61,69
Log P**	2,97	2,68
Provjeri i dopuni svoje pretpostavke i obrazloženja iz zadatka **1(a)**	(Odgovor Slajd 8, u poglavlju 9. Dodatak).	

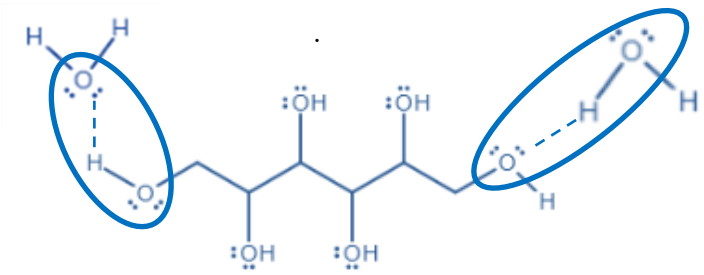
*TPSA ili ukupna polarna površina govori o polarnosti molekule (vidi fizikalno-kemijska svojstva). Ako je brojka manja, u mast molekula zaranja!
**LogP, vrijednost označava lipofilnost – topljivost molekule u mastima (vidi lipofilnost). Veća vrijednost, veća topljivost.

ZADATAK 2 Dvadesetogodišnji mladić hitno je prevezen u bolnicu zbog teške ozljede glave tijekom nogometne utakmice. Ispitivanja su potvrdila prisutnost cerebralnog edema – oticanja mozga. Odlučeno je primijeniti manitol, čija je molekulska struktura prikazana na Slici M2.



Slika M2. Strukturna formula molekule manitola.

Manitol je klasificiran kao osmotski diuretik i u ovom slučaju se koristi za uklanjanje tekućine (većinski voda) iz mozga preko krvno-moždane barijere čime se smanjuje oteklina. **Zaključi** koje svojstvo molekula manitola omogućuje ovo djelovanje navedenog lijeka. Obrazloži odgovor crtežom na atomsko-molekulskoj razini pojave i navedi definicije korištenih pojmova.



Polarnost molekula. Manitol može vezati molekule vode vodikovim vezama O-H···O sa svojih šest hidroksilnih skupina.

APSORPCIJA LIJEKA

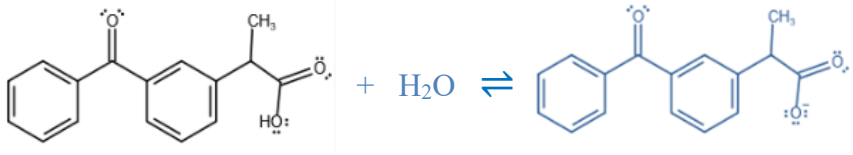
Nakon što se lijek unese oralno (putem usta), na njega između ostalih čimbenika utječe i pH-vrijednost organizma. Lijekovi su zapravo slabe organske kiseline (HA) ili slabe organske baze (B) koje su u ovom neioniziranom obliku – topljive u mastima(lipofilne). To svojstvo je ključno za apsorpciju, odnosno prolazak lijeka kroz stanične membrane i time njegovo djelovanje u stanici. Ionizirani je oblik konjugirana baza (A^-) ili konjugirana kiselina (BH^+) – topljiv u vodi (hidrofilan). To svojstvo je ključno za transport lijeka putem krvi te izlučivanje putem urina.
Konstanta p*K*a predstavlja pH pri kojem su koncentracije ioniziranog i neioniziranog oblika lijeka jednake, odnosno u ravnoteži. Odnos ovih jedinki definiran je jednadžbom kemijske reakcije u ravnoteži:

$$HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + H3O^+$$

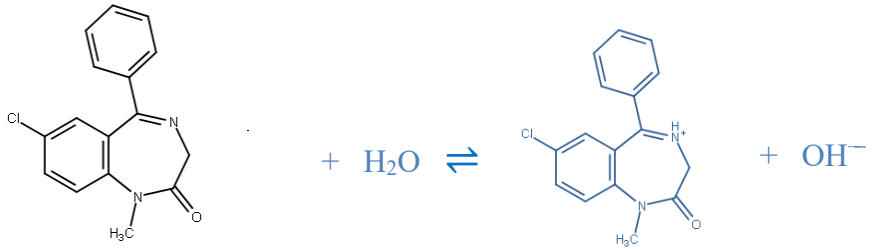
ili

$$B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + OH^-$$

ZADATAK 3(a) Jednadžbom kemijske reakcije prikaži dinamičku ravnotežu u vodenoj otopini:



(i) analgetika ketoprofena (slaba organska kiselina, HA)



(ii) sedativa diazepama (slaba organska baza, B).

ZADATAK 3(b) Na temelju odgovora u zadatku 3(a), Brønsted–Lowryjeve teorije baza i kiselina (BL) i Le Chatelierova načela za svaki dio tijela (slina, želudac…) kojim prolaze molekule ketoprofena odnosno diazepama, zapiši u tablicu M2 kiselo bazna svojstva prema BL teoriji te kemijsku formulu **zastupljenijeg** oblika molekule obzirom na pH-vrijednost medija tog dijela organizma, uz pretpostavku stalne temperature. Možeš koristiti opće formule: HA/A^- / B/BH^+.

Tablica M2. Zastupljeniji oblici lijekova ketoprofena i diazepama prema gastrointestinalnom pH.
*Mogu se pretpostaviti bazični fiziološki uvjeti.

Lijek	**Slina (bazično)***	**Želudac (pH = 2)**	**Tanko crijevo (bazično)***
Kiselo bazna svojstva prema BL teoriji	BL baza	BL kiselina	BL baza
Zastupljeniji oblik molekule **ketoprofena**	A^-	HA	A^-
Zastupljeniji oblik molekule **diazepama**	B	BH^+	B

PITANJE 1 Što možeš zaključiti o apsorpciji ova dva lijeka?

Ketoprofen se najbolje apsorbira u želucu jer povećana koncentracija H_3O^+ iona povećava udio njegovog neioniziranog oblika (HA), topljivijeg u mastima. Diazepam se bolje apsorbira u tankom crijevu, gdje povećana koncentracija OH^- iona povećava udio njegovog neioniziranog oblika (B), koji lakše prolazi kroz stanične membrane.

PITANJE 2 Što možeš zaključiti o izlučivanju ova dva lijeka, ako znaš da su krv i urin bazični?

Budući da je okoliš bazičan, koncentracija OH− iona je povećana, ravnoteža za diazepam se pomiče prema reaktantima, odnosno neioniziranom obliku koji je slabo topljiv u vodi, ali dobro topljiv u mastima zbog čega će se dulje zadržati u tijelu. Ravnoteža za ketoprofen će se pomaknuti prema produktima, odnosno ioniziranom obliku koji je topljiviji u vodi, odnosno u krvi i urinu te će se brže izlučiti.

MEĐUDJELOVANJE RECEPTORA I LIJEKA

Nakon što lijek prođe svoj put i stigne do cilja – receptora, za njega se treba vezati kako bi mogao djelovati. Za to su ključne međumolekulske interakcije. Slijedi priča o ibuprofenu.

