

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

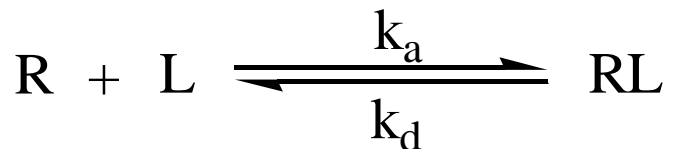
И22 - Радиофармација

Радиолиганд везивање: закон о дејству маса, утросак
лиганда, неспецифично и специфично везивање

Шеста недеља наставе

Закон о дејству маса

- Анализе експеримената радиолиганд везивања су засноване на једноставном моделу који се назива закон масеног дејства. У овом моделу се подразумева да је везивање повратно или реверзибилно.



R-рецептор

L-лиганд

RL- комплекс рецептор-лиганд

- Везивање се одвија када се лиганд и рецептор сударе услед дифузије, када је тај судар има тачну оријентацију и довољно енергије. Једначина која повезује наведено је:

$$\text{Број везивања по јединици времена} = [L] \times [R] \times k_a$$

Закон о дејству маса

- Чим се изврши везивање, лиганд и рецептор остају везани одређен временски период.
- Вероватноћа дисоцијације је иста у сваком делу посматраног времена. Рецептор нема меморију којом памти време за које је био везан за лиганд. Степен дисоцијације износи:

$$\text{Број дисоцијација по јединици времена} = [RL] \times k_d.$$

- Након дисоцијације лиганд и рецептор остају исти као и пре насталог везивања.
- Уколико су лиганд и/или рецептор променили хемијскиу структуру, онда закон масених дејстава (односа) не важи за везивање лиганд-рецептор.

Закон о дејству маса

- Равнотежа се постиже када је брзина настанка (асоцијације) комплекса лиганд-рецептор једнака брзини дисоцијације комплекса лиганд-рецептор.

$$[L] \times [R] \times k_a = [RL] \times k_d$$

- Из ове равнотеже изводи се вредност равнотежне константе дисоцијације (K_D).

$$K_D = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[L][R]}{[RL]}$$

k_a - константа асоцијације [$M^{-1}min^{-1}$]

k_d - константа дисоцијације [Min^{-1}]

K_D - равнотежна константа дисоцијације [M]

Закон о дејству маса

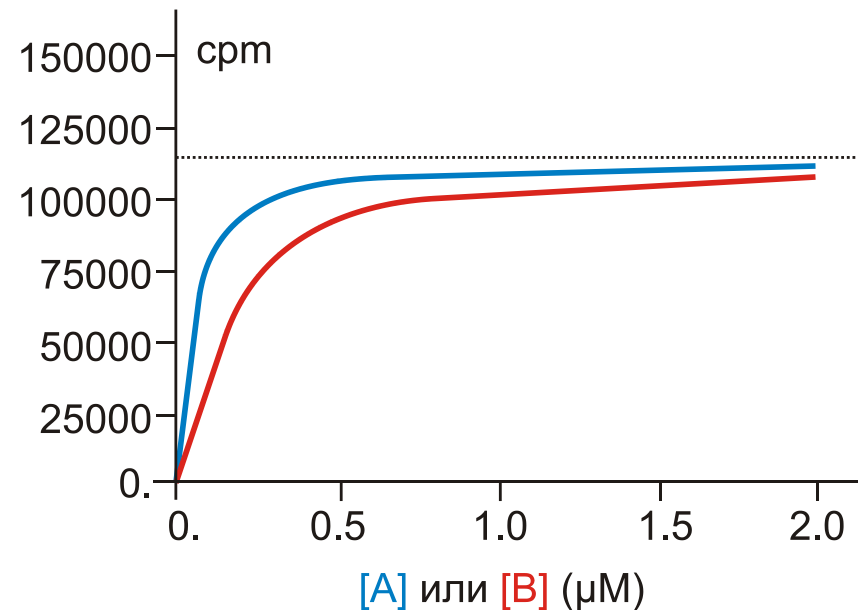
- Када је концентрација лиганда једнака K_D , половина од укупне количине рецептора је везана у лиганд-рецептор комплекс у равнотежном стању.
- Када је афинитет рецептора према лиганду висок, вредност K_D је мања јер су тада потребне мале количине лиганда да веже половну од укупне количине рецептора.
- K_D и k_d нису исте константе, јер је прва константа равнотеже а друга константа дисоцијације. Нити су једнаке нити се изражавају у истим јединицама.

