



Reseptör Analizinde Radyoligand Bağlanma Deneyleri

Hidayet TUTUN¹, Emine BAYDAN²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji, Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Biyolojik sistemlerin işleyişinde ve patolojisinde reseptörler önemlidir. Belirtilen nedenle reseptör ve reseptör alt tiplerini tanımlama, anatomik dağılımları, hastalık durumundaki sıklığı, reseptörlere özgü ligand geliştirme, geliştirilen ligandların farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarının yapılması gibi birçok alanda reseptör analiz yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Reseptör analizinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi ile ligandı belli olmayan “yetim” reseptörlerin keşfi ve hastalıklarla bağlantılarının incelenmesi kolaylaşacaktır. Reseptör analizlerinde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi radyoligand bağlanma deneyleridir. Bu derlemede, radyoligand bağlanma deneyinin prensibi, tekniği, kullanım alanları, reseptöre özgü ligand geliştirilmesindeki rolü, geliştirilen ligandların farmakokinetik çalışmalarında kullanımı, biyolojik ve patolojik mekanizmaların anlaşılmasındaki rolü ve diğer reseptör analiz yöntemlerine göre avantajları ve dezavantajları hakkında genel bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ligand, radyoligand, reseptör

Radioligand Binding Assays in Receptor Analysis

Summary: Receptors are important in function and pathology of biological systems. In this regard, a number of receptor assay methods are needed such as identification of receptor and receptor subtypes, anatomical distributions, the frequency disease state frequency, development of receptor specific ligands, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the ligands. Development of new methods in receptor analysis will facilitate the discovery of "orphan" receptors and examination of relation between these receptors and diseases. One of the methods widely used in receptor analysis is radioligand binding assays. In this review, general information about the principle of radioligand binding assay, uses, role of it in development of ligand specific to the receptor, the use of ligands developed in pharmacokinetic studies, role of it in understanding of biological and pathological mechanisms and the advantages and disadvantages of it to other receptor analysis methods will be given.

Key words: Ligand, radioligand, receptor

Giriş

Genel olarak ilaçların canlı yapılarıdaki etkilerini kendilerine özel bazı noktalara bağlanarak veya buraları etkileyerek oluşturdukları kabul edilmektedir. İlaçların vücutta etkileşme gösterdikleri bu hücrel makromoleküler yapılara genel anlamda reseptör adı verilir; bunlar hücrenin ve dolayısıyla canlının hayatını devam ettirebilmesi bakımından hayati önem taşır (3,13).

İlaç reseptörlerinin yapısal ve sayısal bakımdan en önemli sınıfını hücrel proteinler oluşturur. Bu hücrel proteinler hormonlar, büyüme faktörleri, çevirim faktörleri, sinirsel araçları, metabolizma ya da düzenleme yollarının enzimleri, taşıma süreçlerine katılan proteinler, salgı glikoproteinleri ve yapısal proteinler gibi içsel dü-

zenleyici ligandlar için reseptör görevi yapar. Bu tür fizyolojik reseptörlerin işlevi, uygun içsel ligandı bağladıktan sonra yanıt olarak düzenleyici sinyali hedef hücre içine yaymaktır. Proteinler dışında, cevap oluşturmada diğer hücrel bileşenlerin spesifik bağlama özelliklerinden de yararlanılabilmektedir. Bu bağlamda nükleik asitler özellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar için önemli nükleer ilaç reseptörleridir(3).

Reseptör proteinleri, periferel membran proteinleri, transmembran proteinleri veya nükleer reseptörler şeklindedir. Periferel membran proteinleri sadece ilişkili olduğu biyolojik membrana geçici olarak yapışan (yüzeye gevşek bağlanan) zar proteinleridir. Bu proteinler kendilerine bağlanan ligandın hücre içine alınabilmesi için tanımlayıcı görev üstlenir. Transmembran reseptörler hücre zarının içinde gömülmüştür, böylece dışarıdan bir ligandın bağlanması, hücrenin içi-

ne doğru sinyal transdüksiyon yolunun etkinleşmesini sağlar (6,23). Nükleer reseptörler ise hücre çekirdeğinde bulunur. Nükleer reseptörler ailesinde yer alan steroid hormon reseptörleri sürekli hücre çekirdeğine gidip gelen proteinlerdir; ligandın varlığı ve tipine bağlı olarak, farklı subsellüler yerleşme gösterirler; ligandlı ve ligandsız östrojenler ve progesteron reseptörleri büyük çoğunlukla nükleer, mineralokortikoid reseptörler kısmen sitoplazmik ve nükleer, ligandsız glukokortikoidler ve androjen reseptörler çoğunlukla sitoplazmada yerleşmiştir. Glukokortikoid ve androjen reseptörler sadece hormona bağlandıktan sonra nükleusa tam olarak geçebilirler (8). Steroid hormonlar reseptörlerine bağlanınca, aktive edilmiş reseptör DNA'daki bazı özel dizilere bağlanır ve bu yolla transkripsiyonun hızını değiştirirler (3,6,32).

