

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmakologie a toxikologie

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vazebnosti receptorově specifických peptidů na  
plazmatické bílkoviny

Mezidruhové srovnání vazebnosti somatostatinového analogu DOTA-  
TATE značeného  $^{90}\text{Y}$  a  $^{111}\text{In}$

Autor: David Gregor

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček, CSc.

Hradec Králové 2008

**NÁZEV:**

Studium vazebnosti receptorově specifických peptidů na plazmatické bílkoviny

**ABSTRAKT:**

Metodou rovnovážné dialýzy při 37°C byla studována vazebnost dvou receptorově specifických peptidů, a to 90Y-DOTA-TATE a 111In-DOTA-TATE, z hlediska mezidruhového srovnání. Tato vazebnost byla u zvolených živočišných druhů (člověk, potkan, králík, skot případně prase) rozdílná, přičemž vazebnost 90Y-DOTA-TATE byla vyšší než vazebnost 111In-DOTA-TATE.

**KLÍČOVÁ SLOVA:**

vazebnost na bílkoviny, radiofarmaka, rovnovážná dialýza, 90Y-DOTA-TATE, 111In-DOTA-TATE

**TITLE:**

Study of plasma protein binding of receptor-specific peptides

**SUMMARY:**

The binding ability of two receptor specific peptides namely <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE and <sup>111</sup>In-DOTA-TATE was studied in term of interspecies comparison by the method of equilibrium dialysis. This plasma protein binding was different for the chosen animal species (human, rat, rabbit, bovine eventually pork) whereas binding of <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE was higher than binding of <sup>111</sup>In-DOTA-TATE.

**KEYWORDS:**

Protein binding, radiopharmaceuticals, equilibrium dialysis, <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE, <sup>111</sup>In-DOTA-TATE

Poděkování : Rád bych poděkoval katedře farmakologie a toxikologie za umožnění vykonání mé diplomové práce.

Velké poděkování patří mému školiteli Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc., za odborné vedení, rady, spolupráci, o ochotu poradit a pomoci s jakýmkoliv problémem. Děkuji také všem pracovníkům katedry za ochotu a vstřícné jednání.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

16.května 2008

.....

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH</b> .....	6
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>4</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	9
4.1	Vazba léčiv .....	9
4.1.1	Vazba na erytrocyty .....	9
4.1.2	Vazba na tkáňové bílkoviny .....	10
4.1.3	Vazba na plazmatické bílkoviny .....	10
4.2	Plazmatické bílkoviny .....	10
4.2.1	Albumin .....	10
4.2.2	Globuliny .....	12
4.2.3	Kyselé $\alpha_1$ -glykoprotein (orosomukoid) .....	12
4.2.4	Lipoproteiny .....	12
4.3	Typy vazby léčiva na bílkoviny .....	14
4.4	Vlastnosti vazby na plazmatické bílkoviny .....	15
4.5	Metody stanovení vazebnosti léčiva na plazmatické bílkoviny .....	16
4.5.1	Rovnovážná dialýza .....	17
4.5.2	Ultrafiltrace .....	18
4.5.3	Mikrodialýza .....	19
4.5.4	Gelová filtrace .....	20
4.5.5	Vazba na albuminové mikrosféry .....	21
4.5.6	Cirkulární dichroismus .....	21
4.6	Radioaktivně značené peptidy .....	22
4.6.1	Somatostatin .....	23
4.6.2	ALFA– melanocyty stimulující hormon .....	26
4.6.3	Vasoaktivní intestinální peptid .....	26
4.6.4	Substance P .....	27
4.6.5	Cholecystokinin-B / Gastrin .....	27
4.6.6	Neurotensin .....	28
4.6.7	Bombesin .....	28
4.7	Radionuklidy používané v praxi .....	29
4.7.1	Radionuklidy používané pro zobrazování .....	29
4.7.2	Radionuklidy užívané v terapii .....	31
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	32
5.1	MATERIÁL .....	32
5.1.1	chemikálie .....	32
5.1.2	pomůcky .....	32
5.1.3	Radioaktivní materiál .....	32
5.1.4	Biologický materiál .....	33
5.1.5	přístrojové vybavení .....	33
5.2	metodika .....	34
5.2.1	příprava plazmy .....	34
5.2.2	postup stanovení vazebnosti peptidu na plazmatické bílkoviny metodou rovnovážné dialýzy .....	34
5.2.3	PoSTUP zpracování získaných hodnot .....	35

<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	37
6.1	mezidruhové srovnání vazebnosti $^{90}\text{Y}$ -dota-TATE na plazmatické bílkoviny .....	37
6.2	mezidruhové srovnání vazebnosti $^{111}\text{In}$ -dota-TATE na plazmatické bílkoviny.....	40
<b>7</b>	<b>DISKUZE</b> .....	43
	<b>ZÁVĚR</b> .....	44
	<b>LITERATURA</b> .....	45
	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	47

## 2 ÚVOD

Stanovení míry vaznosti léčiva na plazmatické bílkoviny je důležitým farmakokinetickým parametrem. Léčiva obvykle nebývají v organismu přítomna pouze ve volné formě. Většina léčiv je v organismu určitým podílem vázána. Vazba léčiv na bílkovinné struktury organismu samozřejmě ovlivňuje jejich další osud, zejména procesy distribuce, biotransformace a exkrece. Na bílkovinné struktury se léčiva vážou převážně vodíkovými, iontovými, případně polárními vazbami, přičemž typ vazby ovlivňuje pevnost vzniklého komplexu. Část léčiva, jenž je vázáno na bílkovinné struktury, nemůže prostupovat kapilární stěnou, a proto se farmakodynamický účinek projeví pouze u volné, nevázané, frakce. Nevázané léčivo pak představuje určité depo aplikovaného léčiva.

Vazba léčivo-bílkovina je reverzibilní a platí pro ni, že čím vyšší je afinita léčiva k dané bílkovině, tím více se léčivo váže, a čím je vazba pevnější, tím déle setrvává léčivo v organismu a má pomalejší nástup a dlouhodobější účinek (i když menší). Vytěsněním léčiva z komplexu s bílkovinou může dojít ke zvýšení koncentrace daného léčiva a projevům toxicity. To hraje významnou roli především u léčiv, která se velkou měrou váží na plazmatické bílkoviny a přitom mají malý distribuční objem.

V současné době je již známo množství především in vitro metod k určení míry vazebnosti a následně k možnému předvídání osudu léčiva po podání do živého organismu.

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy jsou důležitou skupinou léčiv používanou ke specifickému zobrazování nádorů a k terapii různých druhů nádorových onemocnění. K zástupcům těchto peptidů patří především klinicky nejužívanější analogy somatostatinu a další perspektivní peptidy jako jsou analogy cholecystokininu, gastrin, alfa melanocyty stimulující hormon, vasoaktivní intestinální peptid, neurotensin, bombesin a další.

Díky mezidruhovému srovnání vazebností můžeme částečně předvídat chování léčiva v lidském organismu na základě výsledků předklinických studií.



## 3 CÍL PRÁCE

Stanovit vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE a  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání, srovnat dosažené výsledky a zhodnotit přínos studia vazebnosti těchto látek na předpověď farmakokinetiky v lidském organismu.

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 VAZBA LÉČIV

Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny je většinou stanovována in vitro experimenty za fyziologického pH a teploty, je dynamická, reverzibilní a kompetitivní

#### 4.1.1 *VAZBA NA ERYTROCITY*

Na erythrocyty se vážou zejména bazická léčiva, jejichž vazba se uskutečňuje většinou na erythrocytární membráně, která nese za normálních podmínek negativní náboj (imipramin, chlorpromazin), případně léčiva pronikají do vnitřního prostředí erythrocytů (chinidin, propranolol). Záleží proto na ionizaci léčiva při pH krve a na jeho rozpustnosti v lipidech.

#### 4.1.2 VAZBA NA TKÁŇOVÉ BÍLKOVINY

Mnohá léčiva se rovněž vážou na bílkoviny cílových orgánů a při opakované aplikaci se zde kumulují, což může mít za následek rovněž toxický účinek. Pokles hladiny volného léčiva vyvolává uvolnění dalšího léčiva z komplexu s bílkovinou. Tento typ vazby má tedy depotní charakter, což znamená, že dochází k zadržování kvantitativně významného podílu léčiva podaného do organismu. Mezi léčiva, která se výrazně vážou na tkáňové bílkoviny, počítáme například léčiva ze skupiny antimalarik.

#### 4.1.3 VAZBA NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Plazmatické bílkoviny mohou být rozděleny podle afinity k ligandu na specifické a nespecifické. Mezi specifické patří např. vazebné proteiny pro vitamin D, pohlavní hormony, tyroxin nebo kortizon. Tyto proteiny mají k ligandu velmi vysokou afinitu a váží většinu ligandu v plazmě. Ostatní bílkoviny mají afinitu nižší, ale jejich koncentrace v plazmě jsou natolik vysoké, aby vážaly významné množství látky.

V plazmě se setkáváme s vazbou na tři základní typy proteinů : albumin, glykoproteiny (alpha1, 2, beta 1, 2, gama ) a globuliny. O vazbě rozhodují fyzikálně – chemické vlastnosti daného léčiva.<sup>[1,2]</sup>

## 4.2 PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

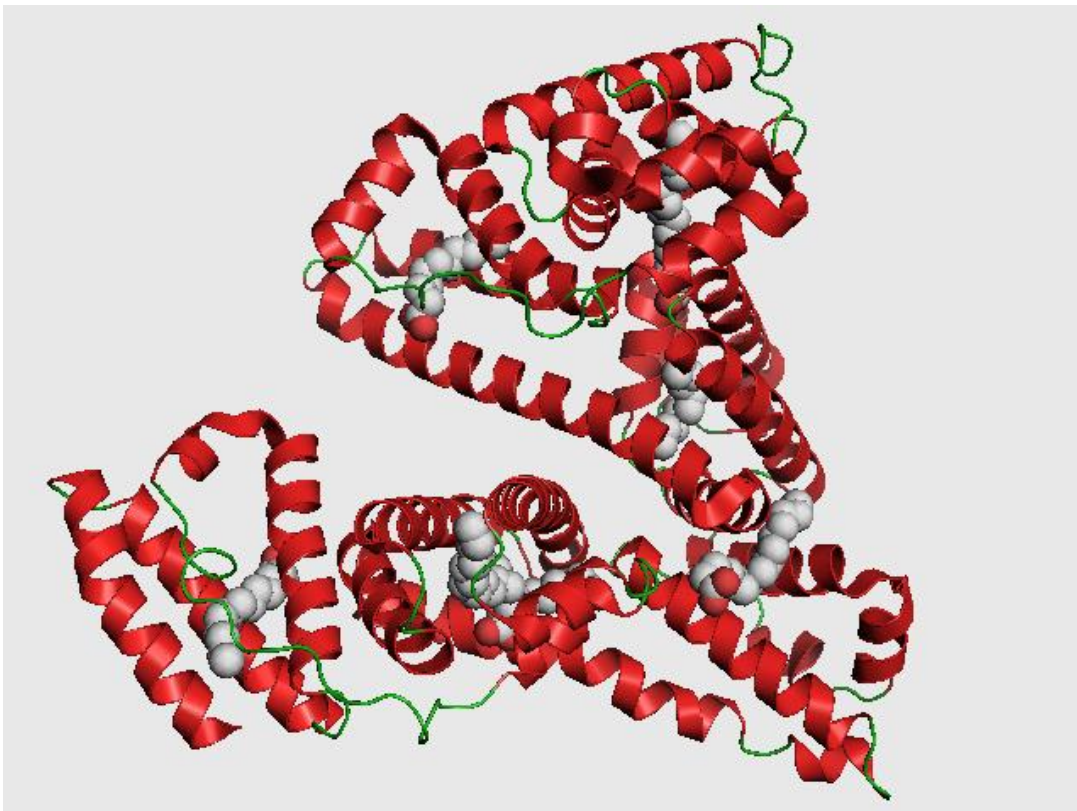
### 4.2.1 ALBUMIN

Hlavním proteinem plazmy je lidský albumin. Albumin je protein elipsoidního tvaru, tvořený jediným polypeptidovým řetězcem o 585 aminokyselinách. Obsahuje 17 disulfidových můstků a působením proteáz se štěpí na tři domény s rozdílnými funkcemi. Molekulární hmotnost je asi 69000 Da s katabolickým poločasem 17 až 18 dnů.