Закон о дејству маса



- $[RL] + [R]$ је константа, јер је укупан број рецептора (приликом припреме) **ограничен**.
- То значи да је везивање лиганда за рецепторе **сатурабилно**.
- С обзиром да је број рецептора у есеју коначан (ограничен), лиганд се додаје у концентрацији таквој да ће сви рецептори бити везани у облику комплекса а крива везивања ће достићи максимум (График је дат у облику семилогаритамског дијаграма, јер је лакши за тумачење).

**Семилогаритамски дијаграм
специфичног везивања лиганда
А и Б за рецепторе**



Scatchard-ова (*Rosenthal*-ова) једначина

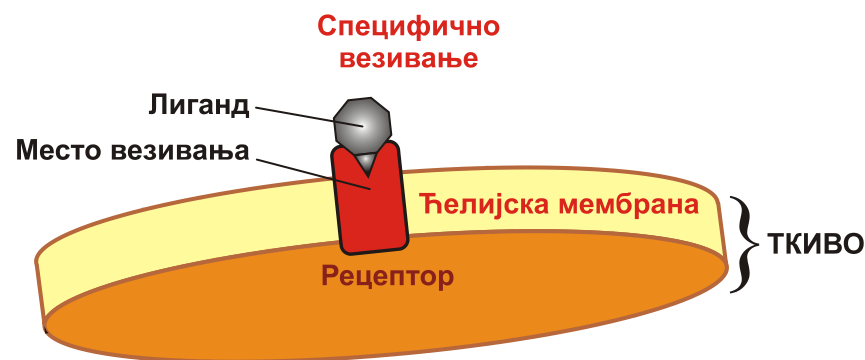


- С обзиром да је за везивање лиганда за рецептор неопходно одговарајуће поклапање између структуре лиганда и места везивања ово везивање је специфично.
- Укупан број рецептора се обележава са B_{max} . Дакле,

$$[RL] + [R] = B_{max}$$

B_{max} се изражава у јединици
[pmol/mg протеина]

Стереоспецифично везивање лиганда за рецепторе



Scatchard-ова (Rosenthal-ова) једначина



- Комбинацијом $[RL] + [R] = B_{max}$ и једначине за K_D , добија се следећа математичка једначина:

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{B_{max} - [RL]}{K_D}$$

- Ако следеће параметре дефинишемо на следећи начин:

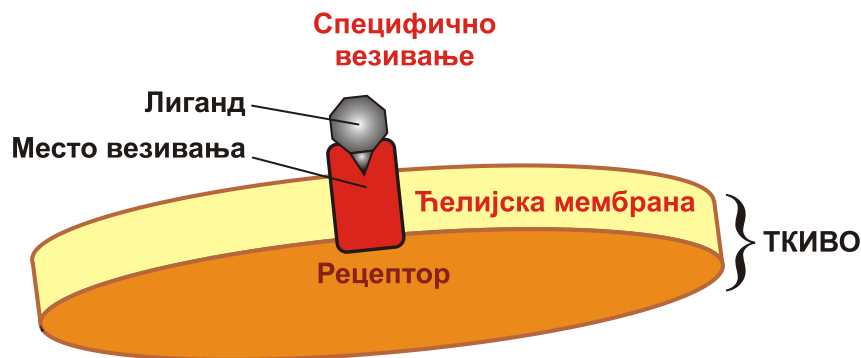
$[RL]$ - везани лиганд **B**

$[L]$ - неvezани (слободни) лиганд **F**
(јер се параметри **B** и **F** одређују експериментално)

- добија се Schatchard-ова једначина:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max} - B}{K_D}$$

