

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

И22 - Радиофармација

Радиолиганд везивање

Четврта недеља наставе

Оглед (есеј) радиолиганд везивање

- Оглед радиолиганд везивања представља везивање лиганда за протеинску мету.
- У лиганде спадају неуротрансмитери, хормони, фактори раста, цитокини, лекови, токсини.
- У протеинске мете спадају рецептори, јонски канали и транспортни молекули.
- Интеракција између лека и протеинске мете представља основни механизам дејства лека.
- Процена афинитета ендогеног лиганда (нпр. хормона) или егзогеног лиганда (нпр. лекова) и њихових протеинских мета (нпр. рецептора) постиже се применом специфичних, радиоизотопски обележених лиганда - **радиолиганда**.

Оглед (есеј) радиолиганд везивање

- Огледи радиолиганд везивања омогућавају директан приступ у проучавању рецептора у препаратима ткива и њихове промене настале услед дејства лекова, болести или експерименталних услова.
- Експерименти радиолиганд везивања нису засновани на антигенској специфичности због чега имају предност у односу на радиоимуно есеје.
- За експерименте радиолиганд везивања неопходно је:
 1. Ткиво које садржи одговарајуће (жељене) рецепторе.
 2. Радиолиганд.
 3. Одговарајућа техника одвајања везаног од не везаног (слободног) лиганда.
 4. Апарат за детекцију радиокативности узорка.

Оглед (есеј) радиолиганд везивање

- Експериментална процедура радиолиганд везивања се састоји из следећих фаза:
 1. Припрема ткива и инкубација.
 2. Хомогенизација.
 3. Инкубација.
 4. Филтрирање.
 5. Испирање.
 6. Мерење на бројачу.
 7. Анализа добијених података.
- Експерименти радиолиганд везивања пружају информације само о афинитету лиганда према његовом рецептору.
- Да би се утврдило да ли је лиганд агониста или антагониста потребни су додатни (функционални) експерименти.

Радиолиганд

- Лиганд мора да буде селективан према типу или подтипу рецептора, приликом инкубације.
- Могу да се користе и агенси који спречавају везивање лиганда за друга везивна места.
- Лиганд-антагониста је најчешћи тип лиганда у интеракцији рецептор-лиганд. На ову интеракцију утичу присуство катјона, pH -вредност и присуство нуклеотида.
- Афинитет лиганда, према рецептору је битан фактор, обзиром да константа дисоцијације утиче на време инкубације као и на избор технике за одвајање (сепарацију).

Радиолиганд



- Брзина разлагања комплекса **[лиганд-рецептор]** не сме бити ни превише брза ни превише спора у односу на време које је потребно да се изврши мерење комплекса радиолиганд-рецептор на бројачу.
- Радиолиганд треба да буде растворан и стабилан у ензимском или хемјском инкубационом раствору (медијуму).
- Из невденог разлога, неопходна је употреба антиоксиданаса или инхибитора ензима. Чистоћа лиганда је такође важна и треба да се одређује нарочито када се лиганд добија синтетичким путем.
- Одговарајуће складиштење радиолиганда представља кључан фактор код ових експеримената.

Радиолиганд



- Одговарајуће складиштење радиолиганда се постиже додавањем раствора који су чистачи слободних радикала или складиштењем на ниским температурама.
- Увек треба водити рачуна о подацима који потичу од произвођача, ако је лиганд комерцијално набављен.
- Безбедно складиштење подразумева и коморе у којима се радиолиганд налази, а да се при томе избегне контаминација радиоактивним зрачењем.
- Лиганд (референтна или главна супстанца) мора да поседује биолошку активност обзиром да је везивање за место препознавања (рецептор) повезано са фармаколошким дејством (антагонистичким или агонистичким).

Чистоћа радиолиганда



- Неопходна је чистоћа високог степена и погодно место за складиштење (чување) лиганда јер нечистоће и неадекватно руковање могу да убрзају процес распадања.
- Процес распадања може да се смањи, на следеће начине:
 - ⇒ Уношењем чистача слободних радикала (нпр. етанола) у раствор лека.
 - ⇒ Чувањем на, што је могуће, нижој температури, али без замрзавања.
 - ⇒ Чувањем од светлости (тамне бочице).
 - ⇒ Додавањем антиоксиданаса (нпр. аскорбинске киселине).

Радиоактивни изотопи



- Радиоактивни изотоп треба да поседује одговарајућу специфичну радиоактивност која обезбеђује детекцију везивања при врло ниским концентрацијама.
- Трицијум (^3H) је изотоп који се најчешће користи у оваквим експериментима.
- Трицијум се инкорпорира у молекул директном синтезом или у реакцијама измене са водоником (^1H).
- Особине лиганда који садржи трицијум у својој структури (радиолиганд) су идентичне матичном лиганду (без трицијума) и поседује радиоактивност са другим временом полу-распада (12,5 година).

Радиоактивни изотопи



- Радиоактивни изотоп јода (^{125}I) има већи специфичну радиоактивност у односу на трицијум. Међутим, често јод није део молекула у структури лиганда, као што је то случај са трицијумом.
- Јод (^{125}I) се најчешће налази у радиолиганду као резултат измене са јодом или као додатни атом, који утиче на биолошку активност лиганда. Време радиоактивног полураспадања (полуживот) јода (^{125}I) је 60 дана, што утиче на време његове употребе.
- Поред наведених, користе се и други радиоактивни изотопи попут сумпора ^{35}S , фосфора ^{32}P и флуора (^{18}F), мада се јод (^{125}I) и трицијум (^3H) најчешће користе.