Reseptör varlığının ortaya konmasında *in vitro* ve *in vivo* uygulanan farklı metodlar söz konusudur (2, 28). Reseptör tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerin başında Radyoligand bağlanma deneyleri gelmektedir. Teknolojik gelişmeler, medikal olarak önemli proteinlerin geniş çapta görünür hale gelmesini, hatta üç boyutlu görüntüsünün elde edilmesini sağlamıştır. Yapısal biyolojideki gelişmeler, özellikle nükleer manyetik rezonans spektrofotometresinde, robotik kristallenme, kriyojenik kristal yapılabilmesi, X ışınli kristalografi ve yüksek hızlı programlama, protein yapısını belirlemeyi kolaylaştırmıştır. Reseptör analiz yöntemlerinin etkili kullanılması ile iyi bir şekilde valide edilmiş hedef yapılar yeni ilaç geliştirme, fizyolojik ve patolojik mekanizmaların anlaşılmasında yönlendirici olabilmektedir (7,29).

Reseptör-ligandile ilgili kavramlar

Hüresel makromoleküllerin çoğunun (örneğin, antikorlar, enzimler, reseptör proteinler, nükleik asitler vb) meydana getirdikleri biyolojik işlevler ligand adı verilen özgül moleküllerle etkileşimlerinin bir sonucudur. Biyokimyada ligand, bir biyomoleküle bağlanarak kompleks oluşturan bir bileşik anlamında kullanılır. Ligandın bağlanma eğilimi veya gücüne de "afinite" denir (26). İnt-rinsik aktivite veya efikasite maksimum bir fonksiyonel yanıtı oluşturabilmede ilaç reseptör bileşiminin nispi yeteneğini ifade eder. Diğer bir ifade ile ne kadar "iyi" bir agonist ilaç olduğunu anlatır. Bu tanımın afiniteden ayrılması gerekir; afinite, ilacın moleküler hedefine bağlanmasındaki yeteneğidir (24). Reseptörlere bağlanabilen ve içsel uyarıcı bileşiklerin düzenleyici etkilerini

taklit eden ilaçlara agonist (kannabinoid reseptör 2 agonisti JWH-133 gibi) denir. Tek başlarına uyarıcı etkileri olmadığı halde bir agonistin etkisini engelleyerek istenen etkileri oluşturabilen bu tür bileşiklere de antagonist (kannabinoid reseptör 1 ve 2 antagonisti kannabidiol gibi) denir (15,28).

Radyoligand bağlanma deneylerinin tanımı ve uygulama alanları

Sitokimyasal metodların en önemlisi maddelerin radyoizotoplarla işaretlenmesidir. İşaretli madde (markır) hücre veya doku içine verilir ve sonra fotoğrafla yerleri tespit edilir. Radyoaktif maddelerin yayılımından oluşan ışınlar, nükleer emülsiyon veya röntgen filmi üzerinde görüntü oluştururlar. Alternatif olarak, sintilasyon gaz dedektörlerinin son zamanlarda geliştirilmesiyle otoradyografide dijital görüntü elde edilebilir hale gelmiştir (1).

Radyoligand, reseptör, taşıyıcı, enzim veya herhangi bir proteine bağlanabilen radyoizotopla işaretlenmiş bir bileşiktir. Bağlanmanın gücü ve oranı, bağlanma alanlarının sayısı, ilaçların afinitesi ve çeşitli ilaçların keşfi için bilgi sağlar. Radyoligand bağlanma deneyleri yapılması kolaydır ve birçok alanda yararlı bilgi sağlayabilir. Fakat birçok araştırmacı radyoligand bağlanma bilgilerini yorumlama aşamasında zorlanır (18). Radyoligand bağlama, reseptör tanımlama ve onların anatomik dağılımını belirlemek için geniş çapta kullanılır. Özellikle G-protein aracılı reseptörlerin (GPCRs) analizinde kullanılmaktadır (4,5). Birçok önemli fizyolojik süreçleri yönlendiren ve tüm ilaçların yaklaşık %50'sine hedef olan 200'den fazla reseptör bu familya içerisine girer. Yaklaşık 160 belki de daha fazla yetim GPCRs insan genomunda bulunduğu ve GPCR'nin karakteristik mRNA dizilerinin olduğu, fakat iç ligandlarının hala isimlendirilmediği bilinmektedir. Bu reseptörlerin çoğu hücre hatlarında yapay olarak eksprese edilmiştir. Bu hücre hatlarında bu reseptöre bağlanan ligandlar tespit edilerek 45'den fazla reseptörün yetim olmaktan kurtarılması sağlanmıştır. Bu içsel ligandların neredeyse yarısının peptid olduğu anlaşılmıştır. Geriye kalan isimlendirilmemiş yetim reseptörlerin yaklaşık 70 kadarı peptidik bir liganda sahip olabileceği düşünülmektedir (5,30).

