

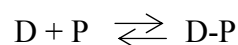
Vaja: VEZAVA NA ALBUMINE

Učinkovine se v plazmi vežejo predvsem na albumine, α -kisle glikoproteine in lipoproteine. Na interakcijo med učinkovino in plazemskimi proteini vplivajo fizikalno – kemijske lastnosti učinkovine in proteinov ter njihove koncentracije v plazmi. Sočasna prisotnost drugih spojin v plazmi ter določena patofiziološka stanja posameznika lahko bistveno spremenijo vezavo učinkovin na plazemske proteine.

Preglednica 1: Patofiziološka stanja, ki lahko vplivajo na vezavo učinkovin na plazemske proteine.

	ALBUMINI	α_1 – KISLI GLIKOPROTEINI	LIPOPROTEINI
ZMANJŠANJE KONC.	<ul style="list-style-type: none">♦ Starost♦ Opekline♦ Ciroza jeter♦ GI bolezni♦ Nosečnost♦ Operacije♦ Ledvične motnje♦ Bakterijska pljučnica	<ul style="list-style-type: none">♦ Nefrotski sindrom♦ Peroralni kontraceptivi	<ul style="list-style-type: none">♦ Hipertiroidizem♦ Poškodbe
POVEČANJE KONC.	<ul style="list-style-type: none">♦ Benigni tumorji♦ Naporni treningi♦ Hipotiroidizem♦ Nevroze♦ Psihoze♦ Shizofrenija	<ul style="list-style-type: none">♦ Staranje♦ Poškodbe♦ Miokardni infarkt♦ Ledvične motnje♦ Revmatoidni artritis♦ Stres♦ Operacije	<ul style="list-style-type: none">♦ Diabetes♦ Hipotiroidizem♦ Nefrotski sindrom

Vezavo učinkovine na plazemski protein ponazorimo s spodnjo ravnotežno reakcijo:



D predstavlja prosto učinkovino v plazmi, P prosta vezavna mesta na plazemskem proteinu in D-P učinkovino vezano na plazemski protein.

Parametri, ki določajo kako se učinkovina veže na plazemske proteine:

- Število vezavnih mest (n)
- Število razredov vezave
- Odstotek vezave (β)
- Afinitetna konstanta (K_a)
- Stopnja vezave (v)

Zgoraj omenjene parametre lahko izračunamo le v primeru, da poznamo koncentracijo proste in na proteine vezane učinkovine v plazmi. Pri tem si pomagamo z ravnotežno dializo, ultrafiltracijo, ultracentrifugiranjem in gelsko filtracijo.

RAVNOTEŽNA DIALIZA

Dializa poteka v celici, ki jo na dva dela enakih volumnov razmejuje polprepustna membrana. V enem od prostorov se nahaja plazma z učinkovino, v drugem pa pufer. Separacija proste in vezane učinkovine temelji na difuziji proste učinkovine iz plazme preko polprepustne membrane v pufer. Prehod kompleksov plazemski protein-učinkovina je onemogočen zaradi velikosti membranskih por. Prosta učinkovina prehaja membrano do vzpostavitve ravnotežja, ko se koncentracija učinkovine v pufru izenači s koncentracijo proste učinkovine v plazmi. Z določitvijo pufrske in plazemske koncentracije učinkovine se lahko izračunajo parametri vezave učinkovine na plazemske proteine.

Na hitrost vzpostavitve ravnotežja pri ravnotežni dializi vplivajo temperatura, vrsta membrane in mešanje. Dializa običajno poteka pri telesni temperaturi. Čas dialize je potrebno določiti eksperimentalno.

Določitev proste frakcije učinkovine je lahko netočna zaradi:

- vpliva pH: pH se zviša zaradi izgube CO₂ iz plazme pred dializo ali med njo. Sprememba pH je pomembna pri učinkovinah, katerih vezava je odvisna od pH.
- volumskega premika: volumski premik pomeni povečanje volumna plazme zaradi difuzije vode iz pufra v plazmo, ki je posledica večjega osmotskega tlaka plazme. Zmanjša se koncentracija plazemskih proteinov, zato se spremenita stopnja vezave in kapaciteta vezanja, medtem ko vpliva na asociacijsko konstanto ni. Osmotski gradient zmanjšamo z uporabo izotoničnih pufrskih raztopin in z vključevanjem polimerov v pufer (npr. dekstran).
- Donnanovega efekta: naboj plazemskih proteinov in učinkovine lahko povzroči različno koncentracijo proste učinkovine na obeh straneh membrane. Razlika v naboju se lahko zmanjša z uporabo pufra z dovolj veliko kapaciteto ali z dodatkom nevtralnih soli ustrezne koncentracije.
- nelinearne vezave učinkovine na plazemske proteine: v ravnotežju je plazemska koncentracija učinkovine nižja kot na začetku dialize (razlika je odvisna od odstotka vezave), zato velja dobljeni odstotek vezave za končno plazemsko koncentracijo. Pri učinkovinah, katerih vezava je v danem koncentracijskem območju odvisna od koncentracije učinkovine, je potrebnih več eksperimentov, da lahko določimo odstotek vezave pri začetni koncentraciji. Za večino učinkovin je v območju terapevtskih koncentracij vezava na plazemske proteine linearna (neodvisna od koncentracije).
- vezave učinkovine na dializno celico in membrano
- časa dialize: pri nestabilnih učinkovinah