Радиолиганд - дефиниција



- *"Биохемијска супстанца обележена радиоактивним изотопом која се користи у експериментима за проучавање рецепторских система у организму."*
- Већина радиолиганда је комерцијално доступна, што омогућава уштеду у времену приликом експеримената.

Радиоизотопско обележавање



- Радиоизотопско обележавање активне супстанце (лека) радиоактивним изотопом мора бити такво да се постигне висока специфична активност при чему се користе врло ниске (у траговима) концентрације. Најчешће се врши употребом трицијума (^3H) или јода (^{125}I).
- Предности радиоизотопског обележавања трицијумом (^3H):
 - ▶ Могућност радиоизотопског обележавања супстанце без промена њене нативне структуре.
 - ▶ Висока специфична радиоактивност ($> 80 \text{ Ci/nmol}$).
 - ▶ Добра стабилност изотопски обележене супстанце ако се добро складишти, ондосно чува.
 - ▶ Време полу-распада 12,5 година.

Радиоизотопско обележавање



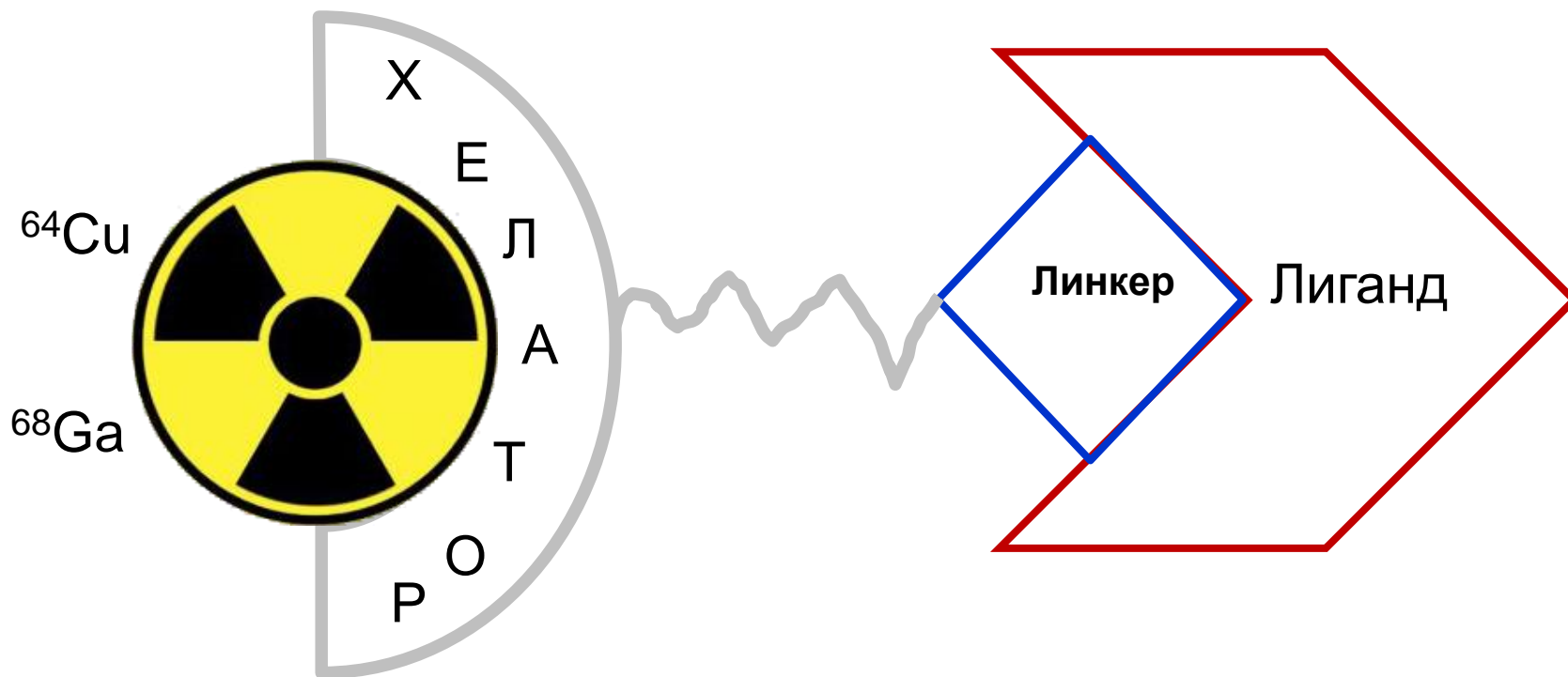
- Недостаци радиоизотопског обележавања трицијумом (^3H):
 - ▶ Услови под којима се врши изотопско обележавање трицијумом (лабораторије).
 - ▶ Изотопско обележавање нпр. неке нове потенцијално активне супстанце је веома скупо.
- Предности радиоизотопског обележавања јодом ^{125}I :
 - ▶ Код супстанци које у својој структури поседују ароматску хидроксилну групу (нпр. тирозин у пептидима), јод ^{125}I може да се уведе у структуру молекула са високом специфичном радиоактивношћу од $> 2000 \text{ Ci/nmol}$.
 - ▶ Реакција обележавања јодом ^{125}I (јодовање) је изводљива у лабораторијским условима без захтева специјалних услова и опреме.

Радиоизотопско обележавање



- Недостаци радиоизотопског обележавања јодом ^{125}I :
 - ▶ Јављају се производи распадања у току реакција јодовања и у току складиштења.
 - ▶ Биолошка активност јода може да се смањи.
 - ▶ Кратко време полу-распадања од 60 дана.

Радиоактивни трејсер



⇒ Хелатор представља двофункционални хелат који се једним делом веже за метални јон а другим делом ковалентно веже за "нишањени молекул" (лиганд).