

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

И22 - Радиофармација

Радиолиганд везивање: припрема ткива, методе за
одвајање везаног од невезаног лиганда

Пета недеља наставе

Припрема ткива

- У ткива која су важна за експеримент радиолиганд везивања спадају:
 - ▶ Мембране.
 - ▶ Синаптозоми.
 - ▶ Ћелијске културе.
 - ▶ Исечак ткива.
 - ▶ Солубизирани рецептори.
- Одабрано ткиво мора да садржи места за везивање/препознавање (тј. рецепторе).
- Фактори који утичу на одабир ткива су рецептори и хипотеза која се проверава у експерименту.
- Оваква припрема ткива не подразумева начин који се односи на припрему хистолошких препарата.

Припрема ткива

- У току саме припреме ткива узорци се испитају да би се отклоноли ендгоени лиганди тако што се врши ресуспензија или центрифугирање.
- **Изоловање ћелијских препарата:**
 - За радиолиганд екперименте успешно се користе примарне ћелијске културе, ћелијске линије, механички акунто одвојене ћелије.
 - Ензимска дисоцијације се такође користи, мада ова метода доводи до елиминације рецептора.
 - Постоје бројне методе које се користе за припрему оваквих прпарата и њихова примена зависи од типа ћелија.

Припрема ткива

□ Припрема ћелијских мембрана:

- Процес се састоји од добијања грубе синаптозомалне фракције, затим испирања, лизе и градијетног цетифугирања, до специфичнијих метода. Све то зависи од локације и заступљености везивних места у фракцији која се користи. Уопште, најбољи метод за почетно лоцирање везивних места у грубом хомогенату је преко P_3 -пелета. Центрифугирањем на 125,000 обрт./мин, у току 10 мин настају P_3 -пелети (донорске мембране).

□ Растворни рецептори:

- У растворне рецепторе спадају цитоплазматски растворни рецептори или солубилизирани мембрански рецептори (модификовани да буду растворни).

Преинкубација



- У већини техника радиоиганд везивања неопходна је преинкубација или фаза прања.
- Узорци се преинкубирају у пуферу са циљем да се уклоне ендогени лиганди или лекови који су предходно примењени.
- Често пуфер није довољан да изазове дисоцијацију лиганда па се примењују и друге процедуре, попут додавња аденинских нуклеотида. Фактори који утичу на преинкубацију су пуфер, време, температура, запремина и број извршених преинкубација.
- Преинкубација хомогената подразумева суспензију узорка у пуферу и градијентно центрифугирање.

Инкубација



- Радиолиганд се уноси у пуфер у присуству или одсуству агенаса за замену, модулятора или осталих лекова од интереса.
- Радиолиганд се везује (у идеалном случају) за рецепторе при чему се постиже равнотежа између везаног и невезаног (слободног) лиганда.
- Услови инкубације у ин витро експериментима треба да буду подешени тако да се очува структура и лиганда и рецептора тј. места везивања.
- Фактори који утичу на инкубацију су концентрација протеина, запремина есеја, адитиви, температура и подешавање оптималног времена инкубације.

Фактори који утичу на инкубацију



- **Концентрација протеина**

Треба да буде у опсегу од 0,1-1,0 mg протеина мембране / ml.

- **Запремина есеја**

Обично је од 0,25 ml до 1,0 ml.

- **Адитиви**

Користе се ради заштите лиганда и ткива: инхибитори протеаза, уколико је лиганд пептид, антиоксиданси (нпр. аскорбинска киселина) ако је лиганд подложен оксидацији (нпр. катехоламини).

- **Температура**

Представља значајан фактор у експериментима радиолиганд везивања. Обично су пожељне ниже температуре (приближно 0°C) нарочито уколико је комплекс лиганд-рецептор врло нестабилан.