Ligandın radyoışaretili analogunun sentezini takiben, radyoligand bağlanma deneyleri ile reseptörü tanımlayan farmakolojik kriterler (ismi, ekspresyon yeri, doyurulabilirlik, sipesifite ve afi-

nite vb.) saptanabilir. Bir doku veya hücrede yeni bir reseptörün keşfi, olası fonksiyonları anlamada bir ipucu ve fonksiyonel deneylerin tasarlanmasına kılavuzluk yapabilir. Yeni keşfedilen taşıyıcı sistemlerin bazılarının karakteristik özelliği olarak reseptör yoğunluğu nispeten düşük olabilir. Bu nedenle dokularda çalışılan anatomik bölgeler sınırlandırılmalıdır. Bu şekilde otoradyografi ile görüntülenmesi kolaylaşır. Tüm doku veya organların homojenliğini kullanmak ise incelemeyi zorlaştırır hatta imkânsızlaştırır (5).

İlaç ve metabolitlerinin *in vivo* doku ve hücresele dağılımı hakkındaki bilgiler, ilaçların etkileri ve toksisitelerinin anlaşılması bakımından önemlidir. İlaç hedefleri ve hedef biyoyararlılık çalışmaları yüksek çözünürlüklü ve hassas metodlar gerektirir. Bu metodlar arasında en çok kullanılanlardan birisi *in vivo* ve daha hassas inceleme yapabilen mikrootoradyografi tekniğidir. İlaçların ve toksisite etkilerinin tahmin ve etkinin mekanizması anlamak için bu gibi metodlara ihtiyaç vardır. Bu yöntemin temeli radyoligand bağlanma deneyleri ile aynıdır. Reseptör mikrootoradyografi doku bütünlüğünü korur ve mikroskopik bir görüntüleme nicel analizler ve hedef alanın karakterizasyonunu sağlar (25). Yaygın olarak kullanılan ADMET (Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Zehirlilik) prosedürleri, radyoassay-HPLC ve whole-body otoradyografi ile tanımlanamadan kalan birçok hedef dokudaki reseptör, mikrootoradyografi ile keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir. Reseptör mikrootoradyografi hassas bir yöntemdir. Düşük dozlarda toksin bileşiklerinin vücuda verilerek savunma mekanizmasının uyarılması ve harekete geçirilmesini sağlayan "Hormesis" olarak bilinen çalışmalarda kullanılabilir. Ayrıca, otoradyograf ve immunositolimya, radyo işaretli ilaç ve antikor kombinasyonu reseptörlerin ve diğer hücresele yapıların hedef karakterizasyonunda daha iyi sonuçlar verir. Mikrootoradyografi daha iyi detay ve kesinlik ile doğrulayabilir ve düşük hassaslıktaki yöntemlerin tamamlayıcısı olabilir, ADMET öngörülerinde hataları azaltabilir. Tanı aracı olarak görev alır ve ilaç araştırmalarında ve geliştirmelerinde biyokimyasal, fonksiyonel ve kliniksel olarak takibi yönetmede yardımcı olabilir (25).

Birçok yetim GPCR reseptörleri için ya doğal ya da yapay ligandların bulunması hatırı sayılır bir çaba gerektirir. Bu gibi çalışmalarla histamin reseptörleri için iyi tanımlanmış farmakolojik ligandların reseptör alt tipleri ortaya çıkarılmıştır. Başka çalışmalarda da buna benzer birçok ye-

tim reseptör tanımlanmıştır. Örneğin, GABA-B reseptör, peptid reseptörlerle ilgili kalsitonin geni, amilin reseptör ve nikotinik reseptör gibi. Ama asıl heyecan verici çalışmalar GPCR'nin bir sınıfı olan "Eser aminle ilişkili reseptörler (TAARs)" lerin keşfidir. Bu reseptör sınıfında bulunan prokinetik reseptörleri ve nöromedin reseptörlerinin iki alt tipinin isimlendirilmesi akademisyenlerin ve ilaç sanayinin büyük ilgisini çekmiştir. Keşfedilen bu reseptörler, hücre biyolojisini ve hastalıkların mekanizmalarını anlamada yardımcı olmuştur (30).

Bir dokuda reseptör sayısı, içsel ligandların miktarına bağlı olarak değişebileceğinden reseptörlerin yoğunluğu sabit olmayabilir. G protein aracılı reseptör sisteminde, içsel ligandlarda meydana gelen bir yükselmeye karşılık dengenin sağlanması için reseptör sayısında bir düşme (down regülasyona) görülebilir. Buda fonksiyonel cevapta bir gerilemeyle sonuçlanır. Alternatif olarak, iç ligandların düşük seviyede olması karşılık dengenin sağlanması için reseptör miktarı upregülasyona uğrayabilir. Ligand bağlanma ile bu gibi değişimlerin ölçümü, son zamanlarda keşfedilmiş bir reseptör sistemini hastalık süreçleriyle ilişkilendirmek için ipuçları sağlayabilir ve başka buluşlar için öncül olabilir. Örneğin, insan arteriosklerozunda [¹²⁵I]-ghrelin reseptörleri önemli ölçüde upregülasyona uğrar (12).

