



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS**

Farmacija

Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras

Mindaugas Dzvinka, 5 kursas, 1 grupė

VIENTISŪJŲ STUDIJŲ MAGISTRO

BAIGIAMASIS DARBAS

**Antidepresantų jungimosi su biomembranomis tyrimas naudojant kvarco
kristalo mikrobilansę su dissipacijos stebėjimu (QCM-D)**

**Study of Antidepressant Binding to Biomembranes Using a Quartz Crystal
Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D)**

Darbo vadovė

doc. dr. Nora Šlekienė

Centro vadovė

doc. dr. Kristina Garuolienė

Vilnius, 2026

Studento elektroninio pašto adresas: mindaugas.dzvinka@mf.stud.vu.lt

TURINYS

SANTRAUKA.....	3
SUMMARY.....	5
SANTRUMPOS IR SĄVOKOS	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Kvarco kristalo mikrogravimetrija su energijos disipacijos stebėjimu.....	9
1.2. QCM-D metodo tyrimo eiga	10
1.3. Sąveikos kinetiniai modeliai.....	11
1.4. Antidepresantų vartojimo tendencijos pasaulyje	11
1.5. Serumo albumino funkcija ir struktūra	12
1.6. Antidepresantų veikimo mechanizmai ir klasifikacija	13
1.7. Fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino struktūros ir veikimo ypatumai.....	14
1.8. Terapinis vaistų monitoravimas ir jų koncentracija plazmoje	15
1.9. QCM-D metodo palyginimas su kitais metodais biomolekulių sąveikų tyrimuose.....	16
1.10 Vaistų sąveika per albumino jungimosi vietas ir jos klinikinė reikšmė	16
2. TYRIME NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR METODIKA	18
2.1. Tyrimo dizainas	18
2.2. Tyrimo objektas.....	18
2.3. Tyrime naudoti reagentai, priemonės ir įranga.....	19
2.4. Metodika	19
2.5. Rezultatų analizė	22
3. REZULTATAI	24
3.1. Mirtazapino, fluoksetino ir venlafaksino imobilizacija.....	24
3.2. Mirtazapino, fluoksetino ir venlafaksino kinetina ir termodinamika	26
3.3. Rezultatų aptarimas	29
5. IŠVADOS.....	33
LITERATŪROS SĄRAŠAS	34

SANTRAUKA

Mindaugo Dzvinkos vientisųjų studijų magistro baigiamasis darbas. Darbo vadovė: doc. dr. Nora Šlekienė. Vilniaus universiteto medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras.

Magistrinio darbo tema: Antidepresantų jungimosi su biomembranomis tyrimas naudojant kvarco kristalo mikrobalsę su dissipacijos stebėjimu (QCM-D).

Temos aktualumas: Vaistų sąveika su serumo albuminu tiesiogiai lemia jų farmakokinetines savybes ir terapinį efektyvumą, tačiau šios sąveikos antidepresantams išlieka mažai ištirtos. Realio laiku veikiantis QCM-D metodas leidžia tiksliai įvertinti molekulinę sąveiką kinetiką, tuo jis yra naudingas įrankis žinių trūkumui užpildyti.

Tyrimo tikslas: Ištirti fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveiką su jaučio serumo albuminu taikant kvarco kristalo mikrobalsės su dissipacijos stebėjimu (QCM-D) metodą.

Tyrimo uždaviniai:

1. Ištirti fluoksetino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
2. Ištirti venlafaksino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
3. Ištirti mirtazapino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
4. Palyginti fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveikos ypatumus, remiantis QCM-D analizės rezultatais.

Tyrimo metodai:

Buvo atliktas eksperimentinis tyrimas, kuriame taikant kvarco kristalo mikrogravimetrijos su dissipacijos stebėjimu (QCM-D) metodą buvo tiriama trijų antidepresantų (fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino) jungimosi kinetika su jaučio serumo albuminu (JSA). JSA buvo imobilizuotas ant aukso sensoriaus paviršiaus per 11-merkaptoundekanoinę rūgšties aktyvias grupes. Antidepresantų sąveika su JSA buvo vertinama naudojant 0,1, 1, 10 ir 100 μM koncentracijos tirpalus, realio laiku registruojant dažnio ir dissipacijos pokyčius.

Tyrimo rezultatai:

QCM-D analizė parodė, kad visi tirti antidepresantai (fluoksetinas, venlafaksinas ir mirtazapinas) sąveikauja su imobilizuotu JSA. Ryškiausi buvo dissipacijos (ΔD) pokyčiai (dažnio pokyčiai buvo per maži analizei), todėl kinetinių parametrų analizė atlikta remiantis ΔD duomenimis. Dėl silpnų signalų mažesnėse koncentracijose tolimesni tyrimai vykdyti naudojant 100 μM antidepresantų tirpalus. Fluoksetinas asocijavosi greitai ($k_a = 8,52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir lėtai disocijavo ($k_d = 9,97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $KD = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$). Venlafaksinas asocijavosi lėčiausiai ($k_a = 7,33 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tačiau sudarė itin stabilų

kompleksą ($k_d = 7,40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$). Mirtazapinas asocijavosi greitai ($k_a = 7,53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), bet disocijavo greičiausiai ($k_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1,14 \times 10^{-6} \text{ M}$). Visų vaistų sąveika su JSA buvo spontaniška (ΔG : fluoksetino $-38,9$, venlafaksino $-39,3$, mirtazapino $-33,4 \text{ kJ/mol}$).

Išvados: 1. Fluoksetinas pasižymi dideliu asociacijos greičiu ir maža disociacijos greičio konstanta, sudarydamas stabilų kompleksą su JSA ($K_D = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$). 2. Venlafaksinas asocijuojasi lėčiausiai, tačiau turi mažiausią disociacijos greičio konstantą, sudarydamas itin stabilų kompleksą ($K_D = 1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$). 3. Mirtazapinas asocijuojasi greitai, tačiau disocijuoja greičiausiai, formuodamas mažiausiai stabilų kompleksą ($K_D = 1,14 \times 10^{-6} \text{ M}$). 4. Fluoksetinas ir venlafaksinas pasižymi panašiu afinitetu albuminui ($K_D \sim 10^{-7} \text{ M}$), tačiau skiriasi kinetika. Mirtazapinas išsiskiria greita disociacija ir mažiausiu afinitetu ($K_D \sim 10^{-6} \text{ M}$). Visų trijų vaistų sąveika su JSA yra spontaniška ($\Delta G < 0$), o fluoksetino ir venlafaksino Gibso energijos reikšmės ($-38,9$ ir $-39,3 \text{ kJ/mol}$) yra didesnės nei mirtazapino ($-33,4 \text{ kJ/mol}$).

Raktiniai žodžiai: antidepresantai, QCM-D, jaučio serumo albuminas, fluoksetinas, venlafaksinas, mirtazapinas.

SUMMARY

Mindaugas Dzvinke's Integrated Master's Thesis. Thesis supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nora Šlekienė. Centre of Pharmacy and Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University.

Thesis topic: Study of Antidepressant Binding to Biomembranes Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D)

Relevance of the topic: Drug interactions with serum albumin directly determine their pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy; however, these interactions remain poorly studied for antidepressants. The real-time QCM-D method enables precise evaluation of molecular interaction kinetics, making it a valuable tool for addressing this gap in knowledge.

Research aim: To investigate the interactions of fluoxetine, venlafaxine, and mirtazapine with bovine serum albumin using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) method.

Research objectives:

1. To investigate the interaction of fluoxetine with bovine serum albumin by determining binding kinetics.
2. To investigate the interaction of venlafaxine with bovine serum albumin by determining binding kinetics.
3. To investigate the interaction of mirtazapine with bovine serum albumin by determining binding kinetics.
4. To compare the interaction characteristics of fluoxetine, venlafaxine, and mirtazapine based on the results of QCM-D analysis.

Research methods: An experimental study was conducted in which the binding kinetics of three antidepressants (fluoxetine, venlafaxine, and mirtazapine) with bovine serum albumin (BSA) were investigated using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) method. BSA was immobilized on a gold sensor surface via the active groups of 11-mercaptopundecanoic acid. The interaction of the antidepressants with BSA was evaluated using solutions at concentrations of 0.1, 1, 10, and 100 μM , with frequency and dissipation changes recorded in real time.

Research results: QCM-D analysis demonstrated that all three antidepressants studied (fluoxetine, venlafaxine, and mirtazapine) interact with immobilized BSA. The most prominent were dissipation (ΔD) changes (frequency changes were too small for analysis), and therefore kinetic parameter analysis was performed based on ΔD data. Due to weak signals at lower concentrations, further studies were conducted using 100 μM antidepressant solutions. Fluoxetine associated rapidly ($k_a = 8.52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

and dissociated slowly ($k_d = 9.97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1.17 \times 10^{-7} \text{ M}$). Venlafaxine associated most slowly ($k_a = 7.33 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) but formed an exceptionally stable complex ($k_d = 7.40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1.01 \times 10^{-7} \text{ M}$). Mirtazapine associated rapidly ($k_a = 7.53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) but dissociated most quickly ($k_d = 8.58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1.14 \times 10^{-6} \text{ M}$). The interaction of all drugs with BSA was spontaneous (ΔG : fluoxetine -38.9 , venlafaxine -39.3 , mirtazapine -33.4 kJ/mol).

Conclusions:

1. Fluoxetine exhibits a high association rate and a low dissociation rate constant, forming a stable complex with BSA ($K_D = 1.17 \times 10^{-7} \text{ M}$). 2. Venlafaxine associates most slowly but has the lowest dissociation rate constant, forming an exceptionally stable complex ($K_D = 1.01 \times 10^{-7} \text{ M}$). 3. Mirtazapine associates rapidly but dissociates most quickly, forming the least stable complex ($K_D = 1.14 \times 10^{-6} \text{ M}$). 4. Fluoxetine and venlafaxine display similar affinity for albumin ($K_D \sim 10^{-7} \text{ M}$) but differ in their kinetics. Mirtazapine stands out for its rapid dissociation and lowest affinity ($K_D \sim 10^{-6} \text{ M}$). The interaction of all three drugs with BSA is spontaneous ($\Delta G < 0$), and the Gibbs energy values of fluoxetine and venlafaxine (-38.9 and -39.3 kJ/mol) are greater in magnitude than that of mirtazapine (-33.4 kJ/mol).

Keywords: antidepressants, QCM-D, bovine serum albumin, fluoxetine, venlafaxine, mirtazapine.

SANTRUMPOS IR SĄVOKOS

11-MUR – 11-merkaptoundekano rūgštis.

DALY – negalios pakoreguoti gyvenimo metai.

DDD – nustatyta paros dozė.

DMSO – dimetilsulfoksidas

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid.

JSA – jaučio serumo albuminas.

LogP – pasiskirstymo koeficiento logaritmas.

NaSSA – noradrenerginiai ir specifiniai serotonerginiai antidepresantai.

NET – noradrenalino transporteris.

NHS – N-hidroksisukcinimidas.

OECD – Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija.

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas.

PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas.

SAM – savitvarkis monosluoksnis.

SERT – selektyvus serotonino transporteris.

SNRI – serotonino ir noradrenalino reabsorbcijos inhibitoriai.

SSRI – selektyvūs serotonino reabsorbcijos inhibitoriai.

TDM – terapinis vaistų monitoravimas.

Terapinis langas – vaisto dozės intervalas, kuriame vaistas veikia saugiai ir efektyviai.

VVKT – Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba.

QCM-D – kvarco kristalo mikrogravimetrija su disipacijos stebėjimu.

ŽSA – žmogaus serumo albuminas.

ΔD – disipacijos pokytis.

Δf – dažnio pokytis.

IVADAS

Gera psichinė sveikata yra būtina norint palaikyti bendrą žmogaus emocinę savijautą, darbingumą ir socialinį funkcionavimą. Psichikos sutrikimai daro reikšmingą neigiamą poveikį ne tik individualiam paciento gyvenimui, bet ir aplinkinei visuomenei bei sveikatos priežiūros įstaigoms. Pacientai, turintys psichikos sveikatos problemų, dažnai turi prastesnius mokymosi ir profesinės veiklos rezultatus, padidėjusį nedarbo lygį, patiria socialinę atskirtį bei blogesnę bendrą fizinę sveikatą. Negydomi arba nepakankamai kontroliuojami psichikos sutrikimai gali lemti ilgalaikę negalią ir padidėjusią savižudybės riziką (1,2).

Pastarųjų dešimtmečių epidemiologiniai tyrimai rodo, kad psichikos sutrikimų našta pasauliniu mastu išlieka didelė ir pastoviai auga. Remiantis „Global Burden of Disease“ tyrimų duomenimis, psichikos ir elgesio sutrikimai sudaro reikšmingą dalį visų negalios pakoreguotų gyvenimo metų (DALY). Ypač didelę dalį šių psichikos ir elgesio sutrikimų sudaro depresiniai ir nerimo sutrikimai, kurie dažniausiai pasireiškia darbingo amžiaus asmenims. Nors kai kurios šalys turi geresnę šių sutrikimų atpažinimą ir diagnostiką, absoliutus sergančiųjų skaičius toliau didėja, o pagrindinė to priežastis yra populiacijos augimas ir senėjimas (3,4).