- **Подешавање оптималног времена инкубације**

Обезбеђује је се да реакција везивања постигне стање равнотеже.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



- Након инкубације узорка (ткива) са радиолигандом везани лиганд, у облику комплекса радиолиганд-рецептор, се одваја од не везаног (слободног) лиганда.
- Испирање комплекса се врши ради смањења количине било ког остатка слободног лиганда.
- Одвајање (сепарација) је врло важан корак у експериментима радиолиганд везивања.
- Прекомерно одвајање може да доведе и до разлагања комплекса рецептор-радиолиганд (потцењивања рецептора), док неадекватно испирање може довести до прецењивања рецептора.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



- Нестабилан комплекс се одваја техником која умањује распадање комплекса.
- Теоријски, дозвољено време за испирање и одвајање комплекса може да се израчуна преко константе K_D .
- Методе којима се врши одвајање везаног од слободног (не везаног) лиганда у екпериментима радиолиганд везивања у хомогенату или ћелијама су: филтрација, центрифугирање, дијализа, гел филтрација или филтрација на колони гела, преципитација, атсорпција.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



□ Филтрација

- Вакуум филтрација је најчешће примењивана метода при чеми се везани лиганд (комплекс) одваја тако што се задржава на филтеру захваљујући његовим атхезионим особинама.
- Даље, радиолиганд-рецептор комплекс се испира и емулгује течним сцинтилантом, инкубацијом преко ноћи (12^h).
- Користе се микро-филтери, а могућа је и ручна вакуумфилтрација.
- Пуфер за испирање комплекса је "ледено хладан" у циљу смањења распадања комплекса и ако је могуће (идеално) исти који се корисити и за припрему есеја.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



□ Центрифугирање

- При центрифугирању везани лиганд (комплекс) остаје у насталом пелету.
- Обавља се у микроепруветама, од 1,5 ml, за центрифугирање при 11000 до 15000 обртаја у времену од 5 минута.
- Слободни лиганд се налази у супернатанту и може да се uklони аспирацијом или *Pasteur*-овом пипетом.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



□ Дијализа

- Користи се за врло нестабилне комплексе, припрему растворних рецептора, нарочито протеина плазме.
- Рецептор и пуфер се одвајају преко полупропустљиве (семипермеабилне) мембране у малим ћелијама за дијализу, што обезбеђује еквилибрацију радилоганда мале молекулске масе.
- Одређивањем концентрације слободног лиганда у пуферском делу и комплекса у рецепторском делу процењује се количина везаног лиганда.
- Недостаци методе су смањење афинитета лиганда и велика колична протеина која би дала адекватан сигнал.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



- **Гел филтрација или филтрација на колони гела**
 - Ова метода је погодна за модификацију рецептора у циљу њихове растворљивости. Филтрирање се изводи пропуштањем кроз колону при чему се везани лганд одваја постепеном квантификацијом (сакупљањем фракција).
 - Гел филтрација се може извести тако што се пепарат рецептора нанесе на колону која је еквилибрисана радиолигандом и елуирана са пуфером који сарджи радиолоиганд.
 - У обе наведене технке издвојене фракције се сакупљау и анализирају.
 - Недостатак је дуготрајност процеса.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



□ Преципитација

- Рецептори који су модификовани да буду растворни (солубилизирани), се преципитирају (талоче) додавањем полиетилен гликола или амонијум сулфата.
- Одвајање талога се врши центрифугирањем или филтрирањем и мора бити довољно брзо да би се избегло распадање комплекса.

Одвајање везаног од не везаног лиганда



□ **Атсорпција**

- Слободни лиганд се селективно атсорбује на неком инертном медијму (талк или активни угаљ) и даље се изолује центрифугирањем.
- Везани лиганд се налази у супренатану и даље се анализира.
- Могуће је обложити атсорбант помоћу декстрана или албумина да би се повећала селективност према малим молекулима лиганда.
- Време одвајања (сепарације) мора бити брзо да би се спречила дисоцијација комплекса лиганд-рецептор.

Проблеми при одвајању везаног од не везаног лиганда

- При одвајању комплекса рецептор-лиганд, највећи проблем је константа дисоцијације лиганд-рецептор комплекса.
- Брзина одвајања мора да буде у складу са афинитетом лиганда према рецептору.
- Када се ради о нижим афинитетима (већој K_D) одвајање мора да буде брже и ефикасније

Однос између времена одвајања и константе дисоцијације (K_D)



K_D [mol dm ⁻³]	Могуће време за одвајање
10 ⁻¹²	1-2 дана
10 ⁻¹¹	2,9 сати
10 ⁻¹⁰	17 минута
10 ⁻⁹	1,7 минута
10 ⁻⁸	1,0 минут
10 ⁻⁷	0,1 минута
10 ⁻⁶	0,01 минута

- ▷ Филтрација је могућа ако је константа дисоцијација 10⁻⁸ mol dm⁻³ и нижа.