Boli boli,
Za brzo rješenje tvoje tijelo te moli.
Do daske dajem gas,
Stiže ibuprofen kao spas!
Moderni kemičar sada bit ćeš,
Kako lijek sjeda u receptor vidjet ćeš!
Računalu se vraćamo,nove simulacije prihvaćamo.
Uputa ima puno – znam
u Dodatak Računalna aktivnost2 i Slajd 5 pogledaj,
da vidiš kamo pripadam.

Pogledati Slajd 6

Analiza rezultata

ZADATAK 4(a) Pod **cluster number** odaberi prvi te klikni. (Cluster označava dio enzima koji je vezan uz jedan ligand). U prozoru iznad pojavit će se molekula u interakciji s enzimom. Promotri kojim međumolekulskim interakcijama se molekula ibuprofena veže za enzim – kursorom prolazi po strukturi, a u alatnoj traci će ti se pokazati atomi iz enzima (kratice aminokiselina, na primjer Ser, Glu, Asp...) te ibuprofena (LIG kao ligand).

Ibuprofen se veže vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama. (Vidjeti slajd 12.)

ZADATAK 4(b) U tablici promotri kolonu s AC score. AC score je brojka koja u ovom online alatu govori o energiji vezanja. Zaključi o afinitetu vezanja i energiji vezanja ove molekule.

Ibuprofen ima AC score -20 te jak afinitet vezanja.

ZADATAK 5 Obrazloži uputnost istovremenog uzimanja *Aspirina protect 100* kao antikoagulansa i ibuprofena nakon što pročitaš stihove što slijede.

Aspirin svi dobro znaju,
često ga u ruci imaju.
No i ja sam dio iste priče,
NSAID smo – to se viče!
Nesteroidni smo, to je točno,
upalama kažemo „NE!" odlučno i moćno.
Ali aspirin ima moć veću,
sprječava ugrušak u krvi, što ja neću.
Tu mu smetam, priznajem, da,
jer isti enzim voli nas oba dva.

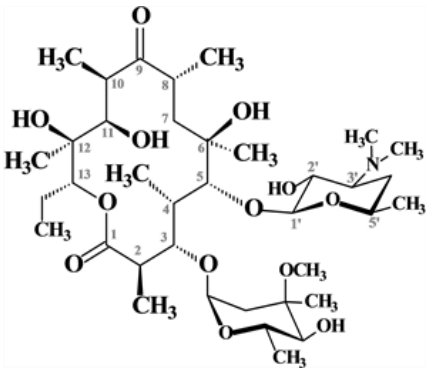
No ja se ne vežem zauvijek snažno,
što je za srčane bolesnike jako važno.
Pa dok sam ja na aspirinovom mjestu,
netko može biti u arestu!
I dok aspirin čeka priliku pravu,
možda ugrušak napravi stravu!

Pacijent ne smije uzimati istovremeno ibuprofen i aspirin jer ako se ibuprofen prije veže u aktivno mjesto enzima, ne dopušta vezanje aspirina čije ireverzibilno vezanje omogućuje duže djelovanje pri sprečavanju grušanja krvi. (Slajd 13)

DIZAJN I SINTEZA LIJEKA

Prouči pjesmicu i otkrij tajnu jedne vrste antibiotika!

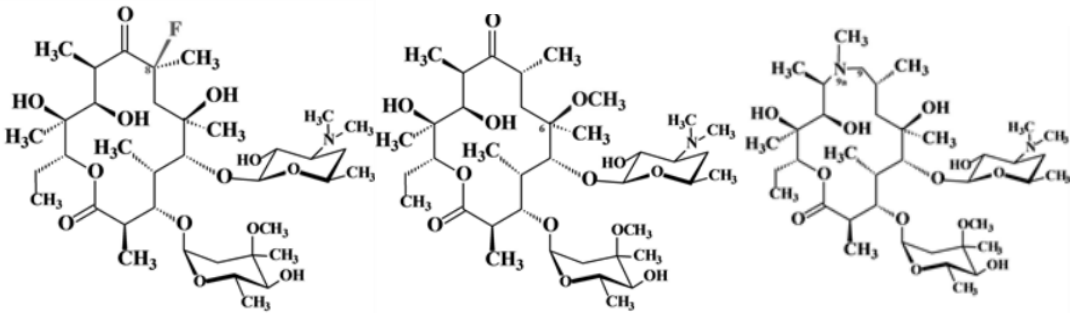
Eritromicin sam, iz prirode dar,
iz Streptomyces-a stižem znaj.
Makrolidom me zovu,
Jer složene sam građe,
Al' djelovanje stoga muka mi snađe.
Kratko trajem, velike su doze,
A ljude onda stavljam u grčevite poze.
U želudcu kiseli rat se bije,
pa me bitka u hemiketal savije.
Neaktivni oblici moji tad se stvore,
Pa bakterija bude čitavo more.
Antibiotske skupine bio sam tron,
Sve dok nije došao on.
Snažniji, jači, dulje traje,
Bakterijama stijenke on radit' ne daje!
Kroz sinteza sto i tisuću na tom putu muka,
Moć mu je otključala struka.
Azitromicin, hrvatski um, Plivin sjaj,
Kako su ga načinili, sad i ti znaj!



Slika M3. Prikaz strukture molekule eritromicina A.

Dizajn i sinteza novih antibiotika u potrazi za boljim opcijama je iznimno skup, trnovit i dug put. Ovo je samo jedan primjer kada se kemijskom intervencijom dobije djelotvornija molekula od one izolirane iz prirodnog materijala. Razlog ovome nastojanju bila je jedna reakcija koja se odvija u kiselom mediju – nastajanje cikličkih poluketala. To su spojevi koji nastaju kada hidroksilna skupina „napadne“ ugljikov atom karbonilne skupine, odnosno ketone zbog čega se zovu poluketali.

ZADATAK 6(a)
Promotri strukturne formule molekula nekih makrolidnih antibiotika (slika M4) dobivenih kemijskim intervencijama u molekuli eritromicina. Usporedi prirodni izvor i sintetske pripravke i obrazloži koji dio molekule eritromicina A je bio cilj modifikacije u dizajnu novih antibiotika i zašto?



Slika M4. **A** Fluoritromicin **B** Klaritromicin **C** Azitromicin

U molekuli eritromicina A, ključna kemijska reakcija odvija se na C9 atomu, gdje dolazi do interakcije između hidroksilnih skupina na C6 ili C12 atomu i keto skupine. Ova reakcija rezultira stvaranjem spojeva koji gube antibakterijsko djelovanje te mogu izazvati nuspojave poput mučnine. Modifikacijom strukture molekule eritromicina A, kao što je vidljivo kod fluoromicina, klaritromicina i azitromicina, cilj je stabilizirati molekulu i spriječiti neželjene kemijske promjene, čime se poboljšava učinkovitost i smanjuju nuspojave.

ZADATAK 6(b) Antibakterijskom djelovanju u građi molekula eritromicina A i njegovih derivata doprinose i heterociklički prstenovi dezozamina i kladinoze. Kojoj skupini spojeva pripadaju i kako se naziva veza kojom se vežu na makrolidni prsten?

Pripadaju šećerima koji su vezani za makrolidni prsten glikozidnom vezom.