İnsan ve hayvan hastalıklarında, hastalık süreci ve ilaç uygulamaları sırasında oluşan bağlanma parametrelerindeki değişiklikler, hayvan modellerinde deneysel uygulamalar ile ölçülebilir. Bunun için spesifik reseptörleri aşırı eksprese eden (overexpressed) veya hiç eksprese etmeyen (knockout) transgenik hayvanlar kullanılır. Günümüzde, gelişimsel ve letal fenotiplerden kaçınmak için hücre-spesifik knock-out hayvanlar üretilmiştir (5).

Radyoaktif işaretli tamamlayıcı oligonükleotidler veya ribonükleik asit "riboprobe" kullanılması ile doku kesitlerinde RNA transkriptlerinin dağılımının görüntülenmesi *in situ* hibridizasyon yöntemi olarak bilinir. Sırasıyla ³H (timidin) ve ³H (üridin) ile işaretli DNA ve RNA'nın radyoaktif prekürsörleri, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarının zamanlanmasını belirlemek için canlı hücrelere uygulanabilir (11). *In situ* hibridizasyon ve gerçek zamanlı PZR (PCR) gibi moleküler teknikler, hücre ve dokularda yeni reseptör veya reseptör alt tiplerini kodlayan mRNA'nın varlığı konusunda kesin kanıtlar sağlayabilir. Ancak, bu metodlar proteinin gerçekten eksprese edilip edilmediğiyle ilgili bir bilgi veremez.

Reseptörler, yönlendirilmiş antikorlar kullanılarak kendi aminoasit yapılarıyla tanımlanabilirler ve fonksiyonel çalışmalar affinitenin niceliksel ölçümünü sağlayabilir fakat ligand bağlanma çalışmalarında önemli bir parametre olan reseptör yoğunluğunu (B_{max}) ölçemez. Bir reseptörün seçiciliği, translasyon sonrası değişim, diğer reseptörün varlığı veya başka bir proteinin varlığı ile değişebilir. Bunlar hastalık durumunda değişebilir ve moleküler teknikler kullanarak bu değişimler belirlenemez (5).

Ligand *in vivo* olarak verildiğinde, hedef reseptörün bulunduğu dokuya bileşiğin girişinin oranı radyoşaretli ligandın ilk karşılaşacağı engeldir. İlacın hangi çeşit güçle bağlandığı önemlidir (iyonik, kovalent veya van der Waals). Fizyolojik koşullar altında bağlanır ve hızlıca kırılır. Özgünlük, ligand ve reseptörün tamamlayıcı yüzeylerinden kaynaklanır ve ligand bağlanma

$$\text{Kısmi İşgal} = \frac{[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}{[\text{Reseptör}]}$$

$$[\text{Ligand}] \cdot [\text{Reseptör}] / [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] = k_{off} / k_{on} = K_d$$

deneyleri kullanılarak *in vitro* olarak bu etkileşim ölçülebilir. Ligandlar bazı konsantrasyon oranlarında bir hedef reseptöre seçici olabilirler fakat yüksek dozlarda diğer reseptörlere de bağlanabilirler. Ligand ve reseptör arasındaki etkileşim ligand bağlanma deneyleriyle ölçülebilir. Bu şekilde ligandın reseptöre bağlanma afinitesi- K_d ve reseptörlerin maksimum yoğunluğu- B_{max} gibi iki önemli parametre hesaplanabilir (4). Ligandın reseptöre bağlanma afinitesi (K_d), aynı zamanda ligandın denge ayrılma sabiti olarak da ifade edilir (21).

Radyoligand bağlanma deneyleri

Radyoligand bağlanma deney analizlerinin çoğu Kütle Hareket Kanunu olarak bilinen basit bir modele dayanır (18).

Ligand+Reseptör = Ligand.Reseptör

Modele göre:

- Ligand ve reseptör karşılaştığında yeterli enerji ve doğru yönelimle bağlanma meydana gelir. Bağlanma hızı (Ligand). (Reseptör). k_{on} 'a eşittir. Bu denklemde k_{on} , $M^{-1}min^{-1}$ biriminde bağlanma hızı sabitidir.
- Bağlanma meydana geldiğinde, reseptör ve ligand birbirine olan afinitesi oranında bir süre bağlı kalır. Ayrılma hızı (her birim

zamanda ayrışmanın sayısı) $[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] \cdot k_{off}$ 'a eşittir. Bu denklemde k_{off} ayrışma hızı sabitidir ve birimi min^{-1} dir.

- Ayrışmadan sonra reseptör ve ligand ilk halini alır.
- Ayrışma oranı ile bağlanma oranı eşit hale geldiğinde denge sağlanır.

$$[\text{Ligand}] \cdot [\text{Reseptör}] \cdot k_{on} = [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}] \cdot k_{off}$$

Denge ayrışma sabitesi anlamına da gelen K_d reseptörlerin yarısını işgal eden ligand konsantrasyonunu gösterir. Birimi mol/L veya molar (M)'dir. Küçük K_d değeri ligandın reseptöre ilgisinin fazla olduğunu, büyük K_d değeri ise reseptöre ligandın afinitesinin düşük olduğunu gösterir. Denge ayrışma sabitesi olan K_d ile ayrışma hızı sabiti olan k_{off} birbirinden farklıdır ve aynı birimle ifade edilmezler.

$$\frac{[\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}{[\text{Reseptör}] + [\text{Ligand} \cdot \text{Reseptör}]}$$

Kütle hareket kanunu ligand konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak dengede kısmi reseptör işgalini tahmin eder. Kısmi işgal, liganda bağlanan reseptörlerin bölümünü ifade eder.