Стереоспецифично везивање лиганда за рецепторе



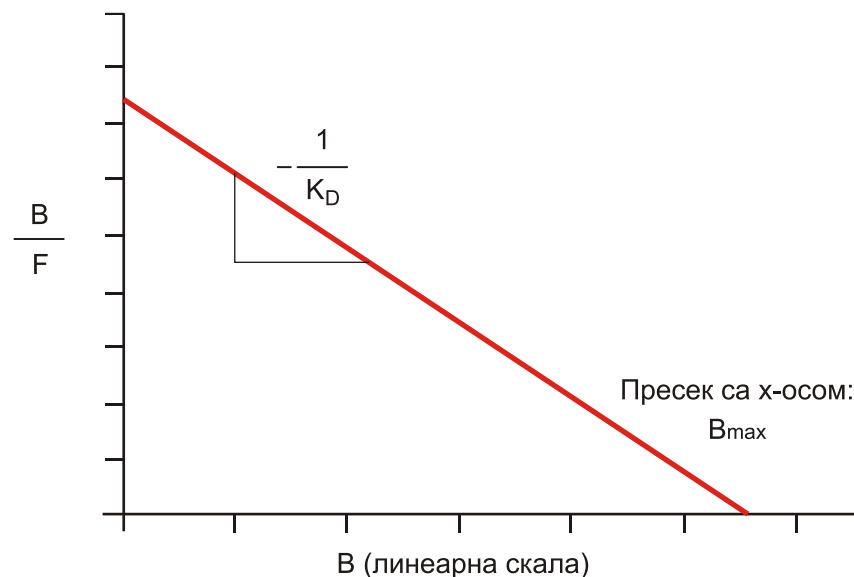
Scatchard-ова (Rosenthal-ова) једначина



- Scatchard-ова (или Rosenthal-ова) једначина може да се представи у другачијем облику, у циљу добијања Scatchard-ове пројекције, где се пресеком криве са x-осом добија вредност B_{\max} .

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} (B - B_{\max})$$

Scatchard-ова пројекција



Ограничења *Scatchard*-ове (*Rosenthal*-ове) једначине



- Овај метод има бројне ограничавајуће факторе, тако да се данас све ређе користи:
 - ▼ Модел важи само када је у питању везивање лекова за један рецептор а не више рецептора.
 - ▼ Непогодност приликом статистичке обраде података.
 - ▼ Појава експерименталних артефакта као што је закривљење *Scatchard*-ове криве тј. линије.
- Зато се данас све више користи модификована верзија овог модела тзв. **"Директни фит"**.

Директни фит



$$B = \frac{B_{\max} F^n}{L^n + K_D^n}$$

B - концентрација везаног лиганда;

B_{max} - максимална количина лиганда која се веже специфично за рецепторе;

F - концентрација не везаног (слободног) лиганда;

K_D - равнотежна константа дисоцијације лиганда;

n - константа која се односи на број молекула лиганда који се везује за сваки рецептор;

Фракциона заокупљеност (засићеност) рецептора



- Закон масених односа предвиђа фракциону заступљеност или фракциону заокупљеност рецептора у стању равнотеже у функцији концентрације лиганда.

- ➔ Међутим, концентрација незаокупљеног рецептора $[R]$ није позната.
- Зато се F_z се израчунава помоћу следеће једначине:

- Фракциона заокупљеност је количина свих рецептора који су везани у лиганд-рецептор комплекс.

$$F_z = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

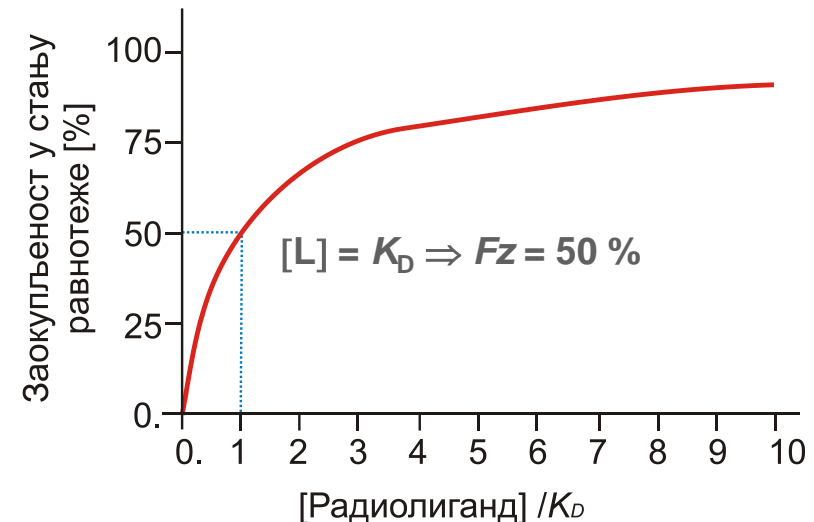
- По правилу, једначина за израчунавање F_z гласи:

$$F_z = \frac{[LR]}{[L]_{ukupno}} = \frac{[LR]}{[R] + [LR]}$$

Фракциона заокупљеност (засићеност) рецептора



- Када је $[L] = K_D$, фракциона заокупљеност је 50 одсто.
- Закон масеног дејства је једноставан модел за описивање многих особина рецептора у фармакологији и физиологији, и подразумева следеће:
 1. Сви рецептори су подједнако доступни лигандима.
 2. Рецептори су или слободни или везани за лиганд. **Није могућа већа стопа афгинитета од једне**, или стање парцијалног везивања.
 3. Везивање не успорава ни лиганд нити рецептор.
 4. Везивање је реверзibilно.



Утрошак лиганда



- Код већине експеримената мале фракције лиганда се везују за рецепторе (или за неспецифична места везивања). У овим случајевима, концентрација слободног (невезаног) лиганда је готово једнака концентрацији која се додаје. Оваква релација умногоме поједностављује анализу експеримента везивања као и саму експерименталну методу.
- Када се веће количине лиганда везују за рецепторе (или неспецифична места) тада концентрација слободног лиганда није једнака концентрацији лиганда које је додана. Овакве разлике нису исте у оквиру истог експеримента (од узорка до узорка).
- Лиганд се троши јер се везује за рецептор.

Утрошак лиганда

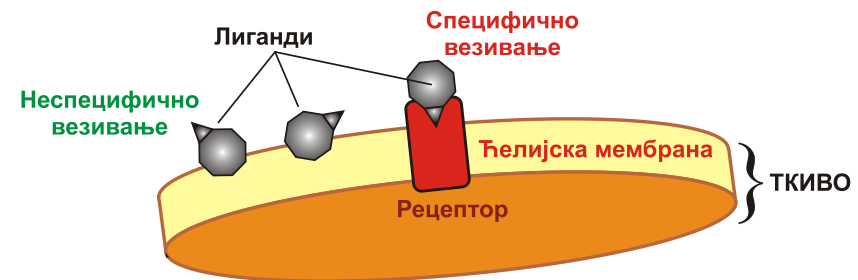


- Код многих истраживача применује се тзв. "правило палца" које гласи: Ако је мање од 10 одсто лиганда везано, лиганда има довољно, ако се више од 10 одсто лиганда везује постоје три могућности:
 1. Променити експерименталне услове. Повећати реакциони волумен без промене у количини ткива. Овакав приступ захтева већу концентрацију радиолиганда.
 2. Измерити концентрацију слободног лиганда у сваком узорку. Користи се центрифугирање или дијализа, али је тешка када се користи вакуум филтрација да би се отклонио радиолиганд.
 3. Подесити разлику између укупне и слободне концентрације лиганда. Ово се постиже коришћењем различитих аналитичких техника.

Специфично и неспецифично везивање



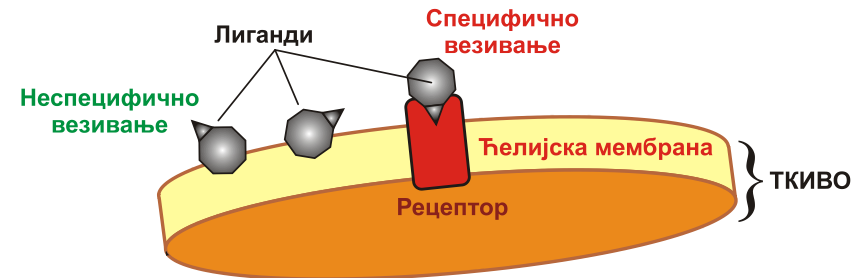
- Везивање лиганда за жељени (циљани) рецептор је **специфично**.
- Међутим радиоактивност коју емитује комплекс радиолиганд-рецептор не односи се само на специфично везивање.
- Везивање лиганда за друга нежељена (нециљана) места претставља **неспецифично** везивање.
- **Неспецифично** везивање може да буде адсорпција лиганда на површини ткива тј. интеракција лиганда са ћелијском мембраном.