Šiame darbe bus tiriamos trijų skirtingų dažnai vartojamų antidepresantų (fluoksetino, mirtazapino, venlafaksino) sąveikos ir jungimosi kinetikos su jaučio serumo albuminu (JSA). Nors literatūros šaltiniuose aprašyta nemažai tyrimų, nagrinėjančių antidepresantų farmakokinetiką ir jų sąveiką su plazmos baltymais, dauguma jų remiasi netiesioginiais metodais arba pateikia tik pusiausvyros afiniteto duomenis (5–9). Informacijos apie šių sąveikų kinetiką realiuoju laiku vis dar trūksta, ypač kai skirtingi antidepresantai analizuojami tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis. QCM-D metodo naudojimas išsprendžia šiuos trūkumus, nes su juo galima sistemingai palyginti fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveiką su serumo albuminu.(10)

Tyrimo tikslas: Ištirti fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveiką su biomolekulėmis taikant kvarco kristalo mikrogravimetriją su disipacijos stebėjimu (QCM-D) metodą.

Tyrimo uždaviniai:

1. Ištirti fluoksetino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
2. Ištirti venlafaksino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
3. Ištirti mirtazapino sąveiką su jaučio serumo albuminu, nustatant jungimosi kinetiką.
4. Palyginti fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveikos ypatumus, remiantis QCM-D analizės rezultatais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kvarco kristalo mikrogravimetrija su energijos disipacijos stebėjimu

Kvarco kristalo mikrogravimetrija su energijos disipacijos stebėjimu (QCM-D) yra pjezoelektrinis matavimo metodas, skirtas realiu laiku stebėti masės pokyčius ir vizkoelastines savybes ant kietojo paviršiaus. Matavimo metu ant pjezoelektrinio kvarco kristalo, kuris svyruoja tam tikru rezonansiniu dažniu, adsorbuojasi tiriamos medžiagos molekulės (11). Kai ant kristalo paviršiaus nusėda masė, jo svyravimo dažnis sumažėja, šį reiškinį yra aprašęs Sauerbrėjaus savo lygtimi. Sauerbrėjaus lygtis nusako tiesinį ryšį tarp rezonansinio dažnio pokyčio (Δf) ir ant kristalo paviršiaus nusėdusios masės pokyčio (Δm) (1 lygtis), kur C yra kristalui būdinga jautrumo konstanta (paprastai $17,7 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ standartiniam 5 MHz kristalui), o n yra harmonikos numeris (12).

$$\Delta m = -C \cdot \Delta f / n \quad (1)$$

Ši lygtis remiasi tuo, kad nusėdusi masė yra kieta, plona, tolygiai pasiskirsčiusi ir visiškai susijungusi su kristalo paviršiumi, t. y. ji svyruoja kaip vientisas vienetas kartu su kristalu, aišku realybėje taip būna retai, todėl buvo pradėta matuoti disipacija. Disipacija šiame metode reiškia energijos sklaidą (angl. *dissipation*), svyravimų slopinimą, kuris leidžia įvertinti adsorbuoto sluoksnio struktūrines savybes, jo kietumą ar lankstumą. Jei sluoksnis yra kietas ir plonai prisisotinęs, energijos sklaida yra maža, o masė gali būti apskaičiuojama tiesioginiu Sauerbrėjaus modeliu. Tačiau jei sluoksnis yra minkštas, vizkoelastinis, svyravimai slopsta stipriau, ir tuomet Sauerbrėjaus lygtis nebėra tinkama, taikomi sudėtingesni modeliai, pavyzdžiui, Voigt modelis, kuris įvertina tiek sluoksnio elastingumą, tiek klampumą (13).

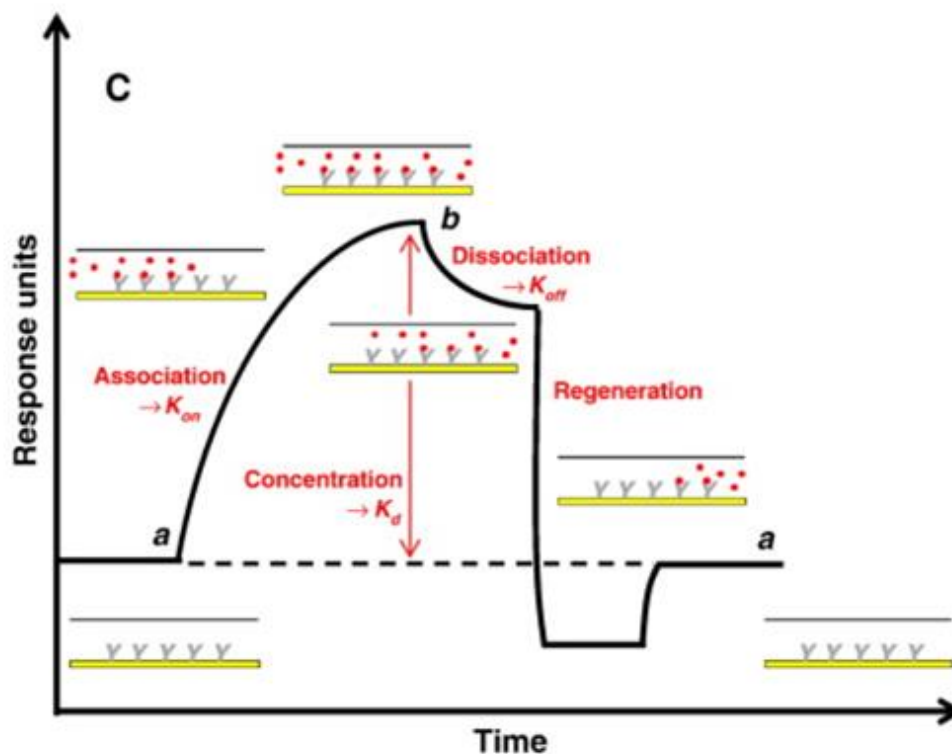
Šiuolaikiniai QCM-D prietaisai (pvz., Q-Sense E4, Biolin Scientific) leidžia tuo pačiu metu matuoti kelis harmonikų numerius (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13), kas suteikia papildomos informacijos apie sluoksnio homogeniškumą ir struktūrą. Jei skirtingų harmonikų $\Delta F/n$ reikšmės sutampa, tai reiškia, kad adsorbuotas sluoksnis yra standus ir galima pritaikyti Sauerbrėjaus lygtį. Jei jos skiriasi, sluoksnis yra viskoelastiškas ir reikalinga kitokio modelio analizė (14).

Matavimai atliekami naudojant QCM-D prietaisus, kurių pagrindinė sudedamoji dalis yra plona kvarco plokštelė su aukso ar kito metalo elektrodais. Prietaisas išmatuoja kelias harmonikas vienu metu, o tai suteikia papildomos informacijos apie sluoksnio homogeniškumą ir storį (15). QCM-D yra ypač vertingas biologinių sistemų tyrimuose, nes tai yra metodas, turintis didelį jautrumą, nereikalaujantis žymėjimo ir jis neardo tiriamų medžiagų (16). QCM-D metodas plačiai taikomas lipidų dvigubų

sluoksnių formavimosi, baltymų adsorpcijos, polimerų plėvelių augimo ir DNR hibridizacijos tyrimuose. Svarbu paminėti, kad QCM-D metodu negalima matuoti sausų medžiagų, tai reiškia, kad kartu su tiriamomis molekulėmis yra matuojamas ir vanduo, kurį jos sulaiko, todėl gauta masė gali skirtis nuo sausosios masės, nustatytos kitais metodais (14). Dėl šios priežasties QCM-D dažnai derinamas su optiniais metodais, tokiais kaip spektrinė elipsometrija ar PPR, siekiant išsamiau ištirti tiriamą paviršių (17).

1.2. QCM-D metodo tyrimo eiga

QCM-D eksperimentui naudojamas plonos kvarco plokštelės sensorius su aukso arba kito metalo elektrodais, kuris yra patalpinamas į mažo tūrio tėkmės celę. Eksperimento pradžioje sensoriaus paviršius yra paruošiamas – valomas ir, jei reikia, modifikuojamas imobilizuojant receptoriaus molekules, kurios sulaikys tiriamą analizę. Tada per tėkmės celę pastoviu greičiu yra praleidžiamas buferinis tirpalas, kol užsitvirtina stabili bazinė dažnio ir disipacijos linija, rodanti, kad sistema yra pusiausvyroje (18). Pasiekus stabilią bazinę liniją, į tėkmės celę yra įleidžiamas tiriamasis tirpalas, ir jeigu analizės molekulės prisijungia prie sensoriaus paviršiaus, fiksuojamas rezonansinio dažnio sumažėjimas (Δf) – tai yra asociacijos fazė, kurios metu paviršiuje kaupiasi masė (pav. 1). Kartu stebimas disipacijos pokytis (ΔD)

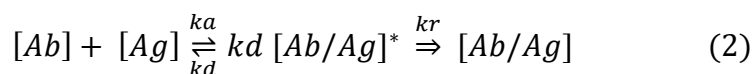


pav. 1. Įprasto QCM-D eksperimento sąveikai įvertinti tarp analizės molekulės ir receptoriaus molekulės schematinė iliustracija (67).

suteikia informacijos apie besiformuojančio sluoksnio vizkoelastines savybes (14). Pasiekus prisotinimo fazę, kai Δf ir ΔD stabilizuojasi, signalai nebesikeičia ir tai rodo, kad laisvos prisijungimo vietos yra užpildytos. Tuomet vėl praleidžiamas grynas buferinis tirpalas ir stebima disociacijos fazė – jei dalis molekulių atsipalaiduoja nuo paviršiaus, dažnis grįžta aukštyn. Nepakitęs dažnis po plovimo rodo, kad molekulių prisijungimas yra negrįžtamas (18). Jei prisijungimas yra negrįžtamas, bet reikia nuplauti prisijungusias analites, tada yra vykdoma regeneracija, kurios metu yra denatūruojamas receptorių, prie kurio prisijungė analitė ir po to viskas nuplaunama ir eksperimentą galima kartoti (19).

1.3. Sąveikos kinetiniai modeliai

Tiriant sąveikas tarp baltymų, kinetikos skaičiavimai gali neatitikti tradicinių modelių, dėl susidariusių stiprių negrįžtamų sąveikų tarp receptoriaus ir analitės molekulių arba analitei sąveikaujant su keliomis receptoriaus molekulėmis (20). Tokiu atveju gali būti pritaikyti kiti skaičiavimai kaip dviejų žingsnių modelis, kuris yra dažnai naudojamas įvertinti antikūnų ir antigenų imuninių kompleksų formavimąsi.



Pirmasis žingsnis aprašo antikūno (Ab) ir antigeno (Ag) komplekso $[Ab/Ag]$ formavimąsi. Šio komplekso formavimosi greitį ir afiniškumą tarp $[Ab]$ ir $[Ag]$ apibūdina asociacijos greičio konstanta (k_a). Susiformavus kompleksui, sąveika tarp $[Ab]$ ir $[Ag]$ gali būti negrįžtama ir apibūdinama stabilių imuninių kompleksų formavimosi greičio konstanta (k_r) arba molekulės gali nutolti viena nuo kitos, ką parodo disociacijos greičio konstanta (k_d). Antikūno ir antigeno sąveikos procesas yra dalinai negrįžtamas ir dėl to yra naudojamas dviejų žingsnių modelis. Laiko tarpas, per kurį antikūno ir antigeno kompleksas spontaniškai disocijuoja, yra daug ilgesnis negu asociacijos greitis, kas yra būdinga tarp didelio afiniškumo antikūnų ir antigenų (20,21).

1.4. Antidepresantų vartojimo tendencijos pasaulyje

Antidepresantų vartojimas tiek Europos, tiek kitų kontinentų šalyse nuosekliai auga jau kelis dešimtmečius. Pagal Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (OECD) duomenis, daugelyje Vakarų Europos šalių antidepresantų suvartojimas nuo 2000 iki 2021 metų išaugo daugiau nei du kartus, matuojant nustatyta paros doze (DDD) 1000 gyventojų per dieną. Ypač spartus augimas stebimas Islandijoje, Portugalijoje, Kanadoje ir Australijoje, kur antidepresantų vartojimas viršija 80–100 DDD/1000 gyventojų/dieną (1). Šią tendenciją lemia ne tik didėjantis paplitimas, bet ir geresnė

diagnozavimo praktika, mažėjanti psichiatrinio gydymo stigma bei besikeičiančios gydymo gairės, skatinančios ilgesnį gydymo kursą (22).

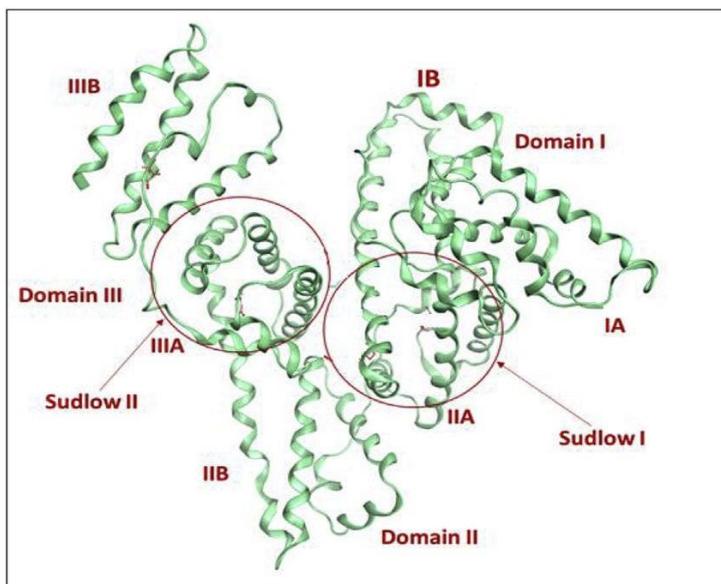
Ši problema taip pat liečia ir Lietuvą. Iš VVKT ataskaitos apie Lietuvoje suvartojamus vaistus matosi akivaizdus antidepresantų vartojimo augimas. Bendras antidepresantų suvartojimas nuo 2019 iki 2024 metų pakilo nuo 35,390 iki 45,123 DDD/1000 Lietuvos gyventojų per dieną. Šiame darbe tiriamų antidepresantų vartojimas tais pačiais metais taip pat pakilo: fluoksetino – nuo 0,796 iki 1,5432; mirtazapino – nuo 5,171 iki 6,310; Venlafaksino – nuo 1,479 iki 2,338 DDD/1000 Lietuvos gyventojų per dieną (1 Lentelė).

lentelė 1. Fluoksetino, mirtazapino ir venlafaksino suvartojimas Lietuvoje 2019-2024 metais(23).