$[\text{Ligand}] = 0$ olduğunda, işgal sıfıra eşittir. $[\text{Ligand}]$ çok yüksek olduğunda (K_d 'nin birkaç katı) kısmi işgal 1.00'e yaklaşır. $[\text{Ligand}]$ miktarı yükseldikçe doygunluğa yaklaşım daha yavaşlar. Ligand miktarı K_d 'sinin dört katına eşit olduğunda denge halinde reseptörlerin sadece yüzde 80'i işgal edilecektir. Ligand konsantrasyonu K_d 'nin dokuz katına eşit olduğunda işgal yüzde 90'a yükselir. Denge halinde reseptörlerin yüzde 99'unu işgal etmek için K_d 'nin 99 katına eşit konsantrasyon alınmalıdır (18).

Kütle Hareket Kanununa Özgü Varsayımlar:

Kütle hareket kanunu bir kanun olarak isimlendirilmesine rağmen, aşağıdaki varsayımların üzerine kurulmuş basit bir modeldir:

- Tüm reseptörler eşit olarak ligandlara erişebilir.
- Tüm reseptörler ya boşta (bağlanmamış) ya da liganda bağlıdır.
- Model parsiyel bağlanmanın herhangi bir durumunu rededer.
- Ne ligand ne de reseptör bağlanma ile farklılaşır.

• Bağlanma dönüşümlüdür. Bu varsayımların oluşmaması durumunda, iki seçenek ile devam edilir. Birinci seçenek daha karmaşık bir model oluşturmaktır. Diğer seçenek ise olağan yoldan bilgileri analiz etmektir (14).

Radyoligand bağlanma deneylerini gerçekleştirebilmek için radyo işaretli ligandlar üretilmesi gerekmektedir. Reseptörleri karakterize etmede kullanılan radyo işaretli ligandlar *in vitro* ortamda kullanılacak şekilde 1960'lı yıllarda üretilmiştir. Bu ligandlar genellikle düşük yoğunlukta ancak yüksek aktiviteye sahip ligandlardır. Son zamanlarda, pozitron veya tek foton emisyon tomografi (SPECT) cihazları için geliştirilen radyoligandlar insan ve hayvan reseptörlerinin *in vivo* görüntülenmesini sağlamaktadır (4). Her zaman istenildiği kalitede radyoligand üretilmesi bu deneylerin doğru sonuç vermesi bakımından önemlidir.

İdeal olarak, radyoışaretleme için ligand adayları aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek afinite (K_D 1nM veya daha az) spesifik olmayan bağlanmadan çok spesifik bağlanma yapmalı,
- Düşük spesifik olmayan bağlantı yapmalı,
- Düşük reseptör yoğunluğunu belirlemek için yüksek spesifik aktivite sahip olmalı,
- Reseptör özgünlüğü olmalı,

Reseptörlerin *in vivo* olarak görüntülenmesi için kullanılan radyo ligandların aşağıdaki özelliklere sahip olması gerekir;

- Kan beyin bariyerinin radyoligandapermeabilitesi,
- Düşük metabolizma oranı,
- Düşük toksisite (4),

Yüksek özgül aktiviteye ve saflığa sahip radyo işaretli bileşikler reseptör otoradyografinin temelunsurudur. Radyoligand bağlanma çalışmalarında bazı örnek radyoizotoplar:

- *Tritium-ışaretili bileşikler* tercih edilir ve özel bir şekilde işaretlenmelidir.
- ^{14}C -ışaretili bileşikler reseptör bağlanma çalışmaları için uygunluğu azdır. Çünkü tritium-ışaretili bileşiklerle kıyaslandığında oldukça düşük spesifik aktiviteye sahiptirler. Ayrıca, 3H - ve ^{125}I -ışaretili bileşiklerden daha düşük otoradyografik çözünürlük sağlar.
- ^{125}I -ışaretili bileşikler kısa yarı ömrü olduğu için uygundur. Çok yüksek spesifik aktivite kısa maruz kalma zamanı ile mümkün olur. Bunların dışında diğer radyoizotoplar (^{131}I -, ^{14}N -

ışaretili gibi) da kullanılmıştır; ancak, bunların spesifik aktivite ve çözünürlüklerinde bazı kısıtlamalar olduğu bildirilmiştir (25).

Rayoligand bağlanma deneylerinde genellikle doku homejenatından kısmi olarak arındırılmış plazma membran bölümleri, reseptör geni transfekte edilmiş hücreler, taze olarak izole edilmiş veya üretilmiş hücreler gibi doku preparatları kullanılır. Ayrıca, taze olarak dondurulmuş doku kesitleri kullanılabilir. Özellikle doku kesitleri radyografi için uygundur (5). *In vivo* çalışmalarda fare, sıçan yaygın olarak kullanılır. Radyoışaretili ilaç verildikten sonra doku örnekleri kesilerek alınır ve özel dondurma teknikleri ile muhafaza edilir (25).

