

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vazebnosti dvou bifunkčních chelátů značených In-111 na
bílkoviny plazmy

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

Autor: Petra Drymlová

Hradec Králové, 2009

Název:

Studium vazebnosti dvou bifunkčních chelátů značených In-111 na bílkoviny plazmy

Abstrakt:

Distribuce mnohých léčiv v organismu je výrazně ovlivněna jejich vazbou na bílkoviny krevní plazmy. Stanovení míry plazmatické vazebnosti je proto nezbytné pro předpovědění farmakokinetiky dané látky po podání do organismu. V této diplomové práci byla stanovena plazmatická vazebnost nově syntetizovaného bifunkčního chelatačního činidla DTPA-oxn značeného ^{111}In na bílkoviny krevní plazmy člověka a tří živočišných druhů a byla porovnána s vazebností v praxi běžně užívaného radiofarmaka ^{111}In -DTPA. Pro měření byla použita metoda rovnovážné dialýzy při 37°C . Výsledky ukázaly, že vazebnost komplexu ^{111}In -DTPA-oxn na bílkoviny lidské, hovězí, králičí a potkaní plazmy je stejně jako u porovnávaného radiofarmaka ^{111}In -DTPA velmi malá, metodou rovnovážné dialýzy nekvantifikovatelná a z farmakokinetického hlediska bezvýznamná. U obou komplexů byla před samotným měřením plazmatické vazebnosti stanovena radiochemická čistota pomocí tenkovrstvé chromatografie na ITLC-SG. Její naměřená hodnota byla u obou sloučenin vyšší než 98%.

Title:

Study of plasma protein binding of two bifunctional chelates labelled with In-111.

Summary:

Distribution of many drugs in an organism is significantly influenced by their binding to plasma proteins. Determination of the extent of plasma binding for a concrete drug is necessary for prediction of its pharmacokinetics after administration to the organism. The aim of this thesis was to determine binding of a new bifunctional chelating agent DTPA-oxn labelled by ^{111}In to the plasma proteins of human and three animal species and to compare these results with the plasma protein binding of routinely used radiopharmaceutical ^{111}In -DTPA. For measurement, a method of equilibrium dialysis at 37°C was used. The results show, that binding of ^{111}In -DTPA-oxn to the proteins of human, bovine, rabbit and rat plasma is similarly very low as at the compared chelate ^{111}In -DTPA and impossible to determine by equilibrium dialysis and pharmacokinetically unimportant. Radiochemical purity was also determined for both complexes by the method of thin layer chromatography ITLC-SG. Measured value was higher than 98% for each compound.

Dovoluji si poděkovat Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc. za odborné a vstřícné vedení při vypracování mé diplomové práce a dále také všem pracovníkům katedry farmakologie a toxikologie za ochotné a vstřícné jednání.

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

10.5.2009

.....

OBSAH

ÚVOD	8
CÍL PRÁCE	10
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny	13
1.1. Význam	13
1.2. Plazmatické bílkoviny.....	14
1.2.1. Albumin	14
1.2.2. α_1 -kyselý glykoprotein.....	16
1.3. Faktory ovlivňující vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny	17
1.4. Druhy vazby léčivo-plazmatická bílkovina	19
1.5. Metody pro stanovení vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny	20
1.5.1. Rovnovážná dialýza	20
1.5.2. Ultrafiltrace	22
1.5.3. Gelová filtrace	23
1.5.4. Ultracentrifugace	23
1.5.5. Vazba na albuminové mikrosféry	23
1.5.6. Cirkulární dichroismus	24
2. Radiofarmaka	25
2.1. Příprava radiofarmak	26
2.2. Receptorově specifická radiofarmaka.....	27
2.2.1. Radionuklid	27
2.2.2. Biomolekula schopná specifické vazby	30
2.2.3. Farmakokinetiku ovlivňující část	30
2.2.4. Bifunkční chelatační činidlo	31
2.3. Bifunkční chelatační činidla	31
2.3.1. Značení biomolekul pomocí chelatačních činidel	32
2.3.2. Deriváty polyaminokarboxylových kyselin	32
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
1. Materiál	36

1.1. Biologický materiál	36
1.2. Přístroje	36
1.3. Pomůcky	36
1.4. Chemikálie	37
1.5. Struktury značených bifunkčních chelatačních činidel	37
2. Metodika	38
2.1. Příprava jednotlivých vzorků	38
2.2. Kontrola radiochemické čistoty.....	39
2.3. Stanovení vazebnosti radiofarmaka na bílkoviny krevní plazmy.....	40
VÝSLEDKOVÁ ČÁST	42
DISKUSE	48
ZÁVĚR	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

ÚVOD

Farmakokinetika mnohých léčiv je po podání do organismu významně ovlivněna jejich vazbou na plazmatické bílkoviny. Zatímco volné léčivo může pronikat k cílovým strukturám a vyvolat zamýšlený farmakologický účinek, navázaná frakce tvoří jakési přechodné depo, ze kterého se léčivo postupně uvolňuje v závislosti na dynamické rovnováze mezi vázanou a nevázanou formou. Vazba na plazmatické bílkoviny tedy léčivu nezabrání dosáhnout cílové struktury, ale prodlouží dobu, než se tak stane.

Znalost míry plazmatické vazebnosti je proto naprosto nezbytná k určení farmakokinetiky léčiva po podání do organismu. Metod pro stanovení plazmatických vazebností léčiv bylo vyvinuto několik. Každá z nich má své klady a zápory a rozhodnutí, který postup bude využit v daném případě, by mělo být řádně uváženo podle vlastností stanovovaného ligandu, náročnosti metody a přesného účelu daného měření.