Hladina albuminu v plazmě je závislá na mnoha faktorech. Bývá ovlivněna těhotenstvím, pohlavím, věkem, etnickou příslušností jedince a též chemickými sloučeninami, která jsou na albumin vázány. Koncentrace albuminu v plazmě je asi 0,6mmol/l, což je 4g/100 ml. Protein je produkován v jaterních hepatocytech, které ho vytvoří zhruba 17 gramů za den. Zhruba 42% celkového tělního albuminu se nachází v plazmě, zbytek je ve tkáních, hlavně v podkoží a ve svalech. Nepatrné množství (120 – 300 mg/l) proniká přes hematoencefalickou bariéru do mozkomíšního moku.

Vytváří onkotický tlak (což je osmotický tlak bílkovin, kterým molekuly bílkovin vážou vodu) a udržuje tak stálou hladinu plazmatické vody. Kromě toho funguje také jako přenašeč některých látek, např. steroidních hormonů a hormonů štítné žlázy, bilirubinu, volných mastných kyselin a iontů.

Vážou se na něj léčiva typu slabých kyselin, aniony při pH plazmy. Mezi taková léčiva patří fenytoin, nesteroidní protizánětlivé látky, peniciliny, sulfonamidy a další. Lipofilní léčiva, neutrální při pH plazmy, jako je například cyklosporin A ,se vážou kromě albuminu též na lipoproteiny.<sup>[1,2,3,4,5,6]</sup>



Obrázek č. 1 : Trojrozměrná struktura lidského albuminu

#### 4.2.2 GLOBULINY

Poměrně široká skupina plazmatických bílkovin. Patří sem i lipoproteiny. Můžeme je rozdělit na  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , přičemž  $\alpha$  a  $\beta$  se ještě dále mohou dělit na frakce  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ . Globuliny mají dvojnásobnou molekulární hmotnost než albuminy (150 000).

Jsou významné pro obranu organismu, zvláště  $\gamma$ -globuliny (imunoglobuliny), jež se tvoří B-buňkami v lymfatických uzlinách. Rovněž na sebe vážou některé enzymy a hormony (hormony štítné žlázy).  $\alpha_1$ -globuliny jsou důležité pro transport tuků,  $\alpha_2$ -globuliny silně vážou měď a volný hemoglobin.  $\beta$ -globuliny mají význam pro transport železa a tuků, zejména cholesterolu.  $\gamma$ -globuliny se podílí především na obraně organismu.

Z léčiv se na globuliny váží např. kortikosteroidy nebo některá svalová myorelaxancia. Denně se vytvoří asi 5 gramů globulinů.<sup>[1,3,4]</sup>

#### 4.2.3 KYSELÝ $A_1$ -GLYKOPROTEIN (OROSOMUKOID)

Jedná se o bílkovinu s molekulovou hmotností 44100 Da, v krevní plazmě je přítomna v koncentraci 0,5 až 1,0 g/l. Plazmatická hladina kyselého glykoproteinu je velmi variabilní, estrogeny hladinu v plazmě snižují, z toho důvodu je jeho koncentrace vyšší u mužů než u žen (v těhotenství se ještě více snižuje). Ve fetální plazmě je jeho koncentrace mnohem nižší než v plazmě mateřské a též u novorozenců je jeho hladina přibližně třikrát nižší než u matky. Jeho hladina je zvyšována při fyzické zátěži.

Na kyselý glykoprotein se většinou vážou neutrální léčiva a léčiva typu slabých bazí, kationy při pH plazmy. Mezi taková léčiva patří chinidin, digitoxin, TCA, cyklosporin A, streptomycin, chloramfenikol a další.<sup>[1,4]</sup>

#### 4.2.4 LIPOPROTEINY

Lipoproteiny jsou nekovalentní komplexy lipidů s bílkoviny (s tzv. apolipoproteiny). Plasmové lipoproteiny vytvářejí kulovité, micelám podobné částice,

kteře obsahují nepolární jádro z triacylglycerolů a esterů cholesterolu. Toto jádro je obklopeno amfifilním obalem z proteinů, fosfolipidů a cholesterolu.

Podle obsahu lipidů, který přímo určuje jejich hustotu, dělíme krevní lipoproteiny na chylomikrony (obsah lipidů 99 %), lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (angl. **very low density lipoproteins**, VLDL, 93 %), lipoproteiny se střední hustotou (**intermediate density lipoproteins**, IDL, 89 %), lipoproteiny s nízkou hustotou (**low density lipoproteins**, LDL, 75 – 80 %) a lipoproteiny s vysokou hustotou (**high density lipoproteins**, HDL, 65 - 50 %).

Zajišťují transport a distribuci lipidů (triacylglycerolů vstřebávaných ve střevu, steroidních hormonů, vitaminů rozpustných v tucích, cholesterolu, fosfolipidů atd.). Asociace bazických léčiv s lipoproteiny byla prokázána například u chinidinu, tetracyklinu či u imipraminu. Doposud však není zcela jasné, zda jde u těchto léčiv o vazbu specifickou, nebo o prostě rozpouštění léčiva v hydrofóbní fázi, která je úměrná koncentraci léčiva v krevní plazmě.

**Chylomikrony**, jsou to částice tvořené v buňkách střevní sliznice z lipidů přijatých potravou. Transportují lipidy ze střeva do periferních tkání.

**VLDL**, lipoproteiny o velmi nízké hustotě jsou tvořeny v játrech a také slouží k transportu lipidů ze střeva do periferie.

**IDL** jsou to intermediární částice, které vznikají v krevním oběhu z VLDL

**LDL**, lipoproteiny o nízké hustotě transportují cholesterol z IDL do jater a periferních tkání, LDL je také aterogenní faktor (tzv. špatný cholesterol)

**HDL**, lipoproteiny o vysoké hustotě transportují cholesterol z periferie do jater (tzv. hodný cholesterol).<sup>[1,2,3,4]</sup>

Na hladinu plazmatických bílkovin může mít vliv celá řada faktorů. Při snížení této hladiny může docházet ke zvýšení koncentrace volného léčiva a tím pádem ke zvýšení jak farmakologického účinku tak případně i toxického. Nižší hladina albuminu je zcela fyziologická u žen v těhotenství, u malých dětí i u starších lidí. Může být ovšem způsobena také nemocemi jater, ledvin, GIT, diabetem a dalšími onemocněními, případně alkoholismem. Stejně tak jsou podobnými stavy a nemocemi ovlivněny i ostatní plazmatické bílkoviny.<sup>[1]</sup>

### 4.3 TYPY VAZBY LÉČIVA NA BÍLKOVINY

Léčiva se mohou vázat na bílkoviny různými typy vazeb. Mezi ně patří především iontová, vodíková a hydrofobní vazba. Tyto typy se od sebe liší především vazebnou energií, která představuje sílu vazby mezi bílkovinou a léčivem. Všechny níže uvedené vazby jsou ovšem poměrně slabé a proto, aby byla vazba dostatečně pevná, je výsledná vazebná energie kombinací mnoha takových interakcí případně kombinací několika typů sil.

Van der Waalsovy síly - slabý typ vazby, který charakterizuje nespécifická přitažlivost mezi nenabitými molekulami nebo částmi molekul; například přitahování dvou methylových skupin, jedné z bílkoviny a druhé z léčiva

Hydrofobní vazba - opět poměrně slabý typ vazby. Může vzniknout mezi dvěma aromatickými cykly, pokud se přiblíží k sobě a vyvolají přeskupení okolní vody a interakci mezi  $\pi$ -elektrony cyklů. Stejně slabá vazba může vzniknout mezi dvěma jednoduchými alkylovými řetězci

Vodíkové můstky - se vytváří mezi vodíky polárních skupin ( $-OH$ ,  $-NH_2$ ) a atomy s volným elektronovým párem (kyslík, dusík). Jako příklad lze uvést vodíkový můstek mezi hydroxylovou skupinou tyrosinu v bílkovině a karbonylovou skupinou léčiva. Bílkoviny mají velké množství možných míst pro vznik vodíkových můstků a právě proto je tento typ vazby při interakci léčivo – bílkoviny důležitý.

Iontová vazba - je nejsilnější z uvedených typů vazeb. Negativně nabitě karboxylátové ionty ( $-COO^-$ ) a pozitivně nabitě amoniové ionty ( $-NH_3^+$ ) jsou v bílkovině vázány elektrostatickými silami k opačně nabitým skupinám léčiva. Pro mnoho léčiv je tento typ vazby nejdůležitější.<sup>[6]</sup>

## 4.4 VLASTNOSTI VAZBY NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Na vlastnosti vazby léčiva na plazmatické bílkoviny má vliv řada faktorů nejen druh léčiva (jeho fyzikálně-chemické vlastnosti) a druh plazmatické bílkoviny. Léčivo L vstupuje do reakce s plazmatickým proteinem P za vzniku komplexu protein léčivo LP s rychlostní konstantou K1. Komplex léčivo-protein však není ireverzibilní a jeho rozpad charakterizuje rychlostní konstanta K2.

Celý proces vazby léčiva na plazmatické bílkoviny charakterizuje asociační konstanta Ka, která je rovná

$$K_a = \frac{[LP]}{[L] \cdot [P]} = \frac{K_1}{K_2}$$

Jestliže asociační konstanta popisuje proces vazby léčiva na plazmatické bílkoviny, disociační konstanta (Kd) charakterizuje proces uvolňování léčiva z vazby na ně.

$$K_d = \frac{[L] \cdot [P]}{[LP]} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{1}{K_a}$$

Celkové množství navázaného léčiva, jenž bude navázáno na plazmatické proteiny, se vypočítá ze vztahu, kde n je počet vazebných míst pro léčivo na plazmatických bílkovinách:

$$\frac{[LP]}{[L]} = n \cdot K_a \cdot \frac{[L]}{1} + K_a \cdot [L]$$

$$\frac{[LP]}{[L]} = n \cdot \frac{[L]}{K_d} + [L]$$

U léčiv, která na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jsou vázána pouze slabě ( $K_a = 10^4$ ), jsou změny ve vazbě v podstatě závislé pouze na změně v koncentraci proteinu.

Léčiva s intermediární vazebnou afinitou ( $K_a = 10^5$ ) vykazují změnu podílu vázaného léčiva, jež je závislá jak na koncentraci proteinu, tak samotného léčiva.

U léčiv, jejichž vazebná afinita je významná ( $K_a = 10^7$ ), ani podstatné změny v koncentraci proteinů nemají významný vliv na podíl vázaného léčiva. Podstatné změny ve vazbě se projevují teprve při velmi nízkých koncentracích proteinu.

