

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

И22 - Радиофармација

Радиолиганд везивање: ефикасност детекције,
израчунавање концентрације радиолиганда,
радиоактивни распад, интактне ћелије; имидазолински
рецептори

Седма недеља наставе

Ефикасност детекције радиоактивности



- Није могуће детектовати сваки радиоактивни распад. Део (фракција) радиоактивног распадања које детектује бројач представља радиоактивну ефикасност.
- Ефикасност се одређује мерењем стандардног узорка под истим експерименталним условима под којим се мери непознати узорак.
- Детектовање гама зрачења, које емитују изотопи, попут ^{125}I , је такво да је ефикасност преко 90 одсто, у зависности од облика бројача.
- Детектор не окружује у потпуности суд са узорком (нпр.: епрувета), тако да мањи делови (фракције) гама зрачења (фотони) пролазе поред детектора.
- Ефикасност у детекцији зрачења које емитује ^3H је око 40 одсто.

Ефикасност детекције радиоактивности



- Када се атом трицијума распада, неутрон се преводи у протон при чему се ослобађају електрон (β^- - бета минус честица) и неутрино.
- Енергија која се ослобађа потиче од неутрина (који се не детектује) и електрона (који се детектује). Када електрон има довољну енергију онда може да пређе довољно дуг пут и да се судари са молекулом флуора, присутног у сцинтилационој течности.
- Сцинтилациона течност појачава сигнал и даје светлосни одсјај (флуоресценцију - молекулска емисија) који се детектује на сцинтилационом бројачу. Уколико енергија електрона није довољна онда не долази до његовог судара са флуором и нема детекције.
- Обзиром да се највећи део трицијума не распада на фотоне, ефикасност мерења бројачем је много мања од 100 одсто. Оваква ниска ефикасност је последица физичког (радиокативног) распадања и на њу неможе да се утиче.

Ефикасност детекције радиоактивности



- Енергија електрона који се емитују приликом распадања трицијума је мала и може да се детектује само ако се електрони директно сударају са молекулом флуора у сцинтилацној течности.
- Радиоактивност која је присутна у ткиву као и радиоактивни материјал у воденој фази који није добро измешан са сцинтилационом течношћу, није могуће детектовати.

Специфична радиоактивност



- Представља број распада у минути (*cpm*-од енгл. *counts per minute*) и изражава се у јединици [*cpm/fmol*] ($1 \text{ fmol} = 1 \times 10^{-15} \text{ mol}$).
- Специфична радиоактивност радиолиганда може да се изрази у Киријима ("Curie") по милимолу [*Ci/mmol*] или у гигабекерелима по милимолу [*Gbлђ/mmol*].

Специфична радиоактивност



- Ако је специфична радиоактивност радиолиганда изражена у киријима по милимолу [$Ci/mmol$].
- $1\ C_i = 2,22 \times 10^{12}$ распада у минути.
- Онда се превођење $C_i/mmol$ у $cpm/fmol$ врши помоћу следеће једначине:

$$1 \frac{cpm}{fmol} = 1 \frac{Ci}{mmol} \cdot 2,22 \cdot E$$

- Е-ефикасност [%]
 - нпр. 90 % = 0,90

Специфична радиоактивност



- Ако је специфична радиоактивност радиолиганда изражена у гигабеккерелима по милимолу [$Gb\text{л} / mmol$].
- 1 бл = 1 распад у секунди \Rightarrow 1 $Gb\text{л} = 10^9$ распада у секунди.
- Онда се превођење $Gb\text{л} / mmol$ у $cpm / fmol$ врши помоћу следеће једначине:

$$1 \frac{cpm}{fmol} = 1 \frac{Gbq}{mmol} \cdot 0,06 \cdot E$$

- Е-ефикасност [%]
 - нпр. 90 % = 0,90

Израчунавање концентрације радиолиганда



- Израчунавање концентрације радиолиганда врши се на основу следеће једначине:

$$C_{radioligand} = \frac{\overline{C}}{\overline{Y}} \cdot V$$

C - измерена радиоактивност [cpm]

V - запремина раствора [ml]

Y - специфична радиоактивност лиганда [$cpm/fmol$]

$C_{radioligand}$ - [pM]

- Употребом стандардних (stock) раствора, врши се мерење cpm -а на малу запремину раствора.

Радиоактивни распад



- Радиоактивни распад је дат експоненцијалном једначином:

$$N_t = N_0 \cdot e^{-K_{\text{расп}} \cdot t}$$

N_0 - број почетних радиоактивних атома

N_t - број преосталих радиоактивних атома

$K_{\text{расп}}$ - константа брзине радиоактивног распадања [min^{-1}].

Радиоактивни распад



- Сваки изотоп има своју $K_{\text{расп}}$ која се изражава у min^{-1} .
- Време полураспада ($t_{1/2}$) - време потребно да би се половина од укупне количине радиоактивног изотопа распала.
- Једначина која повезује $K_{\text{расп}}$ и $t_{1/2}$:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{K_{\text{расп}}} = \frac{0,693}{K_{\text{расп}}}$$

Време полураспада, константа брзине распада и специфичне радиоактивности неких радиоизотопа



- У табели су дате вредности времена полураспадања, константе брзине распадања и специфичне радиоактивности радиоактивних изотопа који се најчешће користе.
- Вредности специфичне радиоактивности се односе у случају када се узме у обзир да је сваки молекул обележен једним радиоактивним изотопом, што је чест случај са ^{125}I и ^{32}P .
- Молекул који је обележен триуцијумом често садржи инкорпорирана два или три атома триуцијума, што повећава интензитет радиоактивности.

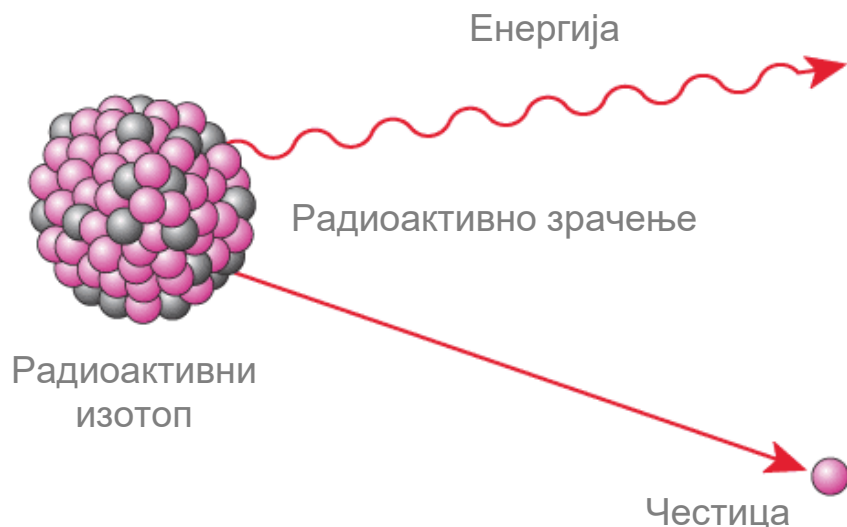
Изотоп	Полувреме	$K_{\text{расп}}$	Специфична радиоактивност
^3H	12,43 година	0,056/година	28,7 Ci/mmol
^{125}I	59,6 дана	0,0116/дан	2190 Ci/mmol
^{32}P	14,3 дана	0,0485/дан	9128 Ci/mmol
^{35}S	87,4 дана	0,0079/дан	1493 Ci/mmol

Преостали удео (фракција)



- За израчунавање радиоактивног распада, познавајући датум од када је мерена концентрација и специфична радиоактивност, користи се следећа једначина:

$$N_{preostalo} = e^{-K_{rasp} \cdot t}$$



- Специфична радиоактивност се не мења током времена већ се мења концентрација радиолиганда.
- Нпр., након периода од 20 дана преостали удео радиоактивног изотопа ^{125}I је 79,5 одсто.
- Енергија која се ослобађа у току радиоактивног распадања разлаже лиганд тако да се он више не налази у везаном облику са рецептором. Због тога се у експериментима увек користе свеже направљени радиолиганди или се користе као поново пречишћени.

Примена технике радиолиганд везивања



- Компетициони експерименти (инбиција или измена).
- Идентификација и лоцирање рецептора у органима (нпр. ауторадиографија, скенирање мозга, код људи).
- Мерење лекова и трансмитера у телесним течностима.
- Процена промене повезане са степеном обољења тј. болести.

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

- ▶ Један од приступа у радиолиганд експериментима је употреба интактних ћелија као врста ткива за инкубацију. Предност оваквог приступа је у томе што је структура мембранског рецептора у нативном стању, као и структуре рецептора у ћелијском компартменту.
- ▶ Ограничења употребе интактних ћелија уместо ћелијских мембрана у радиолиганд експериментима су следећа:
 - Утицај различитих неорганских јона на везивни афинитет.
 - Осетљивост гуанинских нуклеотида.
 - Хидрофобна или хидрофилна природа радиолиганда.
 - Субћелијска локализација рецептора и интернализација и рециклирање рецептора индуковано агонистима.
 - Лиганди за мускаринске рецепторе могу бити ћелијски непропусни и ћелијски пропусни антагонисти и агонисти.
 - Лиганди за соматостатинске рецепторе су пептидни агонисти.

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

► Рециклирање мембрана

- Рани ендозом у свом везикуларном делу концентрише потребне материје за ћелију, а његов тубуларни део враћа део мембране са рецепторима.
- У касном ендозому налазе се концентрисане материје које ћелија користи. Постоје две ћелијске форме касног ендозома: тубуловезикуларна форма и мултивезикуларно тело.
- Мултивезикуларно тело је најмање изучена форма; испуњена је ситним везикулама; претпоставља се да је органела која служи за депоновање протеина.
- Велики број касних ендозома улази у мембрански деградациони компартмент ћелије - лизозомски систем.

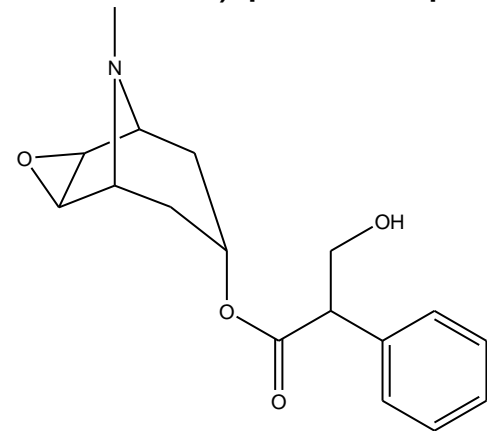
Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

► Интернализација рецептора

- Процес при коме награђени комплекс лиганд-рецептор улази у унутрашњост ћелије ендоцитозом.
- Лиганд се везује за мембрански рецептор, али своје деловање остварује нпр. у ћелијском једру.
- Овим механизмом делују фактор раста нервних ћелија (*NGF*) и бета-агонисти на еритроците.

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

- ▶ Последице интернализације и рециклирања рецептора у радиолиганд експериментима у интактним ћелијама су различите у погледу агониста и антагониста, јер су агонисти ти који иницирају процес интернализације.
- ▶ Експерименти који се односе на површински део рецептора са мембрански непропусним антагонистом се рутински изводе (нпр. [^3H]-N-метил-скополамин за мускаринске рецепторе).
- ▶ Док је мерење укупног (површинског и интернализованог) рецептора доста сложеније.



[^3H]-N-метил-скополамин

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

- ▶ Мембрански пропусни лиганд-антагонисти (као што су [^3H]-скополамин или [^3H]-хинуклидинил бензилат) не могу подједнако заокупирати и мембранске и интернализоване рецепторе. Највероватније због pH вредности ендозомалног компартмента ($pH < 5,5$) на којој радиолиганд има низак афинитет.
- ▶ Везивање радиолиганд-агонисте у интактним ћелијама доводи до интернализације лиганда као и до везивања за површину. То је могуће доказати једино на лигандима који поседују висок афинитет, а то су најчешће пептиди обележени [^{125}I].

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

- ▶ Постоје два основна експериментална протокола за радиолиганд везивање у интактним ћелијама:
 - ▶ примена ћелијске суспензије и
 - ▶ адхерентних ћелија
- ▶ За оглед у ћелијској суспензији, користи се поступак сличан радиолиганд везивању за мембрану:
 - ▶ филтрација “убраних ћелија” (ћелија након жетве). Овај протокол је погодан за обимније огледе.

Радиолиганд везивање у интактним ћелијама

- ▶ Познато је да интернализација и рециклирање рецептора зависе од структуре цитоскелета која се значајно мења при преласку из адхерентних ћелија у ћелијску суспензију. За мање обимне огледе погодније су адхерентне ћелије, чиме се олакшава и убрзава цео процес.
- ▶ Две основне процедуре радиолиганд везивања у интактним ћелијама:
 - Везивање антагонисте за мускаринске ацетилхолинске рецепторе на интактним ћелијама које су залепљене за плочице са више бунарчића.
 - Везивање и интернализација радиолиганда-соматостатина (лиганд агониста).

Имидазолински рецептори

► Фармаколошке класе:

⇒ I₁- имидазолински рецептори

- учествују у централној инхибицији симпатикуса која проузрокује снижење крвног притиска;

⇒ I₂- имидазолински рецептори

- представљају алостерно место везивања моноамино оксидазе Б (МАО-Б)

⇒ I₃- имидазолински рецептори

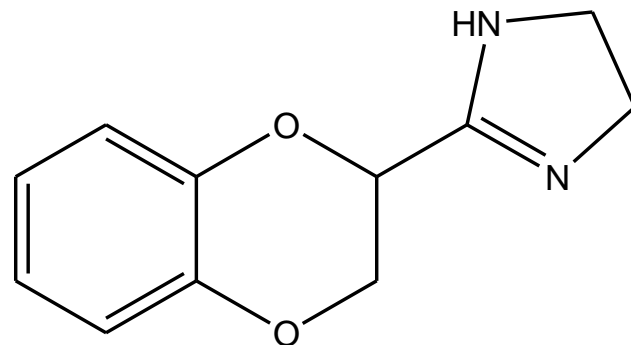
- регулишу секрецију инсулина из β-ћелија панкреаса. Због своје улоге у организму све три класе имидазолинских рецептора представљају веома важно циљно место за истраживања нових лекова.

Карактеризација имидазолинских рецептора

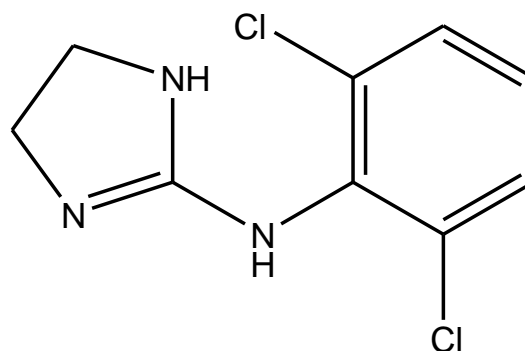
- Претходних година су интензивно изучавани фармаколошки ефекти активације имидазолинских рецептора, као и њихова повезаност са активацијом других сигналних путева.
- Услед недостатка селективних радиолиганада са високим афинитетом за имидазолинске I_1 -рецепторе отежано је њихово обележавање и идентификација (ауторадиографија).
- Имидазолински I_1 -рецептори су највише заступљени на ретикуларним нуклеусима у možданом стаблу, те је из тог разлога тешко добити ткива за извођење студија везивања. Међутим, студије везивања за имидазолинске I_1 -рецепторе могу се изводити и на хромафиним ћелијама које су доступније.
- За разлику од имидазолинских I_1 -рецептора, имидазолински I_2 -рецептори се веома лако обележавају и идентификују у различитим ткивима, нарочито ако се користе радиолиганди са високим афинитетом и селективношћу за имидазолинске I_2 -рецепторе.

Карактеризација имидазолинских рецептора

- Радиолиганд $[^3\text{H}]$ идазоксан се најчешће користи за идентификацију имидазолинских I_2 -рецептора у експериментима радиолиганд везивања.
- Поседује висок афинитет према α_2 -адренергичким рецепторима као и $[^3\text{H}]$ клонидин.
- Користи се заједно са α_2 -адренергичким антагонистом (рауволскин) којим се адренергички рецептори “маскирају” и на тај начин омогућава везивање радиолиганда за имидазолинске I_2 -рецепторе.



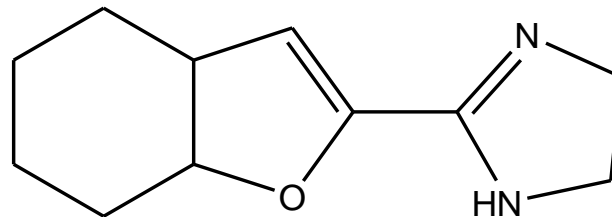
$[^3\text{H}]$ идазоксан



$[^3\text{H}]$ клонидин

Карактеризација имидазолинских рецептора

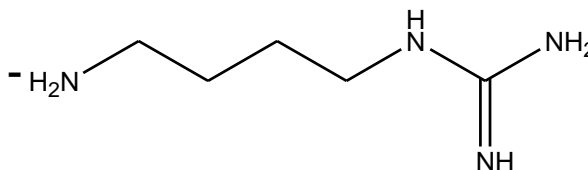
- Новији радиолиганди, као нпр. [^3H]2-BFI (2-(2-бензофуранил-2-имидазолин) не поседују афинитет према адренергичким рецепторима а поседују високу селективност и афинитет према имидазолинским I_2 -рецепторима.
- [^3H]2-BFI је подједнако афинитетан према оба подтипа имидазолинских I_2 -рецептора (А и В).



[^3H]2-BFI

Карактеризација имидазолинских I₂-рецептора

- Имидазолински I₂-рецептори су на основу разлике у афинитету за амилорид подељени на два подтипа: I_{2A} и I_{2B}. Подтип имидазолинских I_{2A}-рецептора има висок афинитет за амилорид.
- Фотоафинитетни радиолиганд 2-(3-азидо-4-¹²⁵I-јодофенокси)метил-имидазолин користи се за иреверзибилно везивање за имидазолинске I₂-рецепторе.
- Имидазолински I₂-рецептори су присутни у мозгу, периферним ткивима и локализовани су на ензиму моноамино оксидази.
- Поменути рецептори утичу на снижење моноамина у мозгу тако да могу имати улогу у депресији. Густина имидазолинских I₂-рецептора се мења у зависности од обољења у мозгу (Алцхајмерова деменција, опиоидна зависност, депресија).
- Ендогени лиганд за ове рецепторе је **агматин** -



Карактеризација имидазолинских рецептора

- Постоје многи докази и о постојању имидазолинских рецептора који су везани за калијумске канале и они се означавају као "атипични".
- "Атипични" имидазолински рецептори имају улогу у регулисању секреције инсулина.
- Низак афинитет за поменуте рецепторе имају [^3H]клонидин и [^3H]2-BFI, а мало већи афинитет везивања показује [^3H]-2-метокси-идазоксан.
- Њихово проучавање у радиолиганд експериментима је отежано јер захтевају везивање у наномолском концентрационом опсегу.

Карактеризација имидазолинских рецептора

	I ₁ -рецептори	I ₂ -рецептори
Радиолиганди	[³ H]клонидин	[³ H]идазоксан
	[³ H]- <i>p</i> -аминоклонидин	[³ H]2-BFI
	[¹²⁵ I]- <i>p</i> -аминоклонидин	[³ H]RS-45041-190
	[³ H]моксонидин	
Извор рецептора	Говеђа мождина	Адипоцити, мозак, бубрег, јетра пацова
	Говеђа адренергичка мождина	мозак, бубрег, јетра зеца
	Хумани тромбоцити	Мозак заморчета
	NG108-15 ћелије	
	PC12-ћелије	
Сигнални пут	Спрегнути са фосфолипазом C	Повезани моноамино оксидазом
Функција	Модулација крвног притиска, клонидин и моксонидин су агонисти	Модулација " <i>turnover</i> " моноамина у мозгу
	Повећавају диурезу и натриурезу у бубрезима	Повећање густине рецептора код пацијената са Алцхајмеровом болешћу и смањење густине код пацијената са Хантингтоновом болешћу и код морфинских зависника
		Инхибиција преузимања натријума у бубрезима пацова