Üç tip radyoligand bağlanma deneyi vardır.

1. Dozurma bağlanma deneyleri: Dozurma bağlanma deneyleri, reseptör sayısını ve afinitesini belirlemek için denge halinde radyoligandın değişen konsantrasyonlarında spesifik bağlanmayı ölçer. Analiz inkubasyonun dengeye ulaşması varsayımına dayanır. Bu birkaç dakikadan birkaç saate varan sürede gerçekleşir. Liganda, reseptöre, ısıya ve diğer deneysel koşullara bağlıdır. Küçük dozdaki radyoligandın dengeye ulaşması çok zaman alır (12,18).

Ligand fizyolojik olarak ilgi duyduğu reseptörlerin yanısıra reseptör olmayan bölgelerde bağlanabilir. Bir radyoligand deneyi gerçekleştirilirken hem toplam hemde nonspesifik bağlanmayı ölçmek gerekir. Spesifik bağlanma, toplam bağlanmadan nonspesifik bağlanmayı çıkararak hesaplanır (16,18).

Tüm reseptörlere bağlanan işaretlenmemiş bileşiklerin bir konsantrasyonunun varlığında radyoligand bağlanmayı ölçerek nonspesifik bağlanma elde edilir. Tüm reseptörler işaretlenmemiş ilaçlar tarafından işgal edildiği için radyoligand sadece nonspesifik olarak bağlanır (20).

İşaretlenmemiş ligand olarak, radyoligand olarak kullanılan bileşiğin aynısı ve işaretlenmemiş olanı kullanılır. Birçok durumda, diğer ilaçların reseptöre bağlanması bilinmediği için bu gereklidir. Fakat çalışılan reseptörlere bağlandığı bilinen standart bir ilaç da nonspesifik bağlanmayı belirlemede kullanılabilir (18).

İşaretlenmemiş ilacın konsantrasyonu, neredeyse tüm spesifik radyoligand bağlanmayı önleyecek kadar kullanılması istenir. Fakat bunun belirlenmesi zordur. İyi tanımlanmış bir reseptör ile çalışılıyorsa, reseptörün K_d 'sinin yüz katına eşit miktarda işaretlenmemiş bileşik kullanmak pratik bir yöntemdir (18).

2. Yarışmalı bağlanma deneyleri: Yarışmalı bağlanma deneyleri, farklı konsantrasyonlardaki işaretlenmemiş ligandın varlığında tek işaretlenmiş ligand konsantrasyonunun bağlanmasını ölçer (12). Yarışmalı bağlanma deneyleri:

- Bir deneyi doğrular. Fonksiyonel deneylerden bilinen ilaçların etki güçlerini yarıştıır. Bu ilaçların umulan etki gücü veya en azından umulan güç sıralaması ile bağlandığını gösterir, radyoligandın doğru reseptöre bağlanıp bağlanmadığının saptanmasında yardımcı olur (18).
- İlacın reseptöre bağlanıp bağlanmadığını belirler. Reseptöre bağlanan ilaçları bulmak için binlerce bileşik görüntülenebilir. Bu diğer görüntüleme metodlarına göre kolay ve hızlıdır (16).
- Reseptörlere düşük afinite gösteren ilaçların etkileşimi araştırılabilir. Radyoligand bağlanma sadece yüksek afiniteye sahip radyoligand olduğunda yararlıdır ($K_d < 100$ nM). Düşük affiniteli bir ligand genellikle yüksek ayrışma hız sabitine sahiptir ve bu yüzden filtreler yıkanırken reseptöre bağlı kalmayacaktır. Eğer düşük afiniteli ligandlarla çalışmak istenirse ligand işaretlenmemiş bir yarışmacı olarak kullanılır.
- İşaretlenmiş ve işaretlenmemiş ligand olarak aynı bileşik kullanılır ve reseptör sayısı ve afinitesi belirlenir (18).

3. Kinetik bağlanma deneyleri

3.1. Ayrışma deneyleri: Bir ayrışma deneyi, reseptörden ayrılan radyoligand için "ayrışma hızı" nı ölçer (16). Ayrışma deneyleri:

- Ligand ve reseptörün etkileşimini tam olarak karakterize etmede kullanılır.
- Kütle hareket kanunu uygulanırlığını doğrulamada kullanılır.
- Deneysel protokolu oluşturmada yardımcı olur. Ayrışmanın hızlı olması durumunda, örnek hızlı bir şekilde yıkanmalı ve filtrelenmelidir. Buna dikkat edilmemesi durumunda ise önemli ölçüde ayrışma meydana gelebilir. Filtreyi yıkamak için kullanılan tamponun ısı düşük olması tavsiye edilir. Ayrışmanın yavaş olduğu durumda ise örnekler yavaş bir şekilde filtrelenmelidir ve bu şekilde yıkama sırasında meydana gelen ayrışma minimum düzeye düşürülür (18).

