

Metabolisme av kalsiumkanalblokker

16. og 17. mars 2005

Ansvarlig for gjennomføring:

Espen Molden/Monica Hermann

Siri Johannesen

Praktisk opplegg

Dere skal arbeide i grupper på 3 studenter. Ta med lab-frakk. Møt opp på laboratorium 411, 4.etg. FI på følgende tidspunkt:

Gruppe A1-6:	kl. 8.30 til kl. 10.30 onsdag 16.mars
Gruppe A7-12:	kl. 11.00 til kl. 13.00 onsdag 16.mars
Gruppe B1-6:	kl. 13.30 til kl. 15.30 onsdag 16.mars
Gruppe B7-B12:	kl . 11.00-13.00 torsdag 17. mars

Introduksjon

Kalsiumkanalblokkeren diltiazem anvendes til behandling av høyt blodtrykk og angina pectoris. Medikamentet gjennomgår en utstrakt 1.pass metabolisme i lever og tarm før det når det systemiske kretsløp. Biotilgjengeligheten til diltiazem er ca. 40-50%. Diltiazem metaboliseres av cytokrom P-450 enzymer (CYP-enzymmer) og uspesifikke esteraser, og det dannes en rekke metabolitter (aktive og inaktive). Isoenzymet CYP3A4 er ansvarlig for en stor del av metabolismen av diltiazem.

Metabolisme av diltiazem skal i denne oppgaven studeres i humane levermikrosomer med og uten CYP3A4-hemmeren erytromycin tilstede.

Prosedyre på labben

- Merk glassrørene med 1 og 2
 - Rør 1:
50 μ l diltiazem-løsning i metanol (0,2 mg/ml) settes i bunnen av glassrøret med en pipette (Diltiazem-konsentrasjonen i inkubatet blir 100 μ M)
 - Rør 2:
50 μ l diltiazem-løsning i metanol (0,2 mg/ml) settes i bunnen av glassrøret med en pipette (Diltiazem-konsentrasjonen i inkubatet blir 100 μ M)
- 160 μ l erytromycin-løsning i metanol (0,2 mg/ ml) settes i bunnen av røret (Sluttkonsentrasjon blir 200 μ M)
- Metanol dampes av under N₂-gass

- Tilsett følgende i hvert rør:
 - 165 μ l 200 mM Tris H₂SO₄-buffer (pH 7,5)
 - 5,5 μ l 20 mM MgSO₄
 - 35 μ l 10 mM NADPH
- Virvle på Wirl-mixer
- Tilsett 15 μ l mikrosomer og rist lett på rørene
- Sett på kork og inkuber i 15 minutter ved 37°C med vipping
- Stopp reaksjonen ved tilsetning av 110 μ l iskald acetonitril. Løsningen virvles på Wirl-mixer og blir stående på benken i 5 minutter
- Sentrifugeres i 5 minutter ved 3000 rpm i Kubota sentrifuge
- Overfør supernatanten til et Eppendorf-rør og virvle på Wirl-mixer
- 150 μ l supernatant overføres til et HPLC-glass og tilsettes 150 μ l mobil fase
- Analyseres på HPLC

Spørsmål som skal besvares i journalen

1. Studer kromatogrammene fra analyse av de to prøvene. Beskriv kort hva som har funnet sted i prøveløsningene. Bruk utdelt referanseark for å identifisere de enkelte toppene på kromatogrammet.
2. Noter arealet for de enkelte toppene på kromatogrammet. Beregn prosentvis effekt av hemmeren.
3. Kommenter kort hvorfor de enkelte substansene er tilsatt inkubasjonsløsningen?
4. Hva er hensikten med å gjøre metabolismestudier in vitro?
5. En person behandles med diltiazem for sitt høye blodtrykk og får en erytromycin-kur for lungebetennelse. Hva kan konsekvensen av dette bli?
6. Vil det eventuelt være et problem med å kombinere erytromycin med en av de andre kassiumkanalblokkerne?

Journalen skal leveres i eske utenfor laboratoriet (rom 411) i løpet av dagen fredag 18. mars.