POSTOJANOST

Lijekovi po zakonu od 1979. godine na pakiranjima moraju imati otisnut rok trajanja, baš kao i hrana. Međutim, to za neke lijekove ne znači nužno i put u smeće. Do tog datuma proizvođač garantira sigurnost i učinkovitost lijeka, ali lijek i dalje može biti upotrebljiv. Ali, svemu treba pristupiti s oprezom, pa tako i ovome, aspirin će ti objasniti zašto!

Ide priča iz prvog lica,
da ne ostane iz prošlog zadatka samo skica.
Znali su još davno davno prije,
Kada temperatura i groznica se sprema,
Vrbinu koru staviš da vrije,
Pa bolesti na vidiku više nema.
Salicilna kiselina - glavna dama,
Ali u želudcu onda dogodila se drama.
Krvarenje, iritacija, svašta nešto
Ali Felix Hoffman problemu tom'
doskočio je vješto.
Acetil je salicilnoj kiselini dodao,
a mene zatim pod nazivom aspirin – prodao!

Svaki lijek, pa i ja, ima svoj kraj,
A zašto se to dogodi - ti u nastavku saznaj!

POKUS 1 SVE IMA ROK TRAJANJA

Pribor: 4 epruvete, stalak za epruvete

Kemikalije: 500 mg salicilna kiselina, nova tableta aspirina, stara tableta aspirina, otopina željezova(III) sulfata, 500 mg fenola, destilirana voda

KORAK 1 U epruvetama **E1, E2, E3 i E4** redom nalaze se fenol, salicilna kiselina, usitnjena nova i stara tableta aspirina. Promotri uzorke i **zabilježi opažanja** u Tablicu M3.

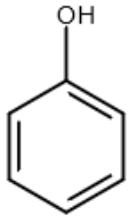
KORAK 2 Dodaj u epruvete **E1, E2, E3 i E4** destiliranu vodu do oznake i **zabilježi opažanja** u Tablicu M3.

KORAK 3 Dodaj u epruvete **E1, E2, E3 i E4** nekoliko kapi otopine željezova(III) sulfata, protresi sadržaj i **zabilježi opažanja** u Tablicu M3.

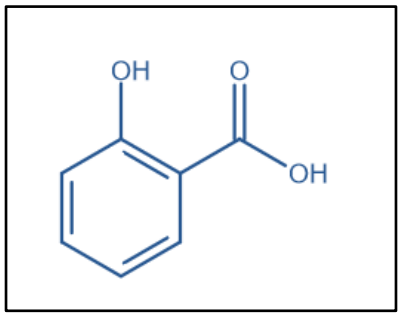
Tablica M3. Opažanja za epruvete E1, E2, E3 i E4 u kojima se nalaze fenol, salicilna kiselina, nova i stara tableta aspirina.

	E1	**E2**	**E3**	**E4**
Uzorci	Bijela kristalna tvar.	Bijeli prah	Bijeli prah	Bijeli prah, miris octene kiseline
Nakon dodatka dH_2O	Bezbojna otopina, oštar miris.	Bezbojna otopina	Bezbojna otopina	Bezbojna otopina
Nakon dodatka $Fe^{3+}(aq)$	Ljubičasta otopina.	Ljubičasta otopina	Bezbojna otopina	Svjetlo ljubičasta otopina

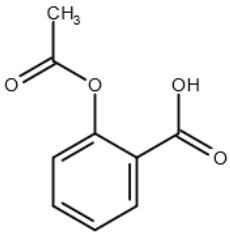
ZADATAK 7 U pravokutniku nacrtaj strukturnu formulu molekule salicilne kiseline čiji je IUPAC naziv **2-hidroksibenzojeva kiselina**.



Fenol



Salicilna kiselina



Acetilsalicilna kiselina

Koje strukturne razlike uočavaš između ovih molekula?

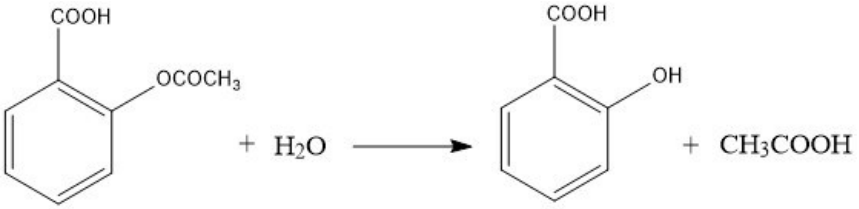
Fenol sadrži hidroksilnu skupinu na benzenskom prstenu, salicilna kiselina sadrži karboksilnu i hidroksilnu skupinu, a acetilsalicilna kiselina karboksilnu i estersku skupinu.

PITANJE 3 Na temelju strukturne analize i rezultata pokusa obrazloži koje molekule mogu dati pozitivan test sa željezovim(III) ionima iz otopine?

Molekule koje mogu dati pozitivan test su fenol i salicilna kiselina, koja sadrži fenolni dio u svojoj molekuli.

ZADATAK 8(a) Aspirin je acetilsalicilna kiselina (IUPAC: 2- acetoksibenzoatna kiselina), koja nastaje esterifikacijom iz salicilne kiseline (IUPAC: 2-hidroksibenzojeva kiselina) i anhidrida octene kiseline.

Na temelju opažanja iz prethodnog pokusa i odgovora na zadatak 7 napiši **jednadžbu kemijske reakcije** koja se odvila u kutiji starog aspirina koja je bila u uvjetima vlage.



ZADATAK 8(b) Što zaključuješ o korištenju lijekova nakon isteka roka trajanja?

Treba pažljivo gledati rok trajanja lijeka te ga ne koristiti nakon isteka zbog mogućih nuspojava i smanjene efikasnosti.

A sada ti je preostalo analizirati rezultate i **ispuniti** tablicu o lijekovima (Tablica M5)!

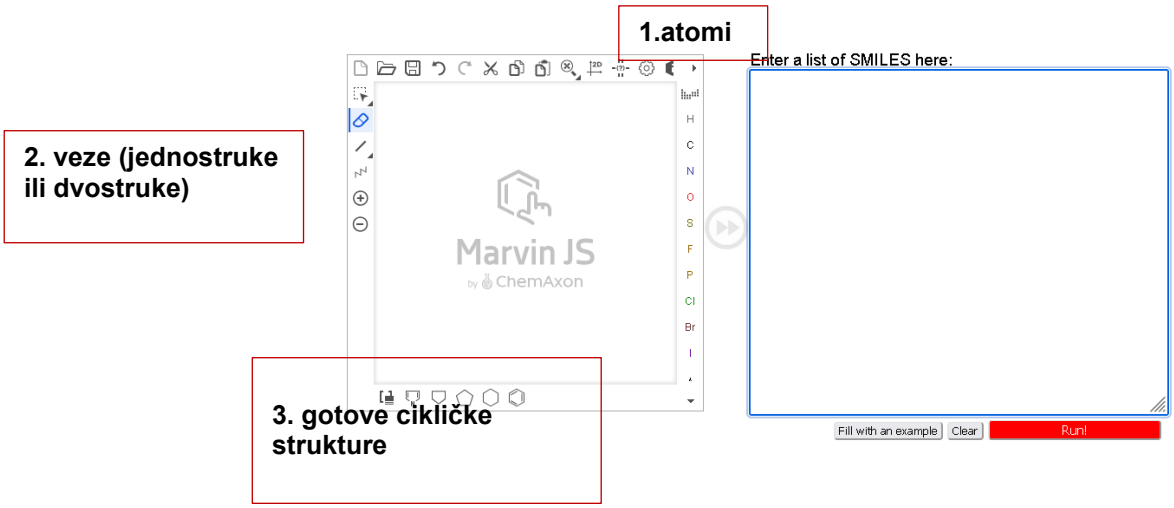
DODACI UZ RADNI LISTIĆ

Tablica M4. Pojmovi i definicije za Radni list Farmaceutika i lijekovi.