Специфично и неспецифично везивање



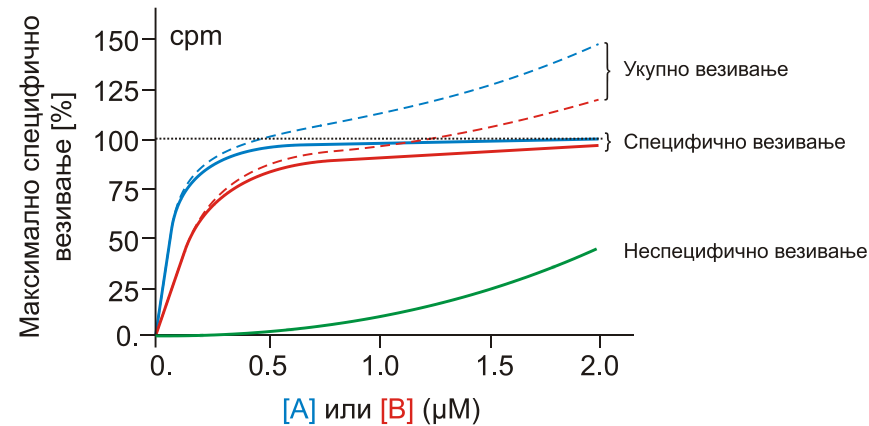
- **Неспецифично** везивање зависи од наелектрисања и хидрофобности лиганда али не и од његове структуре.
- Неспецифично везивање подразумева и везивање рецептора или "транспортера" који нису предмет истраживања у експерименту, као што је везивање епинефрина за серотонинске рецепторе или метаболичке ензиме.
- Поред наведеног, може да се односи и на везивање за филтер који се користи за одвајање везаних од слободних лиганда.



Специфично и неспецифично везивање



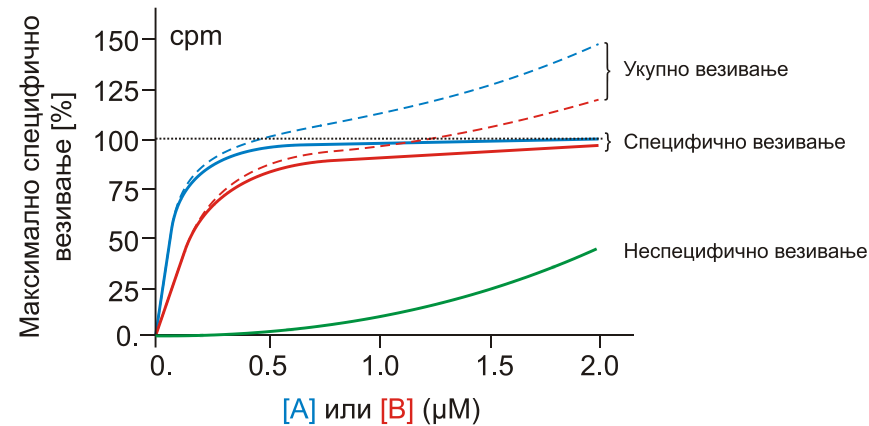
- Према томе, мерење радиоактивности може да се односи на мерење укупног везивања лиганда, специфичног и неспецифичног везивања, и да се прикаже линеарним графиком.
- Већина лиганда имају способност да се неспецифично везују за ткива и за различите површине (филтер папир, стакло) у току процедура као што је филтровање, одвајање и друго.