ATC kodas	Pavadinimas	DDD/1000 Lietuvos gyventojų/per dieną					
		2019 metai	2020 metai	2021 metai	2022 metai	2023 metai	2024 metai
N06A	Antidepresantai	35,390	36,805	37,396	40,113	42,424	45,136
N06AB03	Fluoksetinas (DDD 20 mg)	0,796	0,870	1,066	1,265	1,387	1,5432
N06AX11	Mirtazapinas (DDD 30 mg)	5,171	5,766	5,642	5,932	6,035	6,310
N06AX16	Venlafaksinas (DDD 0,1 g)	1,479	1,700	1,690	1,924	2,205	2,338

1.5. Serumo albumino funkcija ir struktūra

Vienas svarbiausių veiksnių, lemiančių vaistų pasiskirstymą kraujyje, yra jų gebėjimas jungtis su plazmos baltymais, iš kurių reikšmingiausias yra serumo albuminas. Albuminas sudaro didžiąją dalį kraujo plazmos baltymų ir atlieka esminį vaidmenį palaikant onkotinį slėgį bei pernešant endogenines ir egzogenines medžiagas (24,25). Vaistų jungimasis prie albumino yra grįžtamas procesas, nuo kurio priklauso laisvos, farmakologiškai aktyvios vaisto frakcijos koncentracija (26). Stipriai



pav. 2 Žmogaus serumo albumino struktūra su pažymėtomis sudlow I ir II vietomis

prie albumino prisijungę vaistai pasižymi mažesne laisva koncentracija plazmoje, tačiau ilgesniu cirkuliacijos laiku (27,28).

Žmogaus serumo albuminas (ŽSA) yra 66,5 kDa monomerinė struktūra, sudaryta iš 585 aminorūgščių ir pasižyminti trimis homologiniais domenais (I, II, III), kiekvienas iš kurių susideda iš dviejų subdomeno (A ir B) porų (pav. 2.) (29). Dėl unikalios struktūros albuminas turi kelias hidrofobines kišenes, kurios yra pagrindinės vaistų jungimosi vietos. Sudlow I ir Sudlow II yra pagrindinės ir geriausiai apibūdintos jungimosi vietos, prie kurių jungiasi didžioji dauguma vaistų molekulių. Sudlow I vieta (IIA subdomenas) pirmenybę teikia dideliems, neigiamai įkrautiems arba neutraliems junginiams, o Sudlow II vieta (IIIA subdomenas) yra labiau linkusi prie mažesnių, aromatinių ir lipofiliškų molekulių (30,31)

Jaučio serumo albuminas (JSA), kuris naudojamas šiame darbe, su ŽSA dalijasi 76 % aminorūgščių sekos tapatumo ir 80 % struktūrinio panašumo (32). Nors pagrindinis hidrofobinių jungimosi vietų išdėstymas yra analogiškas, pastebėti tam tikri skirtumai Sudlow II vietoje – skirtingas triptofano likučio pozicija lemia šiek tiek skirtingą kai kurių ligandų afinitetą. Nepaisant to, JSA laikomas tinkamu ir plačiai naudojamu ŽSA modeliu in vitro farmakologiniuose tyrimuose, kadangi pagrindinio vaistų jungimosi pobūdis išlieka panašus (33,34).

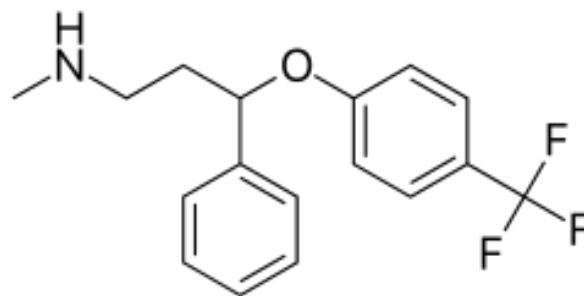
1.6. Antidepresantų veikimo mechanizmai ir klasifikacija

Šiuolaikiniai antidepresantai veikia per kelis skirtingus mechanizmus, kurių pagrindinis tikslas – valdyti monoaminų (serotonino, noradrenalino ir dopamino) kiekį centrinėje nervų sistemoje. Šių vaistų veikimas paremtas monoaminų signalo perdavimo valdymu centrinėje nervų sistemoje. Nors antidepresantų klinikinis poveikis dažniausiai pasireiškia tik po kelių savaičių gydymo, jų ilgalaikis vartojimas gali reikšmingai pagerinti pacientų gyvenimo kokybę (35).

Pagal veikimo mechanizmą antidepresantai skirstomi į kelias pagrindines klases. Plačiausiai vartojami selektyvūs serotonino reabsorbcijos inhibitoriai (SSRI), kurie laikomi pirmo pasirinkimo vaistais dėl didesnio saugumo ir geresnio toleravimo, palyginus su senesnėmis antidepresantų klasėmis (36). Serotonino ir noradrenalino reabsorbcijos inhibitoriai (SNRI) veikia platesnį neuromediatorių spektrą ir dažnai pasirenkami esant sunkesnėms depresijos formoms arba gretutiniam lėtiniam skausmui. Tuo tarpu noradrenerginiai ir specifiniai serotonerginiai antidepresantai (NaSSA), pasižymi unikaliu veikimo mechanizmu ir dažnai naudojami pacientams, kuriems būdingi miego sutrikimai ar stiprūs nerimo sutrikimai (35).

1.7. Fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino struktūros ir veikimo ypatumai

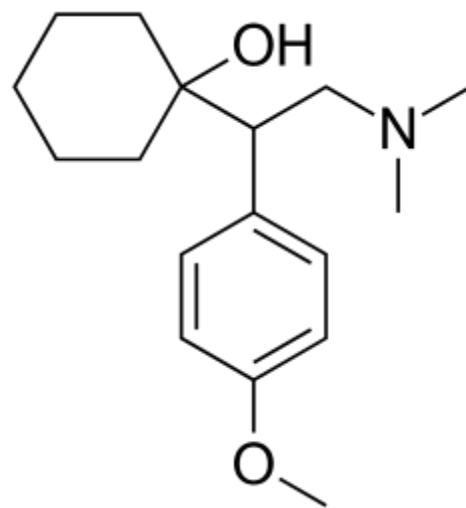
Fluoksetinas priklauso selektyvių serotonino reabsorbcijos inhibitorių (SSRI) klasei. Jo veikimo mechanizmas grindžiamas selektyviu serotonino transporterio (SERT) blokavimas presinaptinėje membranoje, dėl ko serotoninas ilgiau išlieka sinaptinėje plyšyje ir sustiprina serotonerginę neurotransmisiją (35). Molekulė pasižymi ryškiu lipofiliškumu ($\log P = 4,05$), kurį lemia trifluorometilo



pav. 3. Fluoksetino struktūra

grupė fenoksi žiede – vienas hidrofobiškiausių pakaitų farmakologijoje (37,38). Ši grupė kartu su pagrindiniu fenilo žiedu suteikia molekulei plokščią formą, tinkančią įsisprausti į siaurą ir gilią albumino IIA subdomena (Sudlow I vieta), kurioje vyrauja hidrofobinės sąveikos (39,40). Dėl šio kombinuoto hidrofobinio ir elektrostatinio mechanizmo fluoksetinas jungiasi prie serumo albumino su dideliu afinitetu, o tai tiesiogiai veikia vaisto pasiskirstymą ir biologinį prieinamumą (41).

Venlafaksinas priklauso serotonino ir noradrenalino reabsorbcijos inhibitorių (SNRI) klasei ir pasižymi dvigubu veikimo mechanizmu – slopina SERT ir noradrenalino transporterį (NET), nors mažesnėmis dozėmis vyrauja serotonerginis aktyvumas (42). Struktūriniu požiūriu venlafaksinas skiriasi nuo fluoksetino tuo, kad jis žymiai poliškesnis. Molekulė neturi halogeninių pakaitų, o laisvoji hidroksilo grupė cikloheksano žiede ir metoksi grupė fenilo žiede suteikia molekulei amfifilinių savybių. LogP reikšmė (0,43) ir lipofiliškumas yra žymiai mažesni nei fluoksetino (38).

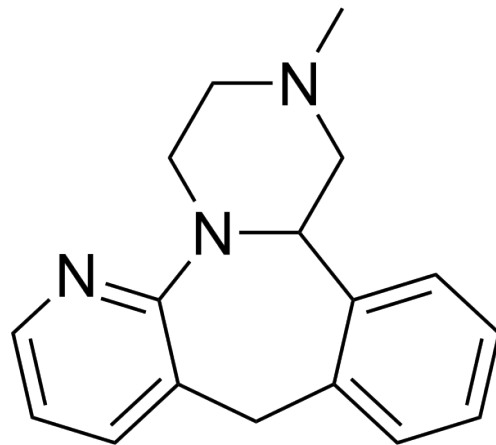


pav. 4 Venlafaksino struktūra

Dėl šios priežasties venlafaksino prisijungimas prie plazmos baltymų yra reikšmingai mažesnis nei fluoksetino (43).

Venlafaksino jungimosi analizės duomenimis, vaistas prie albumino jungiasi Sudlow I vietoje per silpnėsnes π - π sąveikas (palyginus su fluoksetinu) tarp fenilo žiedo ir albumino aromatinių liekanų, papildomai stabilizuojamas vandenilinių ryšių tarp metoksi ir hidroksilo grupių bei albumino polinio jungimosi vietos (44).

Mirtazapinas priklauso noradrenerginių ir specifinių serotonerginių antidepresantų (NaSSA) klasei ir pasižymi unikaliu, kitų antidepresantų neturimu veikimo mechanizmu – blokuoja presinaptinį α 2-adrenoreceptorių autoreceptorių, taip padidindamas noradrenalino ir serotonino išsiskyrimą, o ne slopindamas jų reabsorbciją (45). Mirtazapinas yra tetraciklinė molekulė, susidedanti iš benzodiazepinopiridazino sistemos, kuri suteikia jai plokščią, didelį aromatinį paviršiaus plotą, šis bruožas yra svarbus norint suprasti jo jungimosi prie albumino savybes. Mirtazapino logP (2,9) patenka į tarpą tarp venlafaksino ir fluoksetino (38). Tetraciklinė struktūra yra labai panaši į triciklinių antidepresantų (TCA) pagrindą, kurių jungimasis prie albumino yra gerai žinomas. Kaip ir TCA, mirtazapinas jungiasi prie albumino Sudlow I vietos, kur didelė aromatinė sistema gali maksimaliai išnaudoti hidrofobines π – π sąveikas (45,46).



pav. 5 Mirtazapino struktūra

1.8. Terapinis vaistų monitoravimas ir jų koncentracija plazmoje

Terapinis vaistų monitoravimas (TDM) yra esminė klinikinė priemonė optimizuojant antidepresantų gydymą. Atnaujintose TDM rekomendacijose psichiatriniais vaistams pateikiamos terapinės nuorodos, kurios nusako antidepresantų lygius paciento plazmoje. Fluoksetinui rekomenduojamas terapinis langas yra 120–500 ng/mL (0,36–1,5 μ M), venlafaksinui – 100–400 ng/mL (~0,3–1,2 μ M), o mirtazapinui – 30–80 ng/mL (0,1–0,27 μ M) (41,47). Šios koncentracijos atspindi vaisto lygius visoje plazmoje, tai reiškia ir laisvo, ir prie baltymų prisijungusio vaisto kiekiai yra neatskiriami standartiniais metodais (48,49).

Atsižvelgiant į šiuos duomenis, in vitro QCM-D tyrimuose pasirenkamos koncentracijos turi būti pakankamai žemos, kad išliktų farmakologiškai reikšmingos, bet kartu pakankamai didelės, kad būtų užtikrintas patikimas metodo signalas. Šiame tyrime kiekvieno antidepresanto sąveika su jaučio serumo albuminu bus tiriama naudojant tris koncentracijas – 0,1 μ M, 1 μ M ir 10 μ M. Tokia koncentracijų seka leidžia įvertinti sąveikos priklausomybę nuo koncentracijos: 0,1 μ M atspindi apatinę terapinio intervalo ribą, 1 μ M – vidutinę kliniškai reikšmingą koncentraciją, o 10 μ M – aukštesnę, tačiau tyrimuose naudojamą koncentraciją (41).

1.9. QCM-D metodo palyginimas su kitais metodais biomolekulių sąveikų tyrimuose

QCM-D metodas yra plačiai naudojamas baltymo–ligando sąveikų tyrimuose. Jis tapo svarbia priemone tiriant vaistų sąveiką su imobilizuotais baltymais ar modelinėmis membranomis (50). Taip atsitikė, nes QCM-D metodas leidžia gauti kinetinius parametrus (k_a , k_d) realiuoju laiku, be papildomų žymėjimų, kas yra didelis privalumas prieš daugumą kitų metodų (51).

Lyginant su fluorescencine spektroskopija, QCM-D leidžia tirti sąveikas be molekulių žymėjimo ir suteikia tiesioginę informaciją apie jungimosi kinetiką. Fluorescencinė spektroskopija dažniausiai pateikia netiesioginius duomenis ir yra jautri signalų persidengimui (52). Palyginti su izotermine titravimo kalorimetrija, QCM-D reikalauja mažesnių tiriamųjų medžiagų kiekių ir yra jautresnis mažų molekulių sąveikai, tačiau nesuteikia tiesioginės informacijos apie termodinaminius parametrus (53). Palyginti su paviršiaus plazmonų rezonansu, QCM-D papildomai leidžia įvertinti adsorbuoto sluoksnio mechanines savybes, nors abiem metodams būdingas baltymo imobilizavimo poreikis (54). Ultrafiltracijos metodų atžvilgiu QCM-D išsiskiria galimybe tirti sąveikas dinaminėmis, o ne tik pusiausvyros sąlygomis (53).

1.10 Vaistų sąveika per albumino jungimosi vietas ir jos klinikinė reikšmė

Kadangi serumo albuminas turi ribotą skaičių didelio afiniteto jungimosi vietų, jungimosi konkurencija tarp kelių vienu metu vartojamų vaistų yra kliniškai reikšmingas reiškinys. Kai du ar daugiau vaistų varžosi dėl to paties jungimosi taško albumine, stipresnis ligandas gali išstumti silpnesnį, staigiai padidindamas jo laisvą koncentraciją kraujyje ir tokiu būdu – farmakologinį aktyvumą bei šalutinio poveikio riziką (55). Šis mechanizmas ypač aktualus vaistams, kuriems būdingas didelis jungimasis su plazmos baltymais, nes net nedidelis laisvos frakcijos padidėjimas gali turėti kliniškai reikšmingą poveikį (26).

Labai gerai dokumentuotas šio reiškinio pavyzdys yra varfarino ir stipriai albuminą rišančių vaistų sąveika. maždaug 99 % varfarino prisijungia prie albumino Sudlow I vietos, todėl net 1–2 % laisvos frakcijos padidėjimas gali sukelti per daug stiprų antikoaguliacinį poveikį ir kraujavimo komplikacijas (56). Klinikiniai duomenys rodo, kad fluoksetinas, kuris taip pat jungiasi prie Sudlow I vietos ir pasižymi dideliu albumino afinitetu, gali konkuruoti su varfarinu dėl jungimosi vietų, bei papildomai slopina jo metabolizmą per CYP2C9 fermentų sistemą – dėl šios dvigubos sąveikos gali padidėti kraujavimo rizika (57).

Dar svarbu paminėti, kad išstūmimas iš albumino jungimosi vietų ne visada lemia reikšmingą ilgalaikį laisvos vaisto frakcijos padidėjimą. Išstumtas vaistas paskirstosi į audinius, metabolizuojamas

ir šalinamas greičiau, todėl laisvos koncentracijos padidėjimas dažnai būna laikinas (58). Nepaisant to, vaistams su siauru terapiniu langu – tokiems kaip varfarinas, fenitoinas ar valproinė rūgštis – net trumpalaikiai laisvos koncentracijos svyravimai gali turėti klinikinę reikšmę (25,59).

2. TYRIME NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR METODIKA

2.1. Tyrimo dizainas

Eksperimentinis lyginamasis tyrimas, kuriame taikant QCM-D metodą nustatomos skirtingų antidepresantų (venlafaksino, mirtazapino ir fluoksetino) sąveikos ir jungimosi kinetika su jaučio serumo albuminu (JSA). JSA imobilizuojamas ant aukso sensoriaus paviršiaus per 11-merkaptoundekanoinę rūgšties aktyvacines grupes. Kiekvienas antidepresantas tiriamas stebint dažnio ir disipacijos pokyčius realiu laiku.

2.2. Tyrimo objektas

Antidepresantų vaistų kapsulėse ir tabletėse, esančios veikliosios medžiagos – venlafaksinas, mirtazapinas ir fluoksetinas.

lentelė 2. Tiriama vaistiniai preparatai. (29–31)

Veiklioji medžiaga	Farmacinė forma ir stiprumas	Pagalbinės medžiagos
Venlafaksinas (venlafaksino hidrochlorido pavidalu)	150 mg pailginto atpalaidavimo kietosios kapsulės	Sacharozė, kukurūzų krakmolai, hidroksipropilceliuliozė (E463), povidonas (E1201), etilceliuliozė, dibutilo sebakatas ir talkas (E553B)
Fluoksetinas (fluoksetino hidrochlorido pavidalu)	20 mg kietosios kapsulės	Pregelifikuotas kukurūzų krakmolai, dimetikonas.
Mirtazapinas (mirtazapino pavidalu)	15 mg burnoje disperguojamos tabletės	Manitolis, mikrokristalinė celiuliozė, sunkusis magnio subkarbonatas, hidroksipropilceliuliozė, krospovidonas, bevandenis koloidinis silicio dioksidas, L-metioninas, mikrokristalinė celiuliozė ir guaro lipai, aspartamas (E 951), apelsinų skonis (maltodekstrinas, gumiarabikas (E414), triacetinas (E1518), gliukozė, natrio sulfatas (E221) ir kvapiosios medžiagos) ir magnio stearatas.

2.3. Tyrime naudoti reagentai, priemonės ir įranga

lentelė 3. Tyrime naudoti reagentai, priemonės ir įranga.

Tyrime naudoti reagentai	Gamintojas, šalis
Metanolis	Honeywell, Prancūzija
11-merkaptoundekanoinė rūgštis (11-MUR)	Sigma-Aldrich, JAV
N-hidroksisukcinimidas (NHS)	Sigma-Aldrich, JAV
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC)	Roth, Vokietija
Fosfatinio buferio tirpalas (PBS)	Roth, Vokietija
Etanolamino hidrochloridas	Sigma-Aldrich, JAV
Druskos rūgštis (HCl)	Roth, Vokietija
Glicinas	Roth, Vokietija
Jaučio serumo albuminas (JSA)	Sigma-Aldrich, JAV
Tyrime naudotos priemonės	Gamintojas, šalis
QCM-D sensorius	Biolin Scientific, Švedija
Pipetmanas	Eppendorf SE, Vokietija
Analitinės svarstyklės	RADWAG, Lenkija
Tyrime naudota įranga	Gamintojas, šalis
QCM-D aparatas	Biolin Scientific, Švedija
Peristaltinė pompa „Ismatec IPC“	Cole-Parmer, Šveicarija
Ultragarso vonelė „EMAG Emmi-40 HC“	EMAG-AG, Vokietija

QCM-D dažnio (ΔF) ir disipacijos (ΔD) matavimai atlikti naudojant „QSense Explorer“ veikiantį 5 MHz pagrindiniu dažniu ir galintį vienu metu užregistruoti septynias harmonikas iki ~65 MHz. QCM-D matavimai užregistruoti naudojant „QSoft401“ ir analizuoti naudojant „QSense dfind“ programinę įrangą. Tolesni matematiniai skaičiavimai buvo atlikti naudojant „Origin“ programinę įrangą.

2.4. Metodika

1. Reagentų paruošimas:

1 mM 11-MUR 20 ml tirpalas buvo paruoštas 4,3672 mg 11-MUR ištirpinus 20 ml metanolio tirpale. 0,1 M NHS 4,5 ml tirpalas buvo paruoštas 51,7905 mg NHS ištirpinus 4,5 ml distiliuoto vandens. 0,4 M EDC 4,5 ml tirpalas buvo paruoštas 279,432 mg EDC ištirpinus 4,5 ml distiliuoto vandens. 7,4 pH PBS 200 ml tirpalas buvo paruoštas įmetus PBS tabletes į 200 ml distiliuoto vandens ir sumaišius

naudojant magnetinę maišyklę. 8,5 pH 1 M etanolamino 40 ml tirpalas buvo paruoštas 2,41 ml etanolamino tirpalo užpylus distiliuotu vandeniu iki 25 ml ir sumažinus pH iki 8,5, naudojant HCl, pasiekus reikiamą pH tirpalas užpilamas distiliuotu vandeniu iki 40ml. 2 pH 10 mM glicino-HCl 50 ml tirpalas buvo paruoštas 40 mg glicino ir 0,045 ml HCl ištirpinus 40 ml distiliuoto vandens ir toliau pakoregavus pH iki 2, naudojant NaOH ir HCl, ir galiausiai užpylus distiliuotu vandeniu iki 50 ml. 1% JSA 5 ml tirpalas buvo paruoštas 50 mg JSA ištirpinus 5 ml distiliuoto vandens.

2. Mirtazapino, venlafaksino ir fluoksetino tirpalų paruošimas:

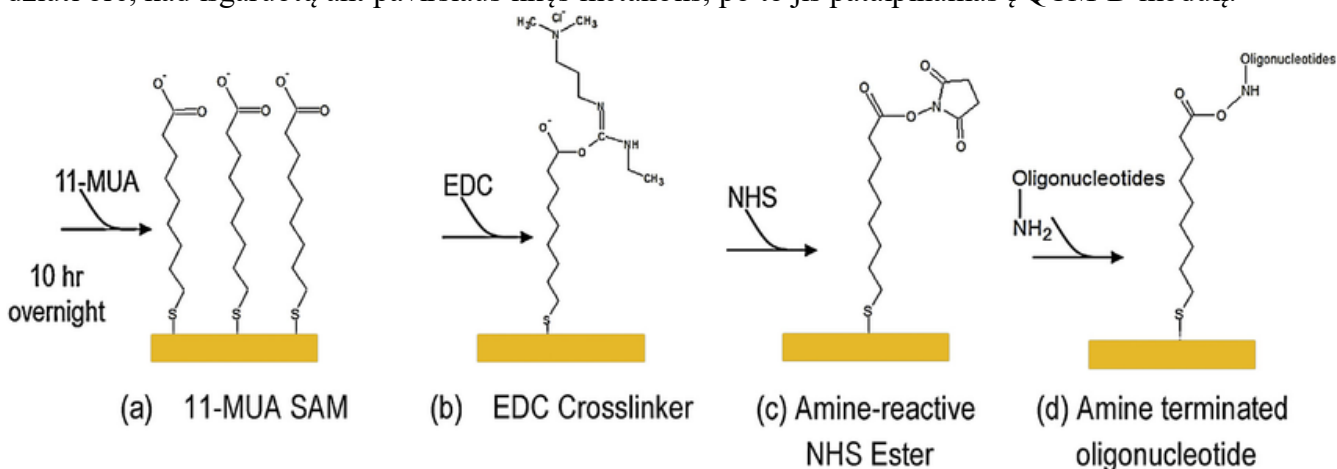
Antidepresantų tirpalai nėra paprasta paruošti, nes jų veikliosios medžiagos blogai tirpsta vandenyje, todėl iš pradžių reikia vaistą ištirpinti DMSO, tada viską praskiesti su buferiniu PBS tirpalu. iki norimų koncentracijų (0.1, 1, 10 ir 100 μ M). Dėl skirtingų vaistinės medžiagos kiekio vaistuose (venlafaksino – 150 mg, fluoksetino – 20 mg, mirtazapino – 15 mg) kiekvienam antidepresantui reikėjo atlikti skirtingus praskiedimus, kad būtų gaunamos norimos koncentracijos.

Mirtazapino tirpalas buvo gautas vieną 15 mg tabletę įdėjus į 10 ml DMSO tirpalo ir su magnetine maišykle išmaišius, kol viskas ištirpo ir buvo gautas 5629.9 μ M tirpalas. Tada iš šio skysčio buvo paimti 17.7 ml ir sumaišyti su 982.3 μ l PBS tirpalo, taip gaunant 100 μ M koncentracijos standartinį tirpalą, kuris buvo naudojamas kitų koncentracijų tirpalų gavimui. 0.1 μ M koncentracijai gauti buvo paimtas 1 μ l standartinio tirpalo ir sumaišytas su 999 μ l PBS tirpalo. 1 μ M tirpalui gauti buvo daroma tas pats, tik paimta 10 μ l standartinio tirpalo ir 990 μ l PBS. Su 10 μ M vėl tas pats – 100 μ l standartinio ir 900 μ l PBS. Fluoksetino tirpalų paruošimas vyko taip pat, tik pirmasis žingsnis skyrėsi, dėl didesnio vaisto kiekio kapsulėje (20 mg). Viena jo kapsulė buvo ištirpinta 10 ml DMSO tirpalo, taip gaunant 6465.8 μ M tirpalą. Tada buvo vėl paruošiamas standartinis tirpalas, paimant 15.5 μ l DMSO tirpalo ir jį sumaišius su 984.5 μ l PBS tirpalo, taip gaunant 100 μ M koncentracijos standartinį tirpalą. Iš šio standartinio tirpalo taip pat kaip ir su mirtazapinu buvo paruoštos 0.1, 1, ir 10 μ M koncentracijos. Venlafaksinu reikėjo praskiesti truputi kitaip, dėl didesnio vaistinės medžiagos kiekio kapsulėje (150 mg). Vienas venlafaksino kapsulės turinys buvo ištirpintas 10 ml DMSO tirpalo, taip gaunant 54.02 mM tirpalą. Tada 1.85 μ l šio tirpalo buvo praskiesti su 998.15 μ l PBS tirpalo, gaunant 100 μ M venlafaksino standartinį tirpalą. Po to vėl buvo kartojami skiedimai, kol gautos visos koncentracijos (0.1, 1, 10 ir 100 μ M).