## Distribuční objem

Distribuční objem vyjadřuje vztah množství radiofarmaka v organismu k jeho plazmatické koncentraci. Znamená objem tekutiny, ve kterém by se léčivo muselo rozpustit, aby dosáhlo stejné koncentrace jako v plazmě. Distribuční objem nepředstavuje objem reálný, jedná se o objem hypotetický. Distribuční objem léčiva ( $V_d$ ) se tak bude rovnat poměru množství podaného léčiva do organismu a jeho plazmatické koncentraci v čase  $t$ .

$$V_d = \frac{D}{C_0} ,$$

Kde dávka  $D$  je známá hodnota a koncentrace léčiva  $C_0$  je koncentrace léčiva v plazmě.

Distribuční objem je často vyjadřován v litrech na kilogram či v litrech vztažených na 70 kg jedince. Pokud má léčivo distribuční objem do 5 l/kg, zůstává pouze v plazmě. Pokud má distribuční objem 5-20 l/kg, distribuuje se do extracelulárního prostoru, pokud má distribuční objem 20-40 l/kg, distribuuje se do všech tělních tekutin, a pokud má více než 40 l/kg, deponuje se v periferních tkáních.<sup>[1]</sup>

## **4.5 METODY STANOVENÍ VAZEBNOSTI LÉČIVA NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY**

Přesné stanovení především koncentrace volného léčiva je důležité pro různé stránky farmakokinetiky a monitorování terapeutických hladin léčiv. Má se totiž za to, že pouze volné léčivo je schopno přechodu do tkání a interakce s receptorem. Mezi metody umožňujícími oddělit volnou frakci léčiva od vázané patří rovnovážná dialýza, ultrafiltrace, mikrodialýza, gelová filtrace, vazba na albuminové mikrosféry, cirkulární dichroismus a další. Každá z metod má své výhody a nevýhody a záleží především na cíli dané studie a vlastnostech použitých látek. Některé z metod jsou používány pouze zřídka.



#### 4.5.1 ROVNOVÁŽNÁ DIALÝZA

Rovnovážná dialýza je nejužívanější metodou stanovení vazebnosti léčiv na bílkoviny. Používá se při ní dialyzační komůrky, která je semipermeabilní membránou rozdělena na dvě části. Membránou mohou procházet pouze nízkomolekulární látky, zatímco pro proteiny je membrána neprostupná. Membrány jsou dostupné s různými velikostmi pórů a její výběr by měl být proveden podle molekulových hmotností zkoumaných látek a bílkovin.

Plazma a pufr jsou umístěny v komůrce odděleny od sebe dialyzační membránou. Soustava je inkubována většinou při fyziologické teplotě 37°C do ustavení rovnováhy. Čas potřebný k ustavení rovnováhy se může lišit. Proto by měl být určen pokusem ještě před vlastním měřením. Je ovlivněn především poměrem mezi povrchem a objemem komůrky. Při větším poměru povrchu membrány k objemu komůrky je rovnováha ustanovena rychleji. Zkrácení času lze dále dosáhnout otáčením nebo třepáním komůrky.

Dále, aby byla metoda spolehlivá, musí být koncentrace léčiva v plazmě a pufru v rovnováze.

K získání věrohodných výsledků by také mělo být upraveno pH plazmy na fyziologickou hodnotu 7,4, protože vazebnost může být na pH závislá. Složení pufru, co do obsahu iontů, také většinou neodpovídá fyziologickým hodnotám v plazmě. To může opět ovlivnit vazebnost na plazmatické bílkoviny. Jednou z možností jak těmto problémům předejít by bylo použít plazmatickou vodu získanou zfiltrováním plazmy. Bohužel to by vyžadovalo mít k dispozici velké objemy plazmy.

Kvůli osmotickému tlaku plazmatických bílkovin může také docházet k přestupu tekutiny z komůrky s pufrém do komůrky s plazmou. To vede k naředění bílkovin. Abychom tomu zabránili, můžeme přidat dextran ke zlepšení isotonicity pufru.

Po ustavení rovnováhy se odebere tekutina z obou komůrek a stanoví se koncentrace léčiva. Koncentrace léčiva v komůrce s plazmou je považována za celkovou koncentraci léčiva ( $C_T$ ). Ta je složena z koncentrace volného léčiva ( $C_U$ ) z komůrky s pufrém a koncentrace vázaného léčiva ( $C_B$ ), kterou lze spočítat z rozdílu celkové koncentrace a koncentrace volného léčiva.

$$C_B = C_T - C_U$$

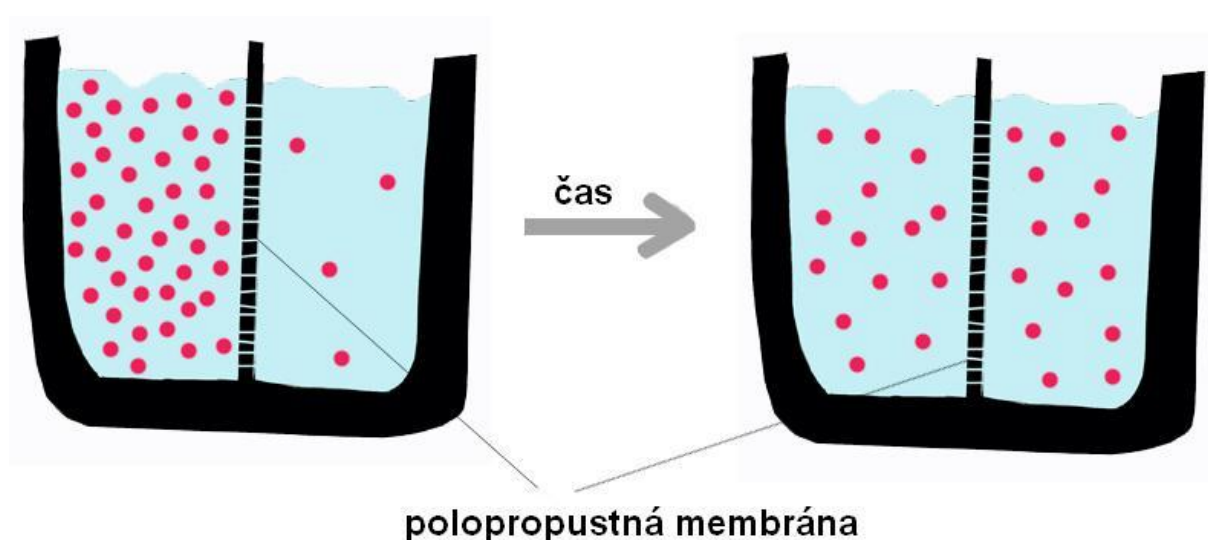
Volnou a vázanou frakci léčiva lze vypočítat pomocí těchto vzorců.

$$F_B = \frac{C_B}{C_T}$$

$$F_U = \frac{C_U}{C_T}$$

Výhody RD : lze jednoduše kontrolovat teplotu, dialyzační aparáty jsou komerčně dostupné, široké rozšíření v praxi.

Nevýhody RD : čas potřebný k dosažení rovnováhy, štěpení nestabilních bílkovin, možnost navázání léčiva na membránu nebo dialyzační komůrku, zředění plazmatických bílkovin.<sup>[7,8]</sup>



Obrázek č. 2 : Dialýza přes semipermeabilní membránu

#### 4.5.2 ULTRAFILTRACE

Význam této metody postupně stoupal v minulých několika letech a dnes se například běžně používá v klinických laboratořích pro měření koncentrace nevázaného fenytoinu u pacientů. Při ultrafiltraci se plazma s léčivem umístí do ultrafiltrační jednotky. Ta je složena ze dvou částí oddělených filtrem. Filtr podobně jako u RD umožňuje přechod plazmatické vody a nízkomolekulárních látek. Oproti tomu větší molekuly jako plazmatické bílkoviny jsou zadrženy. K přechodu tekutiny

přes filtr je využíván buď negativní (centrifugace) nebo pozitivní tlak ( pomocí plynného dusíku nebo stříkačky).

Po zfiltrování vzorku plazmy se v druhé části jednotky objevuje ultrafiltrát, ve kterém se předpokládá koncentrace volného léčiva  $C_U$ . Neprošlá tekutina představuje celkovou koncentraci léčiva  $C_T$ . Koncentrace vázaného léčiva se poté dá jednoduše vypočítat pomocí stejného vztahu jako u RD.

Výhody UF: rychlost, účinnost, technologická jednoduchost, finanční nenáročnost, široké rozšíření v praxi, podstatnou výhodou je, že není potřeba užít nefyziologický pufr.

Nevýhody UF : v průběhu filtrace dochází ke zvyšování koncentrace bílkovin v plazmě. Proto by měl být odebírán pouze malý objem ultrafiltrátu ( 10 -15 % ), aby nebyla příliš ovlivněna koncentrace bílkovin v plazmě. V takto malých objemech však může být koncentrace léčiva pod dolní hranicí stanovitelnosti analytické metody. U některých látek naopak koncentrace volného léčiva zůstává stejná i při zakonzentrování bílkovin v plazmě, proto lze v některých případech odebrat až 20 – 40 % ultrafiltrátu. Může také docházet k poklesu celkové koncentrace léčiva přechodem léčiva do ultrafiltrátu. V tomto případě pak  $C_T$  vypočítáme z průměru hodnot před a po filtraci. Další nevýhodou je nemožnost řízení teploty.<sup>[7,8]</sup>

#### 4.5.3 MIKRODIALÝZA

Je v současnosti nejvíce se rozvíjející metodou. Jako jediná umožňuje in vivo stanovení volné koncentrace léčiva v plazmě, tkáních nebo v jiných tělních tekutinách jako je např. mozkomíšní mok.

Mikrodialyzační sonda obsahující dialyzační membránu je chirurgicky implantována do krevního řečiště, prostoru s tekutinou nebo prostoru tkáně. Pufr je pomalu pumpován skrz sondu a volné léčivo z krve nebo tělní tekutiny přestupuje přes membránu do sondy na základě koncentračního gradientu. Dialyzát je po určité době odebrán a analyzován.

Pomocí této metody měříme pouze volnou koncentraci léčiva, nezískáme žádné informace o celkové nebo vázané koncentraci léčiva. Abychom mohli určit celkovou koncentraci, musí být vzorky odebrány a analyzovány odděleně.  $C_B$  může být vypočítána jako rozdíl celkové koncentrace a koncentrace volného léčiva.

Výhody MD : může být použita ke stanovení in vivo, měření průniku léčiv do specifických orgánů ,tekutin a tkání.

Nevýhody MD : dialyzační sonda musí po celou dobu trvání pokusu zůstat vložena v krevním řečišti, tkáni nebo tekutině, koncentrace léčiva závisí na délce intervalu sběru, vzhledem k malým objemům dialyzačního pufru je potřeba použít vysoce citlivé analytické metody.<sup>[7,8]</sup>



Obrázek č. 3 : Dialyzační sonda

#### 4.5.4 GELOVÁ FILTRACE

Jedná se o chromatografickou metodu založenou na dělení látek na základě různé velikosti molekul. Podstatou je chromatografická kolona naplněná gelem (Sephadex). Gel tvoří zesítěný polymer s různou velikostí pórů. Velikost pórů je charakteristická pro určitý druh gelu a představuje jeho dělicí schopnosti. Pokud na kolonu nanese směs látek s různými molekulovými schopnostmi dojde k následujícímu. Vysokomolekulární látky nemohou pronikat póry gelu a proto gel pouze obtékají a jsou poměrně rychle eluovány mobilní fází. Oproti tomu látky nízkomolekulární pronikají póry dovnitř gelu a jsou rozptýleny uvnitř i vně, což značně prodlouží jejich průchod kolonou.