Специфично и неспецифично везивање



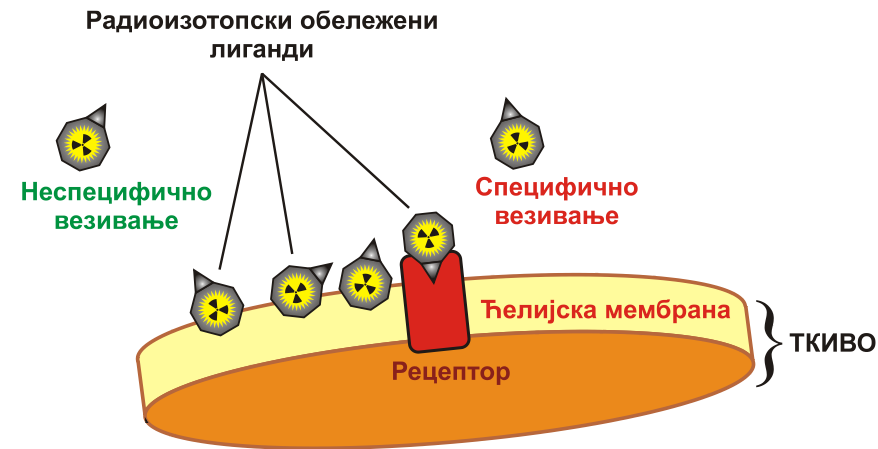
- Овакво везивање (за површину филтера и посуђа) може да се избегне додавањем антиатсорбанса (албумин или колаген за пептиде, о-катехол за катехоламине).
- Неспецифично везивање за ткива не може да се избегне додатком неког агенса.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



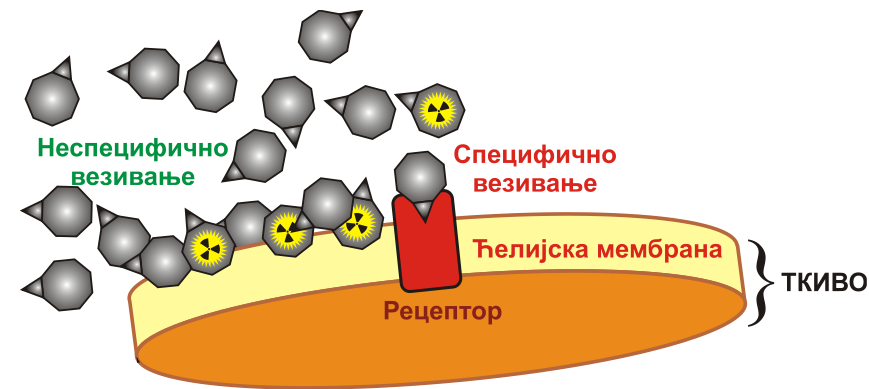
- Потребно је направити **прву серију** узорака која представља ткиво и радиолиганд.
- Тиме се добија тзв. **гранична радиоактивност** која представља збир специфичне и неспецифичне радиоактивности.
- Треба истаћи да се радиолиганд увек користи у ниским концентрацијама (у траговима) али са високом специфичном активношћу која омогућава детекцију.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



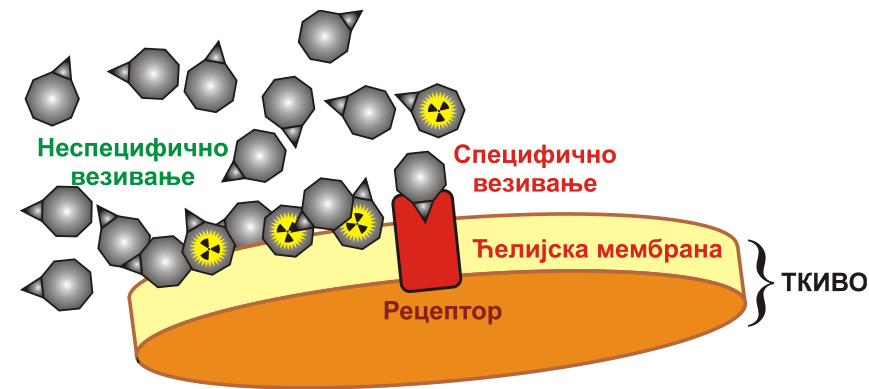
- Затим, направити **другу серију** узорака која представља ткиво и радиолиганд плус изотопски необележен ("хладни") лиганд.
- Радиоизотопски обележени лиганд, због ниске концентрације у којима се користи приликом експеримента, не може да се компетитивно веже за циљ већ уместо њега везују се изотопски необележени ("хладни") лиганди.
- Радиолиганд попутно "истискује" "хладни" лиганд из места везивања.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