3. QCM-D sensoriaus paruošimas eksperimentui:

QCM-D sensorius iš pradžių buvo išvalytas jį panardinus į dejonizuotą vandenį, po to į metanolį, abu kartus naudojant ultragarsinę vonią. Po valymo sensorius buvo panardintas į 1 mM 11-MUA tirpalą

18 val., kad susidarytų savitvarkis monosluoksnis (SAM). Susidarius SAM, sensorius buvo paliktas džiūti ore, kad išgaruotų ant paviršiaus likęs metanolis, po to jis patalpinamas į QCM-D modulį.



pav. 6. EDC/NHS amino prijungimo schema (a) 11-MUA SAM dangos susidarymas. (b) EDC skersinių ryšių aktyvuotojo įvedimas; (c) aminių aktyvinimas su NHS pagalba; (d) 11-MUA SAM jungimasis su amino grupę turinčiu oligonukleotidu.

Įdėjus sensorių modulio kamera buvo užpildyta PBS tirpalu, siekiant nustatyti bazinę liniją ir sudrėkinti paviršių. Vėliau NHS ir EDC tirpalai buvo lygiomis dalimis sumaišyti ir suleisti į kamerą, ten juos laikant tris kartus po 5 min., siekiant aktyvuoti 11-MUA karboksilo grupes. Po to, į kamerą buvo suleistas 1% JSA tirpalas, jis ten buvo laikomas 1 val., kad kuo daugiau jo prisijungtų prie 11-MUA SAM (pav. 6). Taip atlikta imobilizacija yra nekryptinga, bet nuo to sąveika tarp JSA ir tiriamų antidepresantų reikšmingai nesikeičia. JSA nuplovus PBS tirpalu buvo atliktas likusių aktyvių 11-MUA karboksilo grupių blokavimas, naudojant 1 M etanolamindo tirpalą. Tai buvo daroma, kad tiriamasis vaistas prisijungtų tik prie JSA, o ne prie 11-MUA karboksilo grupių.

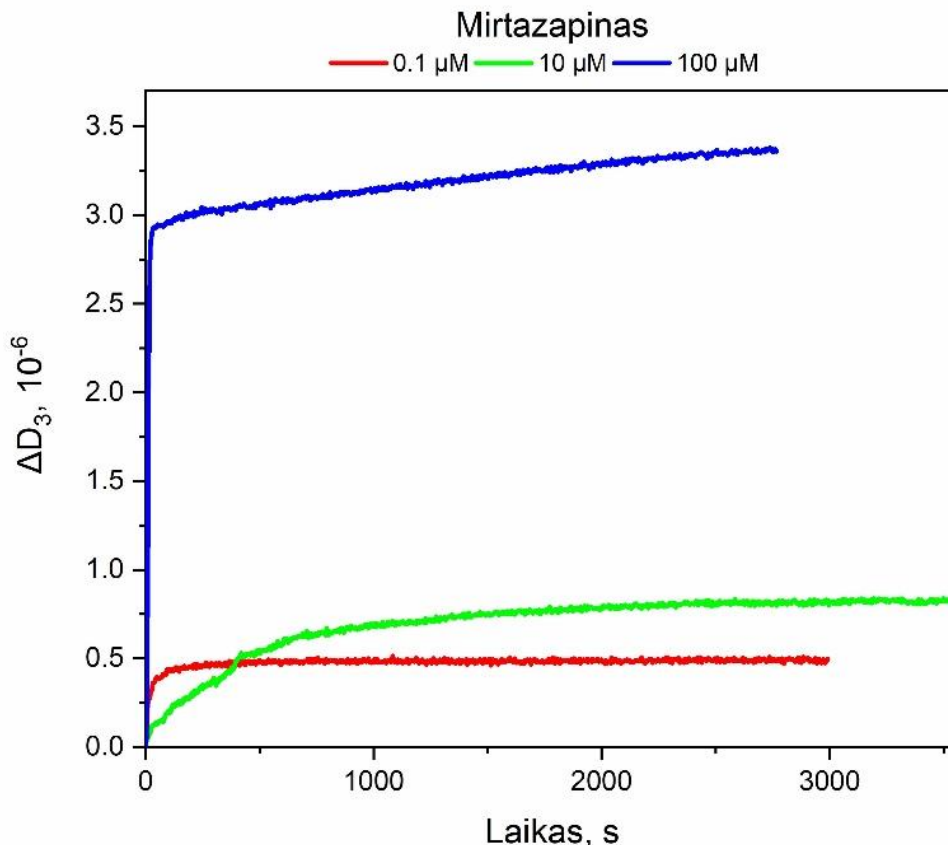
4. QCM-D matavimas:

Prieš atliekant matavimus į QCM-D aparato kamerą turi būti įleidžiamas PBS tirpalas ir palaukiama, kol stabilizuojasi bazinė linija. Atsiradus bazinei linijai yra įleidžiamas tiriamasis tirpalas ir ten laikomas 1 val., kol vyksta matavimas. Po valandos mėginys yra nuplaunamas PBS tirpalu ir atliekama regeneracija su 10 mM glicino tirpalu. Atlikus regeneraciją matavimą galima atlikti su kitu mėginiu.

Eksperimento metu buvo matuojamas mėginio disipacijos (ΔD) ir dažnio (ΔF) pokyčiai. Disipacijos pokytis matėsi tik ties trečia harmonika ir dažnio pokytis buvo per mažas, nepriklausomai nuo tirpalo koncentracijos, kad būtų galima ją naudoti tolimesniuose skaičiavimuose.

Tyrimo pradžioje buvo mėginta atlikti matavimus su mažesnėmis antidepresantų koncentracijomis (0.1, 1 ir 10 μM), bet tirpalų disipacijos pokyčiai labai mažai skyrėsi vienas nuo kito ir

buvo tiesiog per maži, kad būtų galima juos naudoti apskaičiuojant kinetiką ir termodinamiką, todėl buvo pasirinkta didesnė koncentracija visoms tiriamoms medžiagoms – 100 μM (pav. 7). Grafike matosi, kad ΔD tarp 0.1 ir 10 μM yra tik 0.3×10^{-6} , šis skaičius yra per mažas norint atrasti kinetikos skirtumus tarp skirtingų vaistų koncentracijų.



pav. 7. Skirtingų koncentracijų (0.1, 10 ir 100 μM) mirtazapino disipacijos skirtumo (ΔD) matavimai, eksperimento metu.

2.5. Rezultatų analizė

Įvertinti sąveikos tarp imobilizuotų antidepresantų (mirtazapino, venlafaksino ir fluoksetino) ir JSA kinetinius parametrus bei termodinamiką buvo panaudotas dviejų žingsnių matematinis modelis. Atlikus QCM-D disipacijos (ΔD) laike duomenų normalizavimą buvo pritaikytas modelis apskaičiuojant asociacijos greičio, disociacijos greičio ir sulaikymo konstantas. Iš šių rezultatų toliau buvo apskaičiuota: asociacijos konstanta (K_A), disociacijos konstanta (K_D) ir Gibso laisvoji energija (ΔG). R yra dujų konstanta, kuri yra lygi $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, o T yra reakcijos temperatūra lygi kambario temperatūrai išreikšti kelvinais.

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (3)$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (4)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (5)$$

Duomenų normalizavimas buvo atliekamas atskaičiuojant pradinę bazinę disipacijos vertę (D_0), fiksuotą prieš antidepresanto tirpalo įleidimą. Taip gauti normalizuoti ΔD duomenys atspindi gryną sąveikos su JSA sukkelto disipacijos pokytį. Visos kreivės buvo normalizuotos iki atitinkamo laiko momento $t_0 = 0$, kuris atitiko analitės tirpalo kontakto su sensoriumi pradžią. Toks normalizavimas leido palyginti skirtingų antidepresantų kinetikos kreives toje pačioje koordinačių sistemoje, nepriklausomai nuo absoliutinių pradinių disipacijos reikšmių skirtumo.

Visų antidepresantų sąveikos su JSA termodinaminiai parametrai buvo apskaičiuoti iš pusiausvyros asociacijos konstantos (K_A) naudojant (5) lygtį. ΔG yra apskaičiuojama prie pastovios temperatūros ($T = 298,15$ K, atitinkanti kambario temperatūrą 25 °C). Neigiama ΔG reikšmė rodo, kad sąveika vyksta spontaniškai, tai kuo didesnė neigiama vertė, tuo energetiškai palankesnė sąveika.

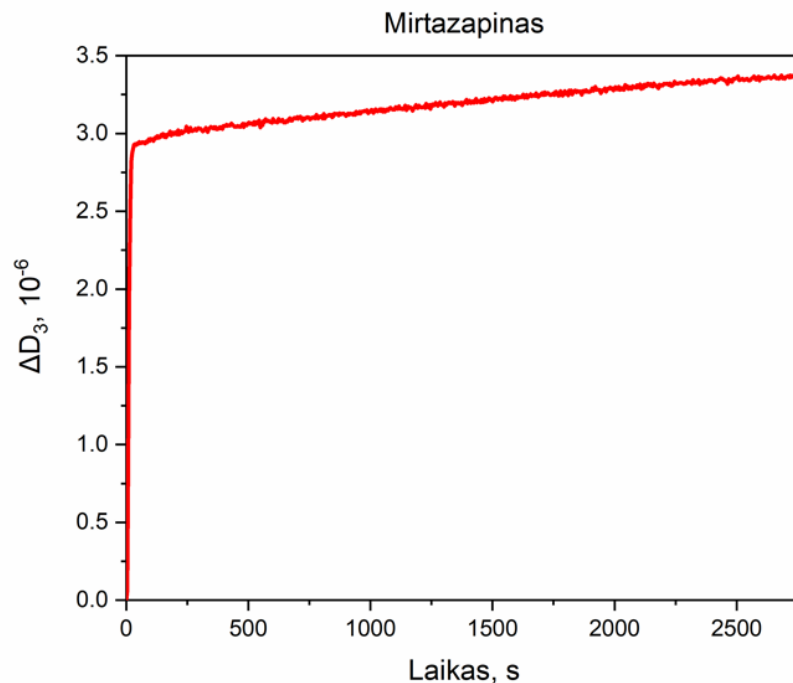
3. REZULTATAI

3.1. Mirtazapino, fluoksetino ir venlafaksino imobilizacija

Tiriamo antidepresanto 100 μM tirpalas laikomas celėje 1 val., per kurią nusistovi bazinė linija ir po to nuplaunamas PBS tirpalu. Vykdam analizę, harmonika, kurioje buvo stebimas disipacijos pokytis, buvo parenkta pagal tai, kad ji būtų kuo jautresnė ir kad joje būtų stebimas mažas triukšmas. Kinetika, kuri buvo įvertinta naudojant dviejų žingsnių modelį, buvo analizuojama pagal disipacijos (ΔD) skirtumą trečioje harmonikoje.

Šie grafikai (pav. 8 - 10) rodo kiekvieno antidepresanto disipacijos (ΔD) pokytį laike trečioje harmonikoje. Grafikuose matosi trumpa asociacijos fazė, kuri prasideda įleidus 100 μM antidepresanto tirpalą, tai matosi iš disipacijos signalo staigaus pakilimo grafiko pradžioje, o tai rodo, kad antidepresantas jungiasi prie imobilizuoto JSA ant sensoriaus paviršiaus. Prisotinimo fazėje signalas stabilizuojasi ir vyksta tik lėti neryškūs pokyčiai (mirtazapino grafikas lėtai kyla). Šio momento nėra grafike, bet po sensoriaus nuplovimo PBS tirpalu matytusi žemėjanti disociacijos pokyčio reikšmė, bet ji negrįš į pradinę reikšmę, neatlikus regeneracijos, o tai rodo, kad išlieka dalis antidepresanto komplekso su JSA.

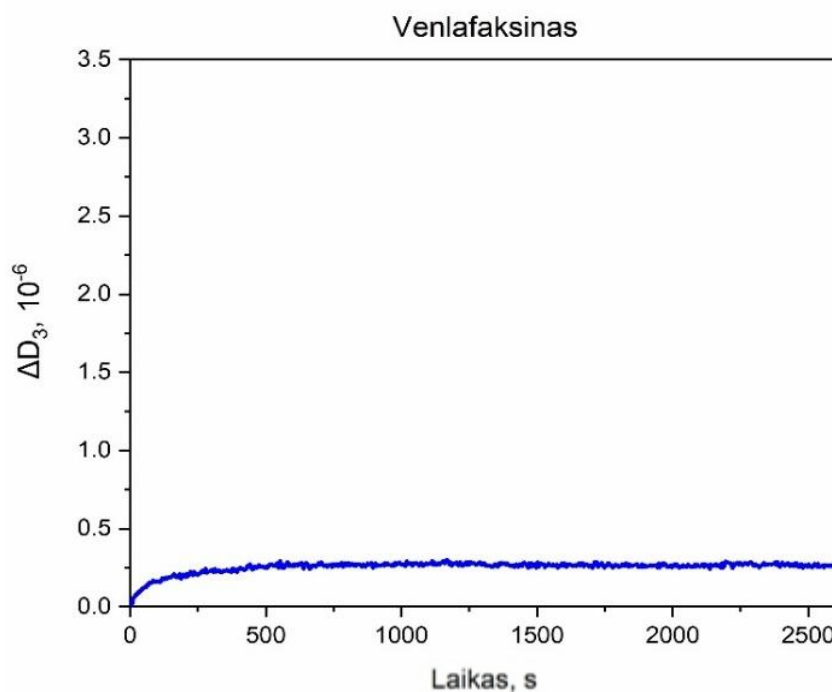
Iš visų grafikų mirtazapino grafikas rodo didžiausią ΔD reikšmę, tai sako, kad šis vaistas turi didžiausią poveikį QCM-D sensoriaus disipacijai. Didelis ΔD pokytis gali reikšti, kad mirtazapinas prie sensoriaus prisijungia tankiai, bet netvirtai, nes sugeba sukelti didelį svyravimų slopinimą.