Ayrışma hız deneyini gerçekleştirmek için ilk başta ligand ve reseptörün bağlanmasına izin verilir yani dengeye ulaşması sağlanır. Bu noktada radyoligand ve reseptörün diğer bağlanma-

ları engellenir. Ayrışma başladıktan sonra reseptörden ligandın ne kadar hızda ayrıldığını saptamak için belirli zamanlarda ölçüm yapılır (16,18).

3.2. Bağlanma deneyleri:

Bağlanma deneyleri:

- Bağlanma hız sabitesinin belirlenmesinde kullanılır.
- Reseptör ile ligand arasındaki etkileşimi karakterize etmede yararlıdır.
- Doyurma ve yarışma deneylerinde dengeye ulaşmanın ne kadar süre alacağını belirleme de önemlidir.

Çalışmada radyoligand eklenir ve çeşitli zamanlarda spesifik bağlanma ölçülür (14,18).

Radyoligand çalışmaları birçok reseptör karakterizasyonu ve ligand analizinde kullanılmıştır. Mussap ve ark. (19) köpeklerde idrar kesesi kasında takinin reseptörlerini radyoligand bağlanma deneyi ile karakterize etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Tsukahara ve ark. (27) yohimbin ile yaptıkları bağlanma çalışmasında köpeklerin serebral arterlerindeki α_2 adrenoreseptörlerini incelemişler ve serebral arterlerde iki farklı alttipi (α_{2H} , α_{2L}) olduğunu bulmuşlardır. Meini ve ark. (17) bu metod ilekinin B₂ reseptör farmakolojisinde hayvan türleri arasındaki farklılıkları araştırmışlardır. Buna benzer bir çalışma olarak Geizen ve ark.(10), köpeklerde ticagrelor, clopidogrel ve prasugrel (P2Y₁₂ plateletlerin yüzünde bulunan protein; reseptör antagonisti; plateletlerin toplanmasını sağlar) maddelerinin affinitelerini radyoligand bağlanma deneyi ile karşılaştırmışlardır.

Yoshino-Furukawa ve ark. (31) nörokinin-1 (NK(1)) reseptör antagonisti FK886'in farmakolojik özelliklerini insan NK(1) reseptörleri ekspres eden çin hamster ovarium hücrelerinde çalışmışlardır. Fishback ve ark. (9) σ_1 reseptör için *in vivo* ve *in vitro* olarak kullanılabilecek bir ligand geliştirmiş ve bu ligandın incelemesini radyoligand bağlanma denemeleri ile yapmışlardır. Başka bir çalışmada, köpek P2RX7 reseptörlerinin insan ve sıçan P2RX7 reseptörlerine benzerlikleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, köpek P2RX7 reseptörlerine afinite duyan bir antagonist radyoligand kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, araştırmacılar insan yerine köpeğin bu antagonistin toksikolojik değerlendirme çalışmalarında kullanılabileceğini saptamışlardır (22).