Výhody GF : lze provádět s malými vzorky plazmy, šetrnost – vhodné pro dělení nestálých látek biologického původu.

Nevýhody GF : složitost a časová náročnost.<sup>[7,8]</sup>

#### 4.5.5 VAZBA NA ALBUMINOVÉ MIKROSFÉRY

Tato metoda byla popsána v 70. letech Rollerim a Hegesippem. Mikrosféry jsou rozpuštěny v pufru a tato suspenze je přenesena do plastových stříkaček s porézním diskem na jejich dně. Po přidání léčiva se stříkačky nechají inkubovat, aby bylo dosaženo rovnováhy mezi volným léčivem a léčivem vázaným na mikrosféry. Volná frakce léčiva je získána protlačením suspenze přes porézní disk. Mikrosféry zůstávají ve stříkačce a přes disk neprojdou.

Výhody : jednoduchost, cenová nenáročnost

Nevýhody : nemožnost řízení teploty, pouze použití vazebnosti na albumin, omezená fyziologická důležitost.<sup>[7,8]</sup>

#### 4.5.6 CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS

Cirkulární dichroismus spočívá v měření změn absorpance nebo fluorescence Cottonova jevu molekul vázaných na vazebnou bílkovinu jako je albumin. Navázáním léčiva na albumin vzniká vnější Cottonův jev, který se projevuje změnou absorpance (rozdílem levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla) nebo fluorescence v normálním cirkulárním dichroickém spektru bílkoviny.

Výhody : rychlost provedení

Nevýhody : dosti drahé vybavení, nemožnost řízení teploty, omezená fyziologická důležitost.<sup>[7,8]</sup>

## **4.6 RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ PEPTIDY**

Peptidy jsou organické sloučeniny složené ze dvou a více aminokyselin spojených peptidovými vazbami. Peptidy jsou v podstatě základem proteinů a liší se pouze svojí velikostí. O peptidech mluvíme pokud jsou složené z méně jak 100 aminokyselinových zbytků a mají nižší molekulovou hmotnost než 10 000 Da. Peptidy jsou ve vodných roztocích disociovány a tvoří vnitřní soli. Jsou to polyelektrolyty, jejichž celkový náboj záleží na aminokyselinovém složení (různé postranní řetězce) a pH okolí.

Peptidy jsou látky s širokou škálou biologických účinků od hormonálních léčiv až k jedům hadů či muchomůrek. Proto našly použití jak v humánní a veterinární medicíně, tak v základním nebo aplikovaném výzkumu v oblastech biochemie, farmakologie a imunologie.

Radioaktivně značené peptidy jsou značené různými izotopy. Jejich účinek je specifický pro určité membránové receptory a proto se užívají v cílené diagnostice a terapii.

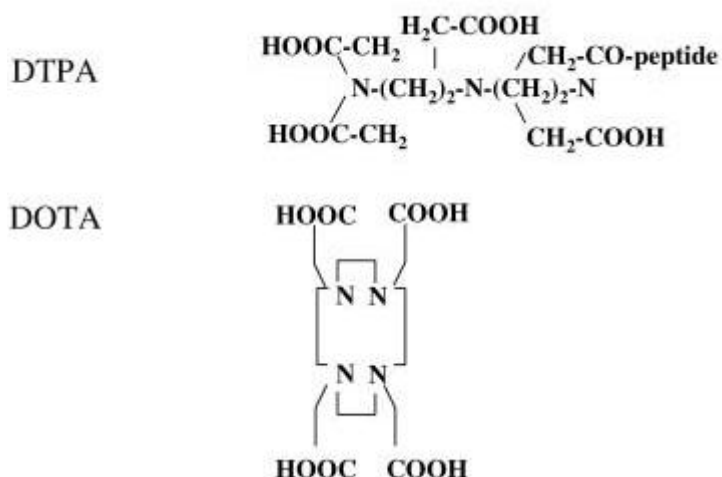
Jednou z nejdůležitějších vlastností pro použití v praxi je jejich odolnost proti enzymatické degradaci. Ke zvýšení odolnosti se dají použít například acetylace N-konce, cyklizace řetězce nebo záměna AMK za atypické AMK nebo za D-řadu.

Výhodami použití peptidů v praxi je jejich celkově rychlá farmakokinetika, nejsou imunogenní a váží se na konkrétní receptor s vysokou afinitou.

Peptidy mohou být značeny radionuklidy buď přímo nebo pomocí tzv. chelatačních činidel.<sup>[1,3,4]</sup>

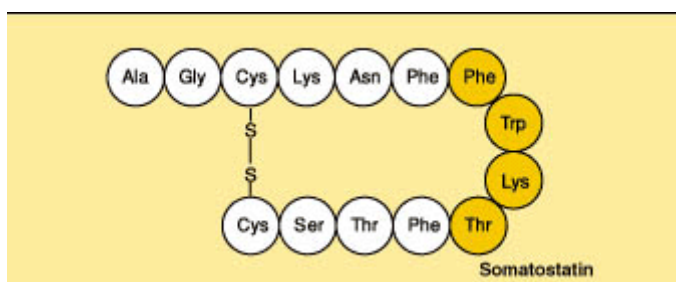
### Chelatační činidla

Slouží ke značení molekul peptidů, bílkovin nebo specifických protilátek radionuklidy. Při značení dochází nejprve k navázání chelatačního činidla k peptidu pomocí amidové vazby. Následně se vzniklý komplex označí vhodným radionuklidem. Mezi nejznámější činidla patří DOTA, DTPA, EDTA, TETA nebo DFO. DOTA (1,4,7,10-tetraazocyklohexadecan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina) má asi nejširší spektrum použití např. pro radionuklidy  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  a další. DTPA (diethylenetriaminpentaoctová kyselina) se používá především ke značení pomocí  $^{111}\text{In}$ . DFO (desferrioxamine-B) se využívá například pro značení  $^{68}\text{Ga}$ .



Obrázek č. 4 : Vzorče chelatačních činidel: DOTA, DTPA

#### 4.6.1 SOMATOSTATIN



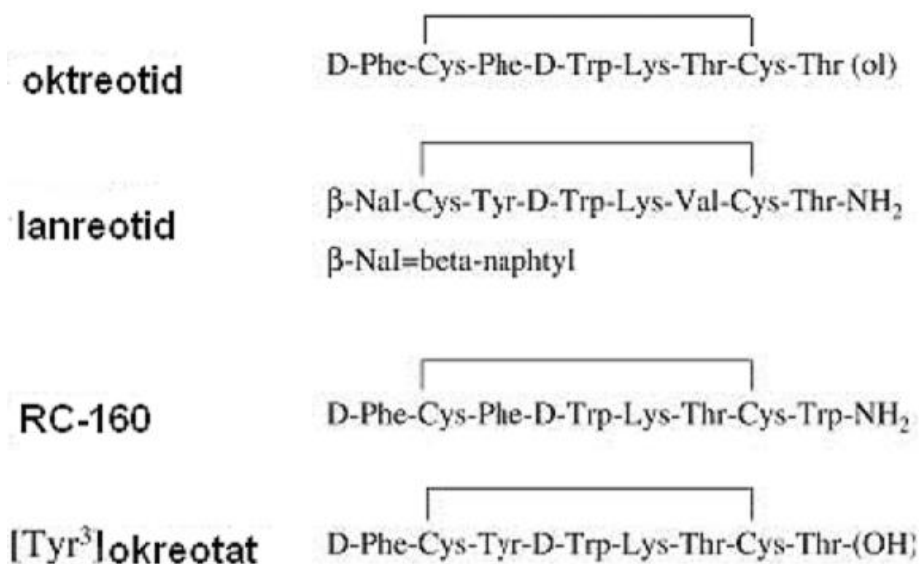
Obrázek č. 5 : Pořadí AMK ve struktuře somatostatinu

Somatostatin je cyklický tetradekapeptid (složený ze 14 aminokyselin) poprvé izolovaný z ovčího hypothalamu. Byly objeveny také jeho prekurzory např. pro-somatostatin(o velikosti 28 AMK). Je nejrozšířenějším z hormonů produkovaných hypothalamem. Vyskytuje se v CNS, kromě hypothalamu také v mozkové kůře a kmeni, i v periférii včetně slinivky, žaludku a střev. Má mnoho funkcí, především inhibičních. Inhibuje vylučování mnoha hormonů jako je růstový hormon, glukagon, insulin, gastrin, a další. Dále hraje roli i v imunitním systému a také funguje jako přenašeč v centrálním nervovém systému.

Všeobecný inhibiční účinek na vylučování hormonů mnoha žláz vedl k myšlence jeho možného přínosu a využití v léčbě nadprodukce hormonů způsobených hyperfunkcí žláz nebo endokrinně aktivními nádory.

V klinické praxi je však jeho použití velmi omezeno. Při podání ústy je stejně jako ostatní peptidy velice rychle rozložen a i po intravenózním podání je jeho plazmatický poločas kvůli masivní degradaci zhruba pouhé 3 minuty. Proto byly již od 80. let vyvíjeny jeho analogy s větší odolností proti štěpení.

Molekula somatostatinu byla měněna mnoha způsoby se snahou o zachování biologického účinku původní molekuly. Bylo nalezeno bioaktivní jádro a syntetizovány analogy o velikosti 8 aminokyselin jako je oktreotid (sandostatin), lanreotid (BIM23014) a vapreotid (RC-160).



Obrázek č. 6 : Vzorce analogů somatostatinu

Účinek somatostatinu je zprostředkován s G proteinem spřaženými receptory, složenými ze sedmi domén umístěných na obou stranách membrány. Extracelulární část odpovídá za navázání ligandů, intracelulární je zodpovědná za přenos signálu do buňky. In vivo a in vitro studie ukázaly, že SSTR se vyskytují na povrchu mnoha typů buněk včetně nádorových ve vysoké hustotě např. u nádorů gastrointestinálního traktu jako jsou karcinoid, inzulinom, gastrinom, malobuněčný karcinom plic, meningiom nebo karcinom štítné žlázy.



V současnosti je popsáno 5 různých typů SSTR. Byly pojmenovány, postupně podle toho jak byly objeveny, SSTR 1 – SSTR 5. Liší se vzájemným působením s prodlouženou formou neuropeptidu (somatostatin – 28) nebo jeho syntetickými deriváty a v jejich výskytu na povrchu buněk. Nejčastěji se u nádorů vyskytuje typ SSTR 2 (většina gastrointestinálních neuroendokrinních nádorů, dále karcinomy prsu a plic, lymfomy, neuroblastomy, meningeomy, adenomy hypofýzy atd.). Typ SSTR 1 se vyskytuje v sarkomech a karcinomech prostaty, kde ale může být přítomen i SSTR 5. SSTR 3 se vyskytuje hlavně u adenomu hypofýzy a SSTR 4 se na povrchu nádorů objevuje v malé míře. Oktreotid a jeho analogy mají vysokou afinitu k SSTR 2, zatímco vapreotid a lanreotid mají navíc i vysokou afinitu k SSTR 5.

Prvním široce klinicky používaným derivátem byl  $^{111}\text{In}$ -[DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-oktreotid (OctreoScan). Byl používán především pro scintigrafii ale vzhledem k tomu, že  $^{111}\text{In}$  emituje také Augerovy elektrony, se používal i pro terapii některých druhů nádorů. Je vylučován především ledvinami, což mělo pozitivní vliv na kvalitu zobrazování nádorů v oblasti břicha. Jedním z omezení je jeho průměrná afinita k SSTR 2 a minimální afinita k ostatním typům. Dále dosah jeho záření a průnik tkání je dosti malý a proto se pro terapii užívají spíše prvky emitující  $\beta$  záření jako  $^{90}\text{Y}$  nebo  $^{177}\text{Lu}$ . Pro ty je ovšem lepším chelatačním činidlem DOTA. Další nevýhodou je i nedostatečná energie záření a v neposlední řadě poměrně vysoká cena  $^{111}\text{In}$ . Pro zobrazení byl úspěšně použit např.  $^{111}\text{In}$ -DOTA-lanreotid.

Pro terapii bylo vyvinuto mnoho analogů za všechny např. [ $^{90}\text{Y}$ -(DOTA), Tyr<sup>3</sup>]oktreotid ( $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC), [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA]-lanreotide, a [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA, Tyr<sup>3</sup>]oktreotate.

My jsme pro naši experimentální práci použili  $^{90}\text{Y}$ -[DOTA-Tyr<sup>3</sup>]-oktreotid a  $^{111}\text{In}$ -[DOTA-Tyr<sup>3</sup>]-oktreotid, tedy ( $^{90}\text{Y}$ -,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE) které mají velmi výraznou afinitu k receptorům SSTR 2.

Nevýhodou zaměření se v terapii na analogy somatostatinu je to, že hlavní druhy nádorů na povrchu nevystavují receptory pro somatostatin. Proto byly metodami in vitro hledány jiné druhy receptorů vyjádřených na povrchu nádorů s cílem najít radiopeptidy pro cílené použití in vivo. Z těchto výzkumů vzešlo několik velmi důležitých zástupců jako jsou  $\alpha$  – melanocyty stimulující hormon, vasoaktivní intestinální peptid, substance P, cholecystokinin-B, gastrin, neurotensin a bombesin. Všechno to jsou regulační peptidy s různými funkcemi v gastrointestinálním traktu a

centrálním nervovém systému. Jejich funkce jsou zprostředkovány specifickými receptory spřaženými s G-proteiny.<sup>[9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22]</sup>

#### 4.6.2 ALFA–MELANOCYTY STIMULUJÍCÍ HORMON

$\alpha$  – melanocyty stimulující hormon ( $\alpha$  – MSH) je peptid složený ze 13 aminokyselin odvozený od propiomelanokortinu. Svou funkcí se uplatňuje v mozku, v periferních žlázách a částečně v kůži všech obratlovců, kde ovlivňuje formování pigmentu v epidermálních melanocytech. Stejně tak  $\alpha$  – MSH hraje hlavní roli v regulaci růstu buněk a funkce melanonů.

Bylo popsáno 5 podtypů receptorů pro melanokortin (MC-R) 1-5, ale pouze typ MC1-R je považován za důležitý pro kontrolu buněk melanomů. Přítomnost MSH receptorů s vysokou afinitou na myších a lidských melanomech byla potvrzena studii s MSH ligandy značenými [<sup>125</sup>I]. Analogy pro užití in vivo jsou spojené pomocí chelátů DTPA nebo DOTA většinou s indiem nebo jódem.<sup>[9]</sup>

#### 4.6.3 VASOAKTIVNÍ INTESTINÁLNÍ PEPTID

VIP je lineární peptid složený z 28 aminokyselin se širokým spektrem funkcí v rozdílných typech buněk. Ve vysoké koncentraci se vyskytuje v lidských plicích. Původně byl popsán jako vazodilatační substance s účinkem na plicní krevní tlak. Dále stimuluje sekreci celé řady hormonů. Je hlavním regulátorem sekrece vody a elektrolytů ve střevě a způsobuje proto průjem u pacientů, kteří trpí nádory produkujícími VIP. Je také známo, že propaguje růst jak normálních tak rakovinných buněk.

Všechny jeho účinky jsou zprostředkovány specifickým typem receptorů. Pomocí radioligandu [<sup>125</sup>I]-Tyr10]-VIP byly lokalizovány nejvíce na adenokarcinomech a karcinomech squamózních buněk. Ukázalo se, že je rozhodně nadřazen somatostatinu, neboť receptory pro něj byly nalezeny u všech nádorů prsu včetně metastáz, a stejně tak u karcinomů prostaty, močového měchýře, dělohy, tračníku a jícnu. Dále většina nádorů vaječníku, slinivky a glioblastomů exprimuje receptory VIP ve zvýšené míře a často také neuroendokrinní nádory jako pheochromocytom,

neuroblastom a adenom hypofýzy. Toto ukazuje na velký potenciál pro využití v zobrazovacích metodách, diagnóze i terapii.<sup>[9]</sup>

#### 4.6.4 *SUBSTANCE P*

Substance P je undekapeptid patřící do rodiny chemicky příbuzných peptidů, tachykininů. Je široce rozšířen v centrálním a periferním nervovém systému, kde účinkuje jako neurotransmitter a neuromodulátor. V cévním systému je potenciálním vazodilatátorem. Vyrůstá také počet důkazů ohledně jeho důležitosti v přenosu bolestivých podnětů a s nimi spojenou odpovědí.

Receptory byly nalezeny na nádorech gliových buněk, nádorech dřeně štítné žlázy a nádorech prsou. Obzvláště vysoký výskyt receptorů na glioblastomech dělá z SP receptorů zajímavý cíl pro radioterapii tohoto typu nádoru s extrémně špatnou prognózou. Jediným toho času syntetizovaným radioligandem je [111In-DTPA-Arg1]-SP. Je ovšem velmi rychle enzymaticky odbouráván a jeho účinný poločas v krvi je pouze 3 minuty.<sup>[9]</sup>

#### 4.6.5 *CHOLECYSTOKININ-B / GASTRIN*

Gastrin a cholecystokinin (CCK) jsou peptidy přítomné v mozku a GIT mající mnoho různých účinků. Gastrin je složen ze 17 aminokyselin. Vyvolává sekreci žaludeční kyseliny a pepsinogenu a ovlivňuje motilitu GIT. Uvolňování gastrinu brzdí HCl a jiné gastrointestinální hormony. Cholecystokinin se 33 aminokyselinovými zbytky se vylučuje dvanáctníkem. Vyvolává vyprázdnění žlučníku, sekreci trávicích enzymů a HCO<sub>3</sub> slinivkou břišní, ovlivňuje aktivitu gastrointestinální hladké svaloviny a pocit sytosti.

Tyto funkce jsou zprostředkovány dvěma druhy receptorů, CCK-B/gastrin a CCK-A. Vysoký počet receptorů typu CCK-B/gastrin byl nalezen u nádorů dřeně štítné žlázy, malobuněčného karcinomu plic, astrocytomu a nádorech vaječníku.<sup>[9]</sup>

#### 4.6.6 NEUROTENSIN

Neurotensin je peptid složený ze 13 aminokyselin. Nachází se v mozku a GIT a má regulační účinek na buňky tračníku a slinivky. Jako většina funguje v CNS jako neurotransmitter a neuromodulátor a v periférii lokálně jako hormon.

Receptory se vyskytují hlavně u exokrinních adenokarcinomů štítné žlázy. Byly syntetizovány stabilizované NT analogy značené  $^{123}\text{I}$  nebo  $^{111}\text{In}$  za pomoci DTPA. Analogy značené indiem ukázaly rychlejší odstranění z krve a těla močí zatímco analogy značené jódem byly odstraňovány játry.<sup>[9]</sup>

#### 4.6.7 BOMBESIN

Bombesin je tetradekapeptid původně izolovaný z kůže žáby rodu *Bombina bombina*. Patří do rodiny peptidů strukturně se podobajících oblastí decapeptidu na jejich C-konci. Peptidy podobné bombesinu byly později objeveny u savců. U člověka se peptidy podobné bombesinu nazývají gastrin uvolňující peptid (GRP), peptid o 27 aminokyselinách a decapeptid neuromedin B.

Tyto peptidy mají široké spektrum farmakologické aktivity včetně uvolňování určitých střevních hormonů, stimulace uvolňování gastrinu, vylučování žaludeční kyseliny. Dále se podílejí i na vzniku hypoglykémie a kontrakci hladkého svalstva. Předpokládá se, že GRP je růstovým faktorem malobuněčného karcinomu plic a také že podporuje růst buněk u nádorů prostaty. Jedny z prvních zkoumaných analogů byly [Lys3]-bombesin značený techneciem a [125I-Tyr4]-bombesin. Pozdějším analogem se slibnými vlastnostmi pro aplikaci v nukleární medicíně je [111In-DTPA-Pro1-Tyr4]-bombesin.<sup>[9]</sup>

## 4.7 RADIONUKLIDY POUŽÍVANÉ V PRAXI

### ALFA záření

Alfa-přeměny jsou charakteristické především pro těžší atomová jádra. Částice alfa jsou jádra helia  ${}^4_2\text{He}$ . Alfa záření je monoenergetické a jeho dosah v hmotě je velmi malý (řádově  $10^{-8}\text{m}$ ). Vzhledem k velikosti částic alfa záření jde o nejslabší druh jaderného záření, který může být odstíněn i listem papíru. K zástupcům patří např.  ${}^{213}\text{Bi}$  nebo  ${}^{211}\text{At}$ .

### BETA záření

Při přeměně  $\beta^-$  dochází v jádře k přeměně jednoho nukleonu z neutronového stavu na protonový stav za současné emise elektronu a antineutrína. Záření má dosah v tkáních v rozsahu pouze několika milimetrů a proto ho lze využít v terapii. Používají se např.  ${}^{90}\text{Y}$ ,  ${}^{67}\text{Cu}$ ,  ${}^{177}\text{Lu}$ ,  ${}^{188}\text{Re}$ .

Při přeměně  $\beta^+$  dochází k emisi pozitronů. Pozitronové zářiče jako je  ${}^{18}\text{F}$ ,  ${}^{15}\text{O}$ ,  ${}^{11}\text{C}$ ,  ${}^{13}\text{N}$  či  ${}^{68}\text{Ga}$  jsou perspektivní pro diagnostiku.

### GAMA záření

Záření gama je často definováno jako elektromagnetické záření o energii fotonů nad 10 keV. Záření gama je druh ionizujícího záření s vysokou pronikavostí. Proto se využívá pro diagnostiku. Hlavními zástupci jsou  ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  ${}^{111}\text{In}$ ,  ${}^{123}\text{I}$ ,  ${}^{67}\text{Ga}$

#### 4.7.1 *RADIONUKLIDY POUŽÍVANÉ PRO ZOBRAZOVÁNÍ*

##### ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$

Technecium-99m je nejdůležitějším radionuklidem v diagnostice. Asi 80 procent všech používaných radiofarmak je značeno právě jím. Důvodem jsou velmi dobré fyzikální charakteristiky a snadná dostupnost. Energie 140 keV a poločas 6 hodin je

ideální pro většinu použití. To je zejména výhodné pro malé peptidy, které velmi rychle přecházejí z krve na místo určení v tkáních. Poločas je dostatečně krátký, aby umožnil vystavení potřebným dávkám záření bez poškození pacienta a zároveň dovolil dobrou kvalitu snímkování. Tc je přitom snadno dostupné z  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generátoru ve vysoké kvalitě a za nízkou cenu. Produkt přeměny dceřiného radionuklidu není sice na rozdíl od většiny ostatních prvků připravených v generátorech stabilní, má však tak dlouhý poločas přeměny (212 000 roků), že se k jeho aktivitě nemusí přihlížet.

### $^{111}\text{In}$

In-111 se přeměňuje elektronovým záchytem. Má poločas 67,2 hodin a je připravován v cyklotronu ozařováním  $^{111}\text{Cd}$  protony  $\text{Cd}(p,n) ^{111}\text{In}$ . Vedle záření gama dochází k emisi záření rentgenového a Augerových elektronů. To není v praxi příliš výhodné, protože to zvyšuje radiační zátěž při vyšetření a Augerovy elektrony mohou poškodit DNA buněk v jejich blízkosti.

### $^{123}\text{I}$

I-123 je vhodný pro diagnostické metody in vivo. Je to čistý gama zářič s energií fotonů 160 keV a má poměrně krátký poločas 13 hodin. Je připravován v cyklotronu  $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$ . Přípravek je roztok pro perorální podávání a obsahuje radioaktivní jód ve formě jodidu sodného.

### $^{125}\text{I}$

I-125 je nejpoužívanějším radionuklidem ve vyšetřovacích metodách in vitro. Má typ přeměny elektronový záchyt, jeho poločas je poměrně dlouhý (60 dní) a je vyráběn jako roztok pro perorální podání.

### $^{67}\text{Ga}$

Ga-67 je připravováno v cyklotronu  $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$  s poločasem rozpadu 78 hodin. Typem přeměny je elektronový záchyt, energie jeho záření dosahuje hodnot od 93 keV až do 300 keV. Dochází také k emisi Augerových elektronů.

#### 4.7.2 RADIONUKLIDY UŽÍVANÉ V TERAPII

$^{90}\text{Y}$

Y-90 je částečný beta minus zářič s maximální energií elektronů 2,3 MeV a dosahem v tkáni pouze několik mm. Jeho poločas je 64 hodin a je připravován v generátoru ze Stroncía.

$^{131}\text{I}$

I-131 patří k nejvíce užívaným izotopům jodu v klinické praxi, zejména pro radioterapii. Je to smíšený gama a beta zářič, energie fotonů gama je 360 keV a jeho poločas je 8 dní. Připravuje se v jaderném reaktoru ozářením teluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu.

$^{177}\text{Lu}$

Lu-177 je částečný beta zářič s maximální energií 0,5 MeV s malým dosahem v tkáni asi 1mm. Je ale i částečný gama zářič, takže umožňuje zobrazování gama kamerou. Poločas je 160 hodin.

$^{32}\text{P}$

P-32 je čistý beta minus zářič s poločasem přeměny 14,3 dne a získává se v jaderném reaktoru ozařováním síry neutrony.

$^{68}\text{Ga}$

Ga-68 je beta+ zářič s poločasem 68 min. Připravuje se v generátoru z  $^{68}\text{Ge}$ .<sup>[9,10,15,16,23,24]</sup>

# 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5.1 MATERIÁL

### 5.1.1 CHEMIKÁLIE

Heparin Léčiva, injekční roztok, Heparinum natricum 5 000 IU v 1 ml injekčního roztoku

Isotonický fosfátový pufr pH 7,4 (1,82 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 19,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml roztoku)

Destilovaná voda

### 5.1.2 POMŮCKY

Dialyzační kotouč vlastní výroby

Injekční stříkačky 1 ml

Injekční jehly

Pipety

Laboratorní sklo

Měřicí lahvičky

Celofán

Eppendorfovy zkumavky

### 5.1.3 RADIOAKTIVNÍ MATERIÁL

$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-ocreatate

Značení provedeme přidáním 0,5 mCi  $^{90}\text{YCl}_3$  (Perkin Elmet Life Science, Brusel, Belgie) v 50-100  $\mu\text{l}$  40 mM HCl do 200  $\mu\text{l}$  0,4 M acetátového pufru o pH 5 s 0,24 M kyselinou gentisovou a 10 mg DOTA-Tyr<sup>3</sup>-ocreatate v 0,1% TFA. Roztok jsme promíchali a inkubovali při teplotě 90-95°C po dobu 25 minut. Kontrola kvality byla



poté provedena pomocí HPLC. Výsledná koncentrace peptidu v přípravku byla upravena na 1µg/ml.

#### <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-ocreatate

Značení provedeme přidáním 0,5 mCi <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (Amersham, United Kingdom) v 50-100 µl 40 mM HCl do 200 µl 0,4 M acetátového pufru o pH 5 s 0,24 M kyselinou gentisovou a 10 mg DOTA-Tyr<sup>3</sup>-ocreatate v 0,1% TFA. Roztok jsme promíchali a inkubovali při teplotě 90-95°C po dobu 25 minut. Kontrola kvality byla poté provedena pomocí HPLC. Výsledná koncentrace peptidu v přípravku byla upravena na 1µg/ml.

#### 5.1.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

lidská krev – heparinizovaná krev odebraná z vena mediata cubiti od zdravého dobrovolníka

potkaní krev – heparinizovaná krev odebraná z arteria carotis potkanů kmene Wistar

králičí krev – krev odebraná z arteria carotis zvířete plemene Český albín

hovězí krev – heparinizovaná krev získaná z LabMediaServis s.r.o.

vepřová krev – krev odebraná z aorty samic plemenné variace Large white a Landrace

#### 5.1.5 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Gama counter, Wallac, 1480 Wizard 3

Centriguga U-32R, Biotech

Termostat TCH 100, Laboratorní přístroje Praha

Otočné zařízení pro rovnovážnou dialýzu vlastní výroby

## 5.2 METODIKA

### 5.2.1 *PŘÍPRAVA PLAZMY*

Centrifugovali jsme odebranou krev při 5 500 otáčkách po dobu 5 minut. Plazmu jsme poté přelili do nových zkumavek, abychom v nich měli jen čistou tekutinu. Pokud plazma nebyla stále čirá, zcentrifugovali jsem ji ještě jednou případně ještě přefiltrovali. Plazmu jsme uchovávali v mrazícím boxu. Rozmrazili jsme ji vždy až bezprostředně před započítím vlastního pokusu. Na jeden pokus jsme potřebovali alespoň 2,5 ml plazmy od každého živočišného druhu.

Do připravené plazmy jsme přidali peptid tak, aby výsledná koncentrace peptidu byla 1 µg/ml. Zkumavku s plazmou jsme protřepali, aby došlo k promíchání obou složek a rovnoměrnému navázání peptidu.

### 5.2.2 *POSTUP STANOVENÍ VAZEBNOSTI PEPTIDU NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY METODOU ROVNOVÁŽNÉ DIALÝZY*

Připravili jsme si vzorky plazmy a pufru. Izotonický fosfátový pufr o pH 7,4 jsme připravili ze 2 dílů dihydrogenfosforečnanu draselného a osmi dílů dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu draselného. Potom jsme si odebrali 2,5 ml plazmy a přidali k nim 2,5 µl radioaktivně značeného peptidu. Vzorek měl tedy koncentraci 1 ng na 1 ml. Následným protřepáním ve skleněné zkumavce jsme se snažili docílit dokonalého promíchání.

Ke stanovení metodou rovnovážné dialýzy jsme použili dialyzační aparát. Ten byl tvořen dvěma plastovými kotouči, které k sobě byly připevněny pomocí 8 šroubů. Každý kotouč měl 8 mělkých otvorů o průměru asi 2 cm a ke každému z nich vedl z obvodové strany kotouče úzký kanálek. Otvory se po sestavení dialyzačního aparátu překryly a vytvořily dialyzační komůrky. Kotouče byly od sebe odděleny pomocí semipermeabilní membrány, která byla propustná pouze pro nízkomolekulární látky. Díky otvoru ve středu tohoto aparátu jsme poté celé zařízení upevnili na otočnou hřídel.

Při stanovení mezidruhové vazebnosti receptorově specifických peptidů jsme pro každý druh živočišné plazmy použili 4 dialyzační komůrky. Vždy jsme pomocí 1 ml injekční stříkačky a jehly odebrali 0,5 ml radioaktivně označené plazmy, a tu vstříkli kanálkem do předem popsaných komůrek. Museli jsme si dávat pozor, abychom při práci s jehlou nepropíchlí membránu. Kanálek jsme uzavřeli pryžovým uzávěrem. Pak jsme nabrali do nové stříkačky 0,5 ml fosfátového pufru a vstříkli ho do protilehlé komůrky. Kanálek jsme opět uzavřeli. Stejným způsobem se stejným pořadím jsme postupovali až do zaplnění všech komůrek celého kotouče. Ten jsme potom nasadili na otočnou hřídel a dali inkubovat na dobu 20 hodin při teplotě 37°C.

Po 20 hodinách jsme postupně odebrali vzorky pro měření ve stejném pořadí v jakém jsme komůrky plnili. Nejprve jsme odebrali vzorek plazmy a pak příslušný vzorek pufru. Vzorky jsme opatrně vstříkli pomocí 1 ml injekční stříkačky s jehlou do Eppendorfových zkumavek.

Pipetou jsme pak vždy z každého vzorku odebrali 100 µl tekutiny do plastové měřicí zkumavky se šroubovacím uzávěrem. Následně jsme všechny vzorky změřili na gama counteru. Do jedné měřicí lahvičky jsme ještě napipetovali 100 µl destilované vody, abychom případně zjistili zamoření gama counteru.

### 5.2.3 POSTUP ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH HODNOT

Pomocí gama counteru jsme zjistili hodnoty aktivit jednotlivých vzorků. Pro stanovení volné frakce jsme použili vztah:

$$f_v = \frac{\text{aktivita}_{\text{pufru}}}{\text{aktivita}_{\text{plazmy}}},$$

kde  $f_v$  je volná frakce peptidu.

Pak jsem vypočetli volnou frakci peptidu v procentech dle vzorce:

$$\% f_v = f_v * 100 ,$$

přičemž  $\% f_v$  je volná frakce peptidu vyjádřená v procentech.

A z tohoto procentuálního vyjádření pak vázanou frakci podle vztahu:

$$\% f_b = 100 - \% f_v ,$$

kde %  $f_b$  je vázaná frakce vyjádřená v procentech.

Ze všech měření u jednoho živočišného druhu jsme vypočítali aritmetický průměr a směrodatnou odchylku měření dle vzorců:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_1^n X_i ,$$

kde  $\bar{X}$  je aritmetický průměr,  $n$  je počet měření,  $X_i$  jsou výsledky jednotlivých měření.

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} ,$$

kde  $S_{\bar{X}}$  je směrodatná odchylka aritmetického průměru.

Statistické testování hodnot vazebností jsme provedli pomocí Studentova t-testu, abychom zjistili zda se hodnoty vazebností u různých živočišných druhů statisticky významně liší. Statistické hodnocení bylo prováděno se spolehlivostí 0,05.

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft® Office Excel 2003.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

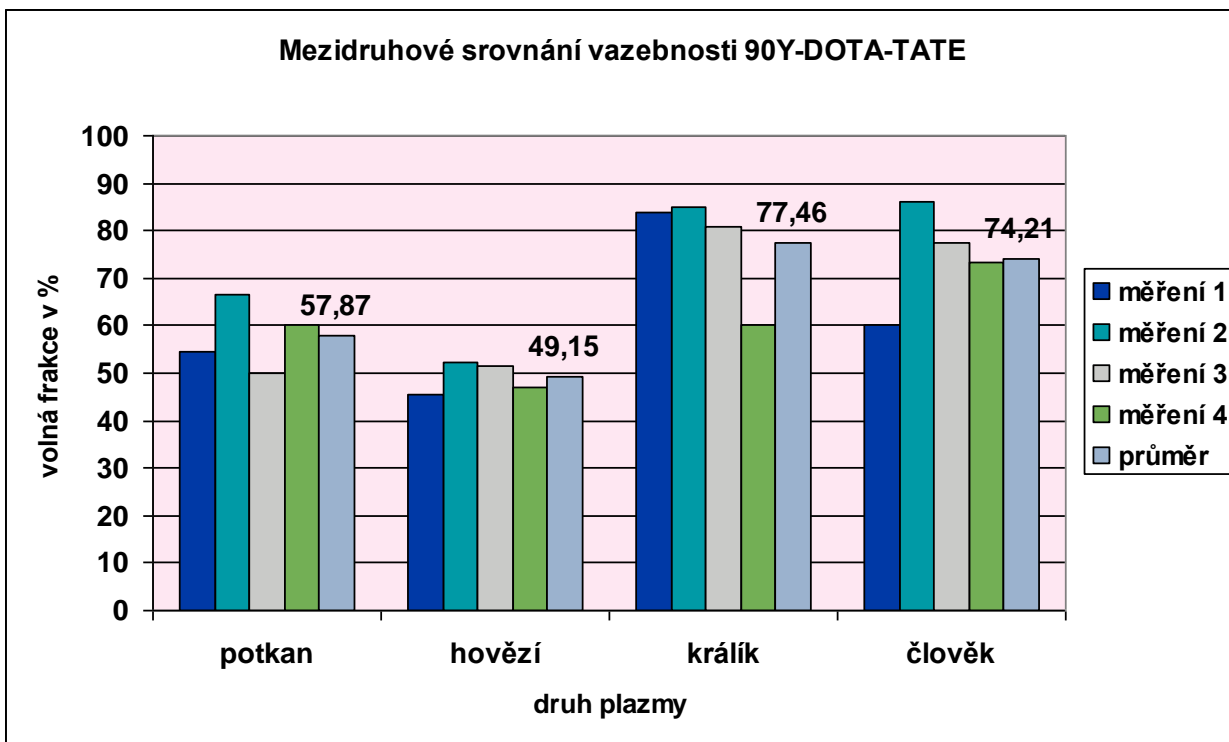
Mezidruhové srovnání vazebnosti je znázorněno v tabulce č.1 a grafu č. 2 a 3. Pro stanovení vazebnosti peptidu <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE na plazmatické bílkoviny jsme použili metodu rovnovážné dialýzy při 37°C a vzorky jsme inkubovali po dobu 20 hodin. Pro mezidruhové srovnání jsme použili plazmu lidskou, potkaní, králičí a hovězí.

V tabulce č.1 jsou vyobrazeny výsledky jednotlivých měření jako procentuální vyjádření volné frakce peptidu, průměr těchto hodnot a směrodatná odchylka. V grafu č.1 jsou graficky znázorněny hodnoty všech měření a v grafu č.2 pouze průměrné hodnoty u jednotlivých živočišných druhů.

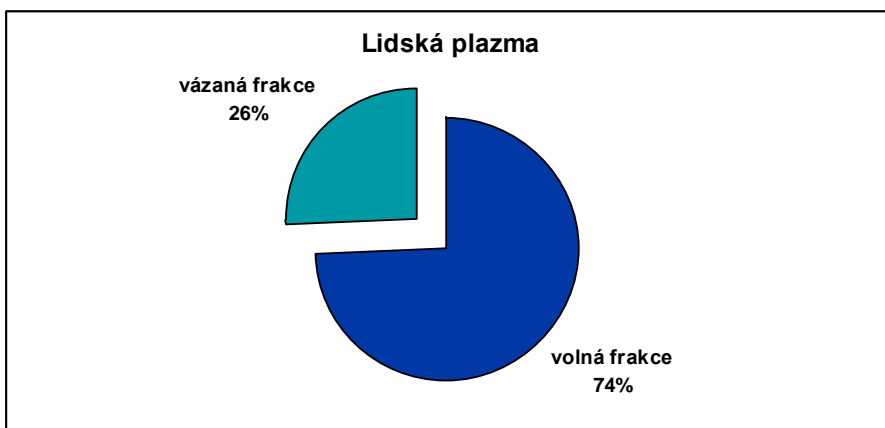
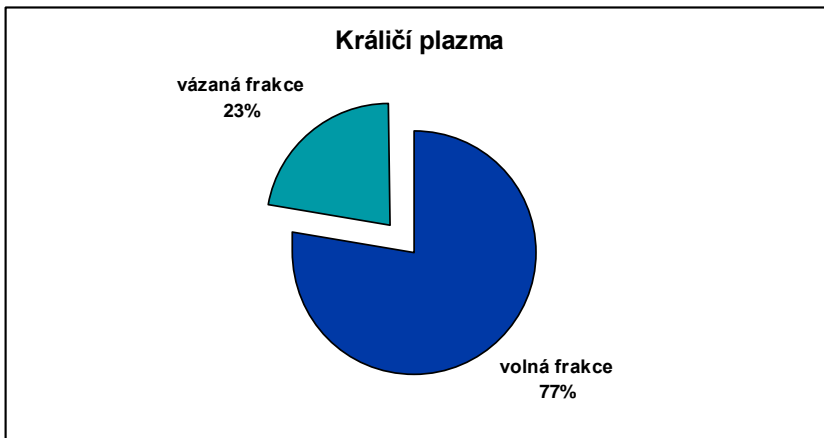
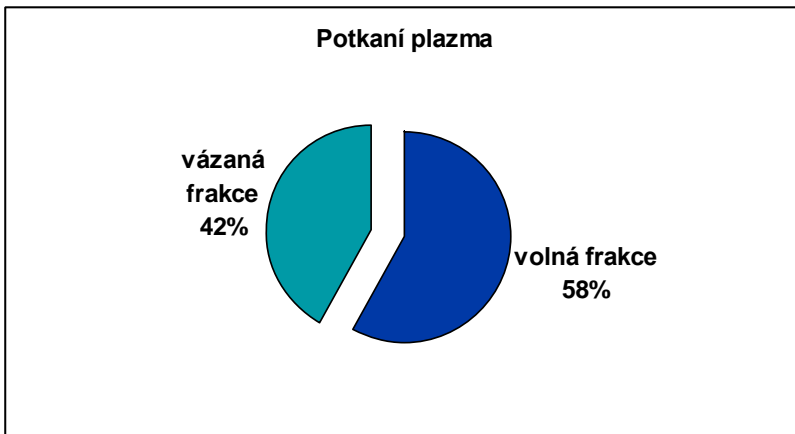
nevázaná frakce v %	druh plazmy			
	Potkan	hovězí	králík	člověk
měření 1	54,67	45,46	83,77	60,14
měření 2	66,54	52,34	85,11	85,91
měření 3	50,05	51,60	80,81	77,53
měření 4	60,20	47,18	60,14	73,24
<b>průměr</b>	<b>57,87</b>	<b>49,15</b>	<b>77,46</b>	<b>74,21</b>
<b>směrodatná odchylka</b>	7,12	3,35	11,68	10,75
<b>t-test</b>	0,0198	0,0038	0,3494	

Tabulka č.1 : Mezidruhové srovnání vazebnosti <sup>90</sup>Y-DOTA-TATE

Hodnota t-test je vyjádřením statistické významnosti rozdílu hodnot mezi příslušnou a lidskou plazmou



Graf č.1 : Mezidruhové srovnání vazebnosti 90Y-DOTA-TATE



**Graf č.2 : Mezidruhové srovnání vazebnosti 90Y-DOTA-TATE**

## 6.2 MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI <sup>111</sup>IN -DOTA-TATE NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Mezidruhové srovnání vazebnosti je znázorněno v tabulce č.2 a grafu č. 3 a 4. Pro stanovení vazebnosti peptidu <sup>111</sup>In -DOTA-TATE na plazmatické bílkoviny jsme použili metodu rovnovážné dialýzy při 37°C a vzorky jsme inkubovali po dobu 20 hodin. Pro mezidruhové srovnání jsme použili plazmu lidskou, potkaní, králičí a vepřovou.

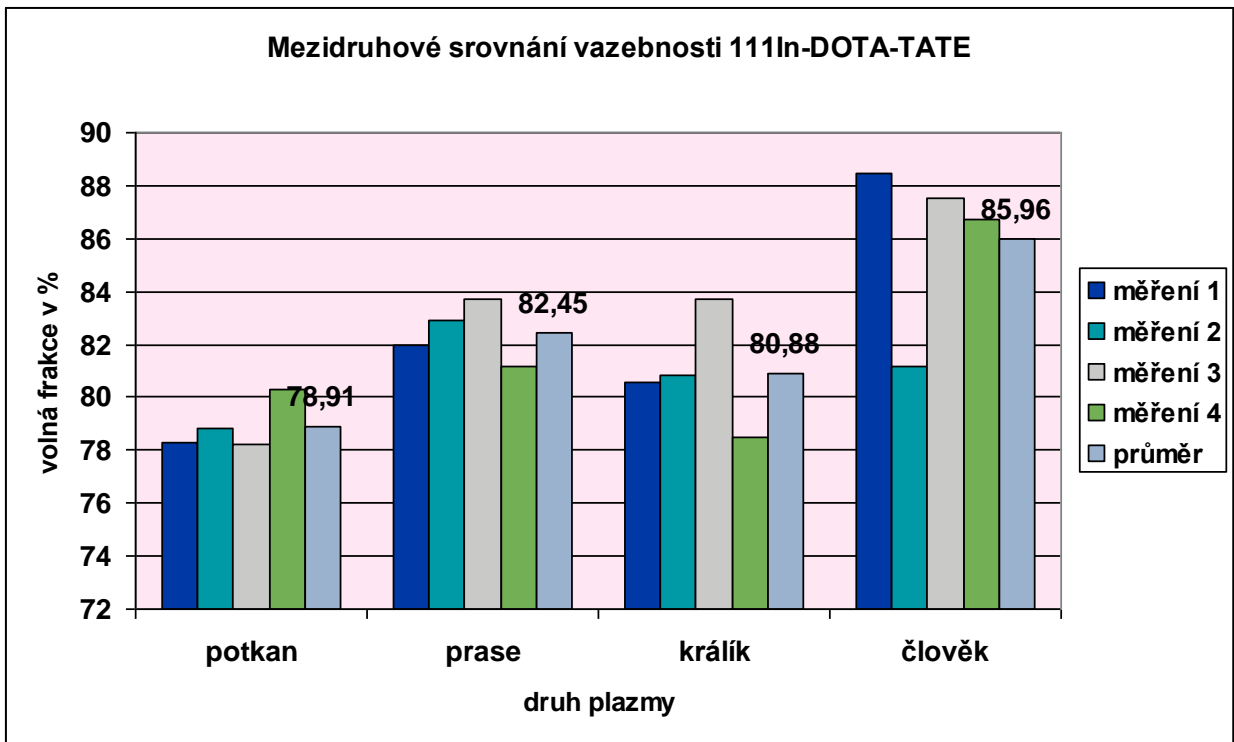
V tabulce č.2 jsou vyobrazeny výsledky jednotlivých měření jako procentuální vyjádření volné frakce peptidu, průměr těchto hodnot a směrodatná odchylka. V grafu č.1 jsou graficky znázorněny hodnoty všech měření a v grafu č.2 pouze průměrné hodnoty u jednotlivých živočišných druhů.

nevázaná frakce v %	druh plazmy			
	potkan	prase	králík	člověk
měření 1	78,28	81,99	80,55	88,45
měření 2	78,84	82,90	80,80	81,15
měření 3	78,25	83,69	83,68	87,54
měření 4	80,28	81,20	78,50	86,69
<b>průměr</b>	<b>78,91</b>	<b>82,45</b>	<b>80,88</b>	<b>85,96</b>
<b>směrodatná odchylka</b>	0,95	1,08	2,13	3,28
<b>t-test</b>	0,0142	0,0758	0,0360	

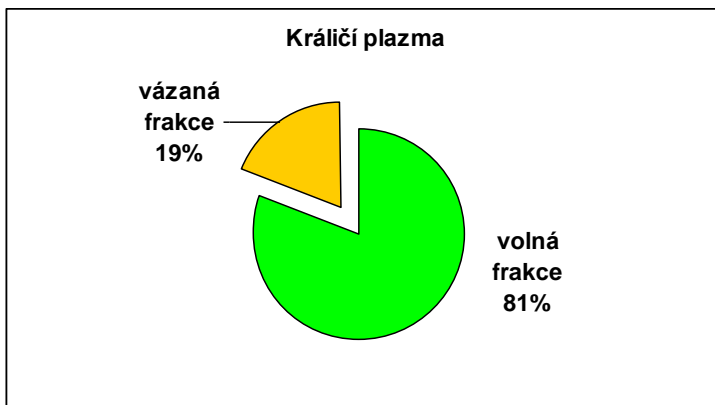
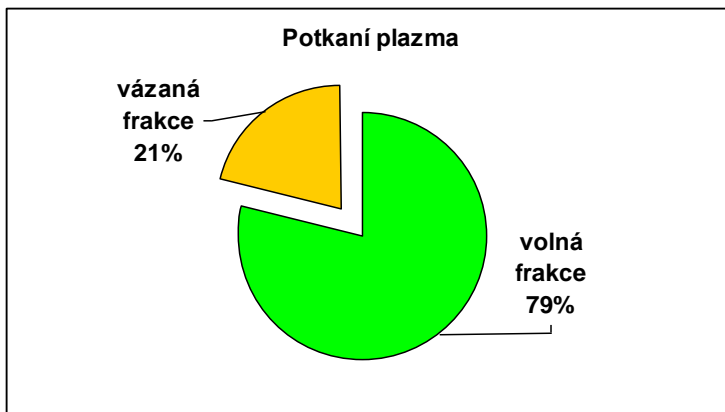
Tabulka č.2 : Mezidruhové srovnání vazebnosti <sup>111</sup>In-DOTA-TATE

Hodnota t-test je vyjádřením statistické významnosti rozdílu hodnot mezi příslušnou a lidskou plazmou





Graf č.3 : Mezidruhové srovnání vazebnosti <sup>111</sup>In-DOTA-TATE



**Graf č. 4 : Mezidruhové srovnání vazebnosti  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE**

## 7 DISKUZE

Mezidruhové srovnání hodnot vazebnosti léčiva na plazmatické bílkoviny může přispět k vysvětlení mezidruhových rozdílů ve farmakokinetice těchto léčiv.

V rámci předložené diplomové práce byla porovnávána plazmatická vazebnost receptorově specifického peptidu DOTA-TATE značeného  $^{90}\text{Y}$  a  $^{111}\text{In}$  z hlediska mezidruhového srovnávání. Výsledky ukázaly, že plazmatická vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE roste v pořadí králíčí < lidská < potkaní < hovězí plazma. Přitom statisticky významné rozdíly mezi vazebností na zvířecí a lidskou plazmu byly nalezeny u potkaní a hovězí plazmy. Plazmatická vazebnost  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE rostla v pořadí lidská < vepřová < králíčí < potkaní plazma. Přitom statisticky významné rozdíly mezi vazebností na zvířecí a lidskou plazmu byly nalezeny u králíčí a potkaní plazmy.

Při hodnocení vlivu radionuklidu na plazmatickou vazebnost radioaktivně značeného DOTA-TATE byla u všech živočišných druhů nalezena vyšší vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE při porovnání s  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE. Znamená to, že vazebnost studovaných potencionálních radiofarmak je ovlivněna nejen strukturou peptidu, ale i zvoleným radionuklidem.

Z literatury je známo, že dominantním eliminačním mechanismem pro radioaktivně značené deriváty somatostatinu je ledvinné vylučování glomerulární filtrací. Ta je dána jednak glomerulární filtrační rychlostí, jednak frakcí volného léčiva v plazmě. Z toho plyne, že rychlost vylučování studovaných receptorově specifických peptidů bude ovlivněna rozsahem jejich vazby na plazmatické bílkoviny.

# ZÁVĚR

1. Studovali jsme vazebnost receptorově specifického peptidu DOTA-TATE značeného  $^{90}\text{Y}$  a  $^{111}\text{In}$  na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání. Ke stanovení jsme použili metodu rovnovážné dialýzy při  $37^\circ\text{C}$ .

2. Plazmatická vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE roste v pořadí: králíčí < lidská < potkaní < hovězí plazma.

3. Plazmatická vazebnost  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE roste v pořadí: lidská < vepřová < králíčí < potkaní plazma.

4. Vazebnost DOTA-TATE na plazmatické bílkoviny u potkana, králíka a člověka byla nižší pro  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE v porovnání s  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE, ovšem významný rozdíl byl zaznamenán pouze u potkaní plazmy.

5. Studované peptidy jsou z organismu vylučovány převážně mechanismem glomerulární filtrace v ledvinách, a proto bude rozsah plazmatické vazebnosti ovlivňovat rychlost jejich vylučování z organismu.

# LITERATURA

- 1) Dostálek M. a kol.: Farmakokinetika, Grada Publishing, Praha, 2006
- 2) Lullmann H. a kol.: Barevný atlas farmakologie, Grada Publishing, Praha, 2001
- 3) [www.wikipedia.cz](http://www.wikipedia.cz)
- 4) Rokyta Richard a kol.: Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech, ISV, Praha, 2000
- 5) Kragh-Hansen U.: Molecular aspects of ligand binding to serum albumin, *Pharm. Reviews*, 33(1):17-53, 1981
- 6) Nilsson J.G.: Chemical aspects of drug interaction; Pharma International, 1971
- 7) Wright J.D. Boudinot F.D, Ujhelyi M.R: Measurement and analysis of unbound drug concentrations; *Clin Pharmacokinet.*, 30(6):445-62., 1996
- 8) Pacifici G.M., Viani A.: Methods of determining plasma and tissue binding of drugs; *Clin Pharmacokinet.*, 23(6):449-68 1992
- 9) Heppeler A., Froidevaux S, Eberle A.N a kol.: Receptor targeting for tumour localisation and therapy with radiopeptides, *Curr Med Chem.*,7(9):971-94, 2000
- 10) Breeman W.A., de Jong M, Kwekkeboom D.J. a kol.: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives, *Eur J Nucl Med*, 28(9):1421-9, 2001
- 11) Bohuslavizki KH.: Somatostatin receptor imaging: current status and future perspectives, *J Nucl Med.*, 42(7):1057-8, 2001
- 12) Ginj M., Chen J., Walter MA, Eltschinger V., Reubi JC, Maecke HR : Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy, *Clin Cancer Res.*, 1;11(3):1136-45, 2005
- 13) Reubi JC, Schaer JC, Waser B, Mengod G : Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 messenger RNAs in primary human tumors using in situ hybridization., *Cancer Res.*, 1;54(13):3455-9, 1994
- 14) Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, Reubi JC. : Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists., *J Nucl Med.*, 47(3):502-11, 2006

- 15) Smith-Jones PM, Bischof C, Leimer M, Gludovacz D, Angelberger P, Pangerl T, Peck-Radosavljevic M, Hamilton G, Kaserer K, Kofler A, Schlangbauer-Wadl H, Traub T, Virgolini I. : DOTA-Ianreotide: a novel somatostatin analog for tumor diagnosis and therapy, *Endocrinology.*, 140(11):5136-48, 1999
- 16) de Jong M, Krenning E. : New advances in peptide receptor radionuclide therapy, *J Nucl Med.*, 43(5):617-20, 2002
- 17) Kwekkeboom DJ, Mueller-Brand J, Paganelli G, Anthony LB, Pauwels S, Kvols LK, O'dorisio TM, Valkema R, Bodei L, Chinol M, Maecke HR, Krenning EP. : Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs., *J Nucl Med.*, 46 Suppl 1:62S-6S, 2005
- 18) Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G. : Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis., *Virchows Arch.*, 440(5):461-75. Roub, 2002
- 19) Grimberg A. : Somatostatin and cancer: applying endocrinology to oncology, *Cancer Biol Ther.*, 3(8):731-3., 2004
- 20) Y.C. Patel, M.T. Greenwood, R. Panettb, L. Demchyshyn, H. Niznik, and C.B. Srikant : Mini Review The Somatostatin Receptor Family, *Life Sciences*, 57(13):1249-1265, 1995
- 21) Storch D, Béhé M, Walter MA, Chen J, Powell P, Mikolajczak R, Mäcke HR : Evaluation of [99mTc/EDDA/HYNIC0]octreotide derivatives compared with [111In-DOTA0,Tyr3, Thr8]octreotide and [111In-DTPA0]octreotide: does tumor or pancreas uptake correlate with the rate of internalization?, *J Nucl Med.*, 46(9):1561-9, 2005
- 22) Maina T, Nock BA, Cordopatis P, Bernard BF, Breeman WA, van Gameren A, van den Berg R, Reubi JC, Krenning EP, de Jong M : [99mTc]Demotate 2 in the detection of sst2-positive tumours: a preclinical comparison with [111In]DOTA-tate, *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 33(7):831-40., 2006
- 23) Marion de Jong, PhD; Wout A.P. Breeman, PhD; Roelf Valkema, MD; Bert F. Bernard; and Eric P. Krenning, MD : Combination radionuclide therapy using 177Lu- and 90Y-labeled somatostatin analogs, *J Nucl Med.*, 46 Suppl 1:13S-7S, 2005
- 24) Lázníček M., Komárek P.: *Základy radiofarmacie*, Karolinum, Praha, 1998

## SEZNAM ZKRATEK

AGP	kyselý alfa-1-glykoprotein
AMK	aminokyselina
CCK-A	cholecystokinin A
CCK-B	cholecystokinin B
C <sub>B</sub>	koncentrace vázaného léčiva
C <sub>T</sub>	celková koncentrace léčiva
C <sub>U</sub>	koncentrace volného léčiva
CNS	centrální nervový systém
DFO	desferrioxamine-B
DOTA	1,4,7,10-tetraazocyclododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
EDTA	ethylendiamin-tetraoctová kyselina
F <sub>b</sub>	vázaná frakce
F <sub>u</sub>	volná frakce
GF	gelová filtrace
GIT	gastrointestinální trakt
GRP	gastrin uvolňující peptid
HDL	high-density lipoproteins
IDL	intermediate-density lipoproteins
K <sub>a</sub>	asociační konstanta
K <sub>d</sub>	disociační konstanta
LDL	low-density lipoproteins
MC-R	melanokortin
MD	mikrodialýza
MSH	melanocyty stimulující hormon
RD	rovnovážná dialýza
SP	substance P
SSTR	somatostatinové receptory

TATE	[DOTA-Tyr3]-okreotid
TCA	tricyklická antidepresiva
UF	ultrafiltrace
Vd	distribuční objem
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
VLDL	very low-density lipoproteins