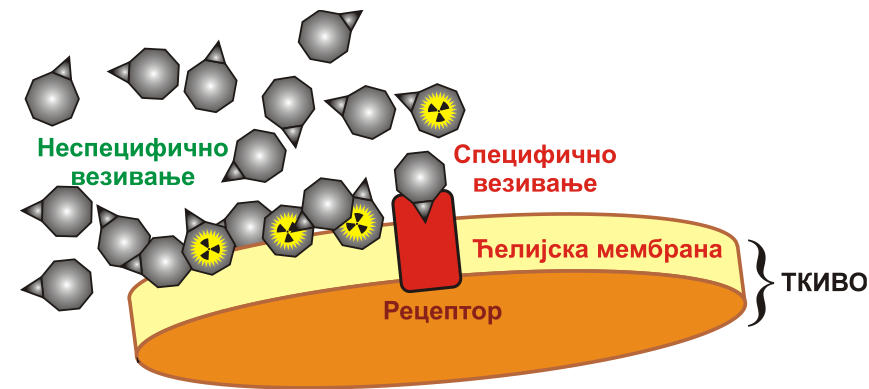
- Под таквим условима сви рецептори су окупирани необележеним лигандима тако да се радиолиганд може везати једино за неспецифична места.
- У овој серији ткиво + радиолиганд + необележени ("хладни") лиганд у вишку даје граничну радиокативност која се односи само на неспецифичну радиоактивност.
- Разлика граничне радиоактивности између прве и друге серије даје граничну радиоактивност која се односи само на специфично везивање.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



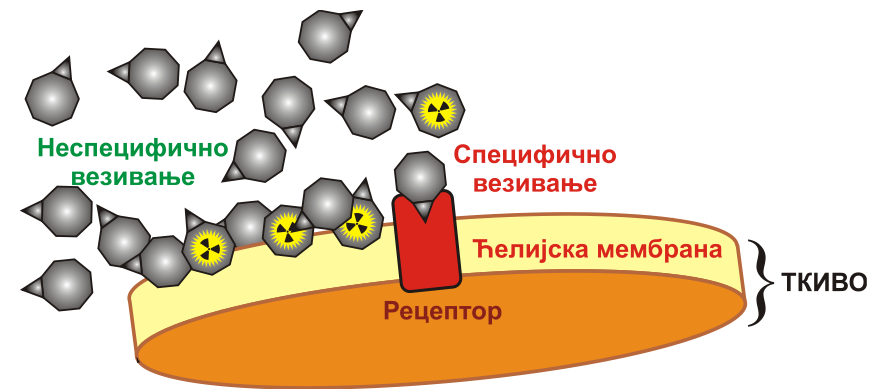
- На неспецифично везивање не утиче велика концентрација необележеног лиганда јер није сатурабилно.
- Необележени лиганд је исто једињење као и радиолиганд само изотопски необележен.
- Међутим, често се избегава овакав приступ тзв. употребе "врућег" и "хладног" лиганда и користе се супстанце које се тотално структурно разликују од структуре радиолиганда.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



- Концентрације необележеног лиганда које се користе су довољне да би се блокирала сва специфична радиолиганд везивања и да се не изазову физичке промене у мембрани које могу да убрзају везивање.
- Уколико се ради о поручавању рецептора чије су особине добро познате, коришћењем "правила палца", употребљавају се изотопски необележени лиганди у концентрацијама 100 пута већим од вредности K_D рецептора или 100 пута већим од концентрације радиолиганда.



Раздвајање специфичног од неспецифичног везивања



- Добијање истих резултата приликом одређивања неспецифичног радилоганд везивања употребом неколико различитих лиганада представља најидеалнији случај.
- Код већине есеја неспецифично везивање износи 10-20 одсто од укупног везивања. Уколико је више од 50 одсто опада квалитет резултата експеримента, па се приступа промени филтера, повећању запремине и температуре пуферских раствора за испирање или промени радиолиганда.