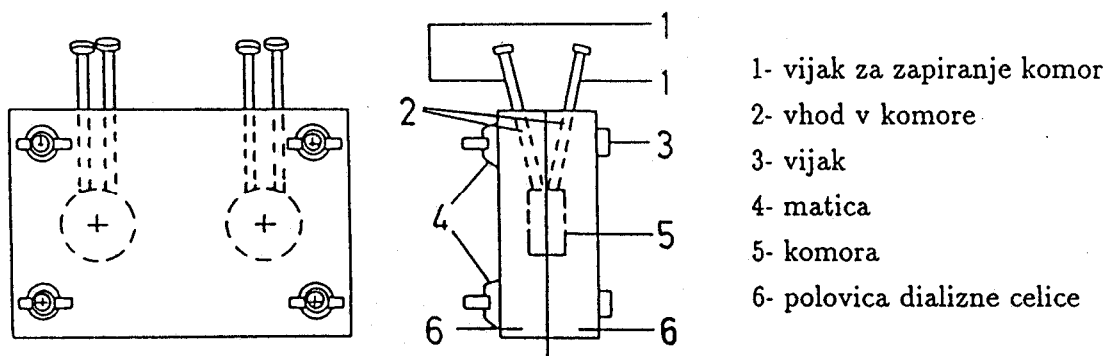
NAVODILA ZA EKSPERIMENTALNO DELO

Naloga:

1. Izračunaj odstotek vezave modelne učinkovine piroksikama na albumine plazme pri različnih plazemskih koncentracijah učinkovine v raztopini albuminov in to odvisnost prikaži na grafu.
2. Iz Scatchardovega diagrama ($v/C_f = n \cdot K_a - K_a \cdot v$) določi za interakcijo piroksikama s plazemskimi albumini afinitetno konstanto (K_a (L/mol)) in število vezavnih mest piroksikama na molekuli vezavnega proteina (n).

Izvedba:

Membrano vstavimo med plošči dializne celice, ki ju privijemo skupaj (slika 1). Vdolbine na eni strani membrane napolnimo s pomočjo injekcijske brizge (po 1 mL) z izotoničnim fosfatnim pufrom (pH=7.4). Na drugi strani membrane napolnimo eno vdolbino z raztopino albuminov (slepi vzorec), ostale štiri vdolbine pa z raztopino piroksikama v raztopini albuminov. V vseh štirih vdolbinah celice morajo biti iste koncentracije učinkovine. Odprtine zamašimo z vijaki. Dializa poteka 4 ure pri 37°C ob občasnem mešanju.



Slika 1: Dializna celica.

Uporabili bomo štiri različne začetne koncentracije piroksikama v raztopini albuminov: 63, 90, 135, 180 mg/L.

Po končani dializi odvezamo puferske dializate učinkovine. Dializate iste koncentracije združimo v centrifugirki, prav tako slepe dializate. Vsebino premešamo na ekscentričnem stresalniku. Puferskim raztopinam na UV-spektrofotometru izmerimo absorbanco glede na slepi dializat. Merimo pri valovni dolžini 354 nm.

Izračuni:

A	absorbanca
C_{tot}	celokupna (začetna) koncentracija učinkovine v raztopini albuminov
$C_f = [D]$	koncentracija nevezane učinkovine v pufru v stanju ravnotežja
$C_b = [D-P]$	koncentracija vezane učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja
C_{pl}	celokupna koncentracija učinkovine v raztopini albuminov v stanju ravnotežja (plazemska koncentracija učinkovine)
C_{prot}	koncentracija albuminov

$$C_{\text{tot}} = C_b + 2 \cdot C_f$$

$$C_{\text{pl}} = C_b + C_f$$

$$\beta = C_b / C_{\text{pl}} \cdot 100\%$$

$$v = C_b / C_{\text{prot}}$$

$$M_{\text{piroksikama}} = 331.35 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{albuminov}} = 65000 \text{ g/mol}$$

$$C_{\text{albuminov}} = 40 \text{ g/L}$$

Priloga: Umeritvena krivulja za pufrske raztopine piroksikama (absorbanca izmerjena pri valovni dolžini 354 nm). Dobite na vajah!

RAČUNSKÉ NALOGE

1.) Pri metodi ravnotežne dialize uporabljamo sistem s koncentracijo albuminov 40g/L. V tem sistemu je v ravnotežju delež proste zdravilne učinkovine 0.08, koncentracija vezane zdravilne učinkovine pa je $1.6 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Izračunaj ravnotežno koncentracijo proste zdravilne učinkovine in afinitetno konstanto vezanja učinkovine na eno vezavno mesto.

$$MM_{\text{albuminov}} = 65000 \text{ g/mol}$$

2.) Delež na proteine vezane učinkovine določamo z metodo ravnotežne dialize. Uporabljamo sistem s koncentracijo proteinov 70 g/L. Izhodna raztopina pri dializi vsebuje 200 mg zdravilne učinkovine v litru plazme. Učinkovina se pri terapevtskih koncentracijah veže na plazemske proteine 96%. Izračunaj število vezavnih mest učinkovine na molekuli plazemskega proteina, če je asociacijska konstanta $23.7 \cdot 10^3$ L/mol.

$$MM_{\text{plaz. proteinov}} = 80000 \text{ g/mol}$$

$$MM_{\text{učinkovine}} = 250 \text{ g/mol}$$

VEZAVA NA ALBUMINE – rezultati eksperimentalnega dela

Preglednica 1: Eksperimentalni podatki in izračunani parametri vezave piroksikama na albumine plazme.

C_{tot} (mg/L)	C_{tot} (mol/L)	A	C_f (mol/L)	C_{pl} (mol/L)	C_b (mol/L)	β	v	v/C_f

Graf 1: Scatchardov diagram

n=

K_a =

:

Graf 2: Odstotek vezave piroksikama v odvisnosti od celokupne plazemske koncentracije.

Diskusija in zaključki:

