

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Studium plazmatické vazebnosti radiofarmak
značených ^{18}F z hlediska mezidruhového srovnání**

**Study of interspecies differences in plasma
protein binding of ^{18}F -labeled radiopharmaceuticals**

Konzultant rigorózní práce: Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček, CSc.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Dana Nováková

Studium plazmatické vazebnosti radiofarmak značených ^{18}F z hlediska mezidruhového srovnání

Abstrakt

Práce je zaměřena na plazmatickou vazebnost tří vybraných radiofarmak značených radionuklidem ^{18}F z pohledu mezidruhového srovnání. Experimenty byly prováděny s využitím bovinní, prasečí, lidské a potkaní plazmy. Vazebnost na plazmatické bílkoviny se stanovila u tří radiofarmak, konkrétně u ^{18}F -FDG, ^{18}F -fluorocholinu a ^{18}F -thymidinu. Byly použity dvě metody: rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Podstata těchto metod spočívá v oddělení volné a vázané složky. Pro separaci je využita semipermeabilní membrána pro rovnovážnou dialýzu a speciální filtry (AMICON a VIVASPIN) pro metodu ultrafiltrace. Volná frakce je významným parametrem dostupnosti léčiva pro distribuci do tkání a buněk, interakci s receptory, exkreci a metabolismus. Všechny experimenty byly prováděny při fyziologické teplotě 37°C.

Výsledky ukazují nízkou plazmatickou vazebnost těchto tří látek u všech zkoumaných druhů a nedochází tedy k významnému ovlivnění farmakokinetiky studovaného materiálu. Nejvyšší hodnota plazmatické vazebnosti byla stanovena u ^{18}F -thymidinu: $25,10 \pm 1,34$ % (potkaní plazma, filtr VIVASPIN). Ale tato hodnota se obecně nepovažuje za vysokou v rámci vazby na plazmatické proteiny. ^{18}F -FDG se prakticky neváže, volná frakce se pohybovala kolem 100 % u všech použitých metod. Mezi filtry AMICON a VIVASPIN nebyly prakticky žádné rozdíly. Obecně vyšší hodnoty volné frakce byly určeny při použití metody rovnovážné dialýzy (ve srovnání s ultrafiltrací) Z hlediska mezidruhového srovnání nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi čtyřmi druhy séra.

Klíčová slova

Radiofarmaka, plazmatické bílkoviny, rovnovážná dialýza, ultrafiltrace, ^{18}F -FDG, ^{18}F -fluorocholin, ^{18}F -thymidin, plazmatická vazebnost

Study of interspecies differences in plasma protein binding of ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals

Abstract

In this thesis, the binding ability of three radiopharmaceuticals containing radionuclide ¹⁸F to the plasma proteins was examined in bovine, pig, human and rat plasma, and the interspecies comparison was performed. Examined radiopharmaceuticals included ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-fluorocholine and ¹⁸F-thymidine. The two main methods used are equilibrium dialysis and ultrafiltration. These methods are based on separation of free ligand from the linked component. During the separation, semi-permeable membrane and special filters (AMICON and VIVASPIN) were used for equilibrium dialysis and ultrafiltration, respectively. Free fraction of drugs is considered to be an important parameter for the availability of the drug distribution into the tissues and cells, interaction with receptors, excretion and metabolism. All experiments were carried out at the physiological temperature of 37°C.

Obtained results indicate low plasma protein binding of the three radiopharmaceuticals in all studied species, which suggests that pharmacokinetics of ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-fluorocholine and ¹⁸F-thymidine would not significantly influence the plasma protein binding. The radiopharmaceutical with the highest ability of plasma protein binding was ¹⁸F-thymidine, which reached 25.10 ± 1.34 % in rat plasma sample (using ultrafiltration with filter VIVASPIN). However, this value is not generally considered as high. ¹⁸F-FDG did not show the ability to bind to plasma proteins; free fraction was nearly 100 % in all species plasma samples, using either method.

In general, higher values of free fraction were measured with equilibrium dialysis approach when compared to ultrafiltration. However, no difference was found between filters AMICON and VIVASPIN. From the perspective of interspecies comparison, no difference in binding of studied radiopharmaceuticals to the plasma proteins in the four kinds of serum was found.

Key words

Radiopharmaceuticals, plasma proteins, equilibrium dialysis, ultrafiltration, ¹⁸F-FDG, ¹⁸F- fluorocholine, ¹⁸F- thymidine, plasma binding ability

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala při zpracování, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány.“

V Hradci Králové 2016

.....

Chtěla bych především poděkovat Prof. PharmDr. Ing. Milanovi Lázníčkoví CSc. za poskytnuté materiály, vstřícný přístup a cenné odborné rady při zpracování této rigorózní práce a Ing. Jiřímu Dejmkoví za poskytnutí pomoci při zpracování a měření vzorků. A dále chci poděkovat kolegům z Kliniky zobrazovacích metod FN Plzeň za spolupráci při přípravě experimentu.

Obsah

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1	Radiofarmaka značená [¹⁸ F].....	14
2.1.1	PET radiofarmaka.....	14
2.1.2	[¹⁸ F]-fluorothymidin.....	15
2.1.3	[¹⁸ F]-fluorid sodný.....	18
2.1.4	[¹⁸ F]-DOPA.....	21
2.1.5	2-(¹⁸ F)fluor-2-deoxy-D-glukosa	23
2.1.6	[¹⁸ F]-fluorocholin	26
2.1.7	[¹⁸ F]-flutemetamol	28
2.1.8	[¹⁸ F]-florbetaben	29
2.2	Plazmatické bílkoviny	30
2.2.1	Lidský sérový albumin.....	31
2.2.2	Bovinní sérový albumin	33
2.2.3	Alfa-1-kyselý glykoprotein	34
2.2.4	Vazba na plazmatické bílkoviny	35
2.2.5	Změny hladiny a struktury plazmatických proteinů	35
2.2.6	Studie popisující vazbu na plazmatické bílkoviny.....	37
2.2.7	Typy vazeb	38
2.2.8	Koncentrace léčiva v plazmě	39
2.2.9	Schválená léčiva s vysokou vazebností.....	40
2.3	Metody	41
2.3.1	Obecně.....	41
2.3.2	Rovnovážná dialýza.....	42
2.3.3	Paralelní analýza permeability umělou membránou	44

2.3.4	Ultracentrifugace	45
2.3.5	Ultrafiltrace	46
2.3.6	Metody kapalinové chromatografie	47
2.3.7	Techniky kapilární elektroforézy.....	48
2.3.8	Mikrodialýza.....	49
2.3.9	Spektroskopické techniky	49
2.3.10	Kalorimetrické techniky	49
2.3.11	Povrchová plazmonová rezonance	50
2.3.12	Shrnutí: výhody a nevýhody jednotlivých metod	50
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
3.1	Materiál a vybavení pro stanovení plazmatické vazebnosti	53
3.1.1	Biologický materiál.....	53
3.1.2	Použitá radiofarmaka.....	53
3.1.3	Přístrojové vybavení a pomůcky	56
3.1.4	Chemikálie	57
3.2	Všeobecné postupy	57
3.2.1	Metoda ultrafiltrace.....	57
3.2.2	Metoda rovnovážné dialýzy.....	57
3.3	Výpočty	58
3.3.1	Aritmetický průměr.....	58
3.3.2	Směrodatná odchylka	59
3.3.3	Výpočet volné frakce pro metodu ultrafiltrace	59
3.3.4	Výpočet rozdílů průměrů a volné frakce pro metodu rovnovážné dialýzy 59	
3.3.5	Statistické zpracování dat	60
4	VÝSLEDKY	61

4.1	Experiment s ^{18}F -FDG.....	62
4.1.1	Výsledky rovnovážné dialýzy	62
4.1.2	Výsledky ultrafiltrace	64
4.2	Experiment s ^{18}F -fluorocholinem.....	68
4.2.1	Výsledky rovnovážné dialýzy	68
4.2.2	Výsledky ultrafiltrace	70
4.3	Experiment s ^{18}F -fluorothymidinem.....	74
4.3.1	Výsledky rovnovážné dialýzy	74
4.3.2	Výsledky ultrafiltrace	76
4.4	Hodnocení statistické významnosti mezidruhových rozdílů	80
5	DISKUSE A ZÁVĚR	82
6	SEZNAM ZKRATEK	88
7	LITERATURA.....	90

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Úvod

Chování léčiva *in vivo* je obvykle hodnoceno z pohledu absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece tohoto léčiva podaného do organismu, rychlosti s jakou nastupuje a trvá jeho efekt. Po podání léčiva do krve jsou jeho molekuly distribuovány tělem pomocí systémové cirkulace a tím dosahují cílových struktur (receptorů). Určení plazmatické vazebnosti je esenciální pro charakteristiku farmakokinetického profilu a odhad celkové farmakologické aktivity.

Vazba léčiva na krevní bílkoviny významně ovlivňuje distribuci léčiva, vazba brání průchodu přes kapilární membránu do tkání. Souvisí také s otázkami bezpečnosti léků a nežádoucími účinky léků, především s interakcí mezi léčivy a ztrátou účinnosti. Plazmatická vazebnost může být pozmeněna různými fyziologickými (těhotenství, stáří) i patologickými (onemocnění jater, ledvin) stavy.

Volná frakce léčiva v plazmě je považována za základní parametr dostupnosti léčiva pro distribuci do tkání a buněk, interakci s receptory, exkreci a metabolismus. Transport nebo difuze léčiv je regulována gradientem koncentrace volného léčiva mezi plazmou a tkání, než se ustaví rovnováha. Rovnováha je ovlivněna změnami v pH, teplotou, koncentrací léčiva, koncentrací proteinu a koncentrací dalších přítomných látek.

Kyselá léčiva se nejčastěji váží na albumin a zásaditá na α 1-kyselý glykoprotein a lipoproteiny. Pokud je plazmatická vazebnost 99 %, znamená to, že 99 % je vázáno na plazmatické proteiny a 1 % je v plazmě nevázané. Toto 1 % je definováno jako nevázaná frakce f_u . Obecně je vysoká vazebnost považována za negativní vlastnost, ale i látky s vysokou vazebností mohou být hodnotná a použitelná léčiva.

Metody určené ke zjištění plazmatické vazebnosti můžeme rozdělit na separativní a neseperativní. První skupina zahrnuje separaci volného ligandu od vázané složky a je vhodná k určení koncentrace buď přímo nevázaného léčiva, nebo vázaného léčiva. Mezi nejčastěji užívané metody patří rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Druhá skupina spoléhá na detekci změny fyzikálně chemických vlastností, buď ligandu, nebo proteinu v důsledku vzniku vazby. Mezi neseperativní metody řadíme např. spektroskopické techniky.

Tato práce je zaměřena na plazmatickou vazebnost radiofarmak, konkrétně radiofarmak značených radionuklidem ^{18}F . Mezi nevýhodu radioaktivně značených látek při určení plazmatické vazebnosti patří radiochemické nečistoty vzniklé buď při přípravě, nebo rozkladem studovaných radiofarmak a mohou vést k přecenění hladiny volného léčiva. Kvůli tomu je vhodné určit čistotu radioaktivně značené látky.

Radiofarmaka značená ^{18}F jsou využívána především k diagnostickým účelům v rámci zobrazovacích metod nukleární medicíny. Jejich výhodou je poměrně krátký poločas rozpadu nuklidu fluoru (110 minut), představující nízkou radiační zátěž pro pacienta a vhodnou energii (510 keV) využitelnou zobrazovacími modalitami jako je pozitronová emisní tomografie (respektive pozitronová emisní tomografie v kombinaci s magnetickou rezonancí nebo počítačovou tomografií). Mezi běžně používaná fluorová radiofarmaka patří 2-(^{18}F)fluor-2-deoxy-D-glukosa, [^{18}F]-fluorocholin, [^{18}F]-fluorothymidin, [^{18}F]-fluorid sodný a [^{18}F]FDOPA.

Cíle rigorózní práce:

1. Zpracovat přehled literárních údajů o vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny, zhodnotit význam této vazebnosti pro farmakokinetiku léčiv.
2. Stanovit vazebnost vybraných radiofarmak značených ^{18}F na plazmatické bílkoviny u několika živočišných druhů včetně člověka.
3. Výsledky zhodnotit z hlediska mezidruhového srovnání a z hlediska možného významu stanovené vazebnosti na farmakokinetiku těchto látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Radiofarmaka značená [¹⁸F]

Radiofarmaka byla zařazena mezi léčiva v roce 1960.¹ Obecně se jedná o radioaktivně značené molekuly určené k *in vivo* aplikaci. Obsahují molekulu nosiče udávajícího chování radiofarmaka v organismu (farmakokinetiku a farmakodynamiku) a radioaktivní nuklid odpovědný za vznik signálu detekovatelného mimo organismus s následnou vizualizací pomocí metod nukleární medicíny. Patologická změna na molekulární úrovni projevující se abnormalitou je vizualizována touto metodou výrazně dříve, než se manifestuje na morfologické úrovni.

Nosiče poskytují vysoký stupeň specifity a selektivity k cílovému místu. Cílem může být receptorový systém, antigen, enzym, přenašeč nebo metabolický proces, up-regulace, oxygenace tkáně, rozdílné energetické požadavky buněk, změny v genech a expresi proteinů. Využity mohou být i rozdíly ve vaskularizaci, proliferaci a perfúzi. Při patologických stavech, tyto cíle nebo procesy mohou být signifikantně změněny v porovnání s jejich normálním stavem. Tudíž se liší i interakce s radiofarmakem.

2.1.1 PET radiofarmaka

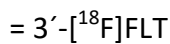
Konkrétně PET radiofarmaka se skládají ze dvou složek: molekulární struktury (vektor, ligand, nosič) a pozitron emitujícího radionuklidu. Pro stabilní propojení těchto dvou částí je nezbytná jejich chemická vazba. Nosič definuje biologický charakter a je odpovědný za chemické a biochemické interakce s organismem. Pozitron emitující radionuklid poskytuje signál detekovaný zařízením PET. Všechny široce používané PET nuklidy mají krátký poločas a dostupnost je limitována relativní blízkostí cyklotronu, ve kterém jsou vyráběny. Poločas radionuklidů by měl být dostatečně dlouhý pro úspěšné značení, případný transport a následnou zobrazovací proceduru.

Použití se liší od typu jednotlivých radionuklidů. Výběr PET radionuklidů je vázán na následujících kritéria: dostupnost radionuklidu, fyzikální charakteristika radionuklidu, radiochemické a radiofarmakologické vlastnosti. Nejpoužívanější radiofarmaka využívané při PET lze rozdělit do 3 skupin z hlediska aplikace: onkologie, kardiologie a neurologie.²

PET vytvořila novou dimenzi pro zobrazování nádorů. Což může vést k signifikantním změnám v péči o pacienty a zvýšení efektivity léčby. Příklad hybridních modalit jako je

kombinace PET se strukturálním zobrazením (např. CT) poskytuje velmi přesné informace o běžných nádorech. Nejběžněji užívaným radiofarmakem je [¹⁸F]FDG, tedy radioaktivně značený analog glukosy. [¹⁸F]FDG PET-CT se stala zobrazovací modalitou využitelnou v diagnostice, stagingu i restagingu, predikci odpovědi na terapii, časnou detekci rekurencí a zhodnocení funkcí orgánů po léčbě u mnoha nádorových onemocnění. Avšak [¹⁸F]FDG je nespecifický tracer a je ovlivněn mnoha benigními podmínkami, jako jsou zánětlivé nebo infekční procesy. Ve snaze o nalezení specifického markeru bylo v poslední dekádě vyvinuto množství nových PET radiofarmak. Chemicky se jedná o aminokyseliny, deriváty nukleosidů, cholinové deriváty, nitroimidazolové deriváty a peptidické látky.³

2.1.2 [¹⁸F]-fluorothymidin



[¹⁸F]FLT je radioaktivně značená forma pyrimidinového nukleosidu, který byl poprvé popsán Langenem jako selektivní inhibitor DNA syntézy.⁴

Před použitím FLT jako diagnostika pro PET vyšetření, byl FLT podáván v klinické studii bez radioaktivního nuklidu jako antiretrovirální terapeutikum při léčbě HIV a AIDS. Při terapeutických dávkách a prolongovaném podání se objevily toxické účinky FLT, včetně dvou úmrtí při podání vyšších dávek a tato látka již k tomuto účelu nebyla používána.⁵

Později Grierson a Shields vyvinuli a syntetizovali [¹⁸F]FLT jako potenciální PET diagnostikum.⁶

2.1.2.1 Použití

[¹⁸F]FLT může být použit u diagnostiky časného stádia nemalobuněčného karcinomu plic a umožní vybrat pacienty s rizikem rekurence, kteří budou mít benefit z chirurgické resekce následovanou adjuvantní chemoterapií. S vysokou přesností lze detekovat také primární tumor plic.

Na druhou stranu nelze doporučit [¹⁸F]FLT -PET jako postup využitelný pro celotělová nádorová onemocnění, jako je používáno [¹⁸F]FDG-PET. A to z důvodu nižšího příjmu v tumoru a vyšší aktivitě v játrech a kostní dřeni. [¹⁸F]FLT-PET kombinované s [¹⁸F]FDG-PET je

potenciálně vhodné pro zvýšení specifity při stagingu a poskytuje informace o růstu tumoru a jeho agresivitě, což může mít význam při stanovení prognózy a při výběru léčby.⁷

FLT jen málo prochází přes neporušenou hematoencefalickou bariéru⁸ a v normální mozkové tkáni dochází pouze k mírné proliferaci. Avšak [¹⁸F]FLT je velmi výrazně vychytáván při high-grade gliomech a dalších tumorech asociovaných s mozkem, kdy typicky dojde k poškození hematoencefalické bariéry.⁹ [¹⁸F]FLT lze použít pro určení proliferační aktivity gliomu před provedením biopsie.¹⁰

U lymfomů dochází k výrazně většímu příjmu [¹⁸F]FLT než u jiných malignit. Avšak vzhledem k zároveň vysokému up-taku [¹⁸F]FLT v normální kostní dřeni a významu zapojení dřeni v malignitách má [¹⁸F]FLT-PET klinicky velmi limitované použití ve stagingu lymfomů. Velmi dobré výsledky byly dosaženy u studie zkoumající vhodnost [¹⁸F]FLT-PET a předpovědi úspěšnosti chemoterapie u non-Hodgkinova lymfomu. Již po 2 dnech od aplikace chemoterapeutik došlo průměrně k 68% poklesu příjmu [¹⁸F]FLT a toto číslo v následujících dnech dále rostlo. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože s nástupem cytostatických léčiv a metod biologické odpovědi nádoru na léčbu poroste význam detekce již velmi malých změn v nádoru.¹¹

Obdobná studie byla provedena v terapii 5-fluorouracilem fibrosarkomu u myší, kde byla potvrzena [¹⁸F]FLT-PET jako metoda s vyšší citlivostí v monitorování úspěšnosti léčby v porovnání s [¹⁸F]FDG. V některých případech vykazuje [¹⁸F]FLT vyšší specifitu ke karcinomu než [¹⁸F]FDG, která může zobrazovat falešně pozitivní up-take v oblastech s infekcí nebo zánětem.¹²

[¹⁸F]FLT se ukázal jako velmi vhodný pro detekci primárního kolorektálního karcinomu, peritoneálních metastáz a plicních metastáz, ale ukázal se jako nevhodný pro detekci jaterních metastáz, z důvodu vysokého pozadí v játrech způsobené jaterní glukuronidací [¹⁸F]FLT.¹³

2.1.2.2 Mechanismus účinku

DNA replikace je esenciální pro replikaci buněk a DNA je aktivně syntetizována v proliferujících buňkách. [¹⁸F]FLT využívá metabolickou dráhu, která transportuje cirkulující

thymidin a jeho analoga dovnitř buněk a fosforyluje je. Podstatou této dráhy je, že proliferující buňky obsahují nukleotidy pro DNA syntézu.¹⁴

Po intravenózní aplikaci následuje přechod [¹⁸F]FLT do buněk pasivní difúzí nebo přes přenašeče pro nukleosidy.¹⁵ Následně je [¹⁸F]FLT fosforylován thymidinkinasou (TK1), tedy cytoplazmatickým enzymem, který reguluje buněčný cyklus. Exprese TK1 v normální buňce je regulována a narůstá pouze v pozdní G₁ a S buněčné fázi, ale mnohem výraznější a trvalejší růst se projevuje u karcinogeneze nebo u abnormální proliferace nádorových buněk. Existuje souvislost mezi proliferací nádorových buněk a příjmem [¹⁸F]FLT, kdy fosforylace [¹⁸F]FLT reflektuje buněčnou proliferaci. [¹⁸F]FLT není substrátem pro DNA syntézu, ale pouze pro TK1.¹⁶

Zatímco thymidin-monofosfát je rychle fixován do buněk během DNA syntézy, [¹⁸F]FLT monofosfát se akumuluje jako membránou nepropustný metabolit a z hlediska PET zobrazení se zobrazí jako by byl součástí DNA. Fakt, že [¹⁸F]FLT je inertní ke katabolickým přeměnám, hraje důležitou roli v prodloužení vstupu traceru a minimalizaci aktivity pozadí.⁶

Zobrazení proliferace tumoru může být využito k diagnostice růstu tumoru nebo určení stupně malignity. Identifikace rychle proliferujících oblastí v nádorech může poskytovat nová a relevantnější data ohledně úspěšnosti léčby. Toto může být obzvláště důležité v hodnocení pacientů na začátku léčby cytostatiky.¹⁶

2.1.2.3 Farmakokinetika

[¹⁸F]FLT se během 10 minut po intravenózní aplikaci rychle vychytává v cílových tkáních a po dobu 60 minut zůstává jeho akumulace stabilní. Průměrně 70% aktivity [¹⁸F]FLT zůstává 60 minut po aplikaci nemetabolizováno.¹⁷

U látek strukturně podobných [¹⁸F]FLT: alovudinu (3'- fluorothymidin) a zidovudinu byla použita metoda mikrodialýzy pro stanovení koncentrací volných léčiv v extracelulární tekutině mozku, svalů a krve krysa po podání. Alovudin a zidovudin byly analyzovány s využitím HPLC s UV detekcí a vazba na plazmatické proteiny byla stanovena mikrodialýzou *in vitro*. Koncentrace dosažená v krvi a svalu byla stejná pro obě léčiva, kdy maximální koncentrace byly nejvyšší v krvi, nižší ve svalu a nejnižší v mozku. Koncentrační pík byl pozorován v krvi a svalu mezi 20 a 40 minutou po podání a v mozku mezi 40 a 60 minutou.

Plazmatická vazba na bílkoviny byla u zidovudinu 10 % a alovudin se prakticky nevázal (vazba byla pod hladinou detekovatelnost, tj. < 5%).¹⁸

2.1.2.4 Dozimetrie

Byla provedena studie na pacientech s potvrzenou nebo suspektní rakovinou plic, kdy podaná dávka byla 2,59 MBq/kg, maximální podaná dávka nepřekročila 185 MBq. Nejvyšší absorbovanou dávkou z orgánů obdržel močový měchýř (0,176 mGy/MBq), následovala játra, dále ledviny a kostní dřev. Efektivní dávkový ekvivalent na močový měchýř 6 hodin po aplikaci [¹⁸F]FLT byl 0,03 mSv/MBq. Při porovnání s ostatními látkami používanými v PET diagnostice je radiační riziko použití [¹⁸F]FLT v přijatelných mezích.¹⁹

2.1.3 [¹⁸F]-fluorid sodný

2.1.3.1 Použití

[¹⁸F]NaF se používá pro celotělové PET zobrazení skeletu a jeho maligních i benigních změn. Dokáže identifikovat fokální abnormality skeletu, které jsou způsobeny nádorovými i nenádorovými onemocněními jako jsou trauma, artritida, infekce a další. Jedná se o metodu senzitivní a poměrně nespecifickou, proto je vhodné ji kombinovat s další zobrazovací metodou.²⁰ Dále je [¹⁸F]NaF využíván u diagnostiky onemocnění kostního metabolismu, při hodnocení kostních štěpů a růstu kosti.

Prakticky všechna nově vytvořená kostní hmota způsobí zvýšené vychytávání [¹⁸F]NaF. Příjem je ovlivňován faktory, jako je regionální krevní průtok a aktivní kostní obrat. Vychytávání je výraznější u nově vznikajících kostí, kde je vyšší dostupnost vazebných míst.²¹

2.1.3.2 Mechanismus účinku

Ionty fluoridu ¹⁸F se ukládají ve skeletu podle stupně osteoblastické aktivity a podle šíře kortikální kosti v jednotlivých částech skeletu. Zvýšená akumulace iontů fluoridu ¹⁸F v okolí kloubů se vyskytuje při degenerativních a zánětlivých změnách kloubů, po traumatu či v těsné blízkosti primárních maligních tumorů kostí a metastáz maligních nádorů do skeletu.

Jejich vychytávání v kostech závisí na lokálním krevním průtoku, stupni osteoblastické aktivity a extrakčním koeficientu kosti. Vysoká kapilární permeabilita a rychlá plazmatická

clearance, která je u kostních metastáz 3 – 10krát vyšší než u zdravé kosti, vede k významnému zvýšení poměru kost/krevní pozadí.²²

2.1.3.3 Farmakokinetika

Minimálně 99 % fluoru obsaženého v lidském organismu je v kostře, primárně ve formě fluoroapatitu. [¹⁸F]NaF má výhodnou charakteristiku zahrnující vysoký a rychlý kostní příjem spojený s velmi rychlou krevní clearance, která způsobí vysoký rozdíl poměru kostní tkáně a pozadí ve velmi krátkém čase. Kvalitní zobrazení lze získat již po méně než hodině od aplikace.²³

Při srovnání ¹⁸F, ⁴⁷Ca, ⁸⁵Sr a ^{87m}Sr (nuklidy použitelné ke skeletální diagnostice) a jejich kinetiky, bylo zjištěno, že nejrychleji je z krve odstraňován ¹⁸F a jeho plazmatická clearance je čtyř až pětinasobná ve srovnání s ostatními nuklidy. Pětihodinová kumulativní exkrece do moči ¹⁸F byla stabilně vyšší než u ostatních nuklidů (hodnoty vyloučené dávky z celkové dávky byly v rozmezí od 7,4 do 24,8%).

Mechanismus ukládání se lišil mezi jednotlivými farmaky. ¹⁸F je injikován ve formě [¹⁸F]NaF a je k dispozici jako monovalentní anion. Depozice probíhá formou výměny s hydroxylovými anionty a zřejmě ještě dalšími anionty. Fluorid se dostává na povrchu kosti do hydroxyapatitu, poté migruje do krystalické struktury kosti a je uložen do té doby, než je zabudován do samotné kostní hmoty. Tento mechanismus, významný v dlouhodobějších biologických procesech, je ovšem příliš pomalý, než aby byl prokázán izotopem ¹⁸F s tak krátkým poločasem.²⁴

Farmakokinetika fluoridu sodného je, jak bylo popsáno výše, dána především jeho příjmem do kostí a renální exkrecí. Transmembránová migrace fluoridových iontů je zřejmě zprostředkovaná chemickou rovnováhou s fluorovodíkem, který má permeabilitu přes lipidovou membránu více než milionkrát vyšší než fluoridové ionty.²⁵

V porovnání s [¹⁸F]NaF z hlediska vazby na plazmatické proteiny je mnohem výraznější vazba u ^{99m}Tc-MDP, kde se po aplikaci váže na krevní proteiny asi 25 % látky a tato frakce roste až na 70 % 24 hodin po injekci.²⁶ Frakce ^{99m}Tc-MDP nevázaná na proteiny se eliminuje z krve srovnatelně rychle jako u [¹⁸F]NaF, ale frakce vázaná na proteiny v krvi zůstává delší dobu.

U $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ bylo kolem 30 % cirkulující látky transportováno červenými krvinkami. S ohledem na data ukazující rychlý transport $[^{18}\text{F}]$ -fluoridu přes erytrocytární membránu, data vypovídající o kinetice $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ mnohem spíše vypovídají o clearance plné krve než o plazmatické clearance.²⁷

V jiné studii byla prokázána vazba na erytrocyty 1 hodinu po aplikaci v množství 2,5 % podané dávky. 2,5 až 4,5 hodiny po aplikaci radioaktivita vázaná na erytrocyty tvořila 47 % z celkové radioaktivity v plazmě.²⁸ $[^{18}\text{F}]$ -fluorid volně difunduje z červených krvinek na povrch kosti, navíc příjem červenými krvinkami zřejmě interferuje s příjmem látky kostí. Pozorovaná koncentrace $[^{18}\text{F}]$ -fluoridu v erytrocytech naznačuje, že pravděpodobně dochází k příjmu i nezralými erytrocyty v kostní dřeni a granulocyty aktivní dřeni.

Za běžných fyziologických podmínek je vazba $[^{18}\text{F}]$ -fluoridu na plazmatické proteiny zanedbatelně malá a fluoridové ionty jsou volně filtrovány glomeruly. Jako u ostatních halogenidů je i fluoridová renální clearance modifikována tubulární reabsorpcí, reabsorbovaná frakce je mnohem nižší než u chloridů, bromidů a jodidů. Resorpce fluoridu v nefronu je zprostředkovávána pomocí HF a tudíž renální clearance $[^{18}\text{F}]$ je závislá na pH.

Ačkoli i menší změny jako jsou metastázy v kostech, fraktury nebo Pagetova choroba jsou snadno identifikovatelné na radionuklidových kostních scanech, existují i větší změny spojené s metabolickým onemocněním kostí jako je renální osteodystrofie, osteomalácie, primární hyperparathyreoidismus nebo osteoporóza, které vyžadují větší sofistikovanost, protože obraz je téměř k nerozeznání od normálního stavu. V takových případech se využije kvantifikace kinetiky kostního radiofarmaka v celém těle, která poskytne užitečnou informaci týkající se stavu kostního obratu.²⁹

Plazmatické křivky závislosti aktivity a času pro $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ byly měřeny přímo z arteriální krve, a následně byla určena koncentrace $[^{18}\text{F}]$ -fluoridových iontů v rovnovážné stavu v poměru plazmy ku plné krvi 1,23 pro plazmu.³⁰

2.1.3.4 Dozimetrie

$[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ určený pro kostní scintigrafii byl testován na myších pro určení radiační zátěže a data následně extrapolována na člověka s teoretickou dávkou 370 MBq. Nejvyšší absorbovaná dávka byla v močovém měchýři 0,059 mGy /MBq a v kostech 0,037 mGy/MBq.³¹

2.1.4 [¹⁸F]-DOPA

= L-3,4-dihydroxy-6-[¹⁸F]fluorofenylalanin

2.1.4.1 Použití

První studie za použití [¹⁸F]FDOPA a její využití pro vizualizaci mozku za využití PET byla provedena v roce 1983. Pouze 1% podané [¹⁸F]FDOPA se dostalo do mozku.³²

[¹⁸F]FDOPA je vhodná k monitorování progresu Parkinsonovy nemoci, neuroprotektivní terapii a stanovení rozsahu degenerace presynaptických dopaminergních neuronů. Umožňuje diagnostiku Parkinsonovy nemoci již v časných stádiích nemoci.^{33,34} Dále lze látku využívat u diagnostiky mozkových tumorů³⁵ a neuroendokrinních lézí.³⁶

Je vhodná pro dobře diferencované neuroendokrinní tumory pocházející z gastrointestinálního traktu, může být vhodná i u dalších typů neuroendokrinních tumorů jako jsou neuroblastomy, medulární karcinom štítné žlázy, feochromocytom nebo paragangliom a také pro malignity v centrálním nervovém systému.^{37,38}

2.1.4.2 Mechanismus účinku

DOPA je prekurzor neurotransmiteru dopaminu, který hraje důležitou roli v mediaci pohybu, kognici a emocích. Dále má význam u různých neuropsychiatrických onemocnění jako je schizofrenie. L-tyrosin se přeměňuje ve dvou krocích na dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a následně na dopamin. První rychlost omezující krok je katalyzován tyrosin-3-monooxygenasou. Druhý krok je katalyzován enzymem AADC. V části nervového systému uvolňujícího dopamin jako neurotransmiter (dopaminergní neurony) nedochází k žádné další metabolizaci a dopamin je ukládán ve vezikulech v presynaptických nervových zakončeních.³

[¹⁸F]FDOPA je radioaktivně značený analog látky L-DOPA používané ke zhodnocení centrální dopaminergní funkce presynaptických neuronů za použití PET. [¹⁸F]FDOPA-PET reflektuje [¹⁸F]FDOPA transport do neuronů, [¹⁸F]FDOPA dekarboxylaci a kapacitu pro ukládání dopaminu.³⁹

Tento prekurzor dopaminu je vychytáván buňkami neuroendokrinního tumoru pomocí transportního systému pro aminokyseliny. Následně je metabolizován na dopamin. V sekrečních vezikulech je dopamin dále metabolizován na norepinefrin a epinefrin.⁴⁰

2.1.4.3 Farmakokinetika

Z hlediska farmakokinetiky má svůj význam enzym AADC, pro kterou je [¹⁸F]FDOPA substrátem a je exprimován v mnoha nádorech neuroendokrinního původu.⁴¹ Zvýšená expimace v maligních buňkách je pozorována také u vysokokapacitního transportéru LAT, který je zodpovědný za vstup různých aminokyselin do buňky, včetně [¹⁸F]FDOPA.

6-[¹⁸F]-fluorodopamin je metabolitem [¹⁸F]FDOPA, který vzniká především ve striatu pomocí enzymu AADC.⁴² Několik dalších významných metabolitů má [¹⁸F]FDOPA v plazmě, jako např. 3-*O*-methyl-6-[¹⁸F]-fluoro-L-DOPA (3-OMFD). V lidské plazmě vzrůstá množství [¹⁸F]FDOPA 30 minut od aplikace a 3-OMFD 120 minut od aplikace. Naopak u hladin sulfátu 6-[¹⁸F]-fluorodopaminu (FDA sulfát) a [¹⁸F]-fluoro-homovanilinové kyseliny (FHVA) docházelo k jejich poklesu v čase. V plazmě nebyly detekovány ve volné formě 6-[¹⁸F]-fluorodopamin (FDA) ani 6-[¹⁸F]-3-4-dihydroxy-fenylactová kyselina (FDOPAC).⁴³

Vznik metabolitů můžeme ovlivnit podáním inhibitoru katechol-*O*-methyltransferasy (COMT) entacaponu a tím prodloužit cirkulační čas [¹⁸F]FDOPA v plazmě, nezmění se ale rychlost dekarboxylace nebo influx striatem.⁴⁴

Další možnou modulací metabolismu je podání inhibitoru DOPA-dekarboxylasy karbidopy, která zabrání časně dekarboxylaci [¹⁸F]FDOPA na [¹⁸F]-dopamin mimo mozek alepší tím zobrazení striata. Karbidopa je tedy používána i ke zvýšení příjmu [¹⁸F]FDOPA nádorovými buňkami při zobrazení neuroendokrinních tumorů.⁴⁵

Ve studii zabývající se metabolismem [¹⁸F]FDOPA u lidí byla podána nejdříve karbidopa a po 90 minutách injekčně [¹⁸F]FDOPA. Plazmatické hladiny se pohybovaly mezi $0,35 \pm 0,18$ $\mu\text{g/ml}$ v době podání a $0,25 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ po 90 minutách od aplikace. Periferní metabolit detekovaný v plazmě byl především 3-OMFD, který tvořil 60 % aktivity v plazmě po 60 minutách od podání látky. Tento metabolit vznikal přednostně z důvodu blokace enzymu dekarboxylasy pomocí karbidopy. Jinak by došlo ke vzniku dalších metabolitů (FDA sulfát,

FDOPAC a FHVA), jak bylo prokázáno při podání nižších dávek karbidopy, případně nepodání u opic.⁴⁶

3-OMFD prochází přes hematoencefalickou bariéru přes transportér neutrálních aminokyselin, jako prochází [¹⁸F]DOPA a přispívá tak celkové radioaktivitě v mozkové tkáni. Ačkoli rychlost přeměny na 3-OMFD na periférii není ovlivněna přítomností karbidopy, hladina plazmatické [¹⁸F]FDOPA je vyšší s karbidopou než bez ní. Toto společně s uptake mechanismem mozku pro [¹⁸F]FDOPA, který není ovlivněn hladinou karbidopy, může vést v důsledku k vyššímu příjmu [¹⁸F]FDOPA podaného s karbidopou striatem.

Křivka vyjadřující závislost času a aktivity v arteriální krvi a v plazmě ukazuje, že krátkou dobu po podání je obecně aktivita vyšší v plazmě než v plné krvi a s postupem času dochází k vyrovnání hodnot aktivity. Nejdříve je aktivita v plazmě i krvi ve formě [¹⁸F]FDOPA. Poměr radioaktivních koncentrací mezi plnou krví a plazmou lze vyjádřit jako 1-Hct (Hct = hematokrit, tj. objem erytrocytů k celkovému objemu krve). To znamená, že [¹⁸F]FDOPA je prakticky jen v plazmě a není na erytrocytech. Později (120 minut) je většina radioaktivní látky ve formě 3-OMFD, pak je poměr plná krev/plazma blízký číslu jedna, což naznačuje, že 3-OMFD prostupuje membránou erytrocytů. Je stále nejasné, jaké transportní a chemické mechanismy se podílí na rozdílné permeabilitě přes membránu erytrocytů.⁴⁷

2.1.4.4 Dozimetrie

Dozimetrie byla odhadnuta z dat biodistribuce naměřených na myších a lidských vzorcích. Nejvyšší dávku absorbovala stěna močového měchýře (0,215 mGy/MBq). Dalšími orgány s relativně vysokou dávkou byly ledviny a pankreas. Mozek, játra a plíce obdržely zanedbatelnou dávku. Efektivní dávkový ekvivalent 0,026 mSv/MBq byl naměřen po intravenózním podání [¹⁸F]FDOPA.⁴⁸

2.1.5 2-(¹⁸F)fluor-2-deoxy-D-glukosa

= 2-(¹⁸F) fluor-2-deoxy-D-glukopyranosa

Zajímavým faktem je, že prototyp této molekuly byl sestaven na Přírodovědné fakultě Univerzity Karlovy v Praze a to roce 1968 prof. Josefem Pacákem a Miloslavem Černým.⁴⁹ První příprava radioaktivní glukosy byla provedena v roce 1978.⁵⁰

2.1.5.1 Použití

PET diagnostika s použitím [^{18}F]FDG je velice výhodná metoda pro vyhledávání neoplastických útvarů téměř v celém lidském těle. Kombinuje výborné vlastnosti snímání (zejména citlivost a rozlišení) a radioaktivního preparátu s příznivou biodistribucí a vysokou afinitou k nádorovým buňkám. [^{18}F]FDG PET je vhodná metoda k diagnostice rakoviny plic, jícnu, hlavy, krku, prsu, děložního čípku, vaječníků, varlat štítné žlázy, mozku, slinivky, melanomu, lymfomu, sarkomu a kolorektálního karcinomu.⁵¹ Dále má velmi široké využití v diagnostice lokálně recidivujících nádorů, postiženích lymfatických uzlin a vzdálených metastáz⁵² např. metastáz v játrech, kostech, plicích, mozku i peritoneu.^{53,54}

2.1.5.2 Mechanismus účinku

[^{18}F]-FDG je agens vhodné k detekování nádorů. [^{18}F]FDG je distribuována v tumoru, nově vzniklé granulační tkáni obklopující tumor a makrofázích, které infiltrují většinu okolí nekrotické tkáně tumoru na rozdíl od životaschopných nádorových buněk.⁵⁵

2.1.5.3 Farmakokinetika

[^{18}F]FDG je analog glukosy obsahující radionuklid fluoru [^{18}F].⁵⁶

Rovnováha koncentrací [^{18}F]FDG na erythrocytech a v plazmě vzniká velmi rychle (do 1 minuty po podání) a poté následuje pomalá fáze, kdy látka prochází přes erythrocytární membránu. Zároveň vznikají radioaktivně značené metabolity, které neprocházejí do erythrocytů a akumulují se v plazmě.⁵⁷

GLUT přenašeče transportují glukosu ve směru jejího koncentračního spádu pasivním transportem (tj. bez nutnosti dodání energie) přes buněčnou membránu. Zvýšená exprese přenašečů transportujících glukosu (především GLUT1) souvisí s rozvojem různých malignit. GLUT1 je široce zastoupen v normální tkáni. GLUT2 se nachází především v játrech, pankreatu a retině, jeho zvýšená exprese byla pozorována u nádorů žaludku. Přenašeče GLUT1 a GLUT3 spolu s enzymem hexokinasou hrají klíčovou roli v akumulaci [^{18}F]FDG.⁵⁸

Intracelulární [^{18}F]FDG je po transportu do buňky fosforylována hexokinasou na [^{18}F]FDG-6-fosfát, fosforylované hexosy vykazují jen nízkou permeabilitu. K rychlé

fosforylaci [^{18}F]FDG dochází *in vivo* i *in vitro*. Prakticky veškerá radioaktivita v mozku mezi 1 a 120 minutou byla ve formě fosforylované formy [^{18}F]FDG.

Radioaktivní látka se nejdříve distribuuje do všech orgánů a poté následuje její rychlá clearance, s výjimkou mozku a srdce. Tento proces je důsledkem metabolického vychytávání fosforylované formy [^{18}F]FDG těmito dvěma orgány a jejich vysokou aktivitou hexokinasy a nízkou až prakticky chybějící aktivitou glukózo-6-fosfátasy. Mozek má nejvyšší hexokinásovou aktivitu, poté následují srdce a ledviny, dále plíce a na závěr z pozorovaných orgánů vykazují nejnižší aktivitu tohoto enzymu játra. Naopak pouze játra vykazují významnější aktivitu fosfatásovou.

Srdce obsahuje vysoké a relativně konstantní množství radioaktivity v čase, na rozdíl od plic, jater a ledvin, kde dochází k rychlé clearance. Nejdříve převažuje [^{18}F]FDG a později se stává dominantní fosforylovaná forma molekuly [^{18}F]FDG-6-fosfát. I když její aktuální koncentrace zůstává konstantní z důvodu rychlé clearance radioaktivní složky. [^{18}F]FDG-6-fosfát není dále metabolizována klasickou glykolytickou dráhou, neprochází pentózovým cyklem, neúčastní se syntézy glykogenu a také jeho defosforylace intracelulární glukosa-6-fosfátasou probíhá velmi pomalu, proto je jeho koncentrace v tkáních udržována stabilní po několik hodin.

[^{18}F]FDG je z plic, jater a ledvin, které mají nižší hexokinásovou a/nebo glukózo-6-fosfátásovou aktivitu, odstraňovaná do moči nejčastěji v nezměněné podobě jako [^{18}F]FDG. Tato rychlá exkrece podstatně snižuje pozadí radioaktivity a přispívá k rychlému odstranění z krve a je i důsledkem zjevné neschopnosti ledvinných tubulů resorbovat [^{18}F]FDG.

Největší rozdíl mezi [^{18}F]FDG a glukosou je v její exkreci do moče. Hladiny krevní glukosy se udržují relativně konstantní pomocí resorpce glukosy renálním proximálním tubulem, jedná se o aktivní transport, který závisí na interakci glukosy s receptorem v kartáčovém lemu na povrchu buněk proximálního tubulu. [^{18}F]FDG má velmi nízkou afinitu k tomuto glukózovému receptoru.^{59,60}

2.1.5.4 Dozimetrie

Nejvyšší dávku obdrží močový měchýř 118,9mGy/GBq, dále následuje srdce a kostní dřeň.⁶¹

2.1.6 [¹⁸F]-fluorocholin

= fluoromethyl-(¹⁸F)dimethyl-2-hydroxyethyl-ammonium chlorid

2.1.6.1 Použití

Fosforylovaný cholin je jedním z meziproductů v Kennedyho dráze, kdy dochází k zabudování cholinu do fosfolipidů. Pro používání v PET diagnostice byl navržen [¹⁸F] fluoromethylcholin ([¹⁸F]FCH) a fluoroethylcholin ([¹⁸F]FECH).⁶² [¹⁸F]FECH vykazoval vysokou akumulaci v močovém měchýři, což se jevílo jako nežádoucí při zobrazení rakoviny prostaty a pánevních lymfatických uzlin, proto byl upřednostněn [¹⁸F]FCH jako analog s lepšími biologickými vlastnostmi.⁶³

Vzrůstající příjem cholinu byl prokázán v měkkých tkáních zasažených infekcí i tumorech a také v aterosklerotických placích.^{64,65}

Využití cholinu pro zobrazení karcinomu prostaty je založeno na rostoucí hladině fosforylcholinu a zvýšení obratu fosfatidylcholinu v prostatických rakovinných buňkách.⁶⁶ PET diagnostika souvisí s vysokým příjmem v malignitách u pacientů nejen s rakovinou prostaty, ale i s rakovinou prsu a mozkových tumorů.^{67,68} Další indikací je detekce kostních metastáz, kde je možné za pomoci [¹⁸F]-FCH predikovat chování metastáz.⁶⁹ PET/CT s [¹⁸F]-FCH je klinicky využitelný nástroj pro re-staging pacientů s rostoucí hodnotou prostatického specifického antigenu v séru po ukončené lokální terapii. Může být také použit pro detekci suspektní rakoviny prostaty s více negativními biopsiemi prostaty.⁷⁰

2.1.6.2 Mechanismus účinku

Cholin je základní nutrient pro všechny buňky, hraje důležitou roli v syntéze fosfolipidů, které jsou součástí buněčné membrány. Methylová skupina je donorem v metabolismu methioninu a cholin je důležitý v syntéze neurotransmiteru acetylcholinu.

Nedostatek cholinu ovlivňuje expresi genů vedoucích k buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze a je také asociován s porušením jaterní funkce a rakovinou.⁷¹

Nádorové buňky mají výrazně zvýšený metabolismus a zvýší se i příjem cholinu, aby buňky zvládaly nároky na syntézu fosfolipidů pro buněčnou membránu.⁷² Příjem cholinu se zvyšuje společně s expresí cholinkinasy.⁷³

Po příjmu do buněk tumoru pomocí vysoce afinního transportérového systému je cholin metabolizován cholinkinase a pokračuje Kennedyho dráhou, vzniká fosfatidylcholin a následně je inkorporován do intracelulární i plazmatické membrány buňky. Klíčové enzymy metabolismu cholinu jako je cholinkinasa jsou up-regulovány v rakovinných buňkách prostaty. Obdobné chování v buňce vykazuje i fluorocholin.⁷⁰

2.1.6.3 Farmakokinetika

[¹⁸F]FCH je rychle odstraněn z cirkulace (během 5 minut). Koncentrace radioaktivního ¹⁸F v prvních deseti minutách po aplikaci rychle vzrůstá, poté následuje pozvolnější vzrůst. V plicích je po celou dobu pouze malé množství radiofarmaka.⁷⁴

Stabilita [¹⁸F]FCH v krvi byla testována inkubací asi 3,7MBq [¹⁸F]FCH ve 3 ml heparinované plné krve zdravého dospělého dobrovolníka. Po 2 hodinách inkubace při 37°C byla oddělena plazma, plazmatické proteiny byly vysráženy a supernatant byl analyzován za použití HPLC. Látka je velmi stabilní, zůstala intaktní i po dvou hodinách inkubace. Z hlediska přeměny na metabolity fluorocholinu po dvouhodinové inkubaci v prostatických rakovinných buňkách byl nejvíce zastoupeným metabolitem fosforylfluorocholin (72 % radioaktivity).⁶⁷

Jeho urinální exkrece může být limitující pro diagnostiku v oblasti pánve. Jednou z indikací, pro kterou byl radioaktivně značený cholin používán, byla detekce lymfatických uzlin u pacientů s rakovinou prostaty.⁷⁵

2.1.6.4 Dozimetrie

[¹⁸F]FCH vykazuje zvýšený příjem ledvinami, játry a slezinou. Z hlediska dozimetrie byly ledviny orgánem s nejvyšší obdrženou dávkou, následované byly močovým měchýřem a játry. Efektivní dávkový ekvivalent byl při podání dávky 4,07 MBq/kg kolem 0,01 mSv/MBq.⁷⁴

2.1.7 [¹⁸F]-flutemetamol

= 2-{3-[¹⁸F]fluoro-4-(methylamino)fenyl}-1,3-benzothiazol-6-ol

2.1.7.1 Použití

Rozvoj Alzheimerovy nemoci (AD) je spojen s neurodegenerací jako s důsledkem neuronální nadměrné exprese, sekrece a depozice neurotoxického beta amyloidu, což je fragment beta amyloidového prekursoru v mozku.⁷⁶ Včasná detekce beta amyloidních plaků neinvazivními technikami jako je PET k identifikaci pacientů, kteří mají predispozici k rozvoji nemoci a k monitorování účinnosti léčiv používaných k léčbě nebo zpomalení této nemoci.⁷⁷

2.1.7.2 Mechanismus účinku

Flutemetamol (¹⁸F) se váže na β-amyloidní neuritické plaky v mozku. Poprvé byla vhodnost použití tohoto radiofarmaka pro detekci amyloidních plaků u pacientů s AD dokázána ve studii ve srovnání s histologickým nálezem. Existuje přímá úměra mezi množstvím beta amyloidních plaků a vychytáváním [¹⁸F]-flutemetamolu.⁷⁸

2.1.7.3 Farmakokinetika

Flutemetamol (¹⁸F) je rychle odstraněn z krve a dalších periferních orgánů. Maximální akumulace látky byla 5 minut po aplikaci detekována v játrech a později ve střevě a po 30 minutách v ledvinách. Jen velmi malá část se dostala do kostí, z čehož lze odvodit, že v cirkulaci nedochází k defluoridaci flutemetamolu (¹⁸F). Nejvyšší příjem mozem byl pozorován po 5 minutách od aplikace ($3,67 \pm 1,69\%$ ID/g) a poměr aktivit krev-mozek byl v tomto čase 12,2 a klesal až na hodnotu 1,0 v čase 60 minut.⁷⁹

Průběh plazmatické aktivity flutemetamolu (¹⁸F) jako funkce času byl stejný ve všech skupinách (zdravé kontroly a pacienti s AD) a byl zjištěn obdobný vzhled bolusového píku. V této studii byl zjištěn pomalejší pokles hladiny flutemetamolu než ve studii uvedené výše. Množství nezměněného flutemetamolu (¹⁸F) klesá s časem: po 2 minutách zjištěno kolem 80 % podané dávky a po 180 minutách jen 10 % z původní hodnoty.⁸⁰

Analýzou za využití HPLC bylo v plazmě 5 minut po aplikaci zjištěno 75 % radioaktivní složky ve formě původního flutemetamolu, který je dále metabolizován a po 90 minutách od aplikace je v plazmě pouze 2 % této látky a dochází k nárůstu méně lipofilních metabolitů.⁸²

Eliminace flutemetamolu (¹⁸F) je zhruba z 37 % renální a z 52 % hepatobiliární.⁸¹

2.1.7.4 Dozimetrie

Podání flutemetamolu bylo dobře tolerováno. Z hlediska radiace byla nejvyšší dávka absorbována žlučníkem (366 μGy/MBq) a tenkým střevem (121 μGy/MBq). Efektivní dávka byla 34,9 μSv/MBq.⁸² Při běžné podávané dávce 185 MBq neobdrží žádný orgán více než 0,2Gy.⁸³

2.1.8 [¹⁸F]-florbetaben

2.1.8.1 Použití

Florbetaben (¹⁸F) je radiofarmakum užívané pro PET ke zobrazení depozit beta amyloidu v mozku u dospělých pacientů s kognitivní poruchou, která je posuzována jako možná Alzheimerova nemoc, případně u dalších nemoc souvisejících s úbytkem kognitivních funkcí. Obvyklá jednotlivá podaná dávka je 300 MBq.

2.1.8.2 Mechanismus účinku

Florbetaben (¹⁸F) se váže na neuritické β-amyloidové plaky v mozku.

2.1.8.3 Farmakokinetika

Farmakokinetika florbetabenu (¹⁸F) je charakteristická rychlou eliminací z plazmy. Příjem mozkiem je velmi rychlý dosahuje maxima kolem 6 % podané dávky a to 10 minut po injekčním podání.

2,5 minuty po podání tvoří přes 80 % podané aktivity původní látka. Následně vzniká frakce polárního metabolitu, která převažuje v degradačním produktu. Látka je metabolizována CYP enzymy, dochází především k N-methylaci a vzniku polárních metabolitů. Touto metabolizací nevzniká žádné riziko pro pacienta. Maximální koncentrace

podané radioaktivity byla zjištěna při prvním odebrání vzorku v čase 2,5 minuty po aplikaci a následně dochází k jejímu prudkému poklesu.

Poměr radioaktivity v krvi ku plazmě byl 0,75 – 0,80. Z tohoto poměru a hodnoty hematokritu můžeme odvodit, že bude látka pravděpodobně slabě vázána na erythrocyty nebo se bude dostávat přímo do erythrocytů. Přibližně 4 hodiny po injekci zůstávají v krvi prakticky neměřitelné zbytky radioaktivity. Většina radioaktivní látky je vyloučena močí v podobě polárního metabolitu. Florbetaben (^{18}F) je silně vázán na plazmatické proteiny (>98,5 %) ^{84, 85}

2.1.8.4 Dozimetrie

Efektivní dávka vyplývající z podání maximální doporučené aktivity 360 MBq dávky pro dospělého o hmotnosti 70 kg je přibližně 7,0 mSv. Pro podanou aktivitu 360 MBq je typická dávka radiace do cílového orgánu (mozku) 4,5 mGy. Nejvyšší dávku obdržel žlučník 0,137 mGy/MBq následuje ho močový měchýř 0,0695 mGy/MBq. ⁸⁶

2.2 Plazmatické bílkoviny

Krevní plazma obsahuje 93% vody, zbývajících 7 % tvoří rozpuštěné složky, zpravidla proteiny. Nejvíce je zastoupen albumin, který tvoří více jak 5 % plazmy.⁸⁷ Ostatní krevní komponenty jako erythrocyty, lipoproteiny α , β a γ globuliny jsou také schopny interakcí léčiva a proteinu. ⁸⁸

Vazba léčiv na sérové nebo plazmatické bílkoviny umožní transport léčiv krevní cestou na místo působení. Pouze frakce nevázaná na plazmatické proteiny může difundovat z vaskulárního systému a kumulovat se ve tkáni, kde dochází k interakci s terapeutickým cílem a k vstupu do eliminačních drah. Rozsah sérové vazebnosti může mít signifikantní vliv na farmakokinetické parametry jako je clearance nebo distribuční objem. Stejně tak může ovlivnit i farmakodynamické vlastnosti. Určení frakce léčiva vázaného na sérové proteiny je standardní parametr zjišťovaný ve výzkumu léčiv a má velký význam v terapeutickém monitorování léčiv. ⁸⁹

Interakce je způsobena kompeticí dvou léčiv na jednom vazebném místě albuminu. V důsledku toho se hladina volného léčiva v plazmě zvýší po přidání další sloučeniny. Klinický efekt v této kombinované terapii může zapříčinit výraznější odpověď a více vedlejších účinků než by se očekávalo u podání léčiva samotného.⁸⁷ Důležité je u vysoce vázaných látek, že při malé změně ve vázané frakci, dochází k významné změně ve volné frakci. Např. změna frakce vázaného léčiva z 99% na 98% způsobí zdvojnásobení volné frakce (z 1 na 2 %).⁸⁸

Mezi nejdůležitější sérové proteiny patří lidský sérový albumin, alfa-1-glykoprotein, globuliny a lipoproteiny, všechny mají ve struktuře místa, na která se selektivně váží léčiva.

Tabulka 1 přehled nejvýznamnějších plazmatických bílkovin (zdroj⁹⁰)

	Albumin	α_1 kyselý glykoprotein	Lipoproteiny
Molekulová hmotnost (g/mol)	67 000	42 000	200 000-2 400 000
Normální koncentrace (g/dl)	3,5-5	0,04-0,1	variabilní
Poločas v plazmě (dny)	19	5	Do 6

2.2.1 Lidský sérový albumin

(HSA = human serum albumin)

Lidský sérový albumin hraje roli v regulaci osmotického tlaku a transportu mnoha endogenních molekul jako jsou mastné kyseliny, hormony, toxické metabolity, žlučové kyseliny, aminokyseliny a kovy. Dále se na albumin váží také léčiva.⁹¹ Má především fyziologický význam a chrání organismus navázáním toxických metabolitů a ukládá oxid dusnatý. Má vysokou antioxidační kapacitu a vykazuje pseudoenzymatické vlastnosti.

Lidský sérový albumin je nejhojněji zastoupený plazmatický protein tvořící 55 % ze všech krevních bílkovin. Lidský albumin je monomerní, neglykosylovaný a kladně nabitý polypeptid s vysokou rozpustností, obsahuje 585 aminokyselin a má kolem 66 000 Da. Tvoří ho 3 strukturálně obdobné α -helix domény, formované do tvaru srdce a označované I- III, které mohou být dále rozděleny na subdomény A a B. Celkem obsahuje 6 helikálních subdomén A a 4 helikální subdomény B spojeny prodlouženou smyčkou. Struktura je stabilizována 17 disulfidickými můstky spojujícími jednotlivé helixy. Stabilizace je založena na obsahu 35 cysteinových zbytků, kdy se všechny s výjimkou jednoho označovaného jako Cys34 zapojují do tvorby disulfidických můstků. Krystalografická data také popisují

interdoménové a intersubdoménové interakce významně přispívající ke stabilitě molekuly proteinu. Absence uspořádání ve formě beta-skládaného listu dává proteinu vysoký stupeň konformační stability. Vysoká flexibilita může být odpovědná za překvapivě velkou vazebnou kapacitu, která se odráží v množství vazebných míst. Má mimořádnou kapacitu pro vazbu ligandů a váže reverzibilně kyselé a neutrální látky, zásadité látky jsou vázány pouze v menší míře. Jedná se o nespecifický nosič.⁹²

2.2.1.1 Vazebná místa

Existují dvě vazebná místa, konkrétně místo I ležící v subdoméně IIA (také nazýváno vazebné místo pro warfarin) a místo II se nachází v subdoméně IIIA (nazývané vazebné místo pro benzodiazepiny). Ligandy silně vázané k místu I jsou dikarboxylové kyseliny nebo objemné heterocyklické molekuly s negativním nábojem lokalizovaným ve středu molekuly.⁹³ Toto místo vykazuje nízkou stereoselektivitu, která může být způsobena jeho flexibilitou. Bylo zjištěno, že vazebné místo II obsahuje hydrofobní dutinu s kationickou skupinou lokalizovanou na okrajích.⁹⁴ Místo II tvoří převážně nepolární dutina s jednou doménou s polární částí blízko okraje dutiny.⁹⁵ Toto uspořádání polárních a nepolárních funkcí je v souladu s typickými strukturami léčiv vázajících se na místo II, kterými jsou aromatické karboxylové kyseliny s negativním nábojem na kyselé skupině na jednom konci molekuly, který je oddělen hydrofóbním centrem. Mimo diazepam se na toto místo váže i ibuprofen. Místo II je méně flexibilní, ligandy, které se sem váží, vykazují stereoselektivitu a jsou silně ovlivněny strukturální modifikací ligandu s relativně malou skupinou.⁹³

Byla zjištěna sekvence zahrnující tryptofan, která se zapojuje do vazby s anionty. Ion může vytvořit hydrofobní můstek s aromatickou indolovou částí tryptofanu a iontovou vazbu s kladně nabitými skupinami lysinu a argininu. To vše poskytuje vazbě s proteinem vysokou stabilitu a vysvětluje, jak může být kyselá molekula velmi silně vázána na protein.⁹⁶

Třetí nověji objevené místo se nazývá digitoxinové⁹⁷, nachází se v subdoméně IB a typicky se na něj váží látky jako je lidokain, haemin a fusidová kyselina.

Na albuminu byla popsána další místa vázající např. probenecid, digitoxin, propofol, steroidní antibiotika, bilirubin a AZT (3'-azid-3'-deoxythymidin). Mohou vznikat i kovalentní vazby s dalšími léčivy např. s D-penicilaminem, kaptoprilem, cisplatinou

a *N*-acetyl-*p*-bentochinoniminem (reaktivní metabolit acetaminofenu).⁹¹ Další vazebná místa jsou dostupná pro endogenní ligandy, především nepolární molekuly s anionickými nebo elektronegativními funkčními skupinami, stejně jako pro ionty kovů. Mezi endogenní ligandy řadíme např. mastné kyseliny (oleát, palmitát, linolát), bilirubin a haemin.⁹⁹

Molekulární struktura definuje vazbu na lidský albumin ve dvou úrovních. Kostra řetězce určuje místo kam se sloučeniny budou vázat a postraní struktury ovlivní sílu vazby v rámci daného místa.⁹²

Strukturální modifikace lidského albuminu jako je neenzymatická glykace se vyskytuje u pacientů s diabetem a může vést ke změně funkce proteinu, např. ke snížení transportní schopnosti nebo existují modifikace způsobené reaktivními látkami vzniklými při štěpení modifikovaných proteinů. Z tohoto pohledu existují značné rozdíly mezi normálním a modifikovaným albuminem.⁹⁸

Téměř všechny ligandy se váží několika málo vazebnými místy s vysokou afinitou a navíc velkým množstvím slabších vazebných míst. Speciálně bilirubin tvořící dlouhý řetězec mastných kyselin a haemin se váží s vysokou afinitou. Mnoho záporně nabitých a elektrostaticky neutrálních léčiv (ibuprofen, dikumarol, warfarin, fenylbutazon) se váže na albumin s obdobnými asociačními konstantami (10^4 až 10^5 M⁻¹). Navzdory tomu, že albumin obsahuje při fyziologickém pH množství negativních nábojů váže přednostně negativně nabité ligandy před ligandy nesoucí pozitivní náboj (chlorpromazin, pamachin). Nicméně albumin je schopen vázat i ligandy s pozitivním nábojem s vazebnou konstantou srovnatelnou s většinou negativně nabitých látek. Váže i různé anorganické ligandy, např. ionty kovů, které tvoří větší množství slabších vazeb. Experimenty ukázaly, že vazebnost je ovlivňována mnoha faktory jako je koncentrace albuminu, pH, teplota a typ a koncentrace solí v roztoku.⁹⁹

2.2.2 Bovinní sérový albumin

Existují strukturální a funkční homology sérového albuminu u různých živočišných druhů doprovázené drobnými změnami v aminokyselinové sekvenci v porovnání mezi lidmi a zvířaty. Ukázalo se, že plazmatickou vazebnost nelze přesně predikovat podle vazebnosti stanovené u zvířat. Tyto rozdíly mohou být především důležité v radiofarmaceutickém

výzkumu a vývoji a může mít dopady na převádění výsledků experimentů mezi zvířecími modely a lidmi.¹⁰⁰

Výsledky při měření s plazmou nebo krví a při použití proteinových náhražek jako je samotný lidský sérový albumin nebo zvířecí albumin se mohou výrazně lišit. Bylo prokázáno, že nepřítomnost mastných kyselin může vést k alteraci léčiv vázajících se na proteiny a následně dochází k signifikantní změně volné frakce.⁹⁰

Bovinní sérový albumin obsahuje sekvenci 582 aminokyselinových zbytků. Na rozdíl od lidského s jedním obsahuje bovinní albumin dvě tryptofanová rezidua. Bovinní albumin dále obsahuje jeden samostatný a osm párových disulfidických můstků uspořádaných jako v lidském albuminu. Z hlediska pořadí sekvencí jsou tyto 2 albuminy téměř homologní.

Na základě rozložení disulfidických můstků a aminokyselinových sekvencí vytváří bovinní albumin 3 domény spojené dohromady peptidovým řetězcem. Domény jsou děleny na dvě subdomény a tyto subdomény se dělí do tří spirál. Většina z reziduí v dlouhých smyčkách a úseků spojujících domény pravděpodobně tvoří α -šroubovici stabilizovanou disulfidickými můstky. Domény mají vnitřní stranu hydrofobní a vnější stranu polární.⁹⁹

2.2.3 Alfa-1-kyselý glykoprotein

= orosomucoid, AAG, AGP

Jednou z hlavních fyziologických funkcí AAG je transport endogenních ligandů jako jsou lysofosfolipidy a biliverdin, zároveň může transportovat i léčiva jako jsou antibiotika a protirakovinné látky¹⁰¹. AAG vykazuje vysokou podobnost s P-glykoproteinem, interagují se stejnými skupinami léčiv a zvýšená exprese P-glykoproteinu v maligních buňkách způsobí mnohočetné lékové rezistence (MDR) k protinádorové léčbě.¹⁰²

Ačkoli fyziologická funkce AAG není plně objasněna, předpokládá se, že funguje jako imunosupresivní a imunomodulační agens, inhibitor agregace krevních destiček, aktivuje neutrofilů, podporuje proliferaci lymfocytů a sekreci IL-2. Hladina látky narůstá při zánětu a v rámci imunologické odpovědi např. při onkologických onemocněních, infekci a poranění.

Vazebnost AAG pro léčiva je ovlivněna koncentrací AAG, polymorfismy, heterogenitou cukerných zbytků, pH a kompetitivní vazbou endogenních nebo xenobiotických ligandů.¹⁰³

α -1-kyselý glykoprotein je druhým stěžejním sérovým proteinem, i když s výrazně nižší koncentrací (kolem $1-3 \cdot 10^{-5} \text{M}$) tvoří pouze 1-3 % všech plazmatických proteinů. Jedná se o intenzivně glykosylováný protein a obsahuje jediný řetězec 204 aminokyselin. Má nižší vazebnou kapacitu ale vyšší afinitu k ligandům než sérový albumin. Má nízký isoelektrický bod (pI) mezi 2,8 a 3,8. Afinitu má především k bazickým látkám. Váží se na něj i neutrální a některá kyselá léčiva, stejně jako endogenní steroidní hormony jako je progesteron.¹⁰⁴

Lidský AAG obsahuje přibližně 45 % sacharidů, které způsobují velkou heterogenitu této látky. V séru se vyskytují různé isoformy AAG, záleží na typu glykosylace (často obsahuje kyselinu sialovou) a substituci různých aminokyselin. Tento protein také vykazuje genetický polymorfismus, způsobený dvěma geny ORM1 a ORM2 kódující 2-3 genetické varianty (F1, S a A).¹⁰⁵

2.2.4 Vazba na plazmatické bílkoviny

Vazebnost závisí na chemických vlastnostech molekuly, navázané léčivo může procházet pasivní difúzí přes bariéry představované endoteliálními buňkami a tkáněmi do orgánů a následně se účastnit metabolických procesů, exkreci do žluče nebo glomerulární filtraci v ledvinách. Nevázané léčivo může být distribuováno intracelulárně specifickými transportními systémy, jako je receptorově zprostředkovaná endocytóza nebo proteinem zprostředkovaný transport. Pouze volné léčivo interaguje s cílovými strukturami (např. receptory) a způsobí tak terapeutický efekt. Ve většině případů je tkáňová nevázaná koncentrace ve vztahu k plazmatické nevázané koncentraci.⁹¹

Většina léčiv vytváří reversibilní vazbu s plazmatickými proteiny (jako jsou albumin, alfa-1-glykoprotein, lipoproteiny) nebo s dalším biologickým materiálem (jako jsou erytrocyty). Kromě toho existují také plazmatické bílkoviny, které mají vysokou afinitu k určitým hormonům (transkortin, globulin vázající thyroxin TBG). Pokud je léčivo ve formě racemické směsi v krvi nebo plazmě, pak se HSA i AAG váží preferenčně na jeden stereoizomer a tvoří diastereoizomerické komplexy léčiva a proteinu. V mnoha případech HSA vykazuje v těchto izomerických párech vyšší stereoselektivitu než AAG.⁹⁰

2.2.5 Změny hladiny a struktury plazmatických proteinů

Vazba na HSA může být ovlivněna přítomností dalších léčiv nebo endogenních látek, kdy může dojít k ovlivnění struktury HSA během určitých typů onemocnění. Snížená

plazmatická vazebnost způsobená současným podáním léčiv je obvykle výsledkem buď kompetice na stejném vazebném místě nebo alosterickým přeskupením následovaným mikroenvironmentálními změnami na vazebné straně.⁹¹

V další práci je změna vazebnosti při současné vazbě dvou ligandů na protein, kdy může být jeden ligand ovlivněn přítomností druhého ligandu, popsána následujícími mechanismy: konformační změny proteinu způsobené vazbou každého z ligandů, elektrostatické interakce mezi náboji ligandů a vazby dvou ligandů blízko sebe, v jedné vazebné oblasti dochází k částečné kompetici.⁹⁹

Mezi onemocnění, která mohou významně ovlivnit charakteristiku léčiv z hlediska vazebnosti na bílkoviny, patří onemocnění ledvin, jater a štítné žlázy. Další změny vazebnosti pozorujeme u těhotných žen, ale i u pediatrické a geriatrické populace. Tady nabývá na významu určení volné frakce léčiva významné pro individualizaci dávkování během léčby a efektivní medikace pacientů.⁸⁸

2.2.5.1 Onemocnění ledvin

Vazba léčiv na albumin klesá u pacientů s renálním onemocněním jako je nefrotický syndrom (provázený hypoalbuminemií), chronické renální selhání a urémie. Následně roste volná frakce podaného léčiva. Součástí urémie může být spojena se zvýšenou hladinou uremických toxinů, které se také váží na bílkoviny, zároveň se sníží koncentrace albuminu a dochází ke změnám ve struktuře albuminu a projeví se dalším zvýšením volné frakce léčiva.⁹¹

2.2.5.2 Onemocnění jater

Pokles vázaných léčiv při jaterních onemocněních může být způsoben poklesem koncentrace albuminu, akumulací endogenních inhibitorů jako je bilirubin nebo změnou ve struktuře albuminu. Např. po podání fenytoinu nemocným s hepatitidou nebo cirhózou bylo pozorováno zvýšení volné frakce tohoto léčiva, nedocházelo ke korelaci s koncentrací albuminu, ale s koncentrací bilirubinu ano.¹⁰⁶

Mezi další stavy ovlivňující vazebnost na albumin patří diabetes, šok, akutní poranění hlavy nebo onkologická onemocnění.⁹¹

Hypoalbuminémie se běžně manifestuje u onemocnění jako renální selhání, popáleniny, malnutrice nebo v souvislosti s chirurgickými zákroky. Hyperalbuminémie je mnohem méně běžná. Oproti albuminu je nárůst koncentrace AAG mnohem běžnější a může být způsoben zánětlivým onemocněním, traumatem nebo akutním srdečním infarktem.⁹⁰

2.2.6 Studie popisující vazbu na plazmatické bílkoviny

Lze rozdělit na tři typy:

- zaměřené na proteiny: studie o způsobu jakým se váží léčiva na jednotlivé proteiny
- zaměřené na sloučeninu: studie nevázané frakce látky v plazmě
- zaměřené na vzorek: studie *ex vivo* koncentrace nevázaných léčiv v aktuálním vzorku plazmy.

První přístup obvykle využívá izolovaný a purifikovaný protein vázaný na určitém povrchu nebo na chromatografický nosič. Je vhodnou metodou k porovnání strukturně podobných sloučenin.

Druhý přístup je nejvíce užívaný ve výzkumu léčiv, nevázaná frakce je určena obvykle *in vitro* v plazmě různých druhů, populací apod. A tato nevázaná frakce je využita k transformaci pro určení celkové koncentrace léčiva ku nevázané frakci, což pomůže interpretovat účinky léčiv.

Třetí přístup není úplně obvyklý, ale může poskytnout ideální informaci při vývoji léčiv, kterou je nevázaná koncentrace v každém vzorku. Pak je možné přímo porovnat aktuální nevázané koncentrace v každém vzorku ve vztahu k farmakodynamice a toxickým účinkům.

Vazba na proteiny je závislá na pH. Pro bazická léčiva vázající se primárně na α 1-kyselý glykoprotein dochází při nárůstu pH k poklesu nevázané frakce. Pro kyselá léčiva vázající se na albumin, nevázaná frakce narůstá se zvyšováním pH pro některá léčiva a pro jiná klesá. Konformační změny albuminu při pH 6-9 jsou dobře popsány. Dochází ke změnám v zastoupení nevázané frakce při různém pH a různých teplotách. Tyto podmínky lze snadno zabezpečit a mělo by se tak učinit při každém experimentu, kdy je zjišťována vazebnost na plazmatické proteiny.¹⁰⁷

2.2.7 Typy vazeb

Vazby jsou popsány na příkladu albuminu, následující charakteristiky lze aplikovat i na ostatní plazmatické proteiny. Schopnost albuminu vázat léčiva je připisována chemickým vlastnostem různých aminokyselin a jejich umístění v rámci proteinu. Při pH 7,4 jsou kyselé karboxylové skupiny disociovány jako karboxylové anionty a protony, ale bazické aminoskupiny jsou protonizovány a vytváří kationické skupiny. Tyto skupiny tudíž tvoří negativně a pozitivně nabitě části molekuly proteinu a jsou schopné vázat opačně nabitě ionty pomocí elektrostatických sil. Léčiva jsou vázána na albumin několika způsobů a výsledná vazebná energie je kombinací níže uvedených sil.

2.2.7.1 Van der Waalsovy síly

Patří mezi slabý typ vytvářející můstek charakteristický nespécifickou přitažlivostí k nenabitým molekulám nebo fragmentům molekul.

2.2.7.2 Hydrofobní interakce

Obdobně jako předchozí typ vytváří relativně slabou vazbu. Hydrofobní interakce mohou vzniknout mezi dvěma aromatickými kruhy, kdy dojde k interferenci mezi π -elektrony nebo u struktur s prakticky identickou strukturou, až na délku alkylového řetězce, kdy molekula s delším řetězcem váže protein ve větším rozsahu.

2.2.7.3 Vodíkové můstky

Vznikají mezi vodíkem a polární skupinou (obvykle hydroxyskupinou nebo aminoskupinou) a atomy s volným elektronovým párem (obvykle kyslíkem nebo dusíkem). Proteiny mají velké množství míst potenciálně vhodných pro vodíkovou vazbu.

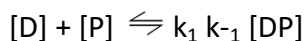
2.2.7.4 Iontové můstky

Je silnější než dříve uvedené typy. Negativně nabitě karboxylové anionty a pozitivně nabitě amoniové ionty proteinu se váží elektrostatickými silami na léčivo s opačným nábojem.⁸⁷

2.2.8 Koncentrace léčiva v plazmě

Předpokládá se, že koncentrace volných léčiv nejlépe koreluje s účinkem léčiva. U léčiv s cílovými místy v centrálním kompartmentu, jako jsou beta-blokátory, je volné léčivo odpovědné za vazbu na cílovou strukturu a vlastní účinek. U léčiv prostupujících membránou, aby dosáhly cílového místa, jsou mnohem významnější jejich chemické vlastnosti a účast transportérů léčiv. Což bylo prokázáno např. ve studii s loperamidem, pro který je mnohem významnější P-glykoproteinem zprostředkovaný efflux než omezení distribuce do mozku způsobené vysokou vazbou na proteiny.¹⁰⁸ V jiné studii porovnávající morfin a oxykodon bylo zjištěno, že účinek nezávisí na koncentraci volného léčiva přímo v krvi, ale na jeho koncentraci v místě působení (v tomto případě v mozku), přičemž se tyto koncentrace významně liší.¹⁰⁹ K_A je rovnovážná asociační konstanta a popisuje informaci o afinitě a síle vazby mezi proteinem a léčivem. Čím je hodnota vyšší, tím výraznější je vazba. Systémy s vysokou hodnotou K_A jsou výrazně ovlivněny koncentrací látky. Systém s nízkou K_A je minimálně ovlivněn koncentrací látky. Koncentrace proteinů je důležitá u obou systémů.⁸⁸

Asociace a disociace těchto komplexů léčiva a proteinu může být popsán zákonem aktivních hmot (Guldberg-Waageův zákon). Asociace (k_1) a disociace (k_{-1}) komplexu léčivo-protein trvá obvykle v řádu mikrosekund a rovnováha mezi volným, nevázaným léčivem [D], proteinem [P] a komplexem léčivo-protein [DP] je ustavena rychle:



V rovnováze je afinita léčiva k vazebnému místu proteinu vyjádřena jako asociační konstanta K_a (protein), je to převrácená hodnota disociační konstanty K_d (protein):

$$K_a (\text{protein}) = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[DP]}{[D] \times [P]} = \frac{1}{K_d (\text{protein})}$$

Míra jakou se váže léčivo na plazmatické proteiny, může být vyjádřeno jako poměr volné (C_{free}) nebo vázané (C_{bound}) a celkové (C_{total}) koncentrace léčiva. Poměr je obvykle vyjádřen jako procento léčiva vázaného na plazmatické proteiny (%PPB = plasma protein binding) nebo nevázaná frakce v plazmě (f_u):

$$\%PPB = \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{total}}} \times 100 = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{free}}}{C_{\text{total}}} \times 100$$

$$f_u = \frac{C_{\text{free}}}{C_{\text{total}}}$$

Plazmatické proteiny mohou mít více vazebných míst pro léčivo a/nebo více plazmatických proteinů se může účastnit více vazebných procesů. Afinita a kapacita každého vazebného místa se v ideálních případech bere v úvahu při výpočtech C_{free} a C_{total} .

U většiny léčiv vazba na plazmatické proteiny není koncentračně závislá. Což platí tak dlouho, dokud je molární koncentrace nevázaného léčiva výrazně nižší než K_d (protein). V tomto případě jak %PPB tak i f_u jsou koncentračně nezávislé a konstantní. V případě vyšší terapeutické dávky a vyšší afinity k proteinu bude léčivo vykazovat koncentračně závislou vazebnost na proteiny. Je běžnější docílit nasycení proteinu v případě AAG. A protože je AAG v plazmě mnohem méně než albuminu, je i práh pro nasycení tohoto proteinu mnohem nižší.⁹⁰

Pokud je %PPB rovno hodnotě 99 %, znamená to, že 99 % je vázáno na plazmatické proteiny a 1 % je v plazmě nevázané. Toto 1 % je definováno jako nevázaná frakce f_u . Pro zjednodušení předpokládáme, že nevázaná frakce v krvi a plazmě je stejná a zaměnitelná. Ale existují i postupy, kterými lze tyto hodnoty mezi sebou převádět. Na hodnotu %PPB a clearance mají vliv vlastnosti jako je lipofilita, počet akceptorů a donorů vodíkových vazeb, pKa a tvar molekuly.¹¹⁰

2.2.9 Schválená léčiva s vysokou vazebností

Závěrem kapitoly je uveden ilustrativní příklad využití léčiv s vysokou vazebností v praxi. Na vazbu léčiva na proteiny je pohlíženo jako negativní vlastnost pro léčivo, ale v praxi existuje 260 obchodovaných léčiv povolených FDA do roku 2003. Téměř 30 % má PPB nad 95 %, jsou obecně považovány za vysoce vazebná léčiva. Navíc 5 % má PPB vyšší jak 99 %, což je označováno jako velmi vysoká vazebnost léčiv.

Při porovnání s obdobím od 2003 do roku 2013, bylo schváleno relativně velké množství léčiv jak s vysokou vazebností (45 % nově schválených léčiv), tak s velmi vysokou vazebností (24 %). Což poukazuje na fakt, že i látky s vysokou vazebností mohou být hodnotná a použitelná léčiva. Pokud by byla při schvalování nových látek vytvořena mezní hranice pro tuto vlastnost, přišli bychom v tomto desetiletí o mnoho užitečných léčiv.¹¹⁰

2.3 Metody

2.3.1 Obecně

Existuje množství metodologií, které jsou vhodné pro určení rozsahu vazby na plazmatické proteiny léčiv, nicméně v klinických hodnoceních terapie farmaky patří mezi nejužívanější metody rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Obě tyto metody prokázaly svoji vhodnost k určení vazebnosti na plazmatické proteiny. Parametry této vazby charakterizují afinitu léčiva a proteinu k vazebným místům. Počet vazebných míst ve skupině příbuzných proteinů a vazebná kapacita jsou užitečné pro predikci koncentrace volného léčiva.⁸⁸

Metody určené ke zjištění plazmatické vazebnosti můžeme rozdělit na separativní (rovnovážná dialýza, PAMPA, techniky kapilární elektroforézy, metody kapalinové chromatografie) a neseperativní (spektroskopické techniky, kalorimetrické techniky, povrchová plazmonová rezonance). První skupina zahrnuje separaci volného ligandu od vázané složky a je vhodná k určení koncentrace buď přímo nevázaného léčiva, nebo vázaného léčiva. Druhá skupina spoléhá na detekci změny fyzichemických vlastností buď ligandu, nebo proteinu v důsledku vzniku vazby.¹¹¹

Klasickou a hojně užívanou metodou je rovnovážná dialýza, která má své nevýhody. Bylo vytvořeno několik alternativních metod k překonání omezení souvisejících s rovnovážnou dialýzou. Ultrafiltrace zkracuje časovou náročnost pokusu, což je výhodné především pro metabolicky nestabilní látky. Kvalita dat získaných touto technikou je závislá na rozsahu nespecifické vazby testované sloučeniny na aparaturu nebo na ultrafiltrační membránu.¹¹²

Další často využívanou alternativní metodou určenou pro stanovení vazebnosti na lidský sérový albumin nebo na α 1-kyselý glykoprotein v séru je využití kolony HPLC.¹¹³

Při určení rozsahu vazby na plazmatické proteiny a nevázané koncentrace léčiv je pravděpodobně jeden z největších problémů určení koncentrace léčiva v systému během rovnováhy, aniž by byla narušena rovnováha samotná. Situace se ještě komplikuje faktem, že přesná nevázaná frakce/koncentrace je neznámá. Existuje mnoho možností, jak může vzniknout špatný výsledek a neexistuje žádná metody, která by byla všeobecně vhodná

k použití. Mnohé studie zkoumající koncentraci vázanou a nevázanou na proteiny byly publikovány bez dostatečné kontroly různých parametrů ovlivňující rovnováhu.¹⁰⁷

2.3.2 Rovnovážná dialýza

Rovnovážná dialýza je nejužívanější metodou pro stanovení vazby na plazmatické proteiny. Dvě prohlubně jsou odděleny semipermeabilní membránou, plazma je umístěna do jedné a pufr do druhé. Membrány jsou vyrobeny pro oddělení různých molekulárních hmotností a mohou být tedy vhodně zvoleny s ohledem na jednotlivé složky a proteiny. Pufr by měl být co nejvíce podobný plazmě, obvykle je používán isotonický fosfátový pufr (PBS-phosphate buffered saline, pH = 7,4). Dialýza probíhá 4 – 24 hodin, kdy je ustavena rovnováha a koncentrace léčiva v plazmě a v pufru by měla být stejná jako koncentrace nevázané látky v prohlubni s plazmou. Pouze proteiny neprocházejí membránou. Čas potřebný k ustálení rovnováhy musí být verifikován pro každou sloučeninu zvlášť. Systém je vhodné inkubovat při fyziologické teplotě (37 °C).

Jedná se o pomalou a pracnou metodu, ale bylo vyvinuto 96-jamkové zařízení v uspořádání s vertikálně umístěnými komorami umožňujícími jednodušší používání a automatizaci, lze získat rychleji výsledky na rozdíl od původního „sandwichového“ uspořádání, které bylo náchylné k únikům a vyžadovalo dlouhé inkubační časy. U novější metody je objemový rozdíl v případě použití PBS mezi 2 až 4%, proto ho lze považovat za zanedbatelný. Po dosažení rovnováhy je tekutina z každého rezervoáru odstraněna a je analyzována koncentrace léčiva.

Experimenty určující plazmatickou vazebnost mohou být provedeny za použití radioaktivně značených nebo neradioaktivně (studeně) značených sloučenin. Pokud je použita radioaktivně značená látka, její koncentrace v dialyzátu může být určena za použití scintilačního detektoru. Jedná se o neselektivní analýzu a v tomto případě má svůj význam kontrola radiochemické čistoty a stability k zajištění věrohodnosti výsledků. U neradioaktivních látek lze k detekci využít LC-MS/MS formou selektivní analýzy. Při použití selektivní analýzy nejsou nečistoty příliš velkým problémem. Problematické jsou enantiomery v systému, který není chirální, protože enantiomery mají různé vazebné vlastnosti.^{107, 88}

2.3.2.1 Získaná data a výpočty

Při analýze se využijí následující hodnoty: léčivo v rezervoáru s pufrům je v rovnováze s koncentrací volného léčiva v rezervoáru s plazmou, která odpovídá koncentraci volného léčiva (C_U) a koncentrace léčiva po ukončení dialýzy v rezervoáru s plazmou (C_T - total drug concentration). C_B (bound drug concentration) může být následně vypočítáno ze vzorce $C_B = C_T - C_U$.⁸⁸ Dále je možné určit hodnotu nevázané frakce jako $f_U = C_U / C_T$.¹¹⁴

2.3.2.2 Nevýhody a úskalí metody

Koncentrace nevázané frakce v plazmě bude stejná jako nevázaná frakce ve tkáni, pokud transportéry, metabolismus a bulk flow neovlivňují rovnováhu. Většinou se rovnováha ustálí za 100 ms, delší čas se projevuje u extrémně vázaných látek, kdy je podíl volné frakce jen do 0,1 %. Rovnováha je ovlivněna změnami v pH, teplotou, koncentrací léčiva, koncentrací proteinu a koncentrací dalších přítomných látek.

Může docházet k úniku proteinů přes membránu a to jak u rovnovážné dialýzy, tak u ultrafiltrace. Únik je možno určit pomocí metody ELISA. Pro membrány s mezní hodnotou molekulární hmotnosti pod 10 kD nebyly v ultrafiltrátu nalezeny žádné bílkoviny. V případě vyšší mezní hodnoty membrány 30 kD byly pozorovány nízké koncentrace albuminu i ve filtrátu.¹⁰⁷

Mezi nevýhodou radioaktivně značených látek při určení plazmatické vazebnosti patří nečistoty a nestabilních látek těchto látek může vést k přecenění hladiny volného léčiva. Kvůli tomu je nutné určit čistotu radioaktivně značené látky ideálně před a po separaci z vázaného léčiva.

V úvahu je nutné brát fakt že, u vyšší molekulové hmotnosti a vyšší vazebnosti na plazmatické bílkoviny je doba ustavení rovnováhy delší¹¹⁵ a rovnováha je ustavena rychleji pokud se sloučenina přidá na stranu s plazmou.

Nespecifické vazebné efekty jsou velmi významné pro léčiva vysoce vázaná na sérové proteiny a mohou vést k podcenění nevázané koncentrace. Tato nevýhoda byla částečně vyřešena různými modifikacemi metody, redukující tyto nespecifické vazby nebo aplikací Tweenu 80 nebo bezalkonia na membránu filtru.¹¹⁶ Tomuto jevu lze předejít i použitím teflonu.¹¹⁷

Z důvodu možné adsorbce léčiva na membránu cely je důležité měřit koncentraci léčiva na obou stranách dialyzační membrány. Existuje mnoho druhů dialyzačních cel různých velikostí i objemů. Se vzrůstající plochou povrchu roste i rychlost ustanovení rovnováhy. Dále čas ustanovení rovnováhy lze snížit rotací nebo třepáním dialyzační cely. Metoda je vhodná pro zpracování malých i velkých objemů vzorků. Nevýhodou rovnovážné dialýzy je, že koncentrace léčiva v plazmě se mění vzhledem k počáteční hodnotě. To má význam především u léčiv vykazujících vazbu závisující na koncentraci.⁸⁸

Volná koncentrace léčiva po difúzi závisí na rozdělovacím faktoru volného léčiva, celkové plazmatické koncentraci léčiva a proteinu a asociační konstantě, ale je naprosto nezávislá na rozdělovacím faktoru proteinu a výsledném objemu distribuovaného proteinu.

Může dojít ke vzrůstu objemu dialyzovaného roztoku influxem dialyzátu způsobeným koloidním osmotickým tlakem plazmatických bílkovin. Použitím isotonického pufru nebo pufru s vyšší koncentrací látek s nižší molekulovou hmotností se nezabrání zcela osmotické diluci, protože pufr a ionty soli se dostávají volně do kompartmentu s plazmou a je vyrovnáván osmotický tlak proteinů. Donnanova distribuce může způsobit signifikantní chyby v určení plazmatické vazebnosti léčiv, která jsou slabě vázána, protože koncentrace v dialyzátu nereflktuje volnou koncentraci v dialyzovaném roztoku. Představuje problém především u vysoce ionizovaných a málo až středně se vázajících sloučenin. A neposlední řadě může být také problematická a limitující nízká rozpustnost ve vodě léčiva.¹¹⁵

2.3.3 Paralelní analýza permeability umělou membránou

PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) byla původně vytvořena, aby umožnila predikci pasivní permeability léčiva přes membrány. Metoda je založena na filtrační desce s 96 jamkami potažené umělou membránou (vyrobenou z fosfolipidů rozpuštěných v inertním organickém rozpouštědle, při výrobě membrán se využívá např. hexadekan nebo oktan-1-ol) použitou k oddělení dvou kompartmentů, jeden obsahuje roztok pufru s obsahem testovaného léčiva (kompartiment donoru) a druhý kompartiment, obsahuje pouze samotný pufr (akceptorový kompartiment). Volná koncentrace léčiva v akceptorovém kompartmentu je měřena v různých časech a rozdíl mezi dvěma experimenty a slouží k určení vazebné konstanty. Klíčovým předpokladem této metody je, že pouze volné léčivo je schopno procházet membránou zatímco jak protein, tak komplex proteinu s léčivem toho

schopny nejsou. Využití metody PAMPA k určení vazebných konstant má následující výhody: není nutný dlouhý čas pro ustavení rovnováhy a filtrační deska s 96 jamkami je tedy rychlejší než tradiční rovnovážná dialýza, nedochází k žádným objemovým změnám způsobeným onkotickým tlakem, protože použité membrány nejsou propustné pro vodu a nespecifická adsorpce se nemusí korigovat. Membrána je zvolena podle testovaného léčiva. Při porovnání s rovnovážnou dialýzou jsou analytické obtíže více méně obdobné. Pro analýzu výstupů obě metody používají chromatografickou spektrometrii (LC-MS).¹¹¹

2.3.4 Ultracentrifugace

Při ultracentrifugaci je roztok léčiva a proteinu smíchán dohromady a umístěn do centrifugy. Využívá se vysoké gravitační síly k oddělení volných a vázaných sloučenin. Centrifugace probíhá, dokud veškeré bílkoviny a komplex bílkoviny a léčiva nezůstane ve formě sedimentu na spodní části zkumavky, zatímco lipoproteiny o nízké hustotě a chylomikrony se nachází v horní vrstvě zkumavky. Koeficient sedimentace léčiva je obecně velmi malý ve srovnání s proteinem, volné léčivo zůstává v supernatantu a v něm může být kvantifikováno.¹¹¹ Vázané léčivo může být vypočítáno z hodnot koncentrace volného léčiva odebraného vzorku přímo pod lipidovou vrstvou a celkové koncentraci sloučeniny před centrifugací.

Vyšší rychlost rotoru, lepší separace a kratší čas experimentu jsou tři důležité faktory pro úspěšné provedení ultracentrifugace. Je vhodné provádět při biologicky relevantní teplotě 37 °C, která minimalizuje sedimentaci léčiv a poskytne hodnotnější informaci z hlediska termodynamiky procesu.¹¹⁸ Ultracentrifugace má tu výhodu, že eliminuje problémy s membránovými efekty jako je Donnanův efekt nebo membránová adsorpce. Na druhou stranu vybavení pro ultracentrifugaci je výrazně dražší než to, které se používá pro rovnovážnou dialýzu a ultrafiltraci. Dále komparativní studie s různými typy léčiv odhalily nesrovnatelnosti mezi výsledky dosaženými rovnovážnou dialýzou a ultracentrifugací, protože odhad koncentrace volného léčiva může být ovlivněn fyzikálními jevy, jako jsou sedimentace, zpětná difúze a viskozita.¹¹¹ Pro představu chyba způsobená sedimentací může nabývat hodnot od 10 % pro léčiva s 300 Da až po 40 % u léčiv s vyšší hmotností (kolem 1300 Da).¹¹⁹

2.3.5 Ultrafiltrace

Principem této techniky je, že plazma obsahující léčivo se umístí do ultrafiltrační jednotky. Semipermeabilní membrána umožní plazmatické tekutině a molekulám s menší molekulovou hmotností projít skrz, zatímco větší molekuly, jako jsou plazmatické proteiny, jsou zadrženy. Roztok léčiva a plazmy se pozitivním tlakem (dusíkem nebo injekcí) nebo častěji negativním tlakem (centrifugací) dostává z horní části do spodní části komory. Koncentrace volného léčiva ve spodní části a celková koncentrace před ultrafiltrací jsou použity k určení rozsahu vazby na proteiny. V porovnání s rovnovážnou dialýzou je výhodná redukce chyb způsobených lipolýzou, rozředěním proteinu a únikem proteinu.^{88, 117}

Ultrafiltrace je rychlá, efektivní a jednoduchá metoda k určení volného léčiva. Podstatnou výhodou této metody je, že nevyžaduje použití fyziologického pufru. Může být využita pro různé typy biologických vzorků včetně tkáňových homogenátů.

Nevýhodou ultrafiltrace je, že koncentrace proteinu se mění, protože ze vzorku plazmy je filtrována plazmatická tekutina. Měly by být provedeny předběžné experimenty ke stanovení efektu ultrafiltračního objemu k měření nevázané koncentrace léčiva. Pouze malý objem ultrafiltrátu (10 – 15 % z původního objemu) může být vhodný k určení koncentrace proteinu v horním rezervoáru. Avšak zhodnocení při malém objemu ultrafiltrátu léčiva se značnou vazbou na plazmatické proteiny je pod možnostmi detekce této metody. U některých léčiv může C_U zůstat konstantní, přestože se proteiny koncentrovaly v horní části rezervoáru jako množství plazmatické tekutiny vzrůstající v ultrafiltrátu. Proto může být v některých případech přijatelný odběr objemu až mezi 20 a 40 % původního plazmatického objemu. Další limitace metody ultrafiltrace jsou obdobné jako u rovnovážné dialýzy. Vzorek plazmy musí být udržován ve fyziologickém pH a v teplotě napodobující fyziologické podmínky. Měření i v tomto případě může být ovlivněno adsorpcí léčiva na membránu.⁸⁸

Snížení nescifických vazeb na membránu bylo dosaženo v jednom z experimentů použitím vhodných úprav filtrů, konkrétně za použití Tweenu-80 pro neutrální a kyselé látky nebo benzalkonia-chloridu pro látky bazické.¹¹⁶

Další nevýhodou ultrafiltrace je molekulární „prosévání“ („sítový“ efekt), kdy plazmatická tekutina a volné léčivo neprochází přes ultrafiltrační membránu stejnou rychlostí. Což může vést k nedostatečnému zastoupení volné frakce ve filtrátu, kdy molekuly

vody projdou přes membránu mnohem rychleji než sloučenina. Je zaznamenáno zvýšení se zvyšující se molekulovou velikostí sloučeniny a rostoucím tlakem.^{120, 121}

2.3.6 Metody kapalinové chromatografie

Tato metoda používaná pro posouzení interakcí léčiva a proteinu může být rozdělena do dvou hlavních přístupů závisících na tom, zda obě interagující složky jsou volně v roztoku (vylučovací chromatografie) nebo zda jeden komponent (zpravidla protein) je imobilizován na chromatografickém nosiči (afinitní chromatografie). Zónová eluce nebo frontální analýza mohou být použity u obou postupů.

2.3.6.1 Vylučovací chromatografie

Ve vylučovací chromatografii (size-exclusion chromatography, SEC) jsou molekuly v roztoku separovány na základě jejich velikosti nebo přesněji jejich hydrodynamického objemu. Směs léčiva a proteinu vzlíná kolonou s porózními částicemi. Protein a komplex proteinu s léčivem, které jsou příliš velké, aby prostupovaly póry kolony, se vymyjí nejdříve. Molekuly léčiva, které procházejí nebo difundují póry se eluují později.¹²² Při metodě SEC, kde jsou ligandy i proteiny volně v roztoku, byly vytvořeny i obměny. Léčivo a protein mohou být smíchány dohromady a následně injikovány do systému nebo může být injikován jeden a druhý je rozpuštěn v eluentu nebo lze použít čistý pufr, zatímco oba komponenty jsou rozpuštěny v mobilní fázi.¹²³ V určení plazmatické vazebnosti je SEC relativně málo perspektivní. Mezi nedostatky patří nízká účinnost kolony, krátká životnost kolon a nízká obnova proteinů, používá se tedy jen zředka.

2.3.6.2 Vysokoučinná afinitní chromatografie

Vysokoučinná afinitní chromatografie (HPAC) je založena na imobilizaci proteinu na nosiči a aplikaci a následné interakci rozpuštěné látky na koloně. Léčiva s vysokou afinitou mohou interagovat s imobilizovaným proteinem a budou eluovat déle než léčiva s žádnou nebo nízkou afinitou. Jedna z hlavních výhod je možnost využití pouze malého množství proteinu pro velký počet měření, stejný protein může být znovu použit ve více experimentech. Např. kolony obsahující lidský sérový albumin imobilizovaný na částicích oxidu křemičitého se dají použít pro 500 až 1000 aplikací.¹²⁴ Další pozitivum je snadná automatizace této metody a možnost studovat chování enantiomerů v případě chirálních

látek použitím racemátu, pokud se z kolony získá enantiomer. Otázkou zůstává vliv imobilizace na protein samotný, diskutuje se o tom, že může dojít k jeho denaturaci, nevhodné orientaci nebo stérickému bránění v okolí vazebného místa.¹²⁵

Albumin je nejčastěji používaný protein u HPAC metody, při jeho zakotvení na nosič zůstávají zachovány vlastnosti jako by byl v roztoku. Jak již bylo zmíněno HPAC může být proveden ve dvou různých nastaveních (zónová eluce a frontální analýza). Častěji se používá ke studiu léčiv interagujících s plazmatickými proteiny zónová eluce, která poskytne informaci o vazbě frakce s léčivem, protože relativní množství léčiva v rovnováze vázané na imobilizovaný protein v porovnání s volným léčivem v mobilní fázi je přímo měřeno pomocí retenčního faktoru. Zónová eluce je relativně rychlá metoda a může být využita i ke studiu kinetické rychlosti vazebných interakcí. Frontální analýza je založena na plynulé infúzi ligandu přes proteinový cíl imobilizovaný na koloně, zatímco je měřeno množství eluovaného ligandu.¹¹¹

2.3.7 Techniky kapilární elektroforézy

Podobně jako u kapalinové chromatografie, může být u kapilární elektroforézy využita zónová eluce i frontální analýza. Mezi nejužívanější patří elektroforéza kombinovaná s frontální analýzou (CE/FA) a afinitní kapilární elektroforéza (ACE) z důvodu jejich jednoduchosti a spolehlivosti.

Při elektroforéze kombinované s frontální analýzou se látky smísí do vialky se vzorkem. Po dosažení rovnováhy se vhodný objem vzorku (tvořící 10-20% efektivní délky kapiláry) vpraví do kapiláry. Když se rovnají hodnoty elektroforetické mobility proteinu a komplexu proteinu a léčiva je velikost plochy volného léčiva úměrná koncentraci volného léku v původním vzorku. Základem afinitní kapilární elektroforézy je kapilára naplněna puftrem obsahující protein v různých koncentracích a malé množství léčiva je vpraveno do kapiláry. Asociační konstanta je vypočítána ze změny elektroforetické mobility léčiva nad komplexem.

Hlavními výhodami kapilární elektroforézy jsou vysoká účinnost a separační selektivita, nízká spotřeba vzorku a reagensů, vysoká rychlost analýzy, jednoduchá automatizace a možnost přizpůsobení se fyziologickým podmínkám. Mezi nevýhody metody

patří riziko adsorpce proteinu na stěnu kapiláry a nízký detekční limit běžně používaných UV detektorů.¹¹¹

2.3.8 Mikrodialýza

Mikrodialýza je poměrně nová metoda, která umožní *in vivo* určení koncentrace volného léčiva v plazmě, tkáních a dalších biologických tekutinách jako je např. cerebrospinální tekutina. Mikrodializační sonda obsahuje dialyzační membránu, která je chirurgicky implantovaná do krevního řečiště, tkáňového prostoru apod. Dialyzační pufr protéká sondou a volné léčivo v tkáni nebo krvi difunduje skrz membránu do sondy ve směru koncentračního gradientu. Dialyzát je sbírán po určitou časovou periodu a je analyzován k určení koncentrace volného léčiva. Neposkytuje informaci o celkové koncentraci léčiva a léčivu vázaného na bílkoviny, k tomu by bylo nutné ještě separátně odebrat vzorek plazmy a analyzovat ho.⁸⁸

2.3.9 Spektroskopické techniky

Spektroskopické metody (UV/VIS, fluorescenční, IR), nukleární magnetická rezonance, optická rotační disperze a cirkulární dichroizmus jsou založeny na změnách elektronových a spektroskopických energetických hladin ligandu nebo proteinu během vzniku vazby. Tyto metody mohou být prováděny v roztoku, což umožní vhodné ustavení rovnováhy při měření. Spektroskopické metody mají velkou výhodu v poskytnutí lepšího porozumění vazebným mechanismům a umožní stanovit vazebnou konstantu.¹²⁶ Fluorescenční spektroskopie pomáhá identifikovat vazebné skupiny léčiv a může být využita k vypočtení vazebné vzdálenosti mezi fluoroforem léčiva a proteinu.¹²⁷ IR je výborná metoda ke studiu sekundární struktury proteinu. NMR spektroskopie indikuje, které skupiny molekuly proteinu se účastní na vazbě s léčivem. Novým trendem je využití kombinace těchto metod pomocí výpočetního zpracování. Nevýhodou těchto metod je nízká senzitivita, která omezuje jejich širší využití.¹¹¹

2.3.10 Kalorimetrické techniky

Používá se izotermální titrační kalorimetrie a diferenciální skenovací kalorimetrie. Reakce a vznik komplexů jsou detekovány změnami v uvolňování tepla, případně při zahřívání kontrolovanou rychlostí se měří změny teploty. Jde o časově náročnější metodu, nelze jí určit hodně a velmi málo afinní procesy a vzorek musí být velmi čistý. V popředí zájmu je diferenciální skenovací kalorimetrie u látek s velmi vysokou vazebnou konstantou

(řádově 10^{15} mol/l), kterou není možné změřit konvenčními technologiemi. Nevýhodou je vysoká spotřeba vzorku. Kalorimetrie poskytuje kompletní termodynamický popis reakce.¹¹¹

2.3.11 Povrchová plazmonová rezonance

Metoda zahrnuje imobilizaci jedné z reagujících látek (protein) na povrchu a monitorování její interakce s druhým komponentem (léčivo) v roztoku, který protéká přes povrch. Detektor monitoruje změny v indexu lomu, které nastávají při formování nebo rozpadu během vazebných reakcí. Poskytuje informaci o stechiometrii reakce, rovnovážné vazebné konstantě a kinetické rychlostní konstantě.¹¹¹

2.3.12 Shrnutí: výhody a nevýhody jednotlivých metod

Tabulka 2 Metody pro stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny (zdroj¹¹¹)

METODA	VÝHODY	NEVÝHODY
Rovnovážná Dialýza	- jednoduchá - levná - dostupná ve formátu pro 96 vzorků	- dlouhá doba pro ustavení rovnováhy - vysoká čistota reagensí - Donnanův efekt - nespecifická vazebnost - molekulová hmotnost proteinu musí být výrazně větší než léčiva - objemové přesuny
PAMPA	- dostupná ve formátu pro 96 vzorků	- vysoká čistota reagensí
Ultrafiltrace	- jednoduchá - dostupná ve formátu pro 96 vzorků	- ucpání filtru - může být narušena rovnováha - síťový efekt - vysoká čistota reagensí - nespecifická vazebnost - molekulová hmotnost proteinu musí být výrazně větší než léčiva
Ultracentrifugace	- jednoduchá	- riziko sedimentace léčiva, zpětné difuze, disociace komplexu - vysoká čistota reagensí
Izotermální titrační kalorimetrie	- termodynamické informace	- velké množství vzorku - nastavení testu do značné míry závisí na předmětu zájmu - vysoká čistota reagensí

METODA	VÝHODY	NEVÝHODY
Diferenciální skenovací kalorimetrie	- termodynamické informace	- vysoká čistota reagensů - chybí potvrzení validace
Spektroskopické techniky	- informace o interakci a struktuře	- falešně negativní - vysoká čistota reagensů - špatná reprodukovatelnost
Povrchová plazmonová rezonance	- informace o kinetice vazebnosti - velmi malé množství vzorku - data v reálném čase	- stechiometrické informace nejsou dostupné přímo - vysoká čistota reagensů - nákladné - imobilizace → dlouhá příprava metody
Vysokoučinná afinitní chromatografie	- imobilizovaný protein lze použít znovu - afinita enantiomerů - není požadován čistý vzorek	- imobilizace → dlouhá příprava metody
Kapilární elektroforéza	- levný materiál - rychlá a jednoduchá - není požadován čistý vzorek	- senzitivita - adsorpce na stěnu kapiláry

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a vybavení pro stanovení plazmatické vazebnosti

3.1.1 Biologický materiál

Při experimentech byla použita plazma (původně heparinovaná krev, centrifugací došlo k oddělení plazmy) čtyř živočišných druhů:

- Lidská plazma – odebraná dospělému zdravému dárci
- Hovězí plazma – dodaná společností LabMediaServis, s. r. o.
- Prasečí plazma – odebraná praseti domácímu, byla získána z Jatek Blovice s.r.o.
- Potkaní plazma – směsná plazma samců potkanů kmene Wistar (hmotnost 250-400 g)

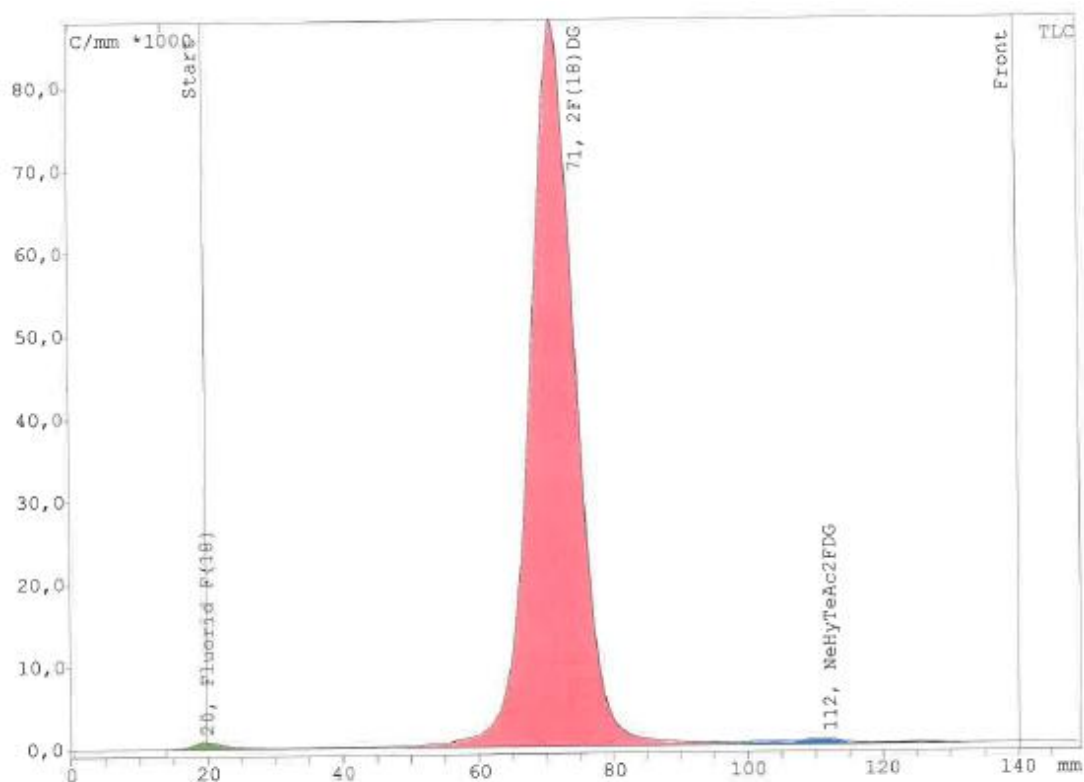
3.1.2 Použitá radiofarmaka

3.1.2.1 ^{18}F -FDG

Výrobce: ÚJV Řež a.s., ČR, šarže č. A16R075, vyrobeno 11.5.2016

Radiochemická čistota stanovena metodou MiniGITA Star Beta+ s GM detektorem. Na desku s vrstvou silikagelu byl nanesen vzorek 1-3 μl ^{18}F -FDG a 2 μl porovnávacího roztoku. Deska se nechala vyvíjet v mobilní fázi z acetonitrilu a vody (poměr 95:5) po dráze 12 mm, tímto se oddělí fluorid (zelená plocha), ^{18}F -FDG (červená plocha), acetylovaná ^{18}F -FDG (modrá plocha) a 1,2,3,4-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosa. Následně bylo stanoveno rozdělení radioaktivity po délce chromatogramu. Výsledný chromatogram znázorňuje Obrázek 1 a Tabulka 3.

Obrázek 1 chromatogram ^{18}F -FDG



Tabulka 3 údaje ke chromatogramu ^{18}F -FDG

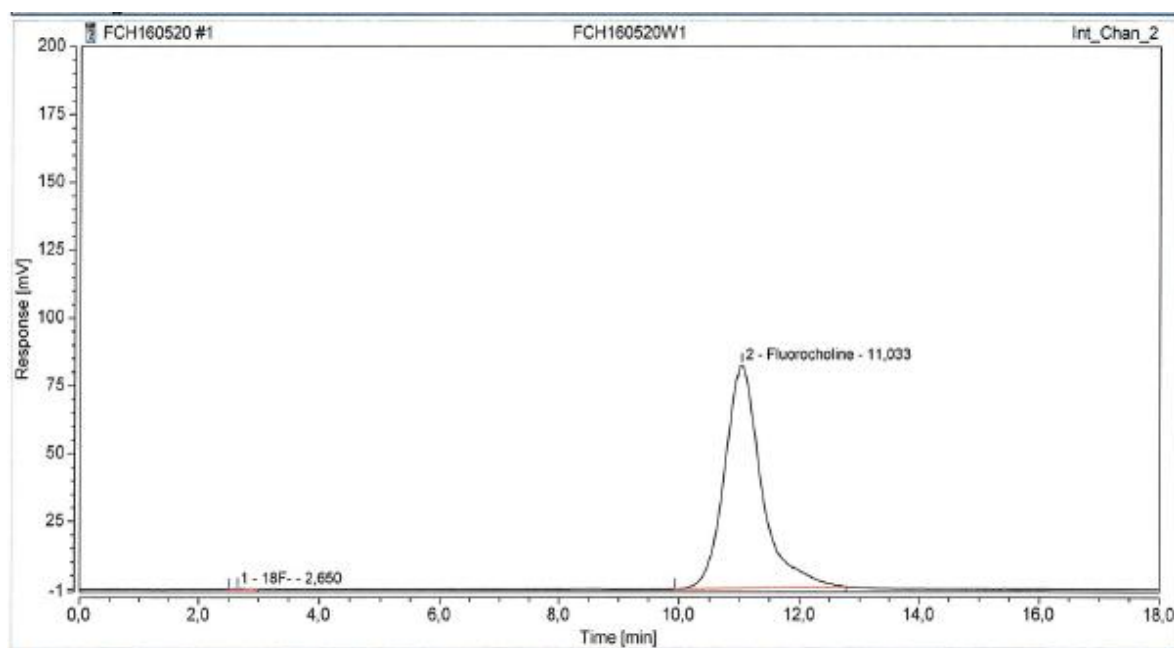
Substance	Relative Area (%)	Area Counts
Fluorid F (18)	0,83	5880,9
2F(18)DG	97,78	690756,9
NeHyTeAc2FDG	1,27	8936,5

3.1.2.2 ^{18}F -fluorocholin

Výrobce: SYNEKTOK S.A., Polsko, šarže: FCh160520W1, vyrobeno 20.5.2016

Radiochemická čistota byla stanovena metodou HPLC. Byl použit nástřikový ventil se smyčkou o objemu 20 μl po vyvíjení v mobilní fázi se oddělí fluorid (retenční čas 2,650) a ^{18}F -fluorocholin (retenční čas 11,033). Jiné produkty nebyly zjištěny. Výsledný chromatogram znázorňuje Obrázek 2 a Tabulka 4.

Obrázek 2 chromatogram ^{18}F -fluorocholin



Tabulka 4 údaje ke chromatogramu ^{18}F - fluorocholinu

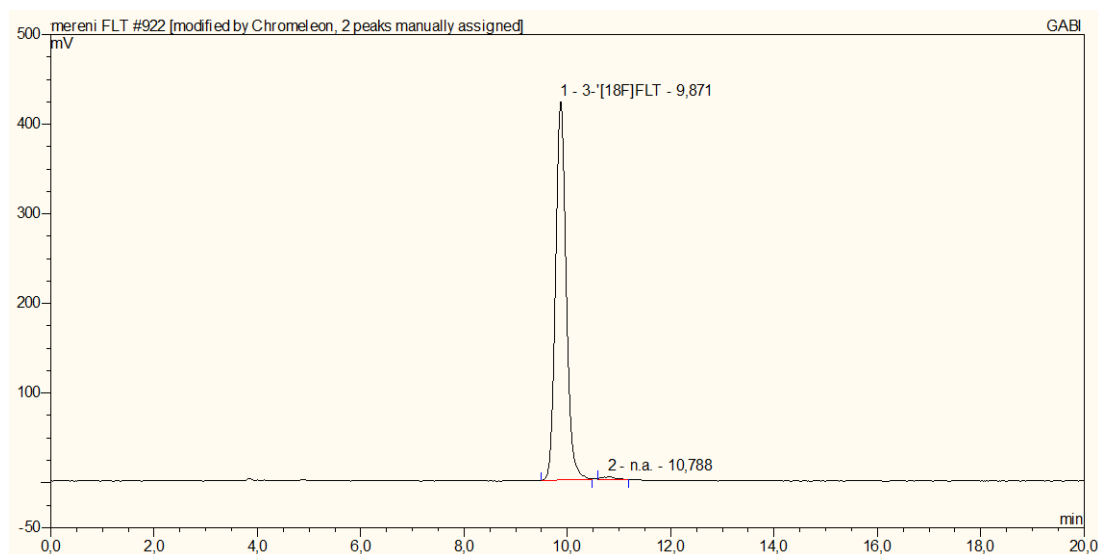
Substance	Relative Area (%)	Area (mV.min)
18F-	0,10	0,061
Fluorochole	99,90	58,879

3.1.2.3 ^{18}F -fluorothymidin

Výrobce: RadioMedic s.r.o., ČR, šarže č. 160524FLT202, vyrobeno 24.5.2016

Radiochemická čistota byla stanovena metodou HPLC. Byl použit nástřikový ventil se smyčkou o objemu 20 μl , kolona Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 (250 \times 4,6 mm, 4 μm , 80 Å), radiometrický detektor a UV/VIS detektor s nastavenou vlnovou délkou 266 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs ethanolu a vody o koncentraci 10 % objemových ethanolu. Došlo k oddělení ^{18}F -fluorothymidin (retenční čas 9,85) a vedlejších produktů n.a. (retenční čas 10,75). Výsledný chromatogram znázorňuje Obrázek 3 a Tabulka 5.

Obrázek 3 chromatogram ^{18}F -fluorothymidin



Tabulka 5 údaje ke chromatogramu ^{18}F -fluorothymidinu

Substance	Relative Area (%)	Area (mV.min)
3- ^{18}F FLT	99,37	113,99420
n.a.	0,63	0,71886

3.1.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

centrifuga EBA 200, Hettich

otáčecí zařízení pro rovnovážnou dialýzu

pH metr Multi 3420, WTW

termostat Climacell CLC 707, BMT Medical Technology s.r.o.

měřič radioaktivity detekční jednotka NE 3502 s analyzátozem MC 1256, EMPOS s.r.o.

semipermeabilní membrána – celofán, Presvit, Chemosvit

injekční jehly, stříkačky (1,0ml) a automatické pipety (1-1000 μl)

ultrafiltr AMICON Ultra-0,5, Merck (limit molekulové hmotnosti 10 kDa)

ultrafiltr VIVASPIN 500 μl , Sartorius Stedim (limit molekulové hmotnosti 10 kDa)

zkumavky

3.1.4 Chemikálie

Isotonický fosfátový pufr pH = 7,40

(složení: 1,82 g KH_2OP_4 , 19,2 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ doplněno do 1000 g Aqua purificata)

antikoagulační látka – Heparin Léčiva inj.

3.2 Všeobecné postupy

Pro analýzu vzorků a určení plazmatické vazebnosti byly použity dvě metody: metoda ultrafiltrace a metoda rovnovážné dialýzy.

3.2.1 Metoda ultrafiltrace

Postup zde uvedený je pro jeden živočišný druh a analýzu jednoho radiofarmaka. Postupně byly analyzovány všechny druhy plazmy (prasečí, lidská, potkaní, hovězí) a všechna tři radiofarmaka (^{18}F -fluorocholin, ^{18}F -fluorothymidin, ^{18}F -FDG).

Nejdříve byl proveden úvodní pokus pro zjištění doby centrifugace pro jednotlivé typy filtrů, abychom získali 80-100 μl ultrafiltrátu. Jako nejvhodnější nastavení vyšlo 12 minut při 6 000 otáčkách pro AMICON a 10 minut při 6 000 otáčkách pro VIVASPIN.

Byl připraven zásobní roztok obsahující 2,5 ml plazmy a 25 μl radiofarmaka (tj. zředění 1:100). Následně byly plněny zkumavky s filtrem vždy 2 typu AMICON a 2 typu VIVASPIN 0,5 ml zásobního roztoku. Zkumavky s filtrem se umístí do centrifugy, kde se při stanovených otáčkách a po stanovenou dobu centrifugují. Experiment probíhal při teplotě 37 °C. Po centrifugaci zásobního roztoku odebereme z ultrafiltrátu celkem 4 vzorky po 20 μl ze zkumavek s filtrem AMICON a 4 vzorky po 20 μl ze zkumavek s filtrem VIVASPIN, u těchto vzorků byla změřena aktivita v impulsech, kde se získají hodnoty aktivity volného radiofarmaka. Zároveň byly změřeny 4 vzorky po 20 μl z původního roztoku s radiofarmakem před centrifugací, takto se získá hodnota aktivity v plazmě.

3.2.2 Metoda rovnovážné dialýzy

Postup zde uvedený je pro 4 živočišné druhy a analýzu jednoho radiofarmaka. Postupně byla analyzována tři radiofarmaka (^{18}F -fluorocholin, ^{18}F -fluorothymidin, ^{18}F -FDG). Aparatura pro rovnovážnou dialýzu obsahuje 4 kotouče, které se skládají vždy po dvojici,

a mezi ně je vložen celofán. Takto vznikne celkem 32 prohlubní oddělených membránou z celofánu.

Nejdříve byl proveden úvodní pokus pro zjištění doby experimentu pro jednotlivá radiofarmaka. Na jednu stranu prohlubně se aplikovalo 0,45 ml samotného pufru a na druhou 0,45 ml pufru s radiofarmakem ze zásobního roztoku připraveného ze 4 ml pufru a 40 μ l radiofarmaka (tj. zředění 1:100). Celý dialyzační přístroj byl umístěn do termostatu nastaveného na 37°C, kde docházelo k přechodu radiofarmaka přes membránu až do vyrovnání koncentrací. Každých 30 minut byl odebírán vzorek ze strany obsahující původně samotný pufr a ze strany s pufrům obsahující radiofarmakum. Z každého odběru byl změřen vzorek 100 μ l, dokud nedošlo k vyrovnání koncentrací (měřených jako aktivita vzorku v impulsech). Takto byl stanoven čas pro ustavení dialyzační rovnováhy.

Doba, za kterou se ustanovila dialyzační rovnováhy, byla stanovena pro ^{18}F -FDG a ^{18}F -fluorothymidin na 120 minut a pro ^{18}F -fluorocholin na 90 minut.

Následně bylo přeměřeno pH 0,01M fosfátového pufru, které odpovídalo hodnotě pH = 7,40 a pufr byl v objemu 0,45 ml aplikován do prohlubní na jedné straně složeného kotouče a oproti nim bylo aplikováno 0,45 ml roztoku plazmy s radiofarmakem, odebraného ze zásobního roztoku, který obsahoval 2,5 ml plazmy a 25 μ l radiofarmaka (tj. zředění 1:100). Z každého druhu plazmy byly aplikovány 4 vzorky s jedním radiofarmakem.

Celý dialyzační přístroj byl umístěn do termostatu nastaveného na 37°C, kde docházelo k přechodu radiofarmaka přes membránu až do doby ustavení dialyzační rovnováhy, zjištěné v úvodním pokusu. Z každé prohlubně byla změřena aktivita v impulsech dvou vzorků o objemu 100 μ l.

3.3 Výpočty

3.3.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr, který je vypočten součtem skupiny čísel a jeho následným vydělením počtem těchto čísel lze vyjádřit vzorcem:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i, \text{ kde } x \text{ značí jednotlivé hodnoty a } n \text{ značí rozsah souboru.}$$

3.3.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka vyjadřuje, jak se hodnoty liší od průměrné hodnoty (střední hodnoty). Směrodatná odchylka je definována následujícím vztahem:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

3.3.3 Výpočet volné frakce pro metodu ultrafiltrace

Hodnota volného radiofarmaka v procentech se vypočte podle vzorce:

$$f_u = \frac{A_{uf}}{A_{pl}} \times 100$$

A_{uf} – aktivita v ultrafiltrátu (v impulsech)

A_{pl} – aktivita v plazmě (v impulsech)

f_u – frakce volného léčiva (v %)

3.3.4 Výpočet rozdílů průměrů a volné frakce pro metodu rovnovážné dialýzy

Hodnota rozdílu průměrů aktivit v procentech se vypočte podle vzorce:

$$\Delta = \left(1 - \frac{A_{pu}}{A_{RF}} \right) \times 100$$

A_{pu} – aktivita pufru (v impulsech)

A_{RF} – aktivita pufru s radiofarmakem (v impulsech)

Δ - Rozdíl průměrů aktivit v pufru a v pufru a radiofarmakem (v %)

Hodnota volné radiofarmaka v procentech se vypočte podle vzorce:

$$f_u = \frac{A_{pu}}{A_{pl}} \times 100$$

A_{pu} – aktivita pufru (v impulsech)

A_{pl} – aktivita plazmy (v impulsech)

f_u – frakce volného léčiva (v %)

3.3.5 Statistické zpracování dat

Statisticky významné rozdíly mezi volnou frakcí v lidské plazmě a v plazmě jednotlivých živočišných druhů byly určeny s použitím statistických funkcí v programu EXCEL.

Byla zformulována nulová hypotéza H_0 : Mezi hodnotami volné frakce nejsou statisticky významné rozdíly.

Jako hladina významnosti testu (α) byla určena hodnota 0,05.

Vzhledem k typu zpracovaných dat tvořící dva soubory hodnot byl nejdříve použit Dvouvýběrový F-test pro rozptyl, z kterého se podle p-hodnoty určilo, zda bude v dalším kroku využít Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů (pokud $p > 0,05$ jedná se o shodné rozptyly) nebo Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů (pokud $p < 0,05$ jedná se o neshodné rozptyly). P-hodnota pro oboustranný test z t-testu byla porovnána s hladinou významnosti testu α . Pokud $p < \alpha$, pak zamítneme nulovou hypotézu a jedná se o statisticky významný rozdíl. Pokud $p > \alpha$, pak není možné zamítnout nulovou hypotézu a přijmeme nulovou, tzn. mezi hodnotami volné frakce nejsou statisticky významné rozdíly.^{128, 129}

4 VÝSLEDKY

4.1 Experiment s ¹⁸F-FDG

4.1.1 Výsledky rovnovážné dialýzy

Tabulka 6 Určení doby ustanovení rovnováhy koncentrací ¹⁸F-FDG metodou rovnovážné dialýzy

vzorek	čas (minuty)	A _{RF} a	A _{RF} b	průměr A _{RF}	A _{pu} a	A _{pu} b	průměr A _{pu}	rozdíl průměrů
1	30	60255	59962	60108,5	55594	54663	30142,5	8,3%
2	60	45871	46196	46033,5	45486	45849	22965,5	0,8%
3	90	36877	36482	36679,5	34058	33930	18483,5	7,3%

Tabulka 7 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F-FDG v hovězí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	A _{pl} a	A _{pl} b	průměr A _{pl}	A _{pu} a	A _{pu} b	průměr A _{pu}	f _u
1	18203	18047	18125,0	18694	18418	18556,0	102,38 %
2	12647	12439	12543,0	12406	12236	12321,0	98,23 %
3	14891	14501	14696,0	17013	16736	16874,5	114,82 %
4	17286	17188	17237,0	17381	17367	17374,0	100,79 %
průměr			15650,25			16281,38	104,03 % ± 6,39

Tabulka 8 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F-FDG v prasečí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	A _{pl} a	A _{pl} b	průměr A _{pl}	A _{pu} a	A _{pu} b	průměr A _{pu}	f _u
1	16668	16728	16698,0	19510	19444	19477,0	116,64 %
2	19860	19938	19899,0	21477	19940	20708,5	104,07 %
3	19609	19775	19692,0	19609	19621	19615,0	99,61 %
4	18324	18457	18390,5	18897	18743	18820,0	102,34 %
průměr			18669,88			19655,13	105,28 % ± 6,53

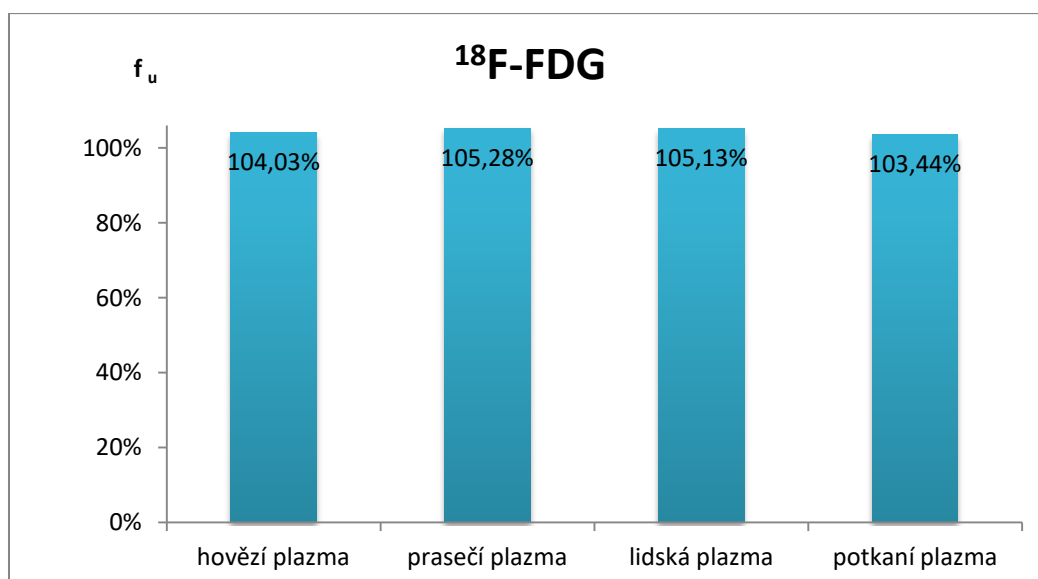
Tabulka 9 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v lidské plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	průměr A_{pu}	f_u
1	18203	18199	18201,0	18669	18622	18645,5	102,44%
2	17560	17440	17500,0	18418	18400	18409,0	105,19%
3	12339	12183	12261,0	13081	13069	13075,0	106,64%
4	14500	14666	14583,0	15534	15713	15623,5	107,14%
průměr			15636,25			16438,25	105,13% ± 1,83

Tabulka 10 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v potkaní plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	průměr A_{pu}	f_u
1	16024	16070	16047,0	16862	16857	16859,5	105,06 %
2	15966	16084	16025,0	16229	16253	16241,0	101,35 %
3	13593	13754	13673,5	14023	13846	13934,5	101,91 %
4	13446	13797	13621,5	14402	14343	14372,5	105,51 %
průměr			14841,75			15351,88	103,44 % ± 1,85

Obrázek 4 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou rovnovážné dialýzy ^{18}F -FDG



4.1.2 Výsledky ultrafiltrace

Tabulka 11 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	13016	12870	101,13%
A-1-b	13153	12957	101,51%
A-2-a	12922	13006	99,35%
A-2-b	13383	12756	104,92%
průměr	13118,50	12897,25	101,73% ± 2,01

Tabulka 12 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	17413	20558	84,70%
A-1-b	19469	19828	98,19%
A-2-a	17521	20267	86,45%
A-2-b	17964	20277	88,59%
průměr	18092,75	20232,50	89,48% ± 5,21

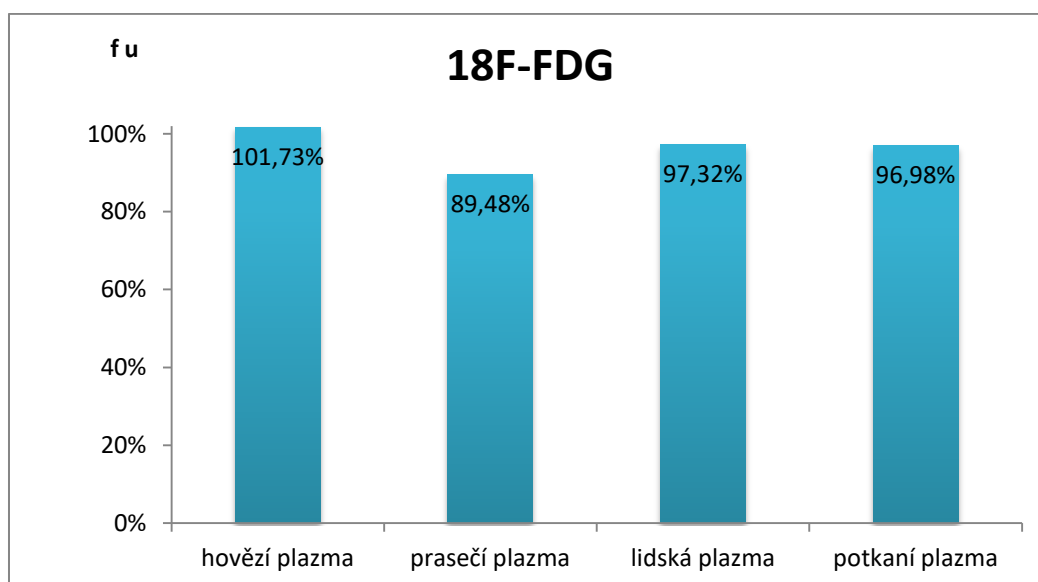
Tabulka 13 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	17266	17229	100,21%
A-1-b	17163	16990	101,02%
A-2-a	15919	17047	93,38%
A-2-b	16554	17487	94,66%
průměr	16725,50	17188,25	97,32% ± 3,34

Tabulka 14 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	14603	14721	99,20%
A-1-b	14825	14924	99,34%
A-2-a	13953	14582	95,69%
A-2-b	14083	15029	93,71%
průměr	14366,00	14814,00	96,98% ± 2,39

Obrázek 5 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem AMICON s ^{18}F -FDG



Tabulka 15 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	9129	9978	91,49%
V-1-b	9479	10055	94,27%
V-2-a	9946	9203	108,07%
V-2-b	9730	9471	102,73%
průměr	9571,00	9676,75	99,14% ± 6,61

Tabulka 16 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	10334	10822	95,49%
V-1-b	10374	10467	99,11%
V-2-a	10160	10735	94,64%
V-2-b	10747	10981	97,87%
průměr	10403,75	10751,25	96,78% ± 1,79

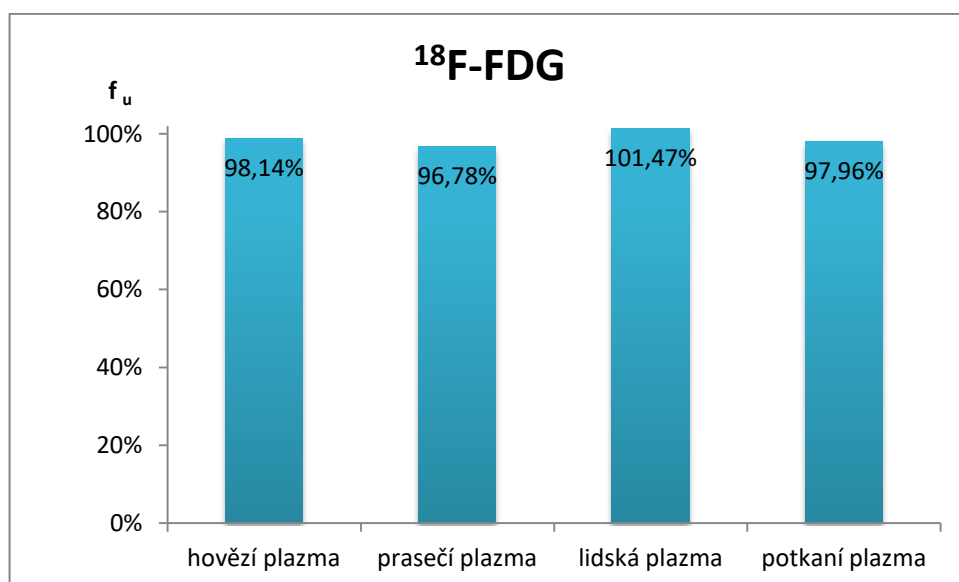
Tabulka 17 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	10552	10486	100,63%
V-1-b	10693	10551	101,35%
V-2-a	10451	10237	102,09%
V-2-b	10383	10198	101,81%
průměr	10519,75	10368,00	101,47% ± 0,55

Tabulka 18 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -FDG v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	9535	10123	94,19%
V-1-b	9933	9837	100,98%
V-2-a	10091	10217	98,77%
V-2-b	9838	10050	97,89%
průměr	9849,25	10056,75	97,96% ± 2,45

Obrázek 6 Mezdruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem VIVASPIN s ^{18}F -FDG



4.2 Experiment s ^{18}F -fluorocholinem

4.2.1 Výsledky rovnovážné dialýzy

Tabulka 19: Určení doby ustanovení rovnováhy koncentrací ^{18}F -fluorocholinu metodou rovnovážné dialýzy

vzorek	čas (minuty)	$A_{\text{RF a}}$	$A_{\text{RF b}}$	průměr A_{RF}	$A_{\text{pu a}}$	$A_{\text{pu b}}$	průměr A_{pu}	rozdíl průměrů
1	30	56148	55976	56062,0	53229	53430	53329,5	4,87%
2	60	47445	47506	47475,5	46833	46079	46456,0	2,15%
3	90	41872	41206	41539,0	41837	41774	41805,5	-0,64%

Tabulka 20: Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholinu v hovězí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{\text{pl a}}$	$A_{\text{pl b}}$	Průměr A_{pl}	$A_{\text{pu a}}$	$A_{\text{pu b}}$	Průměr A_{pu}	f_u
1	12493	12658	12575,5	13209	13334	13271,5	105,53%
2	14129	14498	14313,5	14284	15344	14814,0	103,50%
3	14514	14933	14723,5	14436	14714	14575,0	98,99%
4	13246	13995	13620,5	13549	14300	13924,5	102,23%
průměr			13808,25			14146,25	102,56% ± 2,38

Tabulka 21 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholinu v prasečí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{\text{pl a}}$	$A_{\text{pl b}}$	Průměr A_{pl}	$A_{\text{pu a}}$	$A_{\text{pu b}}$	Průměr A_{pu}	f_u
1	9909	9166	9537,5	10119	10081	10100,0	105,90%
2	10445	11364	10904,5	11067	11313	11190,0	102,62%
3	15029	15593	15311,0	15428	15578	15503,0	101,25%
4	13160	13434	13297,0	13774	13673	13723,5	103,21%
průměr			12262,50			12129,13	103,24% ± 1,69

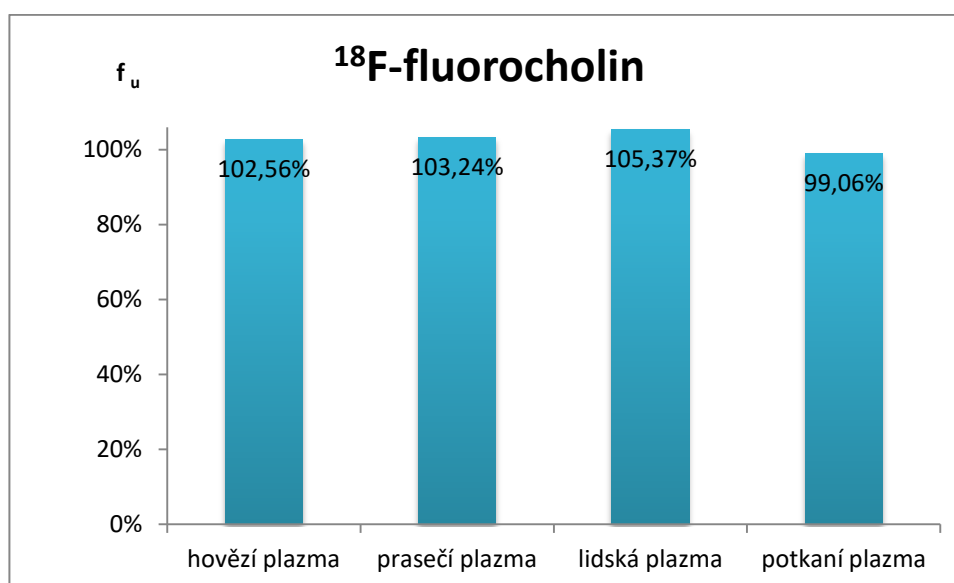
Tabulka 22 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholinu v lidské plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	Průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	Průměr A_{pu}	f_u
1	6921	6958	6939,5	7236	7062	7149,0	103,02%
2	7074	6757	6915,5	7440	7213	7326,5	105,94%
3	7241	7161	7201,0	7516	7642	7579,0	105,25%
4	7467	7707	7587,0	7188	9091	8139,5	107,28%
průměr			7160,75			7548,50	105,37% ± 1,54

Tabulka 23 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholinu v potkaní plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	Průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	Průměr A_{pu}	f_u
1	6968	6358	6663,0	6369	6590	6479,5	97,25%
2	5875	6405	6140,0	6038	5907	5972,5	97,27%
3	6313	6318	6315,5	6404	6107	6255,5	99,05%
4	5941	6111	6026,0	6087	6285	6186,0	102,66%
průměr			6286,13			6223,38	99,06% ± 2,20

Obrázek 7 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou rovnovážné dialýzy ^{18}F -fluorocholinem



4.2.2 Výsledky ultrafiltrace

Tabulka 24 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholin v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	6778	7317	92,63%
A-1-b	5984	7280	82,20%
A-2-a	6571	7720	85,12%
A-2-b	6571	7871	83,48%
průměr	6476,00	7547,00	85,86% ± 4,05

Tabulka 25 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorocholin v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	9008	8841	101,89%
A-1-b	8835	8860	99,72%
A-2-a	9454	9140	103,44%
A-2-b	8652	9153	94,53%
průměr	8987,25	8998,50	99,89% ± 3,37

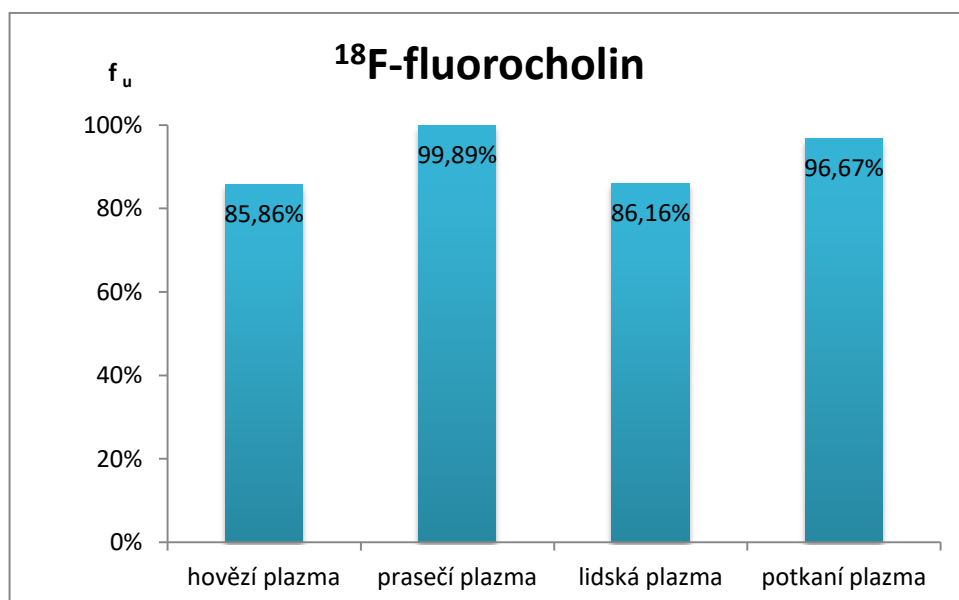
Tabulka 26 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorocholin v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	6302	8117	77,64%
A-1-b	7078	8006	88,41%
A-2-a	6785	7986	84,96%
A-2-b	7348	7849	93,62%
průměr	6878,25	7989,50	86,16% ± 5,80

Tabulka 27 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorocholin v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	8118	8602	94,37%
A-1-b	7986	8588	92,99%
A-2-a	8510	8605	98,90%
A-2-b	8718	8683	100,40%
průměr	8333,00	8619,50	96,67% ± 3,07

Obrázek 8 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem AMICON s ^{18}F -fluorocholinem



Tabulka 28 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorocholin v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	4258	4486	94,92%
V-1-b	4309	4386	98,24%
V-2-a	4438	2852	155,61%
V-2-b	4620	2822	163,71%
průměr	4406,25	3636,50	128,12% ± 31,69

Tabulka 29 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorocholin v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	3854	3894	98,97%
V-1-b	5183	3992	129,83%
V-2-a	3766	3776	99,74%
V-2-b	3467	3698	93,75%
průměr	4067,50	3840,00	105,57% ± 14,19

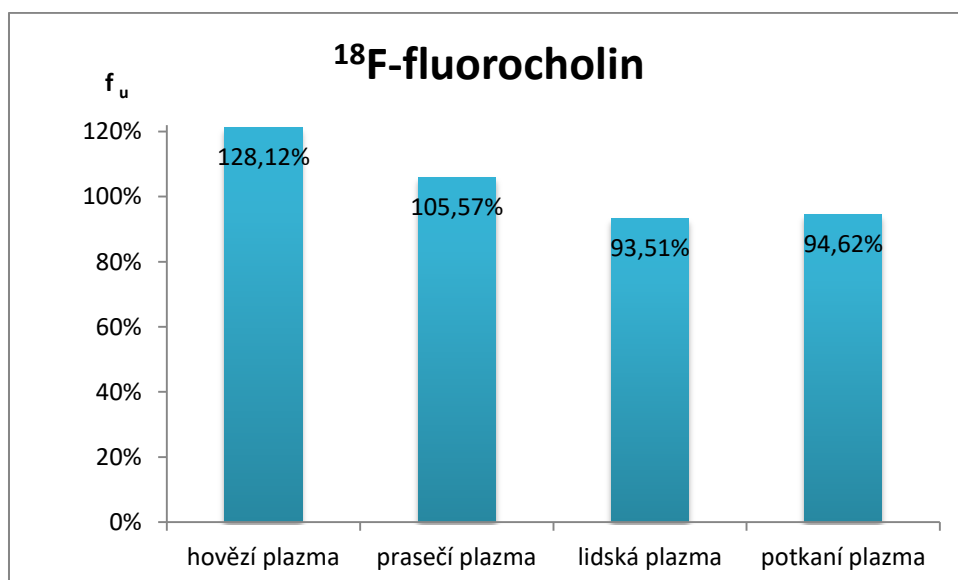
Tabulka 30 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorocholin v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	3748	4133	90,68%
V-1-b	4173	4033	103,47%
V-2-a	3927	4336	90,57%
V-2-b	3933	4403	89,33%
průměr	3945,25	4226,25	93,51% ± 5,77

Tabulka 31 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorocholin v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	4262	4423	96,36%
V-1-b	4301	4523	95,09%
V-2-a	4443	4683	94,88%
V-2-b	4336	4706	92,14%
průměr	4335,50	4583,75	94,62% ± 1,54

Obrázek 9 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem VIVASPIN s ^{18}F -fluorocholinem



4.3 Experiment s ¹⁸F-fluorothymidinem

4.3.1 Výsledky rovnovážné dialýzy

Tabulka 32 Určení doby ustanovení rovnováhy koncentrací ¹⁸F-fluorothymidinu metodou rovnovážné dialýzy

vzorek	Čas (minuty)	A _{RF} a	A _{RF} b	průměr A _{RF}	A _{pu} a	A _{pu} b	Průměr A _{pu}	rozdíl průměrů
1	30	118216	116953	117584,5	98780	99155	98967,5	15,83%
2	60	94365	94465	94415,0	90993	91261	91127,0	3,48%
3	90	82929	82720	82824,5	80905	80805	80855,0	2,38%
4	120	71508	71842	71675,0	73357	73226	73291,5	-2,26%

Tabulka 33 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidinu v hovězí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	A _{pl} a	A _{pl} b	Průměr A _{pl}	A _{pu} a	A _{pu} b	Průměr A _{pu}	f _u
1	23615	23924	23769,5	22646	22614	22630,0	95,21%
2	24108	24507	24307,5	23042	22800	22921,0	94,30%
3	22303	22585	22444,0	22307	22251	22279,0	99,26%
4	23086	23257	23171,5	21796	21932	21864,0	94,36%
Průměr			23423,13			22423,50	95,78% ± 2,04

Tabulka 34 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidinu v prasečí plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	A _{pl} a	A _{pl} b	Průměr A _{pl}	A _{pu} a	A _{pu} b	Průměr A _{pu}	f _u
1	20098	20026	20062,0	20106	19582	19844,0	98,91%
2	20500	20480	20490,0	21645	21515	21580,0	105,32%
3	21157	21221	21189,0	19720	19801	19760,5	93,26%
4	19723	19840	19781,5	19971	19839	19905,0	100,62%
průměr			20380,63			20272,38	99,53% ± 4,31

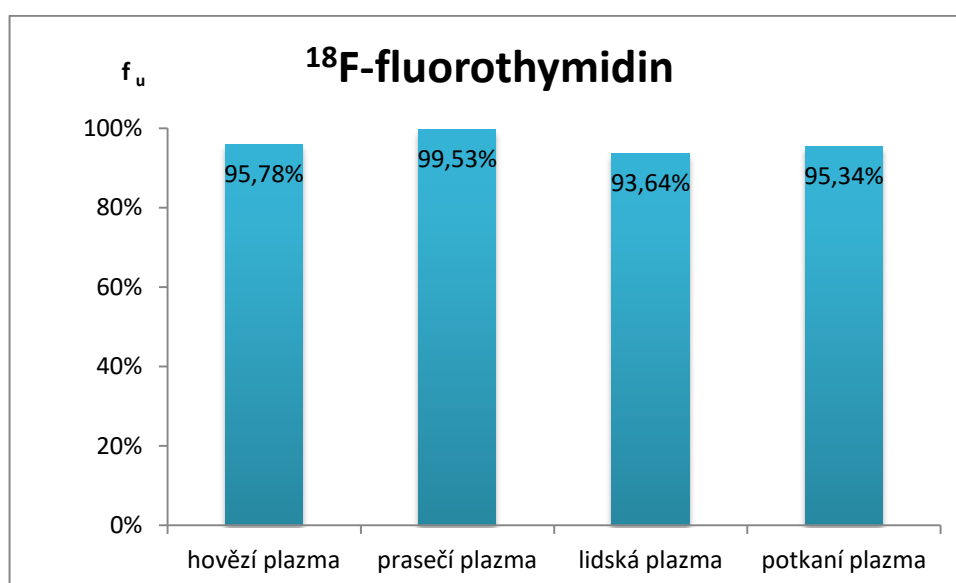
Tabulka 35 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorothymidinu v potkaní plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	Průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	Průměr A_{pu}	f_u
1	17648	17427	17537,5	16322	16288	16305,0	92,97%
2	18026	17885	17955,5	16391	16588	16489,5	91,84%
3	16288	16303	16295,5	15587	15796	15691,5	96,29%
4	16238	16279	16258,5	16295	16300	16297,5	100,24%
průměr			17011,75			16195,88	95,34% ± 3,27

Tabulka 36 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorothymidinu v lidské plazmě stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C

vzorek	$A_{pl} a$	$A_{pl} b$	Průměr A_{pl}	$A_{pu} a$	$A_{pu} b$	Průměr A_{pu}	f_u
1	21600	21436	21518,0	20432	20218	20325,0	94,46%
2	21549	21596	21572,5	20630	20596	20613,0	95,55%
3	20756	20741	20748,5	18916	18919	18917,5	91,18%
4	21778	21720	21749,0	20271	20346	20308,5	93,38%
průměr			21397,00			20041,00	93,64% ± 1,62

Obrázek 10 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou rovnovážné dialýzy ^{18}F -fluorothymidinu



4.3.2 Výsledky ultrafiltrace

Tabulka 37 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F -fluorothymidin v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	9004	11638	77,37%
A-1-b	11007	11520	95,55%
A-2-a	9563	10718	89,22%
A-2-b	9849	10561	93,26%
průměr	9855,75	11109,25	88,85% ± 7,00

Tabulka 38 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorothymidin v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	5844	6105	95,72%
A-1-b	5693	6068	93,82%
A-2-a	5735	6882	83,33%
A-2-b	5426	6777	80,06%
průměr	5674,50	6458,00	88,24% ± 6,67

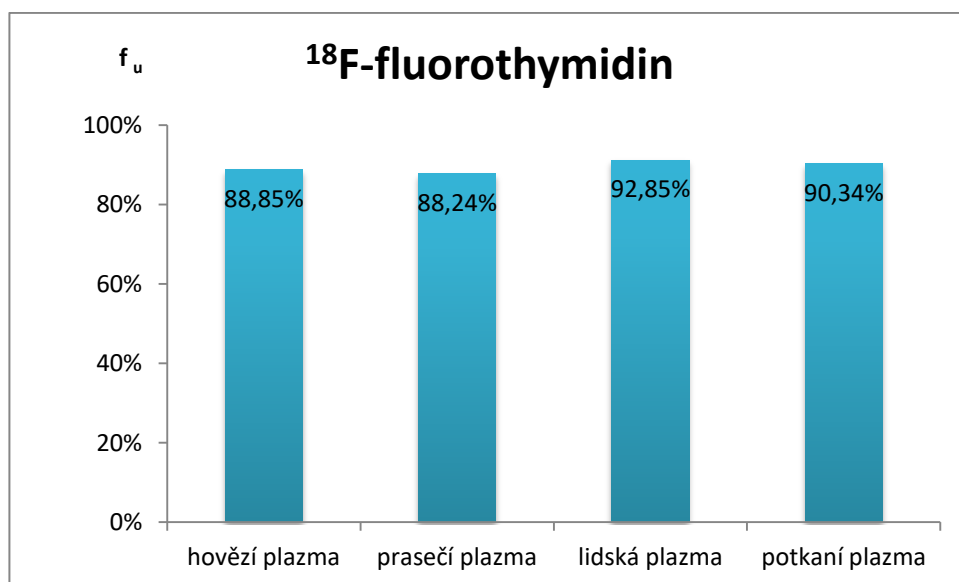
Tabulka 39 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorothymidin v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	5250	5028	104,42%
A-1-b	5430	4926	110,23%
A-2-a	4935	6135	80,44%
A-2-b	4820	6316	76,31%
průměr	5108,75	5601,25	92,85% ± 14,69

Tabulka 40 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorothymidin v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON

Vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
A-1-a	5091	5852	87,00%
A-1-b	5152	5915	87,10%
A-2-a	5172	5613	92,14%
A-2-b	5420	5699	95,10%
Průměr	5208,75	5769,75	90,34% ± 3,45

Obrázek 11 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem AMICON s ^{18}F -fluorothymidinem



Tabulka 41 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidin v hovězí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	3790	4860	77,98%
V-1-b	3898	4879	79,89%
V-2-a	3724	5054	73,68%
V-2-b	3668	5135	71,43%
průměr	3770,00	4982,00	75,75% ± 3,36

Tabulka 42 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidin v prasečí plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	3492	4268	81,82%
V-1-b	3614	4252	85,00%
V-2-a	3408	4646	73,35%
V-2-b	3325	4504	73,82%
průměr	3459,75	4417,50	78,50% ± 5,04

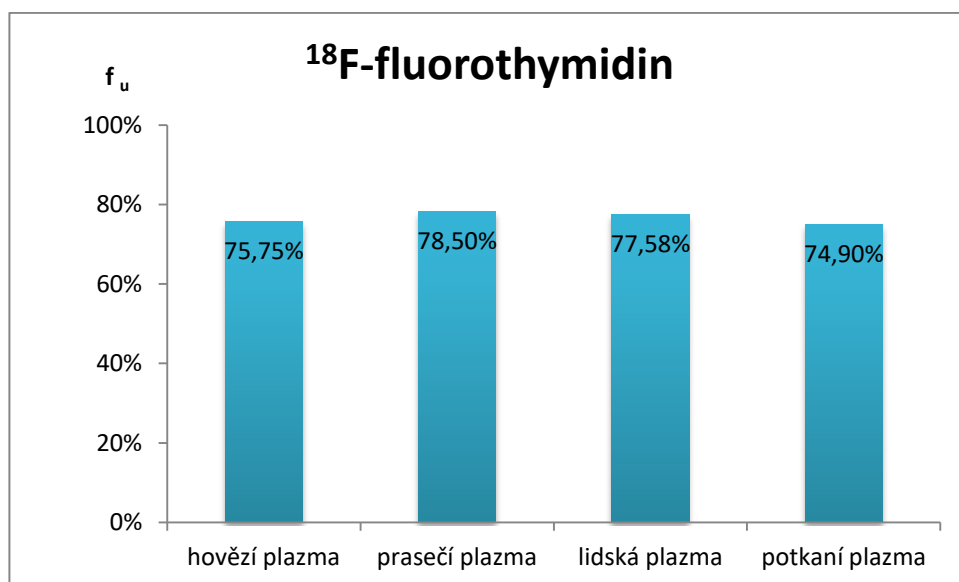
Tabulka 43 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidin v lidské plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

vzorek	A _{ul}	A _{pl}	f _u
V-1-a	4192	5276	79,45%
V-1-b	4296	5378	79,88%
V-2-a	4100	5477	74,86%
V-2-b	4073	5350	76,13%
průměr	4165,25	5370,25	77,58% ± 2,14

Tabulka 44 Výsledky vazebnostních parametrů ^{18}F - fluorothymidin v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr VIVASPIN

Vzorek	A_{ul}	A_{pl}	f_u
V-1-a	3651	4857	75,17%
V-1-b	3563	4839	73,63%
V-2-a	3726	4840	76,98%
V-2-b	3635	4924	73,82%
průměr	3643,75	4865,00	74,90% ± 1,34

Obrázek 12 Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti metodou ultrafiltrace s filtrem VIVASPIN s ^{18}F fluorothymidinem



Tabulka 47: Vyhodnocení statistické významnosti pro ^{18}F -FCh

	hovězí x lidská			prasečí x lidská			potkaní x lidská		
	RD	AMICON	VIVASPIN	RD	AMICON	VIVASPIN	RD	AMICON	VIVASPIN
F-test: p	0,497	0,568	0,019	0,884	0,395	0,173	0,571	0,324	0,056
rozptyly	shodné	shodné	neshodné	shodné	shodné	shodné	shodné	shodné	shodné
T-test:p	0,136	0,944	0,160	0,158	0,012	0,221	0,007	0,032	0,760
statisticky významné rozdíly	nejsou	nejsou	nejsou	nejsou	jsou	nejsou	jsou	jsou	nejsou

5 DISKUSE A ZÁVĚR

Diskuse

Určení plazmatické vazebnosti je esenciální pro charakteristiku farmakokinetického profilu a odhad celkové farmakologické aktivity. Vazba léčiva na krevní bílkoviny významně ovlivňuje distribuci léčiva, vazba brání rozdělování přes kapilární membránu do tkání. Souvisí také s otázkami ohledně bezpečnosti léků a nežádoucími účinky léků, především s interakcí mezi léčivy a ztrátou účinnosti. Volná frakce léčiva v plazmě je považována za základní parametr dostupnosti léčiva pro distribuci do tkání a buněk, interakci s receptory, exkreci a metabolismus.

Cílem rigorózní práce bylo stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny u radiofarmak značených ^{18}F z hlediska mezidruhového srovnání. Konkrétně se jednalo o látky ^{18}F -FDG, ^{18}F -fluorocholin a ^{18}F -thymidin. Pro každou z látek byla využita metoda rovnovážné dialýzy při 37 °C a také metoda ultrafiltrace s dvěma různými typy filtrů (VIVASPIN a AMICON) při fyziologické teplotě 37°C.

Vzhledem k tomu, že látky byly vyrobeny standardizovaným postupem v laboratoři, kde se tato činnost provádí rutinně, bylo dosaženo velmi vysoké hodnoty radiochemické čistoty. Toto stanovení provedl vždy výrobce jako povinnou analýzu pro propuštění šarže do distribuce. Lze tedy konstatovat, že byla vždy dosažena dostatečná radiochemická čistota pro provedení biologických experimentů.

Experiment se prováděl vždy ze stejné šarže pro všechny 4 živočišné druhy najednou, lze tedy vyloučit ovlivnění výsledků parametry pokusu jako je rozdílná teplota, radiochemická čistota či vliv rozdílné délky experimentu

Rovnovážná dialýza je metoda časově náročná, ustavení rovnováhy obvykle trvá několik hodin. Což představuje u radiofarmak značených nuklidem ^{18}F značnou nevýhodu z důvodu krátkého poločasu rozpadu tohoto nuklidu (110 minut) a při příliš dlouhém ustavení rovnováhy by mohlo dojít k takovému poklesu aktivity, která by již nebyla měřitelná detektorem, který byl k dispozici. K dalším negativům řadíme možnost naředení plazmy puřem a denaturaci bílkovin v čase. U této metody docházelo poměrně často k výskytu výsledných hodnot nad 100 %, lze předpokládat, že je to důsledkem Donnanova efektu, kdy dochází vlivem nabitých makromolekul (např. albumin) k ovlivnění rovnováhy.

Ultrafiltrace je časově méně náročná metoda, což představuje značnou výhodu při práci s tímto radionuklidem, protože celý experiment zahrnující přípravu vzorku, jeho centrifugaci a závěrečné změření ultrafiltrátu a plazmy lze uskutečnit za cca 20 minut. Nevýhodou je případná vazba na membránu a další části ultrafiltrační zkumavky.

U části výsledků byly stanovené hodnoty volné frakce radiofarmaka v plazmě (především u metody rovnovážné dialýzy) vyšší než 100 %. Z fyzikálního hlediska nemůže být frakce volného léčiva vyšší než 100 %; příčinou nalezených výsledků může být jednak vliv daný použitou metodou (již zmíněný vliv Donnanova efektu při rovnováze na semipermeabilní membráně mezi koncentrací volného radiofarmaka v plazmě a pufru), jednak vliv dalších faktorů jako je nepřesnost při měření aktivity daná statistickým charakterem radioaktivní přeměny nebo chyba při odměřování objemu vzorků plazmy a pufru (plazma díky vyšší viskozitě při porovnání s pufrům má při pipetování větší tendenci ulpívat na stěnách špičky pipety než u vzorku pufru). V těchto případech (kdy stanovená hodnota volné frakce byla větší než 100 %) lze pouze konstatovat, že vazebnost daného radiofarmaka na plazmatické bílkoviny je minimální a z farmakokinetického hlediska zcela bezvýznamná. Porovnání statistické významnosti rozdílů ve stanovených hodnotách volné frakce studovaných radiofarmak v lidské plazmě a plazmě dalších živočišných druhů ukázalo, že tyto rozdíly nejsou v převážné většině případů statisticky významné. Výjimečně nalezené statisticky významné rozdíly lze považovat spíše za důsledek rozdílného metodického přístupu a experimentálních nepřesností a interpretace těchto mezidruhových rozdílů je problematická vzhledem k tomu, že se tyto látky vážou na plazmatické bílkoviny v minimální míře.

Při srovnání jednotlivých léčiv má nejvyšší vazebnost ^{18}F -fluorothymidin (číselné výsledky experimentu uvedeny v tabulkách 32 – 44 a v grafech na obrázcích 10 – 12), vzhledem ke složení jeho molekuly lze předpokládat hydrofóbní interakci mezi dvěma aromatickými cykly látky (pyridiminový skelet) a odpovídajícími aminokyselinovými zbytky (indolová část tryptofanu) plazmatického proteinu. Byla popsána i vazebná místa na albuminu, která vážou obdobnou sloučeninu 3'-azid-3'-deoxythymidin.⁹¹ Prakticky žádné mezidruhové rozdíly nebyly pozorovány u metody rovnovážné dialýzy a ultrafiltrace s filtrem AMICON. Nejvyšší hodnota vázané frakce (přepočteno v procentech jako $100 - f_u$) byla určena ultrafiltrací s filtrem VIVASPIN v potkaní plazmě pro ^{18}F -fluorothymidin:

25,10 ± 1,34 % (Tabulka 40 Výsledky vazebnostních parametrů ¹⁸F- fluorothymidin v potkaní plazmě stanovené metodou ultrafiltrace. Byl použit membránový filtr AMICON). U ostatních druhů se stejnou látkou a použitím stejné metody byly zjištěny obdobné hodnoty v rozmezí 21,50 % až 24,25 %. Přesto na základě těchto hodnot nemůžeme žádnou z látek označit jako látku se silnou vazebností (>90 %) na plazmatické proteiny.¹³⁰

Proto se při běžném podání ani nedá očekávat, že by vazebnost těchto léčiv způsobila změnu farmakokinetiky, která by ovlivnila pacienta. Jako prakticky nevážající se na plazmatické proteiny se jeví ¹⁸F-FDG (číselné výsledky experimentu uvedeny v tabulkách 6 až 18 a v grafech na obrázcích 4 – 6), kde u všech použitých metod byly určeny hodnoty volné frakce kolem 100 %.

Výsledky vazebnostních parametrů pro ¹⁸F-fluorocholin jsou uvedeny v tabulkách 19 – 31 a v mezidruhovém srovnání znázorněny v grafech na obrázcích 7 – 9. U metody ultrafiltrace s filtrem VIVASPIN jsou výrazně rozdílné hodnoty volné frakce ¹⁸F-fluorocholinu u hovězí plazmy 128,12 ± 31,69 % (Tabulka 28) a lidské plazmy 93,51 ± 5,77 % (Tabulka 30), ale vzhledem ke směrodatné odchylce u hodnoty pro hovězí plazmu nelze hodnotit mezidruhový rozdíl jako relevantní. Stanovené hodnoty volné frakce pro hovězí plazmu jsou vysvětlitelné pravděpodobně experimentálními nepřesnostmi (jak již bylo uvedeno výše, frakce volného léčiva nemůže být vyšší než 100 %).

Porovnáním filtrů nelze zhodnotit, že by jeden z nich poskytoval výrazně odlišné výsledky (průměrná hodnota volné frakce pro AMICON byla 92,86 ± 5,23 % a pro VIVASPIN 93,56 ± 14,74 %). Použití metody ultrafiltrace se liší od rovnovážné dialýzy, kde průměr hodnot volné frakce dosahoval v 101,28 ± 4,23 %.

Výsledky této práce korespondují se zjištěními při dalších měřeních zaměřených na vazbu na plazmatické proteiny u strukturně obdobných látek, jako jsou alovudin (3'-fluorothymidin) a zidovudin (obdoby [¹⁸F]FLT), kdy vazba na plazmatické proteiny byla stanovena mikrodialýzou *in vitro*. U zidovudinu dosahovala 10 % a alovudin se prakticky nevázal (vazba byla pod hladinou detekovatelnosti, tj. < 5%).¹⁸

Velmi nízká hodnota vazebnosti se uvádí i u analogu [¹⁸F]FDG, konkrétně u [¹⁸F]fluorodeoxysorbitolu.¹³¹

V jiném měření, kdy byla analyzována krevní frakce obsahující 2-[¹⁸F]-fluoroethylcholin a jeho metabolity, bylo pouze 6 % této látky vázáno na plazmatické proteiny.¹³²

Nelze exaktně definovat metodu, která by poskytovala přesné údaje o plazmatické vazebnosti ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-fluorocholinu a ¹⁸F-thymidinu. Bylo by nutné využít dalších metod stanovujících plazmatickou vazebnost, aby došlo ke zpřesnění výsledných dat.

Závěr

- 1) Cílem práce bylo stanovení vazebnosti 2-(¹⁸F)fluor-2-deoxy-D-glukosy, ¹⁸F-fluorocholinu a ¹⁸F-thymidinu na plazmatické proteiny plazmy hovězí, prasečí, lidské a potkaní.
- 2) Vazebnosti byla určována dvěma metodami: rovnovážnou dialýzou a ultrafiltrací, přičemž při ultrafiltraci byly používány 2 typy filtrů a to AMICON a VIVASPIN (oba filtry mají limit molekulové hmotnosti pro dělení 10 kDa). Vazebnost byla stanovena při teplotě 37°C.
- 3) Výsledky ukazují, že vazba na plazmatické proteiny u 2-(¹⁸F)fluor-2-deoxy-D-glukosy, ¹⁸F-fluorocholinu a ¹⁸F-thymidinu je nízká. Prakticky vůbec se neváže ¹⁸F-FDG a nejvyšší vazebnost k plazmatickým bílkovinám byla stanovena pro ¹⁸F-thymidin (12,41±8,12%).
- 4) Nebyly pozorovány mezidruhové rozdíly pro vazebnost stanovovaných léčiv.
- 5) Obecně byla u metody rovnovážné dialýzy určena vyšší hodnota pro volnou frakci (lze předpokládat vliv Donnanova efektu a denaturace bílkovin) než při použití metody ultrafiltrace (absorpce na filtr a vliv elektrostatických sil způsobí snížení hodnot volné frakce, tedy zvýšení hodnot vázané frakce).
- 6) Takto nízká plazmatická vazebnost nebude mít zásadní vliv na farmakokinetiku 2-(¹⁸F)fluor-2-deoxy-D-glukosy, ¹⁸F-fluorocholinu a ¹⁸F-thymidinu.

6 SEZNAM ZKRATEK

AADC	Dekarboxylasa pro aromatické L-aminokyseliny (aromatic amino acid decarboxylase)
AAG	α -1-kyselý glykoprotein
AD	Alzheimerova nemoc
Bq	Becquerel (jednotka aktivity)
CT	Výpočetní tomografie (computed tomography)
FDOPAC	6- ^{18}F -3-4-dihydroxy-fenylactová kyselina
FDA sulfát	Sulfát 6- ^{18}F fluorodopaminu
^{18}F FDOPA	L-3,4-dihydroxy-6- ^{18}F fluorofenylalanin
^{18}F FDG	2-(^{18}F)fluor-2-deoxy-D-glukosa
^{18}F FCH	^{18}F -fluorocholin
^{18}F FLT	^{18}F -fluorothymidin
^{18}F NaF	^{18}F -fluorid sodný
f_u	nevázaná frakce
FVHA	^{18}F fluoro-homovanilinová kyselina
Gy	Gray (jednotka absorbované dávky)
ID	Injected dose (injikovaná dávka)
3-OMFD	3-O-methyl-6- ^{18}F -fluoro-L-DOPA
PET	Pozitronové emisní tomografie
RF	Radiofarmakum
Sv	Sievert (jednotka dávkového ekvivalentu)
TK1	Thymidinkinasa

7 LITERATURA

-
- 1 Briner W. H.: *Radiopharmaceuticals are drugs*. Mod. Hosp. 95, 110 (1960).
 - 2 Wadsak W., Mitterhauser M.: *Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT*. Eur. J. Radiol. 73, 461 (2010).
 - 3 Barrio J. R., Huang S. C., Phelps M. E.: *Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases*. Biochem. Pharmacol. 54, 341 (1997).
 - 4 Langen P., Etzold G., Hintsche R., Kowolik G.: *3'-Deoxy-3'-fluorothymidine, a new selective inhibitor of DNA-synthesis*. Acta. Biol. Med. Ger. 23, 759 (1969).
 - 5 Flexner C., van der Horst C., Jacobson M. A., Powderly W., Duncanson F., Ganes D., Barditch-Crovo P. A., Petty B. G., Baron P. A., Armstrong D.: *Relationship between plasma concentrations of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials*. J. Infect. Dis. 170, 1394 (1994).
 - 6 Grierson J. R., Shields A. F.: *Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine: [18F]FLT for imaging of cellular proliferation in vivo*. Nucl. Med. and Biol. 27, 143 (2000).
 - 7 Salskov A., Tammisetti V. S., Grierson J., Vesselle H.: *FLT: measuring tumor cell proliferation in vivo with positron emission tomography and 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine*. Semin. Nucl. Med. 37, 429 (2007).
 - 8 Stahle L., Borg N.: *Transport of alovudine (3'-fluorothymidine) into the brain and the cerebrospinal fluid of the rat, studied by microdialysis*. Life Sci. 66, 1805 (2000).
 - 9 Jacobs A. H., Thomas A., Kracht L. W.: *18F-fluoro-L-thymidine and 11C-methylmethionine as markers of increased transport and proliferation in brain tumors*. J. Nucl. Med. 46, 1948 (2005).
 - 10 Ferdová E., Ferda J., Baxa J., Tupý R., Mraček J., Topolčan O., Hes O.: *Assessment of grading in newly-diagnosed glioma using 18F-fluorothymidine PET/CT*. Anticancer Res. 35, 955 (2015).

11 Herrmann K., Wieder H. A., Buck A. K.: *Early response assessment using 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine-positron emission tomography in high-grade non-Hodgkin's lymphoma*. Clin. Cancer Res. 13, 3552 (2007).

12 Barthel H., Cleij M. C., Collingridge D. R., Hutchinson O. C., Osman S., He Q., Luthra S. K., Brady F., Price P. M., Aboagye E. O.: *3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography*. Cancer Res. 63, 3791 (2003).

13 Francis D. L., Visvikis D., Costa D. C.: *Potential impact of [18F]3'-deoxy-3'-fluorothymidine versus [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose in positron emission tomography for colorectal cancer*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30, 988 (2003).