Pojam	Definicija
Apsorpcija	Proces kojim lijek ulazi u krvotok iz mjesta primjene (kroz usta, intravenozno, putem kože, rektalno, inhalacijom) ovisno o njegovoj topljivosti i ionskom obliku.
Antacidi	Lijekovi koji neutraliziraju kiselinu u želucu, povećavajući pH-vrijednost.
Hidrofilnost	Sposobnost molekule da se otapa u vodi.
Lipofilnost	Sposobnost molekule da se otapa u mastima i prolazi kroz lipidne membrane, često izražena kao LogP vrijednost.
Lijek	Strana molekula koja utječe na biološke procese u tijelu te se koristi za prevenciju, dijagnozu ili liječenje bolesti. Lijekovi mogu biti prirodnog podrijetla ili sintetizirani u laboratoriju.
Farmacija	Multidisciplinarna znanost i zdravstvena profesija koja se bavi istraživanjem, razvojem, proizvodnjom, pripremom, kontrolom, distribucijom i pravilnom primjenom lijekova.
Farmaceutika	Grana farmacije koja se fokusira na formulaciju, proizvodnju i isporuku lijekova, osiguravajući njihovu stabilnost, učinkovitost i sigurnost.
Farmakologija	Znanstvena disciplina koja proučava interakcije između lijekova i bioloških sustava. Podijeljena je na: **Farmakodinamiku**, koja se bavi učincima lijeka na tijelo, mehanizmima djelovanja i nuspojavama. **Farmakokinetiku**, koja proučava apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijeka (tzv. ADME svojstva).
ADME svojstva	Apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje lijeka.
Aktivna/Djelatna tvar	Kemijski spoj ili smjesa koja je odgovorna za željeni farmakološki učinak lijeka na organizam. Bez djelatne tvari, lijek ne bi imao svoju ljekovitu svrhu.
Pomoćna tvar	Kemijski spoj ili smjesa koja sama po sebi nema farmakološko djelovanje, ali ima važnu ulogu u pripremi, stabilizaciji i primjeni gotovog lijeka.
Metabolizam	Kemijska razgradnja lijeka u tijelu, često u jetri, kako bi se omogućila njegova eliminacija.
Polarnost	Neravnomjerna raspodjela električnoga naboja u molekuli zbog čega nastaje električni dipolni moment.
Selektivnost	Sposobnost molekule da se specifično veže za ciljani receptor, čime se postiže preciznije djelovanje, povećava učinkovitost liječenja i smanjuju nuspojave.
Topljivost	Sposobnost molekule da se otopi u vodi ili lipidima, važna za postizanje određene koncentracije lijeka u organizmu u svrhu postizanja željenog farmakološkog odgovora.
Vodikove veze	Slabe međumolekulske interakcije koje nastaju između dvije molekule (ili unutar jedne molekule) kada je atom vodika (H) kovalentno vezan za jedan elektronegativan atom (donor D poput kisika, dušika, fluora...), a istovremeno privučen drugim elektronegativnim atomom iz susjedne molekule (ili drugom dijelu iste molekule, akceptor A). Simbolički opći zapis vodikove veze je D-H···A

Dodatak Računalna aktivnost 1

- ✓ U internetskom pregledniku idi na **SwissADME**.
- ✓ U radnom prostoru *(lijevi kvadrat)* nacrtaj molekulu **diazepama** tako što ćeš *lijevim klikom* odabrati u alatnim trakama potrebne **atome(1.) i veze(2.)**, a zatim ih ponovno *lijevim klikom* staviti u radni prostor. Također za prstenove u strukturi diazepama možeš na isti način odabrati već prethodno pripremljene(**3.**)
- ✓ Ako želiš nešto promijeniti, možeš *obrisati* ili koristiti strelicu *unatrag* .
- ✓ Provjeri odgovara li nacrtana struktura onima iz **Zadatka 1a** te klikni .
- ✓ Pojavit će se *SMILES šifra* u desnom prozoru (*Enter a list of SMILES here*).
- ✓ Zatim obriši nacrtanu strukturu te ponovi postupak za molekulu **lorazepama**.
- ✓ Ponovno provjeri točnost nacrtane strukture i klikni .
- ✓ U desnom prozoru sada ćeš imati dvije *SMILES šifre*. Klikni ***RUN***.
- ✓ Otvorit će se dva profila za svaku od molekula. Riješi zadatak 1(b).



Dodatak Računalna aktivnost 2 - Upute

Korak 1: Pokretanje SwissDock alata

- ✓ Na laptopu otvori internet preglednik i idi na online alat SwissDock (https://www.swissdock.ch/).
- ✓ Prati upute prikazane na pripremljenoj prezentaciji kako bi pravilno koristio alat.

Korak 2: Izrada molekule liganda (ibuprofen)

- ✓ U sučelju SwissDock klikni na opciju **"Using the sketcher"** za odabir liganda.
- ✓ Pomoću alata za crtanje molekula i IUPAC naziva spoja (*R*,*S*)-2-[4-(2-metilpropil) fenil]propanska kiselina nacrtaj strukturnu formulu molekule ibuprofena.
- ✓ Dodaj potrebne atome ugljika (C), kisika (O) i vodika (H).
- ✓ Prilagodi veze između atoma prema kemijskoj strukturi ibuprofena (uključujući jednostruke, dvostruke i aromatske veze).
- ✓ Nakon što završiš s crtanjem, provjeri točnost strukture i klikni na **"Prepare ligand"** za pripremu molekule.

Korak 3: Odabir proteina receptora

- ✓ U drugom prozoru otvori **Protein Data Bank (PDB)** (https://www.rcsb.org/).
- ✓ U tražilicu PDB-a upiši šifru proteina: **3LN1**.
- ✓ Ovaj protein predstavlja COX-2 (ciklooksigenaza 2), enzim koji katalizira stvaranje prostaglandina odgovornih za bol i upalu.
- ✓ Klikni na prvi rezultat u tražilici koji odgovara šifri **3LN1**.
- ✓ Preuzmi strukturu proteina u **PDB formatu** klikom na opciju za preuzimanje (obično označeno kao "Download Files" → "PDB Format").

Korak 4: Priprema proteina kao cilja

- ✓ U SwissDock sučelju pronađi sekciju **"Submit a target"**.
- ✓ Učitaj preuzetu molekulu proteina (PDB datoteku) u ovu sekciju.
- ✓ Klikni na **"Prepare target"** kako bi alat pripremio protein za docking (u prijevodu pristajanje, vezanje liganda za receptor predviđeno računalnim tehnikama).