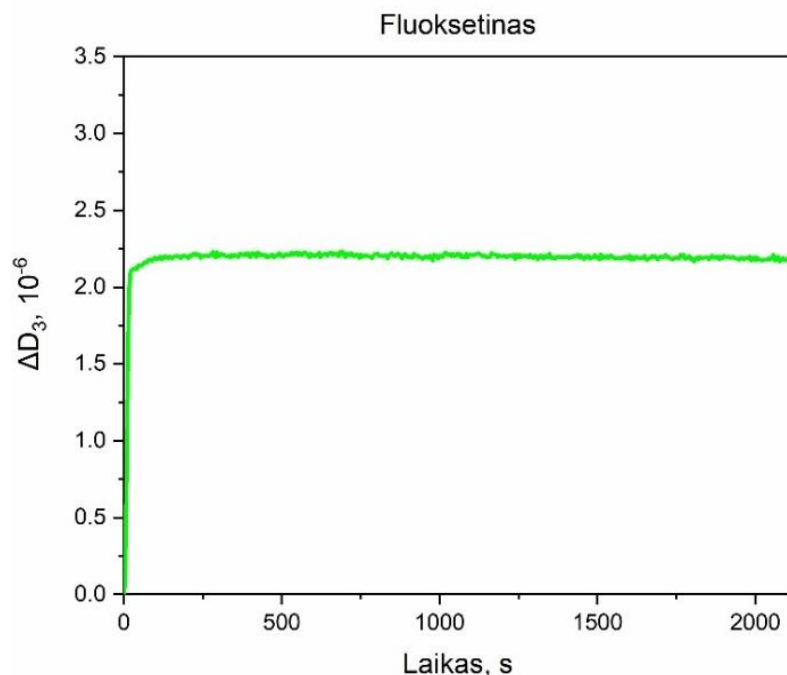
pav. 8. Mirtazapino disipacijos skirtumas (ΔD), eksperimento metu, trečioje harmonikoje.

Iš venlafaksino grafiko galima spręsti, kad jis silpniausiai sugeria sensoriaus virpėjimą ir iš to kaip, palyginus su kitų vaistų grafikais, jo pradinis ΔD šuolis nėra toks staigus ar aukštas galime, dar neatlikę skaičiavimų spėti, kad venlafaksino asociacijos konstanta (k_a) bus mažiausia iš tirtų vaistų. Žema ΔD ir tai, kad ji po pirmojo pakilimo daug nesikeičia gali parodyti didelį (palyginus su mirtazapinu) venlafaksino ir JSA komplekso stabilumą.

Fluoksetino (pav. 10) grafikas yra tarpe tarp kitų dviejų grafikų, jis turi staigų pakilimą kaip ir mirtazapinas, bet jis neturi tokio didelio ΔD pokyčio ir eksperimentui tesiantis jo disociacijos skirtumas nesikeičia, kaip ir venlafaksino. Iš šių duomenų galima nuspėti, kad fluoksetinas turės aukštą asociacijos konstantą, bet ir didelį JSA komplekso stabilumą.



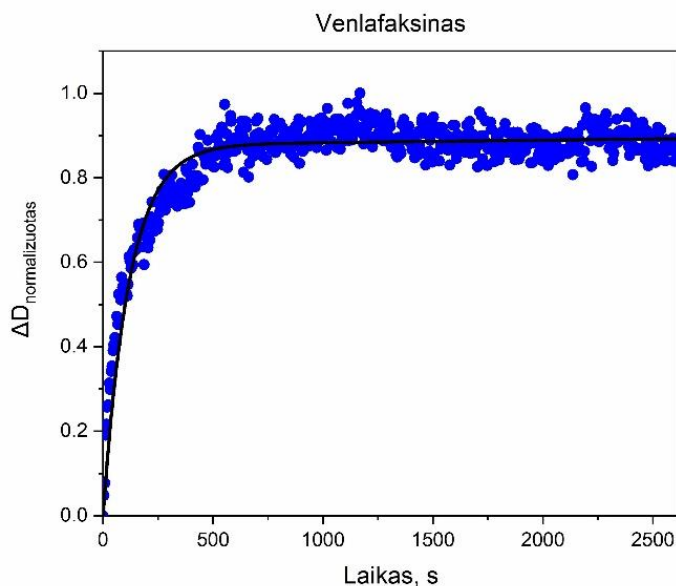
pav. 9. Venlafaksino disipacijos skirtumas (ΔD) eksperimento metu, trečioje harmonikoje.



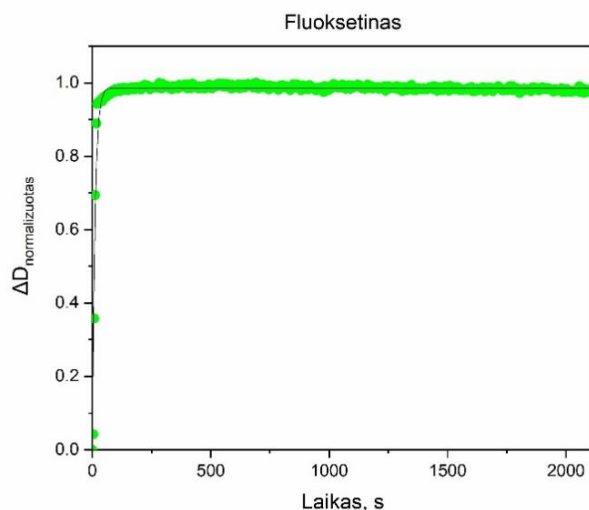
pav. 10 fluoksetino disipacijos skirtumas (ΔD) eksperimento metu, trečioje harmonikoje

3.2. Mirtazapino, fluoksetino ir venlafaksino kinetina ir termodinamika

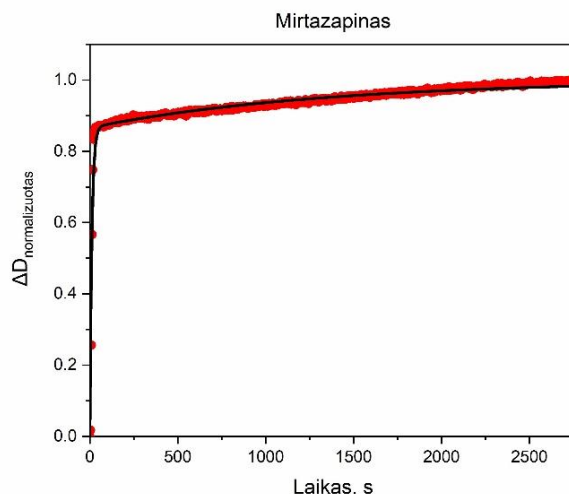
Eksperimento metu gauti disipacijos (ΔD) pokyčiai laike buvo normalizuoti (pav. 11 - 13) ir pritaikyti dviejų žingsnių matematiniam modelyje. Iš šio modelio buvo apskaičiuota asociacijos greičio konstanta (k_a), disociacijos greičio konstanta (k_d), stabilių kompleksų formavimosi greičio konstanta (k_r), pusiausvyros asociacijos ir disociacijos konstantos (K_A ir K_D) ir Gibso laisvoji energija (ΔG). Normalizuoti disipacijos (ΔD) pokyčiai laike po tiriamų antidepresantų prisijungimo prie JSA buvo grafiškai pavaizduoti kartu su pritaikytu negrįžtamu dviejų žingsnių modelio nubrėžta kreive.



pav. 11. Normalizuotas venlafaksino disipacijos pokytis (ΔD) laike. Spalvotais taškais yra žymimi eksperimento metu gauti duomenys, o kreivė žymi pritaikytą matematinį modelį



pav. 13. Normalizuotas fluoksetino disipacijos pokytis (ΔD) laike. Spalvotais taškais yra žymimi eksperimento metu gauti duomenys, o kreivė žymi pritaiktą matematinį modelį.



pav. 12. Normalizuotas mirtazapino disipacijos pokytis (ΔD) laike. Spalvotais taškais yra žymimi eksperimento metu gauti duomenys, o kreivė žymi pritaiktą matematinį modelį.

Grafikuose pateikiami normalizuoti kiekvienų antidepresantų ΔD duomenys, kur $t_0 = 0$ atitinka antidepresanto tirpalo kontakto su JSA pradžią. Spalvoti taškai – eksperimentiniai matavimai, linija – pritaikytas dviejų žingsnių negrįžtamas kinetinis modelis. Modelio sukurta kreivė gerai atitinka eksperimentinius taškus, tai patvirtina, kad šis metodas yra tinkamas. Iš kreivių formos matosi skirtingas kiekvieno vaisto jungimosi pobūdis: fluoksetinas ir mirtazapinas asocijuojasi greitai (panašios k_a reikšmės), venlafaksino kreivė auga lėčiausiai, kas sutampa su jos mažiausiu asociacijos greičiu (k_a).

Taip pat matosi, kad mirtazapino kreivė nepasilieka viename aukštyje, tai parodo vaisto žemą stabilumą su JSA ir mažiau neigiamą Gibso laisvoji energija (ΔG), kuri nusako vaisto ir JSA jungties stiprumą.

Lyginant asociacijos greitį, fluoksetinas ir mirtazapinas jungiasi prie JSA panašiu greičiu, tuo tarpu venlafaksinas – apie 12 kartų lėčiau. Tai rodo, kad venlafaksino molekulės pasiekia JSA jungimosi vietas žymiai lėčiau nei kitų dviejų vaistų molekulės. Kita vertus, prisijungimo greitis neapibūdina, kiek laiko kompleksas išlieka stabilus, tam svarbesnė disociacijos greičio konstanta (kd). Būtent pagal ją tirtieji vaistai skiriasi reikšmingiausiai – mirtazapino kompleksas su JSA irsta beveik 9 kartus greičiau nei fluoksetino ir net 116 kartų greičiau nei venlafaksino. Tai reiškia, kad nors mirtazapinas jungiasi sparčiai, jo sudarytas kompleksas su JSA yra nestabilus ir greitai iširsta – o tai atsispindi ir pusiausvyros disociacijos konstantėje (KD), kuri mirtazapinui yra apie 10 kartų didesnė nei fluoksetinui ir venlafaksinui. Fluoksetino ir venlafaksino KD reikšmės yra labai panašios (skiriasi mažiau nei 20 %), todėl jų bendras afinitetas JSA yra panašus, nors sąveikos kinetika labai skiriasi – fluoksetinas greitai jungiasi ir lėtai disocijuoja, o venlafaksinas jungiasi lėtai, bet sudaro itin stabilų kompleksą

Termodinaminių parametrų analizė parodė, kad visų trijų antidepresantų Gibso laisvoji energija (ΔG) yra neigiama, o tai patvirtina, kad sąveika su JSA vyksta spontaniškai. Fluoksetino ir venlafaksino ΔG reikšmės yra labai panašios tarpusavyje ir reikšmingai didesnės nei mirtazapino. Tai atitinka kitų parametrų vaizdą: mirtazapinas, jungiasi greitai, tačiau sudaro termodinamiškai mažiau palankų kompleksą su JSA nei kiti du vaistai

4 lentelė. Tirtų antidepresantų ir JSA sąveikos kinetiniai parametrai ir Gibso energija

Venlafaksinas					
Greičio konstantos:			Pusiausvyros konstantos:		
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_r (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	ΔG (kJ/mol)
7.33×10^1	4.24×10^{-7}	7.40×10^{-6}	9.90×10^6	1.01×10^{-7}	-39.3
Fluoksetinas					
Greičio konstantos:			Pusiausvyros konstantos:		
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_r (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	ΔG (kJ/mol)
8.52×10^2	1.40×10^{-10}	9.97×10^{-5}	8.55×10^6	1.17×10^{-7}	-38.9
Mirtazapinas					
Greičio konstantos:			Pusiausvyros konstantos:		
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_r (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	ΔG (kJ/mol)
7.53×10^2	6.46×10^{-5}	8.58×10^{-4}	8.77×10^5	1.14×10^{-6}	-33.4

3.3. Rezultatų aptarimas

Darbo metu buvo tiriamos sąveikos tarp JSA ir trijų skirtingų antidepresantų (mirtazapino, venlafaksino ir fluoksetino) naudojant QCM-D metodą. Tyrimo metu gauti disipacijos pokyčiai (ΔD) buvo panaudoti apskaičiuojant sąveikos kinetiką ir termodinamiką. Tam padaryti pirmiausia buvo atliktos QCM-D sensoriaus modifikacijos, kurių metu sensoriaus paviršius buvo padengtas 11-MUR SAM ir po to atlikta JSA nekryptinga imobilizacija. Antidepresantas prisijungia prie JSA, nesvarbu ar jo imobilizacija buvo kryptinga ar ne, tai buvo nustatyta iš eksperimento metu pastebėtų disipacijos pokyčių (ΔD) (pav. 2). Tiriamų antidepresantų sąveikos kinetika ir termodinamika buvo apskaičiuota naudojant dviejų žingsnių modelį. Gauti kinetiniai ir termodinaminiai parametrai leidžia sistemingai palyginti trijų skirtingų antidepresantų jungimosi su serumo albuminu ypatumus.