14 Schwartz J. L., Tamura Y., Jordan R.: *Monitoring tumor cell proliferation by targeting DNA synthetic processes with thymidine and thymidine analogs*. J. Nucl. Med. 44, 2027 (2003).

15 Kong X. B., Zhu Q. Y., Vidal P. M.: *Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine*. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 808 (1992).

16 Toyohara J., Wakib A., Takamatsub S., Yonekurab Y., Magatac Y., Fujibayashi Y.: *Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [3H]thymidine and [3H]arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines*. Nucl. Med. and Biol. 29, 281 (2002).

17 SÚKL: SPC 3'-[¹⁸F] FLT, INJ.

18 Ståhle L., Guzenda E., Ljungdahl-Ståhle E.: *Pharmacokinetics and extracellular distribution to blood, brain, and muscle of alovudine (3'-fluorothymidine) and zidovudine in the rat studied by microdialysis*. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 6, 435 (1993).

19 Vesselle H., Grierson J., Peterson L. M., Muzi M., Mankoff D. A., Krohn K. A.: *18F-Fluorothymidine Radiation Dosimetry in Human PET Imaging Studies*. J. Nucl. Med. 44, 1482 (2003).

20 Hoh C. K., Hawkins R. A., Dahlbom M., Glasby J. A., Seeger L. L., Choi Y, Shiepers C. W., Huang S., Satyamurthy N., Barrio J. R., Phelps M. E.: *Whole Body Skeletal Imaging with [18F]Fluoride Ion and PET*. J. Comp. Tomogr. 17, 34 (1993).

21 Hatherly R., Brolin F., Oldner Å., Sundin A., Lundblad H., Maguire G. Q. Jr., Jonsson C., Jacobsson H., Noz M. E.: *Technical Requirements for Na18F-PET Bone Imaging of Patients Being Treated Using a Taylor Spatial Frame*. J. Nucl. Med. Technol. 42, 33 (2014).

22 SÚKL: SPC [18F]FLUORID SODNÝ.

23 Grant F. D., Fahey F. H., Packard A. B., Davis R. T., Alavi A., Treves S. T.: *Skeletal PET with 18F-fluoride: applying new technology to an old tracer*. J. Nucl. Med. 49, 68 (2008).

24 Weber D. A., Greenberg E. J., Dimich A.: *Kinetics of radionuclides used for bone studies*. J. Nucl. Med. 10, 8 (1969).

25 Whitford G. M.: *Intake and metabolism of fluoride*. Adv. Dent. Res. 8, 5 (1994).

26 Hyldstrup L., McNair P., Ring P., Henriksen O.: *Studies on diphosphonate kinetics. Part I: evaluation of plasma elimination curves during 24 h*. Eur. J. Nucl. Med. 12, 581 (1987).

27 Park-Holohan S. J., Blake G. M., Fogelman I.: *Quantitative studies of bone using 18Ffluoride and 99mTc-methylene diphosphonate: evaluation of renal and wholeblood kinetics*. Nucl. Med. Commun. 22, 1037 (2001).

28 Hosking D. J., Chamberlain M. J.: *Studies in man with 18 F*. Clin. Sci. 42, 153 (1972).

29 Blake G. M., Park-Holohan S. J., Cook G. J., Fogelman I.: *Quantitative studies of bone with the use of 18F-fluoride and 99mTc-methylene diphosphonate*. Semin. Nucl. Med. 31, 28 (2001).

30 Hawkins R. A., Choi Y., Huang S. C., Hoh C. K., Dahlbom M., Schiepers C., Satyamurthy N., Barrio J. R., Phelps M. E.: *Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET*. J. Nucl. Med. 33, 633 (1992).

31 Silveira M. B., Soares M. A., Valente E. S., Waquil S. S., Ferreira A. V., dos Santos R. G., da Silva J. B.: *Synthesis, quality control and dosimetry of the radiopharmaceutical ^{18}F -sodium fluoride produced at the Center for Development of Nuclear Technology – CDTN*. Braz. J. Pharm. Sci. 46, 563 (2010).

32 Garnett E. S., Firnau G., Nahmias C.: *Dopamine visualized in the basal ganglia of living man*. Nature 305, 137 (1983).

33 Gallagher C. L., Oakes T. R., Johnson S. C., Chung M. K., Holden J. E., Bendlin B. B., McLaren D. G., Xu G., Nickles R. J., Pyzalski R., DeJesus O., Brown W. D.: *Rate of 6 -[^{18}F]fluorodopa uptake decline in striatal subregions in Parkinson's disease*. Mov. Disord. 26, 614 (2011).

34 Sioka C., Fotopoulos A., Kyritsis A. P.: *Recent advances in PET imaging for evaluation of Parkinson's disease*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 37, 1594 (2010).

35 Becherer A., Karanikas G., Szabo M., Zetting G., Asenbaum S., Marosi C., Henk C., Wunderbaldinger P., Czech T., Wadsak W., Kletter K.: *Brain tumour imaging with PET: a comparison between [^{18}F]fluorodopa and [^{11}C]methionine*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30, 1561 (2003).

36 Becherer A., Szabo M., Karanikas G., Wunderbaldinger P., Angelberger P., Raderer M., Kurtaran A., Dudczak R., Kletter K.: *Imaging of advanced neuroendocrine tumors with (^{18}F)-FDOPA PET*. J. Nucl. Med. 45, 1161 (2004).

37 Balogova S., Talbot J. N., Nataf V.: *^{18}F -fluorodihydroxyphenylalanine vs other radiopharmaceuticals for imaging neuroendocrine tumours according to their type*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 40, 943 (2013).

38 Seibyl J. P., Chen W., Silverman D. H.: *3,4-dihydroxy-6- ^{18}F fluoro-L-phenylalanine positron emission tomography in patients with central motor disorders and in evaluation of brain and other tumors*. Semin. Nucl. Med. 37, 440 (2007).

39 Thobois S., Guillouet S., Broussolle E.: *Contributions of PET and SPECT to the understanding of the pathophysiology of Parkinson's disease*. Neurophysiol. Clin. 31, 321 (2001).

40Kjaer A., Knigge U.: *Use of radioactive substances in diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors*. Scand. J. Gastroenterol. 50, 740 (2015).

41 Sundin A., Garske U., Orlefors H.: *Nuclear imaging of neuroendocrine tumours*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 21, 69 (2007).

42 Kuik W. J., Kema I. P., Brouwers A. H., Zijlma R., Neumann K. D., Dierckx R. A., DiMagno S. G., Elsinga P. H.: *In vivo biodistribution of no-carrier-added 6-18F-fluoro-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (18F-DOPA), produced by a new nucleophilic substitution approach, compared with carrier-added 18F-DOPA, prepared by conventional electrophilic substitution*. J. Nucl. Med. 56, 106 (2015).

43 Melega W. P., Hoffman J. M., Luxen A., Nissenson C. H., Phelps M. E., Barrio J. R.: *The effects of carbidopa on the metabolism of 6-[18F]fluoro-L-dopa in rats, monkeys and humans*. Life Sci. 47, 149 (1990).

44 Ishikawa T., Dhawan V., Chaly T., Robeson W., Belakhlef A., Mandel F., Dahl R., Margouleff C., Eidelberg D.: *Fluorodopa positron emission tomography with an inhibitor of catechol-O-methyltransferase: effect of the plasma 3-O-methyldopa fraction on data analysis*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 16, 854 (1996).

45 Brown W. D., Oakes T. R., DeJesus O. T., Taylor M. D., Roberts A. D., Nickles R. J., Holden J. E.: *Fluorine-18-fluoro-L-DOPA dosimetry with carbidopa pretreatment*. J. Nucl. Med. 39, 1884 (1998).

46 Melega W. P., Grafton S. T., Huang S. C., Satyamurthy N., Phelps M. E., Barrio J. R.: *L-6-[18F]fluoro-dopa metabolism in monkeys and humans: biochemical parameters for the formulation of tracer kinetic models with positron emission tomography*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 11, 890 (1991).

47 Huang S. C., Yu D. C., Barrio J. R., Grafton S., Melega W. P., Hoffman J. M., Satyamurthy N., Mazziotta J. C., Phelps M. E.: *Kinetics and modeling of L-6-[18F]fluoro-dopa in human positron emission tomographic studies*. J. Cereb. Blood Flow Metab. **11**, 898 (1991).

48 Mejia A. A., Nakamura T., Itoh M., Hatazawa J., Ishiwata K., Ido T., Matsumoto M., Watabe H., Watanuki S., Seo S.: *Absorbed dose estimates in positron emission tomography studies based on the administration of 18F-labeled radiopharmaceuticals*. J. Radiat. Res. (Tokyo) **32**, 243 (1991).

49 Pacák J., Točík Z., Černý M.: *Synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*. J. Chem. Soc. D **2**, 77 (1969).

50 Ido T., Wan C. N., Casella V., Fowler J. S., Wolf A. P., Reivich M., Kuhl D. E.: *Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs F-18-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and C-14-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*. J. Label. Compd. Radiopharm. **14**, 175 (1978).

51 Kelloff G. J., Hoffman J. M., Johnson B.: *Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development*. Clin. Cancer. Res. **11**, 2785 (2005).

52 Schmidt G. P., Baur-Melnyk A., Haug A., Utschneider S., Becker C. R., Tiling R.: *Whole-body MRI at 1.5 T and 3 T compared with FDG-PET-CT for the detection of tumour recurrence in patients with colorectal cancer*. Eur. Radiol. **19**, 1366 (2009).

53 Laurent V., Trausch G., Bruot O., Olivier P., Felblinger J., Régenta D.: *Comparative study of two whole-body imaging techniques in the case of melanoma metastases: Advantages of multi-contrast MRI examination including a diffusion-weighted sequence in comparison with PET-CT*. Europ. J. Radiol. **75**, 376 (2010).

54 Pfannenbergl C., Aschoff P., Schanza S., Eschmann S. M., Plathow C., Eigentler T. K.: *Prospective comparison of 18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography and whole-body magnetic resonance imaging in staging of advanced malignant melanoma*. Europ. J. Cancer. **43**, 557 (2007).

55 Kubota R., Yamada S., Kubota K., Ishiwata K., Tamahashi N., Ido T.: *Intratumoral distribution of 18F-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography*. J. Nucl. Med. 33, 1972 (1992).

56 Bessell E. M., Foster A. B, Westwood J. H.: *The use of deoxyfluoro-D-glucopyranoses and related compounds in a study of yeast hexokinase specificity*. Biochem. J. 128, 199 (1972).

57 Oikonen V., Tolvanen T., Liukko K., Luoto P., Roivainen A.: http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/input_blood-to-plasma.html, zobrazeno 9.4.2016.

58 Szablewski L.: *Expression of glucose transporters in cancers*. Biochim. et Bioph. Acta 1835 164 (2013).

59 Gallagher B. M., Fowler J. S., Gutterson N. I., MacGregor R. R., Wan Ch., Wolf A. P.: *Metabolic Trapping as a Principle of Radiopharmaceutical Design: Some Factors Responsible for the Biodistribution of [¹⁸F] 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose*. J. Nucl. Med. 19 1154, (1978).

60 Bessell E. M., Thomas P.: *The effect of substitution at C-2 of D-glucose 6-phosphate on the rate of dehydrogenation by glucose 6-phosphate dehydrogenase (from yeast and from rat liver)*. Biochem. J. 131, 83 (1973).

61 Jones S. C., Alavi A., Christman D., Montanez I., Wolf A. P., Reivich M.: *The radiation dosimetry of 2 [¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose in man*. J. Nucl. Med. 23, 613 (1982).

62 Sharma P., Mukherjee A.: *Newer positron emission tomography radiopharmaceuticals for radiotherapy planning: an overview*. Ann. Transl. Med. 4, 53 (2016).

63 DeGrado T. R., Coleman R. E., Wang S., Baldwin S. W., Orr M. D., Robertson C. N., Polascik T. J., Price D. T.: *Synthesis and evaluation of 18F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: initial findings in prostate cancer*. Cancer Res. 61, 110 (2001).

64 Kubota K., Furumoto S., Iwata R., Fukuda H., Kawamura K., Ishiwata K.: *Comparison of 18F-fluoromethylcholine and 2-deoxy-d-glucose in the distribution of tumor and inflammation*. Ann. Nucl. Med. 20, 527 (2006).

-
- 65 Matter C. M., Wyss M. T., Meier P., Späth N., von Lukowicz T., Lohmann C.: *18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 584 (2006).
- 66 Ackerstaff E., Glunde K., Bhujwala Z. M.: *Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells?* *J. Cell. Biochem.* 90, 525 (2003).
- 67 DeGrado T. R., Baldwin S. W., Wang S., Orr M. D., Liao R. P., Friedman H. S., Reiman R., Price D. T., Coleman R. E.: *Synthesis and evaluation of (18)F-labeled choline analogs as oncologic PET tracers*. *J. Nucl. Med.* 42, 1805 (2001).
- 68 Hara T., Kondo T., Kosaka N.: *Use of 18F-choline and 11C-choline as contrast agents in positron emission tomography imaging-guided stereotactic biopsy sampling of gliomas*. *J. Neurosurg.* 99, 474 (2003).
- 69 Langsteger W., Balogova S., Huchet V., Beheshti M., Paycha F., Egrot C., Janetschek G., Loidl W., Nataf V., Kerrou K., Pascal O., Cussenot O., Talbot J. N.: *Fluorocholine (18F) and sodium fluoride (18F) PET/CT in the detection of prostate cancer: prospective comparison of diagnostic performance determined by masked reading*. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 55, 448 (2011).
- 70 Schwarzenböck S., Souvatzoglou M., Krause B. J.: *Choline PET and PET/CT in Primary Diagnosis and Staging of Prostate Cancer*. *Theranostics* 2, 318 (2012).
- 71 Michel V., Yuan Z., Ramsuvar S., Bakovic M.: *Choline transport for phospholipid synthesis*. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231, 490 (2006).
- 72 Podo F.: *Tumour phospholipid metabolism*. *NMR Biomed.* 12, 413 (1999).
- 73 Ackerstaff E., Pflug B. R., Nelson J. B., Bhujwala Z. M.: *Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells*. *Cancer Res.* 61, 3599 (2001).
- 74 DeGrado T. R., Reiman R. E., Price D. T., Wang S., Coleman R. E.: *Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry of 18F-Fluorocholine*. *J. Nucl. Med.* 43, 92 (2002).

75 Evangelista L., Guttilla A., Zattoni F., Muzzio P. C., Zattoni F.: *Utility of choline positron emission tomography/computed tomography for lymph node involvement identification in intermediate- to high-risk prostate cancer: a systematic literature review and meta-analysis.* Eur. Urol. 63, 1040 (2013).

76 Bissette G.: *Does Alzheimer's disease result from attempts at repair or protection after transient stress?* J. Alzheimers Dis. 18, 371 (2009).

77 Serdons K., Van Laere K., Janssen P., Kung H. F., Bormans G., Verbruggen A.: *Synthesis and evaluation of three 18F-labeled aminophenylbenzothiazoles as amyloid imaging agents.* J. Med. Chem. 52, 7090 (2009).

78 Wolk D. A., Grachev I. D., Buckley C., Kazi H., Grady M. S., Trojanowski J. Q., Hamilton R. H., Sherwin P., McLain R., Arnold S. E.: *Association between in vivo fluorine 18-labeled flutemetamol amyloid positron emission tomography imaging and in vivo cerebral cortical histopathology.* Arch. Neurol. 68, 1398 (2011).

79 Snellman A., Rokka J., Lopez-Picon F. R., Eskola O., Wilson I., Farrar G., Scheinin M., Solin O., Rinne J. O., Haaparanta-Solin M.: *Pharmacokinetics of [(18)F]flutemetamol in wild-type rodents and its binding to beta amyloid deposits in a mouse model of Alzheimer's disease.* Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 39, 1784 (2012).

80 Nelissen N., Van Laere K., Thurfjell L., Owenius R., Vandebulcke M., Koole M., Bormans G., Brooks D. J., Vandenberghe R.: *Phase 1 study of the Pittsburgh compound B derivative 18F-flutemetamol in healthy volunteers and patients with probable Alzheimer disease.* J. Nucl. Med. 50, 1251 (2009).

81 ---: [http://snmmi.files.cms-plus.com/F-18%20Flutemetamol%2009-01-2014%20\(2\).pdf](http://snmmi.files.cms-plus.com/F-18%20Flutemetamol%2009-01-2014%20(2).pdf)
Zobrazeno 9.4.2016.

82 Senda M., Brooks D. J., Farrar G., Somer E. J., Paterson C. L., Sasaki M., McParland B. J.: *The clinical safety, biodistribution and internal radiation dosimetry of flutemetamol (18F) injection in healthy Japanese adult volunteers.* Ann. Nucl. Med. 29, 627 (2015).

83 Koole M., Lewis D. M., Buckley C.: *Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of ¹⁸F-GE067: a radioligand for in vivo brain amyloid imaging*. J. Nucl. Med. 50, 818 (2009).

84 Senda M., Sasaki M., Yamane T., Shimizu K., Patt M., Barthel H., Sattler B., Nagasawa T., Schultze-Mosgau M., Aitoku Y., Dinkelborg L., Sabri O.: *Ethnic comparison of pharmacokinetics of (18)F-florbetaben, a PET tracer for beta-amyloid imaging, in healthy Caucasian and Japanese subjects*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 42, 89 (2015).

85 Sabri O., Seibyl J., Rowe Ch., Barthel H.: *Beta-amyloid imaging with florbetaben*. Clin. Transl. Imaging 3, 13 (2015).

86 SÚKL: *SPC Neuraceq 300 MBq/ml injekční roztok*.

87 Nilsson J. L. G.: *Chemical Aspect of Drug Interaction*. Pharma international 1, 1 (1971).

88 Wright J. D., Boudinot F. D., Ujhelyi M. R.: *Measurement and Analysis of Unbound Drug Concentrations*. Clin. Pharmacokinet. 30, 445 (1996).

89 Banker M. J., Clark T. H.: *Plasma/Serum Protein Binding Determinations*. Current Drug Metabolism 9, 854 (2008).

90 Schmidt S., Gonzalez D., Derendorf H.: *Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J. Pharm. Sci. 99, 1107 (2010).

91 Yamasaki K., Chuang V. T. G., Maruyama T., Otagiri M.: *Albumin-drug interaction and its clinical implication*. Biochimica et Biophysica Acta 1830, 5435 (2013).

92 Lambrinidis G., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A.: *In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 86, 27 (2015).

93 Kragh-Hansen U., Chuang V. T., Otagiri M.: *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin*. Biol. Pharm. Bull. 25, 695 (2002).

94 Wanwimolruk S., Birkett D. J., Brooks P. M.: *Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin*. Mol. Pharmacol. 24, 458 (1983).

95 Curry S.: *Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin*. Drug. Metab. Pharmacokinet. 24, 342 (2009).

96 Klotz I. M., Swaney J. B.: *Amino acid sequence adjoining the lone tryptophan of human serum albumin. A binding site of the protein*. Biochemistry 9, 2570 (1970).

97 Zsila F.: *Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model*. Mol. Pharm. 10, 1668 (2013).

98 Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P.: *Structural modifications of human albumin in diabetes*. Diabetes Metab. 38, 171 (2012).

99 Kragh-Hansen U.: *Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin*. Pharmacol. Rev. 33, 17 (1981).

100 Giron M. C.: *Radiopharmaceutical pharmacokinetics in animals: critical considerations*. Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 53, 359 (2009).

101 Azad M. A., Huang J. X., Cooper M. A., Roberts K. D., Thompson P. E., Nation R. L., Li J., Velkov T.: *Structure-activity relationships for the binding of polymyxins with human alpha-1-acid glycoprotein*. Biochem. Pharmacol. 84, 278 (2012).

102 Szakács G., Váradi A., Ozvegy-Laczka C., Sarkadi B.: *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discov. Today 13, 379 (2008).

103 Israili Z. H., Dayton P. G.: *Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs*. Drug Metab. Rev. 33, 161 (2001).

104 Fournier T., Medjoubi-N. N., Porquet D.: *Alpha-1-acid glycoprotein*. Biochim. Biophys. Acta. 1482, 157 (2000).

105 Dente L., Pizza M. G., Metspalu A., Cortese R.: *Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein*. EMBO J. 6, 2289 (1987).

106 Lau A. H., Gustavson L. E., Sperelakis R., Lam N. P., El-Shourbagy T., Qian J. X., Layden T.: *Pharmacokinetics and safety of tiagabine in subjects with various degrees of hepatic function*. *Epilepsia* 38, 445 (1997).

107 Nilsson L.B.: *The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs*. *Bioanalysis* 5, 3033 (2013).

108 Schinkel A. H., Wagenaar E., Mol C. A., van Deemter L.: *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pactivity of many drugs*. *J. Clin. Invest.* 97, 2517 (1996).

109 Bostrom E., Hammarlund-Udenaes M., Simonsson U. S.: *Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine*. *Anesthesiology* 108, 495 (2008).

110 Liu X., Wright M., Hop C. E.: *Rational use of plasma protein and tissue binding data in drug design*. *J. Med. Chem.* 57, 8238 (2014).

111 Vuignier K., Schappler J., Veuthey J. L., Carrupt P. A., Martel S.: *Drug-protein binding: a critical review of analytical tools*. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 53 (2010).

112 Cohen L. H., v knize *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*. (Yan Z., Caldwell G. W. ed.), kap. 8. Human Press, Totowa 2004.

113 Beaudry F., Coutu M., Brown N. K.: *Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model*. *Biomed. Chromatogr.* 16, 401 (1999).

114 Kristensen C. B., Gram L. F.: *Equilibrium dialysis for determination of protein binding or imipramine-evaluation of method*. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 50, 130 (1982).

115 Bowers W. F., Fulton S., Thompson J.: *Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction*. *Clin. Pharmacokinet.* 9, 49 (1984).

116 Lee K. J., Mower R., Hollenbeck T., Castelo J. Johnson J., Gordon P., Sinko P. J., Holme K., Lee Y. H.: *Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies*. Pharm. Res. 20, 1015 (2003).

117 Monique L. Howard, John J. H., Gerald R. Galluppi, Matthew A. McLean: *Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 13, 170 (2010).

118 Banker M. J., Clark T. H., Williams J. A.: *Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding*. J. Pharm. Sci. 92, 967 (2003).

119 Kurz H., Trunk H., Weitz B.: *Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration*. Arzneimittelforschung 27, 1373 (1977).

120 Whitlam J. B., Brown K. F.: *Ultrafiltration in serum protein binding determinations*. J. Pharm. Sci. 70, 146 (1981).

121 Spector R., Vernick R., Lorenzo A.V.: *Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus*. Biochem. Pharmacol. 22, 2486 (1973).

122 Mori S., Barth H. G. (Eds): *Size Exclusion Chromatography*. Springer Laboratory, Berlin 1999.

123 Hage D. S., Tweed S. A.: *Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions*. J. Chromatogr. B. 699, 499 (1997).

124 Hage D. S.: *High-Performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. J. Chromatogr. B. 758, 3 (2002).

125 Heegaard N. H., Nilsson S., Guzman N. A.: *Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments*. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 715, 29 (1998).

126 Oravcová J., Böhs B., Lindner W.: *Drug-protein binding sites. New trends in analytical and experimental methodology*. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. 677, 1 (1996).

127 Liu Y. C., Yang Z. Y., Du J., Yao X. J., Lei R. X., Zheng X. D., Liu J. N., Hu H. S., Li H.: *Study on the interactions of kaempferol and quercetin with intravenous immunoglobulin by fluorescence quenching, fourier transformation infrared spectroscopy and circular dichroism spectroscopy*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 56, 443 (2008).

128 ---: <http://cit.vfu.cz/statpotr/potr/teorie> Zobrazeno 9.11.2016.

129 ---: <http://ulb.upol.cz/praktikum/statistika4.pdf> Zobrazeno 9.11.2016.

130 Dostálek M.: *Farmakokinetika*, str. 100. Praha, Grada Publishing a.s. 2006.

131 Wakabayashi H., Werner R. A., Hayakawa N., Javadi M. S., Xinyu Ch., Ken H., Rowe S. P., Lapa C., Higuchi T.: *Initial Preclinical Evaluation of 18F-fluorodeoxysorbitol PET as a Novel Functional Renal Imaging Agent*. J. of Nucl. Med. 57, 1625 (2016).

132 Kristian A., Riss P., Qu H., Milde M., Schoultz B. W., Engebraaten O., Mælandsmo G., Malinen E.: *Positron emission tomography and pharmacokinetics of 2-[18F]-fluoroethyl choline for metabolic studies in breast cancer xenografts*. Acta Oncologica 53, 1086 (2014).