Korak 5: Postavljanje docking parametara

- ✓ Nakon pripreme cilja, odaberi opciju **"Check parameters"** kako bi provjerio jesu li svi uvjeti ispravno postavljeni.
- ✓ Kada su parametri provjereni, klikni na **"Start docking"** kako bi pokrenuo simulaciju interakcije između molekule ibuprofena i COX-2 enzima.
- ✓ Vrati se na zadatak 4(a)

Tablica M5. Kategorizacija lijekova.

Kategorija lijeka	Primjeri lijekova	Namjena (indikacija)
Analgetici (protiv bolova)	**Paracetamol, Ibuprofen, Aspirin**	Ublažavanje boli (glavobolja, zubobolja, menstrualna bol), snižavanje povišene temperature.
Antipiretici (protiv groznice)	**Paracetamol, Ibuprofen**	Snižavanje povišene tjelesne temperature.
Antibiotici	**Eritromicin, Azitromicin, Penicilin**	Liječenje bakterijskih infekcija (upala grla, infekcije mokraćnog sustava, upala pluća).
Antacidi (protiv žgaravice)	**Gastal**	Neutralizacija želučane kiseline kod žgaravice.
Antikoagulansi (protiv zgrušavanja krvi)	**Aspirin, Varfarin**	Prevencija i liječenje krvnih ugrušaka (tromboza, embolija).
Citostatici	**Cisplatin**	Najšire korišteni lijekovi za liječenje raznih tumora.
Imunomodulatori	**Pomalidomid**	Jačanje imunološkog odgovora organizma.
Lijekovi za dijabetes	**Inzulin**	Regulacija razine šećera u krvi kod dijabetesa.
Sedativi	**Lorazepam, diazepam**	Liječenje depresije, anksioznosti i povezanih poremećaja.

8.9. ZAKLJUČAK

Integracija farmakologije u nastavu kemije otvara brojne mogućnosti za unapređenje obrazovanja, osposobljavanje učenika za donošenje informiranih odluka o zdravlju i bolje razumijevanje kemijskih principa kroz primjere iz stvarnog života. Analiza hrvatskog kurikuluma za kemiju pokazuje da postoji okvir za poučavanje o lijekovima, no još uvijek ima prostora za inovativne metode i pristupe.

Uključivanjem lijekova kao modela za prikaz intermolekulskih interakcija između lijeka i receptora naglašava se utjecaj prostorne građe molekula na njihovo djelovanje. Računalno modeliranje molekula pokazuje kako se molekule dizajniraju i optimiziraju za bolje farmakološko djelovanje. Osim toga, koncepti polarnosti i veličine molekula mogu se povezati s apsorpcijom, distribucijom i eliminacijom lijekova te ukazati na važnost utjecaja hidrofilnosti i lipofilnosti molekula.

Djelovanja lijekova su kemijske reakcije. Primjerom hidrolize estera može se objasniti reaktivnost i stabilnost lijekova, utjecaj okolišnih uvjeta (pH-vrijednost, vlaga, temperatura) na stabilnost i učinkovitost lijekova tijekom skladištenja.

Putem klasifikacije lijekova prema njihovom djelovanju (analgetici, antibiotici, antipiretici) pokazuje se kako svojstva lijekova određuju njihovu primjenu. Kombinacija povijesnog konteksta iz Udžbenika 1, kemijske detaljnosti i spektroskopskih metoda iz Udžbenika 2, praktičnih primjera iz Udžbenika 3, te društvenih i edukativnih elemenata iz Udžbenika 5 pružila bi sveobuhvatan i zanimljiv pristup ovoj temi. Takva obrada teme imala bi sadržaj koji je: praktičan (s pokusima i zadacima koji potiču kritičko razmišljanje), temeljen na kemiji (s detaljnim prikazom strukture i reakcija lijekova), značajan za učenike (s temama koje ih povezuju sa svakodnevnim životom i globalnim problemima) te vizualno upečatljiv (grafičkim prikazima i dijagramima za bolje razumijevanje složenih koncepata).

Uključivanje interaktivnih dijagrama i video materijala koji prikazuju kemijske reakcije i razvoj lijekova može značajno pomoći učenicima u razumijevanju složenih procesa. Istovremeno, dodavanje praktičnih zadataka, laboratorijskih vježbi i studija slučaja pruža im priliku da teorijsko znanje primijene u praksi, čime se dodatno potiče njihovo aktivno sudjelovanje u učenju. Redovito ažuriranje sadržaja kako bi se uključila najnovija istraživanja, razvoj i trendovi u farmaceutskoj industriji osigurat će značajnost i suvremenost materijala, a čime tema učenicima postaje ne samo edukativna, već i inspirativna.

8.10. LITERATURNI IZVORI

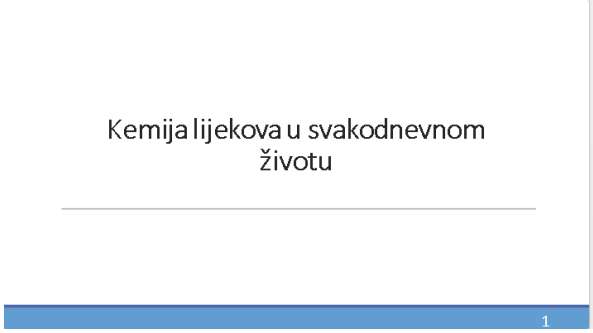
1. S. Šimičić, M. Pešut, *Časopis za metodiku i nastavu matematike*, (2021) 32 – 41.
2. https://narodne – novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_10_208.html (datum pristupa 20. travnja 2024.)
3. I. Buchberger, V. Bolčević, V. Kovač, *Metodički ogledi*, **24** (2017), 109 – 129.
4. https://moodle.srce.hr/eportfolio/view/view.php?id=98025 (datum pristupa 8. siječnja 2025.)
5. R. Schwartz-Bloom, M. Halpin, *J. Res. Sci. Teach*. **40**(2003) 922 – 938.
6. A. Mair, M. Wilson, T. Dreischulte, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **60** (2020) 661–681.
7. Y. Zhao, Y. Liang, L. Laflamme, C. Rausch, K. Johnell, J. Möller, *Drug Saf.,***8** (2022) 873–880.
8. D. F. Santos, M. P. T. Silveira, A. L. Camargo, A. Matijasevich, I. S. Santos, A. J. D. Barros, A. D. Bertoldi, *BMC Pediatr.* **1** (2019) 235.
9. J. S. Choi, K. Y. Kim, *Am J Infect Control.*, **6 (**2019) 715–717.
10. D. C. Gabriel, B. B. Balakrishna, *Int J Contemp Pediatrics.*, **9** (2021) 1557.
11. S. B. Loni, R. E. Alzahrani, M. Alzahrani, M. O. Khan, R. Khatoon, H. H. Abdelrahman, Z. A. Abd-Elhaleem, M. M. Alhaidari, *Front Public Health* ,**11** (2023) 0-0.
12. S. Ylinen, K. Hämeen-Anttila, K. Sepponen, A. K. Lindblad, R. Ahonen, *Pharmacoepidemiol*
    Drug Saf., **10 (**2010) 1000–1008.
13. K. Butorac, Z. Zuckerman ,V. Punoš, *Uporaba lijekova srednjoškolaca i studenata u Zadru (pilot istraživanje), Acta Iadertina*, **1** (2011) 0-0.
14. R. D. Schwartz-Bloom, M. J. Halpin, J. P. Reiter, *J. Chem. Educ.* **6 (**2011) 744–750.
15. https://narodne – novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html (datum pristupa 15. siječnja 2025.)
16. https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=18353 (datum pristupa 15. siječnja 2025.)
17. https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1549&sectionid=93411751 (datum pristupa 15. siječnja 2025.)
18. M. Marino, Z. Jamal, M. A. Siccardi, *StatPearls,* **1** (2025) 0-0.
19. https://www.ualberta.ca/en/pharmacology/about/what – is – pharmacology.html 18353 (datum pristupa 15. siječnja 2025.)

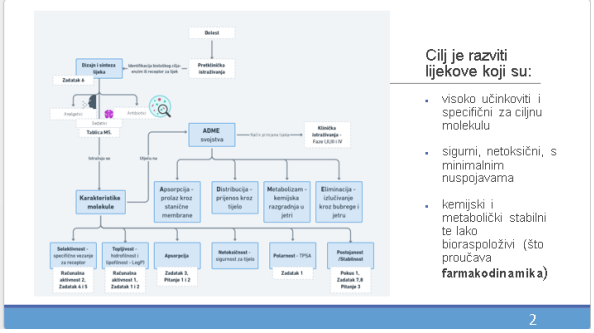
20. https://www.lehrplanplus.bayern.de/fachlehrplan/gymnasium/11/chemie (datum pristupa 15. siječnja 2025.)
21. http://www.mss.gov.si/fileadmin/mss.gov.si/pageuploads/podrocje/ss/ 18353 (datum pristupa 15. siječnja 2025.)
22. M. Barić Tominac, A. Dragobratović, S. Liber, A. Kučak, D. Bajić, *Kemija 4, udžbenik kemije za četvrti razred gimnazije*. Profil Klett d.o.o. , Zagreb, 2021, str. 294-304.
23. T. Begović, M. Luetić, F. Novosel, V. Petrović Peroković, S. Rupčić Petelinc, *KEMIJA 4, Udžbenik kemije u četvrtom razredu gimnazije*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2021. str. 208-228.
24. Z. Popović, L. Kovačević, I. Futivić, *Kemija 4, Udžbenik za četvrti razred gimnazije,* Alfa d.d., Zagreb, 2022, str. 188-198.
25. M. Koludrović, V. Rajić, *Metodički ogledi*, **2** (2021) 11–36.
26. D. Stričević, B. Sever, *Temelji organske kemije udžbenik kemije za četvrti razred gimnazije*, Profil Klett, Zagreb, 2018,str. 152–154.
27. M. Sikirica, B. Korpar-Čolig, *Organska kemija : Udžbenik kemije za IV. razred gimnazije*, IV. Školska knjiga d.d., Zagreb, 1996, str. 141-148.
28. H. N. Rubai, *Pharmacy,* **2** (2021) 70.
29. T. Danel, J. Łęski, S. Podlewska, I. T. Podolak, *J. Chem. Educ.* **10** (2024) 4454–4461.
30. S. L. Mitchell, J. S. McCourt, D. J. Nesset-Tollefson, G. L. Kimball, J. N. Mikesell, E. J. Tollefson, E. E. Carlson, *J. Chem. Educ.* **1** (2023) 410–414.
31. https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jchemed.2c00836 (datum pristupa 17.svibnja 2024.)
32. E. G. Sega, J. Clarke, *J. Chem. Educ.* **12** (2013) 1658–1661.
33. https://www.fda.gov/drugs/special – features/dont – be – tempted – use – expired – medicines (datum pristupa 14. siječnja 2025.)
34. C. Bolte, S. Streller, A. Hofstein, *Teaching Chemistry – A Studybook*, SensePublishers, Rotterdam, 2013, 67–95.
35. https://virtual.edu.rsc.org/aspirin/experiment/1 (datum pristupa 1. srpnja 2024.)
36. https://medlineplus.gov/ency/patientinstructions/000534.htm (datum pristupa 14. siječnja 2025.)
37. https://whimsical.com/ (datum pristupa 31. siječnja 2025.)
38. https://www.biorender.com/ (datum pristupa 31. siječnja 2025.)

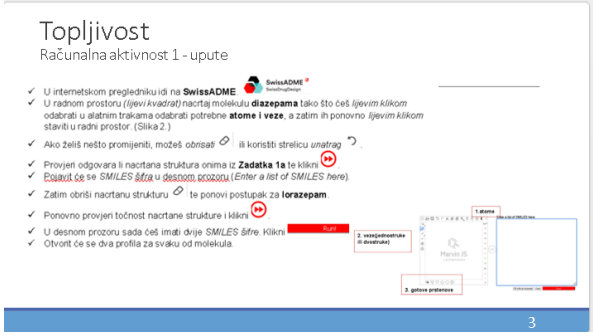
39. https://www.swissdock.ch/ (datum pristupa 5. veljače 2025.)
40. http://www.swissadme.ch/ (datum pristupa 5. veljače 2025.)
41. https://www.mdpi.com/1424-8247/3/7/2146 (datum pristupa 5. siječnja 2025.)
42. https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/cox_inhibitor (datum pristupa 5. siječnja 2025.)
43. B. J. Pleuvry, *Anaesth. Intensive Care Med.*, **4** (2005) 135-138.
44. M. Ouattara, S. Coulibaly, J.-P. N'Guessan Deto, *Open J. Med. Chem.*, **3** (2020) 57–112.
45. M. W. Harrold, R. M. Zavod, *Basic Concepts in Medicinal Chemistry,* 3.izdanje*,* American Society of Health-System Pharmacists, Inc., Bethesda, 2023, str.15-50.
46. https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=12078#v1108963_hr (datum pristupa 10. veljače 2025.)