Vykdamas eksperimentą buvo nustatyta, kad patikimi disipacijos pokyčiai (ΔD) matėsi tik trečiojoje harmonikoje, o dažnio pokyčiai (ΔF) buvo per maži, kad galėtų būti naudojami tolimesniuose skaičiavimuose, nepriklausomai nuo tiriamų koncentracijų. Tai sutampa su Alhankawi ir kt., 2022 pastebėjimais, kurie, tirdami 10 skirtingų vaistų sąveiką su žmogaus serumo albuminu QCM-D būdu, rėmėsi disipacijos pokyčių (ΔD) analize, o ne dažnio pokyčiu (ΔF) (60). Iš jų ir mano eksperimentų galima nustatyti, kad mažų molekulių (šiuo atveju vaistų) sąveika su imobilizuotais baltymais generuoja silpnus QCM-D signalus ir kad šiuo atveju disipacijos pokytis yra jautresnis ir naudingesnis parametras nei dažnio pokytis.

Gautieji kinetiniai parametrai parodo aiškius struktūros ir aktyvumo ryšius tarp trijų tirtų antidepresantų ir JSA. Fluoksetinas, pasižymintis didžiausiu lipofiliškumu ($\log P = 4,05$), asocijuojasi greitai ($k_a = 8,52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir sudaro stabilų kompleksą ($k_d = 9,97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Šį elgesį lemia trifluorometilo grupė fenoksi žiede, suteikianti molekulei stiprių hidrofobinių sąvybių, bei plokščia aromatinė struktūra, kuri leidžia vaistui lengvai pasiekti albumino IIA subdomeną (Sudlow I vieta). Mirtazapinas, kurio $\log P = 2,9$, taip pat asocijuojasi greitai ($k_a = 7,53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tačiau jo didelė tetraciklinė žiedo sistema, nors suteikia platų hidrofobinį kontakto plotą, nesudaro tokio stabilaus komplekso su albuminu – tai atsispindi didžiausia iš tirtų vaistų disociacijos greičio konstanta ($k_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Tikėtina, kad mirtazapino didelė ir erdviška molekulė jungiasi su albumino jungimosi vieta ne taip tiksliai, kaip mažesnis fluoksetinas, todėl kompleksas yra mažiau stabilus. Venlafaksinas, pasižymintis žemiausiu lipofiliškumu ($\log P = 0,43$), asocijuojasi lėčiausiai ($k_a = 7,33 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tačiau susidariusio komplekso stabilumas yra didžiausias ($k_d = 7,40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). Šis iš pirmo žvilgsnio nelogiškas rezultatas yra paaiškinamas tuo, kad venlafaksino laisvoji hidroksilo grupė ir metoksi grupė sudaro papildomas vandenilinių ryšių susidavimo vietas su polinėmis albumino jungimosi vietos liekanomis, o

tai kompensuoja sumažėjusias hidrofobines sąveikas ir galutinai suteikia kompleksui stabilumo. Taigi, remiantis gautaisiais duomenimis, galima teigti, kad asociacijos greitis pirmiausia priklauso nuo vaisto lipofiliškumo, tuo tarpu komplekso stabilumą lemia ne vienos, o kelių fizikinių-cheminių savybių derinys: molekulės geometrija, funkcinų grupių pobūdis ir galimybė sudaryti specifines nekovalentes sąveikas su albumino jungimosi vieta.

Fluoksetino jungimosi prie JSA pusiausvyros disociacijos konstanta, gauta šiame tyrime ($KD = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$), rodo didelį afinitetą albuminui. Katrahalli ir kt., 2010 fluorescencinės spektroskopijos metodu nustatė statinį fluoksetino jungimosi su žmogaus serumo albuminu (ŽSA) mechanizmą (39), o Dangkoob ir kt., 2015 patvirtino šį mechanizmą ternaryje sistemoje su alprazolamu (40). Tiesioginis konstantų palyginimas tarp šių tyrimų ir šiame darbe gautų rezultatų yra netikslus, kadangi minėti tyrimai taikė pusiausvyros Stern-Volmer metodą, o ne dviejų žingsnių kinetinius modelius, ir naudojo skirtingo tipo albuminus. Nepaisant to, visų šių tyrimų duomenys patvirtina, kad fluoksetinas pasižymi dideliu afinitetu serumo albuminui, kas sutampa su žinomais klinikiniais duomenimis: farmakologinėje literatūroje nurodoma, kad apie 94,5 % fluoksetino plazmoje yra susijungę su baltymais, įskaitant albuminą ir alfa-1 glikoproteiną (41).

Venlafaksino pusiausvyros disociacijos konstanta, nustatyta šiame tyrime ($KD = 1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$), yra panaši į fluoksetino KD reikšmę ($KD = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$), nors klinikiniai farmakokinetiniai duomenys rodo, kad venlafaksinas kraujo plazmoje prie baltymų jungiasi kur kas silpniau nei fluoksetinas – tik apie 27–30 % (41). Šis ryškus neatitikimas gali turėti kelias priežastis: pirma, tyrimo metu naudotas QCM-D metodas matavo sąveiką tarp vieno izoliuoto baltymo (JSA) ir tiriamo vaisto kontroliuojamomis in vitro sąlygomis, o klinikinių duomenų baltymų jungimosi procentas rodo sudėtingesnę in vivo situaciją, kurioje yra daug endogeninių ligandų, riebalų rūgščių, kitų vaistų ir biologinių veiksnių, kurie konkuruoja dėl albumino jungimosi vietos (61). Ir antra, in vitro QCM-D sistemoje naudota 100 μM venlafaksino koncentracija, kuri stipriai viršija terapines koncentracijas ($\sim 0,2\text{--}2,0 \mu\text{M}$) (41), o tai gali lemti padidėjusią sąveiką ir galimai sukelti nespecifinį jungimąsi.

Šiame tyrime gauta mirtazapino jungimosi prie JSA pusiausvyros disociacijos konstanta ($KD = 1,14 \times 10^{-6} \text{ M}$), yra didesnė nei fluoksetino ($KD = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$) ir venlafaksino ($KD = 1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$). Šį skirtumą paaiškina didelė mirtazapino disociacijos greičio konstanta ($k_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), kuri yra apie 9 kartus didesnė nei fluoksetino ($k_d = 9,97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) ir 116 kartų didesnė nei venlafaksino ($k_d = 7,40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), nors jo asociacijos greitis ($k_a = 7,53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) yra panašus į fluoksetino ($k_a = 8,52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Šie duomenys rodo, kad mirtazapinas turi mažiau stabilų galutinį kompleksą su JSA, nei kiti du vaistai.

Mokslinėje literatūroje nepavyko rasti tiesiogiai palyginamų duomenų apie mirtazapino jungimosi kinetiką su serumo albuminu.

Termodinaminių parametrų nustatymas parodė, kad visų trijų vaistų Gibso laisvoji energija yra neigiama, o tai reiškia, kad sąveika su JSA vyksta spontaniškai. Venlafaksino $\Delta G = -39,3$ kJ/mol ir fluoksetino $\Delta G = -38,9$ kJ/mol reikšmės yra labai panašios ir rodo stipresnę sąveiką su JSA, palyginus su mirtazapino $\Delta G = -33,4$ kJ/mol. Šios reikšmės atitinka Freire ir kt., 2024 aprašomus baltymų ir ligandų sąveikos termodinaminius duomenis. Jie rėmėsi Protein Data Bank duomenų bazėje esančiais duomenimis, apimančiais daugiau nei 3000 baltymų ir ligandų sąveikų, ir nustatė, kad apie 70 % visų atvejų patenka į -46 iki -26 kJ/mol intervalą (62).

Lyginant asociacijos greičio konstantas, nustatyta, kad fluoksetinas ($k_a = 8,52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir mirtazapinas ($k_a = 7,53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) pasižymi panašiu prisijungimo greičiu, tuo tarpu venlafaksinas ($k_a = 7,33 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) prisijungia apie 12 kartų lėčiau nei fluoksetinas. Šis skirtumas gali būti siejamas su vaistų struktūrinėmis ir fizikinėmis-cheminėmis savybėmis: fluoksetinas ir mirtazapinas yra labiau lipofiliniai junginiai, turintys aromatinės žiedo struktūras, kurios palengvina sąveiką su albumino hidrofobinėmis jungimosi vietomis. Venlafaksinas, priešingai, pasižymi mažesniu lipofiliškumu, kas gali lemti lėtesnę asociaciją su albuminu. Šie teiginiai sutampa su Alhankawi ir kt., 2022 pastebėjimu, kad egzistuoja statistiškai reikšminga koreliacija tarp vaistų lipofiliškumo ir jų jungimosi stiprumo prie serumo albumino naudojant QCM-D metodą.

Gauti kinetiniai ir termodinaminiai parametrai turi praktinę reikšmę nuspėjant šių antidepresantų farmakokinetinį elgesį klinikinėje praktikoje. Fluoksetino KD reikšmė ($1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$) ir maža disociacijos greičio konstanta patvirtina žinomus klinikinės farmakologijos duomenis, kad apie 94,5 % fluoksetino plazmoje yra susijungę su baltymais (41). Didelis afinitetas albuminui ir stabilus kompleksas reiškia, kad laisvos, farmakologiškai aktyvios vaisto frakcijos koncentracija plazmoje yra santykinai maža ir pastovi, todėl fluoksetino poveikis yra nuspėjamas ir mažiau jautrus koncentracijos svyravimams. Tuo pačiu tai reiškia, kad esant polifarmacijai, ypač kartu skyriant kitus aukštą serumo baltymų afinitetą turinčius vaistus, tokius kaip varfarinas ar ibuprofeinas – fluoksetinas gali išstumti juos iš albumino jungimosi vietų, padidindamas jų laisvą frakciją ir gali sukelti pavojingą toksinį poveikį (63).

Venlafaksino atveju nustatyta KD reikšmė ($1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$) in vitro sąlygomis yra artima fluoksetino KD, tačiau klinikiniai duomenys rodo tik ~27–30 % jungimosi su baltymais in vivo (64). Šis skirtumas primena, jog albumino jungimosi tyrimas izoliuotoje sistemoje neviseiškai atspindi sudėtingų biologinių sąlygų gyvame organizme, tokių kaip: endogeniniai ligandai (riebalų rūgštys, bilirubinas), konkuruojantys vaistai (61,63). Tai turi tiesioginę klinikinę reikšmę: venlafaksino mažesnis baltymų

jungimasis reiškia didesnę laisvą vaisto frakciją plazmoje, dėl ko šis vaistas greičiau pasiekia terapinę koncentraciją audiniuose, tačiau kartu yra labiau jautrus inkstų ar kepenų funkcijos pokyčiams, kurie gali keisti jo pašalinimą (65).

Mirtazapino KD ($1,14 \times 10^{-6}$ M) yra apie 10 kartų didesnė nei fluoksetino ir venlafaksino. Nepaisant to, klinikiniai farmakokinetiniai duomenys rodo, kad mirtazapinas in vivo prisijungia prie plazmos baltymų maždaug 85 % (66). Greita asociacija ir greita disociacija ($k_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) lemia dinaminį, greitai kintančios pusiausvyros kompleksą su albuminu – tai gali reikšti, kad šio vaisto laisvojo ir sujungtojo pavidalo santykis yra labiau jautrus tiek vaisto koncentracijos, tiek aplinkos sąlygų pokyčiams (25). Atsižvelgiant į tai, kad mirtazapinas dažnai skiriamas kartu su kitais vaistais nerimo ir miego sutrikimams gydyti, šio vaisto dinaminis jungimosi su albuminu pobūdis yra svarbus veiksnys vertinant galimas vaistų sąveikas (41).

Apibendrinant, visi trys vaistai pasižymi spontaniška sąveika su albuminu ($\Delta G < 0$), tačiau esmingai skiriasi sąveikos kinetika. Šie skirtumai turi praktinę reikšmę klinikiniam terapiniam vaistų monitoravimui (TDM), nes vien pusiausvyros koncentracijos plazmoje matavimas nesuteikia informacijos apie tai, kaip greitai vaistas atsipalaiduoja nuo albumino ir tampa farmakologiškai aktyvus. QCM-D metodu gauti kinetiniai parametrai galėtų papildyti TDM interpretaciją, ypač sudėtingais klinikiniais atvejais, kai svarbu ne tik bendra vaisto koncentracija, bet ir jo dinaminis elgesys su plazmos baltymais.

5. IŠVADOS

1. QCM-D metodu nustatyta, kad fluoksetinas sąveikauja su jaučio serumo albuminu, formuodamas stabilų kompleksą. Tyrimo metu apskaičiuota didelė asociacijos greičio konstanta ($k_a = 8,52 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir maža disociacijos greičio konstanta ($k_d = 9,97 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Gauta pusiausvyros disociacijos konstanta ($K_D = 1,17 \times 10^{-7} \text{ M}$) rodo didelį fluoksetino afinitetą jaučio serumo albuminui.
2. QCM-D metodu nustatyta, kad venlafaksinas sąveikauja su jaučio serumo albuminu, formuodamas stabilų kompleksą. Tyrimo metu apskaičiuota maža asociacijos greičio konstanta ($k_a = 7,33 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir maža disociacijos greičio konstanta ($k_d = 7,40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), rodo, kad susidariusio komplekso stabilumas yra didelis. Pusiausvyros disociacijos konstanta ($K_D = 1,01 \times 10^{-7} \text{ M}$), taip pat rodo stabilią sąveiką su JSA.
3. QCM-D metodu nustatyta, kad mirtazapinas sąveikauja su jaučio serumo albuminu, formuodamas nestabilų kompleksą tyrimo metu apskaičiuota didelė asociacijos greičiu ($k_a = 7,53 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tačiau taip pat didelė disociacijos greičio konstanta ($k_d = 8,58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Pusiausvyros disociacijos konstanta ($K_D = 1,14 \times 10^{-6} \text{ M}$) yra didžiausia iš visų tirtų vaistų, rodančia greitą komplekso irimą.
4. Fluoksetino, venlafaksino ir mirtazapino sąveikų su JSA analizė atskleidė kinetinius ir termodinaminius skirtumus. Fluoksetinas ir venlafaksinas pasižymi panašiomis pusiausvyros disociacijos konstantomis (K_D apie 10^{-7} M), tačiau skiriasi sąveikos kinetika – fluoksetinas greitai jungiasi ir lėtai disocijuoja, o venlafaksinas jungiasi lėčiau, bet sudaro itin stabilų kompleksą su mažiausia disociacijos greičio konstanta. Mirtazapinas išsiskiria greita asociacija ir greita disociacija, formuodamas mažiausiai stabilų kompleksą (K_D apie 10^{-6} M). Visų trijų vaistų sąveika su JSA yra spontaniška ($\Delta G < 0$), o fluoksetino ir venlafaksino Gibso laisvosios energijos reikšmės ($-38,9$ ir $-39,3 \text{ kJ/mol}$) yra artimos viena kitai ir didesnės nei mirtazapino ($-33,4 \text{ kJ/mol}$).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. OECD. A New Benchmark for Mental Health Systems: Tackling the Social and Economic Costs of Mental Ill-Health. OECD Health Policy Studies. 2021.
2. Vigo D, Thornicroft G, Atun R. Estimating the true global burden of mental illness. *The Lancet Psychiatry*. 2016. doi:10.1016/S2215-0366(15)00505-2
3. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*. 2022;9(2). doi:10.1016/S2215-0366(21)00395-3
4. Rehm J, Shield KD. Global Burden of Disease and the Impact of Mental and Addictive Disorders. *Current Psychiatry Reports*. 2019. doi:10.1007/s11920-019-0997-0
5. Dimitrijevic D, Fabian E, Funk-Weyer D, Landsiedel R. Rapid equilibrium dialysis, ultrafiltration or ultracentrifugation? Evaluation of methods to quantify the unbound fraction of substances in plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;651. doi:10.1016/j.bbrc.2023.02.021
6. Li P, Fan Y, Wang Y, Lu Y, Yin Z. Characterization of plasma protein binding dissociation with online SPE-HPLC. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep14866
7. Toma CM, Imre S, Vari CE, Muntean DL, Tero-Vescan A. Ultrafiltration method for plasma protein binding studies and its limitations. *Processes*. 2021. doi:10.3390/pr9020382
8. Jalali E, Sargolzaei J, Rajabi P. Investigating the interaction between sertraline hydrochloride and human serum albumin using equilibrium dialysis and spectroscopic methods. *Inorg Chem Commun*. 2024;166. doi:10.1016/j.inoche.2024.112586
9. Shahlaei M, Rahimi B, Nowroozi A, Ashrafi-Kooshk MR, Sadrjavadi K, Khodarahmi R. Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: Combination of spectroscopic and molecular modeling studies. *Chem Biol Interact*. 2015;242. doi:10.1016/j.cbi.2015.10.006
10. Kanazawa K, Cho NJ. Quartz Crystal Microbalance as a Sensor to Characterize Macromolecular Assembly Dynamics. Penza M, editor. *J Sens*. 2009 Jan 17;2009(1). doi:10.1155/2009/824947
11. Rodahl M, Höök F, Krozer A, Brzezinski P, Kasemo B. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments*. 1995;66(7). doi:10.1063/1.1145396
12. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*. 1959;155(2). doi:10.1007/BF01337937

13. Voinova M V, Rodahl M, Jonson M, Kasemo B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys Scr.* 1999;59(5). doi:10.1238/physica.regular.059a00391
14. Johannsmann D, Reviakine I. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring for studying soft matter at interfaces. *Nature Reviews Methods Primers.* 2024;4(1). doi:10.1038/s43586-024-00340-4
15. Eichelbaum F, Borngräber R, Schröder J, Lucklum R, Hauptmann P, Borngrä R, et al. Interface circuits for quartz-crystal-microbalance sensors ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN Interface circuits for quartz-crystal-microbalance sensors. *Review of Scientific Instruments.* 1999;70.
16. Höök F, Rodahl M, Brzezinski P, Kasemo B. Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. *Langmuir.* 1998;14(4). doi:10.1021/la970815u
17. Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K, Elwing H. Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal Chem.* 2001;73(24). doi:10.1021/ac0106501
18. Marx KA. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution - Surface interface. *Biomacromolecules.* 2003. doi:10.1021/bm020116i
19. Wasilewski T, Szulczyński B, Dobrzyniewski D, Jakubaszek W, Gębicki J, Kamysz W. Development and Assessment of Regeneration Methods for Peptide-Based QCM Biosensors in VOCs Analysis Applications. *Biosensors (Basel).* 2022;12(5). doi:10.3390/bios12050309
20. Plikusiene I, Maciulis V, Vertelis V, Juciute S, Balevicius S, Ramanavicius A, et al. Revealing the SARS-CoV-2 Spike Protein and Specific Antibody Immune Complex Formation Mechanism for Precise Evaluation of Antibody Affinity. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17). doi:10.3390/ijms241713220
21. Galanti M, Fanelli D, Piazza F. Conformation-controlled binding kinetics of antibodies. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep18976
22. Mars B, Heron J, Kessler D, Davies NM, Martin RM, Thomas KH, et al. Influences on antidepressant prescribing trends in the UK: 1995–2011. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2017;52(2). doi:10.1007/s00127-016-1306-4

23. Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba prie Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerijos. Ataskaita apie 2024 metais suvartotus vaistus. Vilnius; 2024.
24. Tayyab S, Feroz SR. Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021;123. doi:10.1016/bs.apcsb.2020.08.003
25. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014. doi:10.3390/ijms15033580
26. Bteich M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon.* 2019. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02879
27. Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine.* 2012. doi:10.1016/j.mam.2011.12.002
28. Tesseromatis C, Alevizou A. The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;33(4). doi:10.1007/BF03190876
29. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 1992;358(6383). doi:10.1038/358209a0
30. Ryan AJ, Ghuman J, Zunszain PA, Chung C wa, Curry S. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *J Struct Biol.* 2011;174(1). doi:10.1016/j.jsb.2010.10.004
31. Zhu L, Yang F, Chen L, Meehan EJ, Huang M. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. *J Struct Biol.* 2008;162(1). doi:10.1016/j.jsb.2007.12.004
32. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol.* 2012;52(3–4). doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011
33. Ràfols C, Amézqueta S, Fuguet E, Bosch E. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). *J Pharm Biomed Anal.* 2018;150. doi:10.1016/j.jpba.2017.12.008
34. Joshi R, Jadhao M, Kumar H, Ghosh SK. Is the Sudlow site I of human serum albumin more generous to adopt prospective anti-cancer bioorganic compound than that of bovine: A combined

- spectroscopic and docking simulation approach. *Bioorg Chem.* 2017;75. doi:10.1016/j.bioorg.2017.10.013
35. Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology*. Stahl's Essential Psychopharmacology. 2021. doi:10.1017/9781108975292
 36. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet.* 2018;391(10128). doi:10.1016/S0140-6736(17)32802-7
 37. Gillis EP, Eastman KJ, Hill MD, Donnelly DJ, Meanwell NA. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem.* 2015;58(21). doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00258
 38. DailyMed. Choice Reviews Online. 2007;44(05). doi:10.5860/choice.44-2734
 39. Katrahalli U, Jaldappagari S, Kalanur SS. Study of the interaction between fluoxetine hydrochloride and bovine serum albumin in the imitated physiological conditions by multi-spectroscopic methods. *J Lumin.* 2010;130(2). doi:10.1016/j.jlumin.2009.07.033
 40. Dangkoob F, Housaindokht MR, Asoodeh A, Rajabi O, Rouhbakhsh Zaeri Z, Verdian Doghaei A. Spectroscopic and molecular modeling study on the separate and simultaneous bindings of alprazolam and fluoxetine hydrochloride to human serum albumin (HSA): With the aim of the drug interactions probing. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;137. doi:10.1016/j.saa.2014.08.149
 41. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry.* 2018. doi:10.1055/s-0043-116492
 42. Papakostas GI, Fava M. Pharmacotherapy for depression and treatment-resistant depression. *Pharmacotherapy for Depression and Treatment-Resistant Depression.* 2010. doi:10.1142/7468
 43. Spina E, Hiemke C, De Leon J. Assessing drug-drug interactions through therapeutic drug monitoring when administering oral second-generation antipsychotics. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology.* 2016. doi:10.1517/17425255.2016.1154043
 44. Shahabadi N, Hadidi S. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;122. doi:10.1016/j.saa.2013.11.016

45. Watanabe N, Omori IM, Nakagawa A, Cipriani A, Barbui C, Churchill R, et al. Mirtazapine versus other antidepressive agents for depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011. doi:10.1002/14651858.cd006528.pub2
46. Mrkalić E, Jelić R, Stojanović S, Sovrlić M. Interaction between olanzapine and human serum albumin and effect of metal ions, caffeine and flavonoids on the binding: A spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021;249. doi:10.1016/j.saa.2020.119295
47. Scherf-Clavel M, Baumann P, Hart XM, Schneider H, Schoretsanitis G, Steimer W, et al. Behind the Curtain: Therapeutic Drug Monitoring of Psychotropic Drugs from a Laboratory Analytical Perspective. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2024. doi:10.1097/FTD.0000000000001092
48. Seyfinejad B, Ozkan SA, Jouyban A. Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: Analytical methods. *Talanta*. 2021. doi:10.1016/j.talanta.2020.122052
49. Salem AA, Lotfy M, Amin A, Ghattas MA. Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques. *Biochem Biophys Rep*. 2019;20. doi:10.1016/j.bbrep.2019.100670
50. Birchenough HL, Jowitt TA. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D): Preparing Functionalized Lipid Layers for the Study of Complex Protein–Ligand Interactions. In: *Methods in Molecular Biology*. 2021. doi:10.1007/978-1-0716-1197-5_7
51. Wu C, Li X, Song S, Pei Y, Guo L, Pei Z. QCM biosensor based on polydopamine surface for real-time analysis of the binding kinetics of protein-protein interactions. *Polymers (Basel)*. 2017;9(10). doi:10.3390/polym9100482
52. Soltermann F, Struwe WB, Kukura P. Label-free methods for optical: In vitro characterization of protein-protein interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021;23(31). doi:10.1039/d1cp01072g
53. Nirschl M, Reuter F, Vörös J. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis. *Biosensors*. 2011. doi:10.3390/bios1030070
54. Hook FF, Vörös J, Rodahl M, Kurrat R, Böni P, Ramsden JJ, et al. A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2002;24(2). doi:10.1016/S0927-7765(01)00236-3

55. Pacifici GM, Viani A. Methods of Determining Plasma and Tissue Binding of Drugs: Pharmacokinetic Consequences. *Clinical Pharmacokinetics*. 1992. doi:10.2165/00003088-199223060-00005
56. Linkins LA, Choi PT, Douketis JD. Clinical Impact of Bleeding in Patients Taking Oral Anticoagulant Therapy for Venous Thromboembolism: A Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2003. doi:10.7326/0003-4819-139-11-200312020-00007
57. Yuet WC, Derasari D, Sivoravong J, Mason D, Jann M. Selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of gastrointestinal and intracranial bleeding. *Journal of the American Osteopathic Association*. 2019. doi:10.7556/jaoa.2019.016
58. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2002. doi:10.1067/mcp.2002.121829
59. Heuberger J, Schmidt S, Derendorf H. When is protein binding important? *J Pharm Sci*. 2013;102(9). doi:10.1002/jps.23559
60. Alhankawi AR, Al-Husseini JK, Spindler A, Baker C, Shoniwa TT, Ahmed M, et al. The Relationship between Hydrophobicity and Drug-Protein Binding in Human Serum Albumin: A Quartz Crystal Microbalance Study. *Biophysica*. 2022;2(2). doi:10.3390/biophysica2020012
61. Yoshida K, Zhao P, Zhang L, Abernethy DR, Rekić D, Reynolds KS, et al. In Vitro–In Vivo Extrapolation of Metabolism- and Transporter-Mediated Drug–Drug Interactions—Overview of Basic Prediction Methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. doi:10.1016/j.xphs.2017.04.045
62. Jiménez JS, Benítez MJ. Gibbs Free Energy and Enthalpy–Entropy Compensation in Protein–Ligand Interactions. *Biophysica*. 2024;4(2). doi:10.3390/biophysica4020021
63. Yamasaki K, Hyodo S, Taguchi K, Nishi K, Yamaotsu N, Hirono S, et al. Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. *PLoS One*. 2017;12(6). doi:10.1371/journal.pone.0180404
64. Eap CB, Gründer G, Baumann P, Ansermot N, Conca A, Corruble E, et al. Tools for optimising pharmacotherapy in psychiatry (therapeutic drug monitoring, molecular brain imaging and pharmacogenetic tests): focus on antidepressants. *World Journal of Biological Psychiatry*. 2021. doi:10.1080/15622975.2021.1878427
65. Wang Z, Li L, Huang S, Wang X, Liu S, Li X, et al. Joint population pharmacokinetic modeling of venlafaxine and O-desmethyl venlafaxine in healthy volunteers and patients to evaluate the

impact of morbidity and concomitant medication. *Front Pharmacol.* 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.978202

66. Timmer CJ, Ad Sitsen JM, Delbressine LP. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clinical Pharmacokinetics.* 2000. doi:10.2165/00003088-200038060-00001
67. Patching SG. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2014. doi:10.1016/j.bbamem.2013.04.028