Sonuç

Transmembran reseptörleri üzerine yapılan çalışmalarda radyoligand bağlanma deneyleri oldukça fazla kullanılmaktadır. Ancak, bir reseptörün analizinde kullanılacak yöntemler o reseptörün çeşidine göre değişiklik gösterebildiği gibi, görüntüleme kalitesi, hedef noktanın konumu, güvenilirliği, hassasiyeti, maliyet ve laboratuvar olanakları gibi faktörlerde yöntemin önceliğini değiştirebilir. Günümüzde radyoligand bağlanma deneyleri ile yeni reseptör ve reseptör alt tipleri keşfedilebilir, bunlar için ligand geliştirilebilir ve ligandın karakterizasyon çalışmaları yapılabilir. Hastalık ile reseptör etkileşimi araştırılabilir. Dolayısı ile uzun zamandır kullanılan ligand bağlanma deneyleri halen popülerliğini kaybetmemiştir. Son yıllarda bilgisayar destekli radyoligand görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesiyle daha sağlıklı ve kaliteli reseptör görüntülemelerin elde edilebilirliği, pek çok biyolojik sistemin çözülmesinde bilim insanlarına büyük katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Barthe N, Coulon P, Hennion C, Ducassou D, Basse-Cathalinat B, Charpak G. Optimization of a new scintillation gas detector used to localize electron emitted by ^{99m}Tc . *J Nucl Med* 1999; 40(5): 868-75.
2. Baydan E, Kartal M, Yurdakök B, Aslan Erdem S, İnce S, Ekici H, Alp H. Contractile effects of *Eryngium kotschy* Boiss. on rat isolated ileum and detrusor muscle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20(5): 779-85.
3. Buxton LLO. Farmakokinetik ve farmakodinamik: İlaç emilimi, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonun dinamiği. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. eds. In: Goodman ve Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi, 2006; s: 1-39
4. Davenport AP, Russell FD. Radioligand binding assays: Theory and practice. Mather SJ eds. In: Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1996; pp.169-79.
5. Davenport AP, Kuc RE. Radioligand-binding and molecular-imaging techniques for the quantitative analysis of established and emerging orphan receptor systems. Davenport Totowa AP. eds. In: Methods in Molecular Biology. Receptor Binding Techniques. NJ: Humana Press Inc, 2005; pp. 93-120
6. Demirpençe E. Steroidhormonlar. Erişim: <http://www.msxlab.org/forum/biyoloji/218070-steroid-hormonlar.html#ixzz2GdTKPUAJ>, Erişim tarihi: 31.12.2012.
7. Drews J. Drug discovery: A historical perspective. *Science* 2000; 287(5460): 1960-64.
8. Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *BBA-Mol Cell Res* 2010; 1803(6): 641-9.
9. Fishback JA, Mesangeau C, Poupaert JH, Mccurdy CR, Masumoto RR. Synthesis and characterization of [3H]-SN56, a novel radioligand for the σ_1 receptor. *Eur J Pharmacol* 2011; 653(1-3): 1-7.
10. Giezen JJ, Berntsson P, Zachrisson H, Björkman J. Comparison of ticagrelor and thienopyridine $p2y_{12}$ binding characteristics and antithrombotic and bleeding effects in rat and dog models of thrombosis/hemostasis. *Thromb Res* 2009; 124(5): 565-71.
11. Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: Methods and applications. *J Clin Lab Anal* 1997; 11(1): 2-9.
12. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. [^{125}I -His 9]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; Up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001; 134 (1):143-9.
13. Kaya S, Ünsal A. İlaçların etkileri. Kaya S. eds. In: Veteriner Farmakoloji. Birinci Cilt. Ankara: Medisan Yayınevi, 2002; s.89-121.
14. Leysen JE, Langlois X, Heylen L, Lammertsma AA. Receptors: Binding assays. Stolerman IP. eds. In: Encyclopedia of Psychopharmacology. New Delhi: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; pp. 1438-47
15. Limbird, LE. Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods, Second Edition. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2003; pp. 1-5
16. Malany S, Hernandez LM, Smith WF, Crowe PD, Hoare SRJ. Analytical method for simultaneously measuring *ex vivo* drug receptor occupancy and dissociation rate: Application to (r)-dimethindene occupancy of central histamine H_1 receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 2009; 29(2): 84-93.
17. Meini S, Cucchi P, Catalani C, Bellucci F, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA. Radioligand binding characterization of the bradykinin B_2 receptor in the rabbit and pig ileals

- mooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2010; 635 (1):34-9.
18. Motulsky H. The graph pad guide to analyzing radioligand binding data, http://fisbio.biof.ufrj.br/restrito/bioEstatistica/90_top_especiais/radiolig.pdf, Erişim tarihi: 23.08.2013.
 19. Mussap CJ, Geraghty DP, Burcher E. Tachykinin receptors: A radioligand binding perspective. *J Neurochem* 1993; 60(6): 1987-2000.
 20. Qume M. Overview of ligand-receptor binding techniques. KeenM. eds. In: *Receptor Binding Techniques*, Totowa NJ: HumanaPressInc, 2005; pp. 1-24.
 21. Pan AC, Borhani DW, Dror RO, Shaw DE. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov Today* 2013; 18(13): 667-73.
 22. Roman S, Cusdin FS, Donfria E, Goodwin JA, Reeves J, Lappin SC, Chambers L, Walter DS, Clay WC, Michel AD. Cloning and pharmacological characterization of the edog P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 2009; 158 (6): 1513-26.
 23. Singer SJ. Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev Physiol* 2004; 66: 1-27.
 24. Stephenson RP. A modification of receptor-theory. *Br J Pharmacol Chemother* 1956; 11 (4): 379-93.
 25. Stumpf WE. Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51(1): 25-40.
 26. Temizkan G. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler: Genel bakış, Temizkan G. Arda N. eds. In: *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; s. 340-50
 27. Tsukahara T, Taniguchi T, Usui H, Miwa S, Shimohama S, Fujiwara M, Handa H. Sympathetic denervation and alpha adrenoceptors in dog cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 334(4): 436-443.
 28. Tutun H. Sıçanlarda sipermetrin toksisitesine bağlı karaciğer hasarında CB2 agonisti JWH-133'ün sağaltıcı etkisinin araştırılması. Doktora tezi, Ankara Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016; 1-105.
 29. Tutun H, Baydan E. İlaç geliştirmede reseptör analizinin önemi. *MAKÜ Sag Bil Enst-Derg* 2016; 4(1): 42-49.
 30. Wise A, Jupe SC, Rees S. The identification of ligands at orphan g-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44(1): 43-66.
 31. Yoshino-Furukawa T, Maeda Y, Kikuchi A, Sakuma H, Imazumi K, Yamakuni H, Sogabe H, Matsuo M, Manda T, Uchida W. Pharmacological properties of FK886, a new, centrally active Neurokinin-1 receptor antagonist. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(1): 76-81.
 32. Yurdakök B, Baydan E. Sirkadiyanritim ve sitokrom p450 enzimleri. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2011; 6(2): 157-62.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Hidayet TUTUN
 Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,
 Veteriner Fakültesi,
 Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
 Burdur-TÜRKİYE
 E-posta: hidayettutun@gmail.com