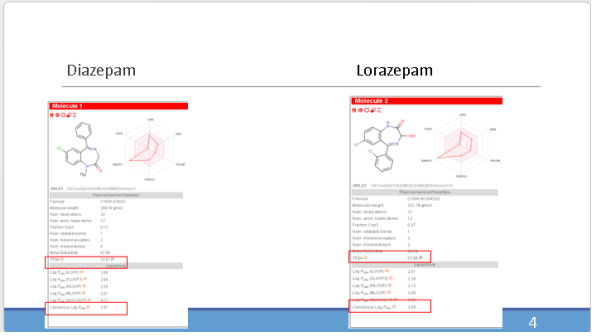
§ 9. DODATAK

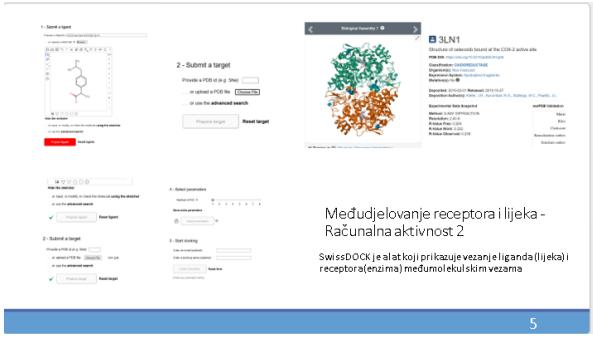
Prezentacija uz nastavni sat *Kemija lijekova u svakodnevnom životu*. Prethodni ishodi su predznanje učenika potrebno za savladavanje ove cjeline. Ishodi za sat su razrađeni po Kurikulumu.[2] Literatura korištena za pripremu sata, podaci o lijekovima i definicije navedene su u literaturnim izvorima. [15-19,23-25]

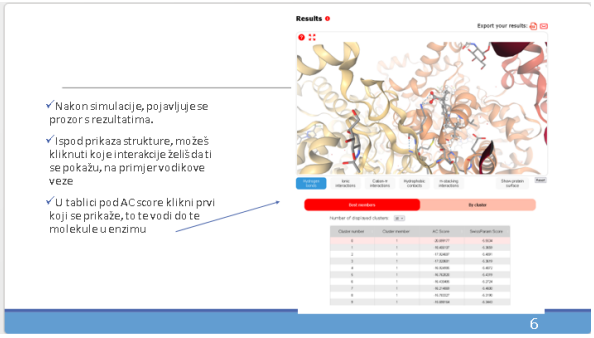










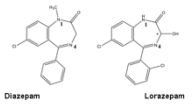


Topljivost

Generičko ime – **diazepam** je na snazi,
ali pod zaštićenim Normabelom me svatko opazi.
Prijatelj moj vjerni, **lorazepam** se zove,
zajedno donosimo snove mirne i opuštene dane nove.

Put nam je dug, pun prepreka svuda,
od usta, kroz želudac – prava je zbrka luda!
No kad stignemo do mozga, to je naša strana,
jer fosfolipidne membrane nisu nam brana.

Naše vrline i mane ključ su te priče,
a tko ih otkriti želi – SwissADME sve reći će!



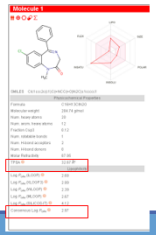
Kod lijekova je bitna topljivost u vodi (transport kroz krvotok i izlučivanje), ali i u mastima radi prolaska kroz stanične membrane.

Animacija- lijek u organizmu

Diazepam

-manja polarna površina, veći LogP zbog čega je topljiviji u mastima

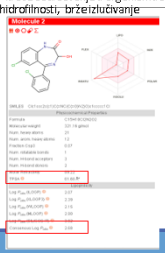
- dulje zadržavanje u organizmu zbog veće lipofilnosti, sporije izlučivanje



Lorazepam

-veća polarna površina, manji LogP zbog čega je topljiviji u vodi

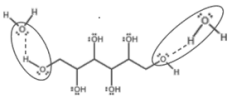
- kraće zadržavanje u organizmu zbog veće hidrofilnosti, brže izlučivanje



Struktura je sve!

Specifičnost manitola su brojne hidroksilne skupine, izrazito je polaran, može stvarati brojne vodikove veze kojima veže puno molekula vode

Osmotski diuretik i laksativ



Manitol

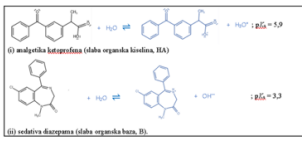
Apsorpcija lijeka

Kroz staničnu membranu može proći lijek koji je u neioniziranom obliku

Ključan je odnos pKa lijeka i pH okoline – kada je razlika dvije jedinice – 99% lijeka je neionizirano

Ketoprofen se zato najbolje apsorbira u želudcu (pH=2 < pKa 5,94)

Diazepam u tankom crijevu (pH = 5,4-6,6 > pKa = 3,3)

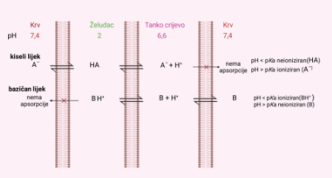


Lijek	Slina (bazično)	Želudac (pH = 2)	Tanko crijevo (bazično)
Kiselo bazna svojstva prema BL teoriji	BL baza	BL kiselina	BL baza
Zastupljeni oblik molekule **ketoprofena**	A^-	HA	A^-
Zastupljeni oblik molekule **diazepama**	B	BH^+	B

Apsorpcija lijeka

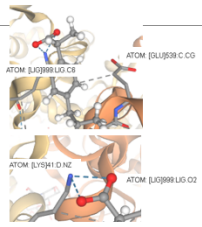
Ketoprofen se brže izlučuje (24h)

Diazepam se sporije izlučuje (20-80h)

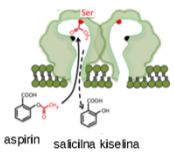


Međudjelovanje receptora i lijeka

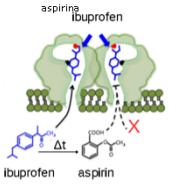
Ibuprofen veže se hidrofobnim interakcijama(na primjer C6 atom te atom ugljika iz glutamina) te vodikovim vezama (dušikov atom iz lizina i kisikovi atomi karboksilne skupine ibuprofena – vodikovi atomi nisu vidljivi)



Vezanje aspirina bez ibuprofena(COX enzim na trombocitima)



Vezanje ibuprofena prije aspirina



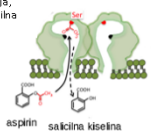
Aspirin – acetilacija serinskog ostatka u aktivnom mjestu COX enzima(ireverzibilno vezanje)

COX enzim nalazi se i u trombocitima(krvna pločica), zbog čega je ključna uloga **trajnog vezanja aspirina** kako bi spriječio ugrušavanje – učinak traje i **3 dana** sve dok se trombocit(krvna pločica) ne razgradi

Ibuprofen – vezanje nespecifičnim interakcijama(reverzibilno vezanje) – vezanje koje **nije trajno**

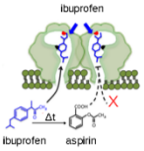
Vezanje aspirina bez ibuprofena (COX enzim na trombocitima)

Acetilacija, ireverzibilna reakcija



Aspirin uspješno prevenira trombozu (stvaranje ugrušaka)

Vezanje i ibuprofena prije aspirina



Aspirin se ne može vezati te dok je ibuprofen vezan, ne može djelovati trajno kao lijek

Mehanizam djelovanja

Analgetici/Antipiretici – lijekovi za bol i snižavanje tjelesne temperature

Neopioidni
- Nesteroidni(derivati propionske kiseline – ibuprofen, ketoprofen, naproksen)
- Paracetamol

Opioidni
- Morfij, metadon

Enzim cikloksigenaza

Arahnidonska kiselina ✗ Prostaglandin

Snižavanje tjelesne temperature

6.1. Popis pomoćnih tvari

Jezgra tablete
Celuloza, mikrokristalična
Karmelozanatrij, umrežena
Laktoza bezvodna
Silicijev dioksid, koloidni, bezvodni
Natrijev laurilsulfat
Magnezijev stearat

Ovojnica
Hipromeloza
Talk
Titanijev dioksid (E171)

2. KVALITATIVNI I KVANTITATIVNI SASTAV

Brufen 400 mg filmom obložene tablete: Jedna filmom obložena tableta sadrži 400 mg ibuprofena.

15

Dizajn lijeka - antibiotici

Antibiotici su prirodan produkt mikroorganizama koji ih koriste kao obranu i zaštitu

Npr. prvi antibiotik otkriven(A. Fleming) iz roda *Penicillium*, penicilin - onemogućuje sintezu bakterijske stanične stijenke

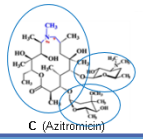
Makrolidni antibiotici – inhibiraju sintezu proteina makrocikliči laktonski prsteni molekule šećera vezane glikozidnim vezama

Eritromicin A – aktivni oblik, antibakterijsko djelovanje

Anhidropoluketal – neaktivni oblik, izaziva mučninu

Prvi je bio eritromicin, koji je zbog razgradnje u želudcu zahtijevao boljuvertiju – tako je nakon brojnih sirćeza nađeo azitromicin(generičko ime), poznatiji kao *Sumamed*(zaštićeno ime – *Pliva 1988.*)

I mnogi drugi antibiotici – cefalosporini, aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni...



C (Azitromicin) A Fluoritromicin B Klaritromicin

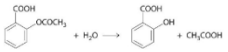
16

Postojanost/Stabilnost lijeka

1979. - na pakiranjima mora biti otisnut rok trajanja

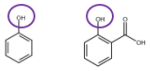
Do tog datuma tvrtka garantira sigurnost i učinkovitost lijeka, ali lijek i dalje može biti upotrebljiv

Ova reakcija se odvija kod aspirina kada je pod vlagom i višim temperaturama



Salicilna kiselina koja tada nastaje iritira sluznicu želudca – više štete nego koristi!

Dokazana testom na fenol u starom aspirinu!



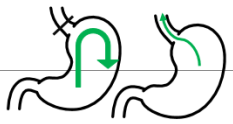
Lijekovima slijede klinička istraživanja dok ne budu spremni pomoći pacijentima. Dug je to put....

17

Dodatno o drugim lijekovima

18

Antacidi



Umanjuju ili neutraliziraju višak želučane kiseline

Sastav želučane kiseline: klorovodična kiselina, pepsin

pH želučane kiseline: 1-2

Koncentracija želučane kiseline: 160 mM

$Al(OH)_3(s) + 3\,HCl(aq) \rightarrow AlCl_3(aq) + 3\,H_2O(l)$

$Mg(OH)_2\,(s) + 2\,HCl(aq) \rightarrow MgCl_2(aq) + 2\,H_2O(l)$

$MgCO_3(s) + 2\,HCl(aq) \rightarrow MgCl_2(aq) + H_2O(l) + CO_2(g)$

$NaHCO_3(aq) + HCl(aq) \rightarrow NaCl(aq) + H_2O(l) + CO_2(g)$

19

Citostatici

jedan je od najsnažnijih i najšire korištenih lijekova za liječenje raznih tumora

1845. godine otkriven, ali njegova biološka svojstva ostala su skrivena do 1965. kada je otkriveno da inhibira diobu stanica

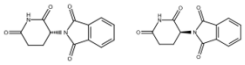
stvaranje oštećenja na DNA interakcijom s purinskim bazama na DNA - apoptoza

20

Imunomodulatori

- lijek koji je izvorno razvijen kao sedativ i sredstvo za suzbijanje mučnine kod trudnica
- Grünenthal, njemačka farmaceutska tvrtka – proglasila sigurnim i pust u prodaju pod imenom Contegan 1957 godine. Lijek je u početku bio dostupan bez recepta i reklamiran je kao siguran za trudnice.
- Ozbiljni teratogeni učinci - uzrokujući deformacije udova kod djece čije su majke uzimale lijek tijekom trudnoće
- Lijek je povučen s tržišta 1961. godine

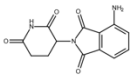
enantiomeri



(*R*) - talidomid (*S*)- talidomid

Sedativ Teratogen

- Unatoč svojoj mračnoj prošlosti, talidomid i njegovi derivati (lenalidomid i pomalidomid) kasnije pronađeni primjenu u liječenju određenih bolesti, kao imunomodulatori
- Inhibicija proizvodnje proteina ključnih za proliferaciju zloćudnih stanica



21

Kategorija lijeka	Primjeri lijekova	Namjena (indikacija)
Analgetici (protiv bolova)	Paracetamol, Ibuprofen, Aspirin	Ublažavanje boli (glavobolje, zubobolje, menstrualna bol), snižavanje povišene temperature.
Antipiretici (protiv groznice)	Paracetamol, Ibuprofen	Snižavanje povišene tjelesne temperature.
Antibiotici	Eritromicin, Azitromicin, Penicilin	Liječenje bakterijskih infekcija (upala grla, infekcije mokraćnog sustava, upala pluća).
Antacidi (protiv žgaraveice)	Gastal	Neutralizacija želučane kiseline kod žgaravice.
Antikoagulansi (protiv zgrušavanja krvi)	Aspirin, Varfarin	Prevencija i liječenje krvnih ugrušaka (tromboza, embolija).
Citostatici	Cisplatin	Najšire korišteni lijekovi za liječenje raznih tumora.
Imunomodulatori	Pomalidomid	Jačanje imunološkog odgovora organizma.
Lijekovi za dijabetes	Inzulin	Regulacija razine šećera u krvi kod dijabetesa.
Sedativi	Lorazepam, diazepam	Liječenje depresije, anksioznosti i povezanih poremećaja.

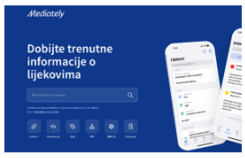
22

Gdje pronaći informacije o lijekovima?

https://www.halmed.hr/ - Agencija za lijekove i medicinske proizvode

Aplikacija Mediately – baza lijekova

Zadatak: Potražite koje sve bakterije su rezistentne na azitromicin!



23

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marija Zora Mišković

Datum rođenja: 24.svibnja 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004–2012	Osnovna škola Bartola Kašića, Zagreb
2012–2016	Srednja škola XVI.gimnazija, Zagreb
2024	Međunarodna studentska razmjena - Erasmus+ program stručne prakse (SMP) – Karakterizacija kondenzata izdahnutog daha (EBC), Institut kemijskih tehnologija i analitika, Tehničko sveučilište u Beču, Beč

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2023	Dan i noć PMF–a
2022	Institut za popularizaciju znanosti

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M.Z. Mišković, Z. Lemaić, D. Vušak, B. Prugovečki, *Chiral Metal – Organic Frameworks of Copper(II): Synthesis and Stability in Solid State* , Međunarodni skup XV. susret mladih kemijskih inženjera , Zagreb, Hrvatska, 2024, Knjiga sažetaka str. 160

Publikacije

1. M.Z. Mišković, M. Wojtyś, M. Winiewska – Szajewska, B. Wielgus – Kutrowska, M. Matković, D. Domazet Jurašin, Z. Štefanić, A. Bzowska, I. Leščić Ašler, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2024) 7613.