Bifunkční chelatační činidla jsou sloučeniny využívané pro značení biomolekul radioaktivními izotopy. Protože se ale jednotlivé radionuklidy i značené biomolekuly navzájem liší svými vlastnostmi, nelze pro všechna značení využít jeden univerzální bifunkční chelát. Snahou proto je syntetizovat takový chelaton, který nabídne pro konkrétní značení stabilnější vazbu radionuklidu a lepší možnost navázání na značenou biomolekulu.

CÍL PRÁCE

- 1) Zpracovat literární přehled o významu vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny a o využití bifunkčních chelatačních činidel pro radioaktivní značení biologických makromolekul.
- 2) Stanovit radiochemickou čistotu nově syntetizovaného komplexu DTPA-oxn značeného ^{111}In .
- 3) Metodou rovnovážné dialýzy při 37°C stanovit plazmatickou vazebnost tohoto komplexu na bílkoviny lidské, hovězí, králičí a potkaní plazmy.
- 4) Dosažené výsledky porovnat s obdobnými údaji stanovenými u komplexu ^{111}In -DTPA, který je rutinně využíván v nukleární medicíně.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny

1.1. Význam

Mnohá léčiva se po absorpci do krevního oběhu vážou různou měrou na plazmatické bílkoviny a tato vazba má významný vliv na jejich farmakologický účinek. Ovlivňuje nástup jejich účinku, délku jejich působení, účinnost, distribuci, biotransformaci i vylučování. Pro účinek léčiva je nezbytné, aby vazba na plazmatické bílkoviny byla reverzibilní, protože pouze volná část léčiva může pronikat barierami a dostávat se k místu účinku. Vázaná část léčiva potom představuje jakési přechodné depo, ze kterého se volné léčivo uvolňuje v závislosti na tom, jak uvolněné molekuly postupně pronikají do dalších prostředí organismu. Jde vlastně o dynamickou rovnováhu mezi volnou a vázanou frakcí léčiva, která je neustále obnovována.

Distribuce léčiv může být významně ovlivněna, pokud se v organismu potkají dvě léčiva, která mají afinitu ke stejným vazebným místům na molekule plazmatické bílkoviny. Tyto látky se potom navzájem z vazby vytěsňují, koncentrace jedné z nich stoupá a to může vést k zesílení jejího účinku nebo případně až k její toxicitě. Tato interakce je zásadní především u léčiv, která se na plazmatické bílkoviny výrazně vážou a jejichž volná frakce v plazmě je tedy relativně nízká (menší než 10%). I malé množství léčiva uvolněného z vazby může pak totiž představovat značné zvýšení koncentrace volné frakce. Představme si například, že léčivo je vázáno z 96% a jeho volná frakce tedy představuje 4%. Pokud jsou z vazby na bílkoviny vytěsněny další 4% dané léčivé látky, znamená to zdvojnásobení její koncentrace, které již může vyvolat nežádoucí nebo toxické účinky.^{1, 2, 3, 4, 5}

1.2. Plazmatické bílkoviny

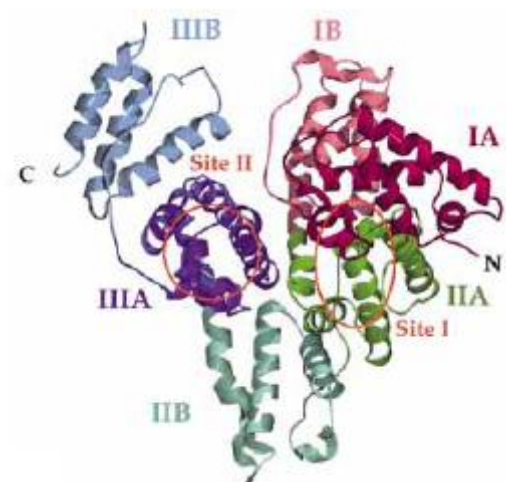
Krevní plazma může být charakterizována jako slabě zásaditý vodný roztok bílkovin, elektrolytů a malých organických molekul. U dospělého člověka představuje asi 5% tělesné hmotnosti, tedy asi 2,8-3,5 l. Z 91-92 % je tvořena vodou, zbylých 8-9 % zaujímají rozpuštěné látky. Hlavní část sušiny krevní plazmy tvoří bílkoviny, kterých je asi 60-80 g/l. Tradičně se dělí do tří základních skupin na albumin, globuliny a fibrinogen.⁶

Pro vazbu látek v plazmě mají největší význam albumin a α_1 -kyselý glykoprotein, ale i ostatní bílkoviny jako jsou α , β nebo γ globuliny nebo lipoproteiny jsou vazby schopné. Důležitý je také fakt, že většina léčiv je schopna vázat se na více typů plazmatických bílkovin.⁷

1.2.1 Albumin

Nejvýznamnější plazmatickou bílkovinou pro vazbu léčiv je albumin. Jde o bílkovinu s molekulovou hmotností 66 500 Da, kterou tvoří 585 aminokyselin. Rentgenové krystalografické studie ukazují, že 67% její struktury je uspořádáno do struktury α -šroubovice. Celý polypeptidový řetězec albuminu vytváří konformaci ve tvaru srdce a je rozdělen na tři domény (I-III), přičemž každá z nich je tvořena dvěma subdoménami (A a B) (obr.1).

Obr. 1: Krystalová struktura lidského albuminu. Vyznačeny jsou domény (I-III) a subdomény (A, B), dále vazebná místa (Site I a II). Písmena C a N označují C a N konec bílkoviny.¹³



Na albumin se vážou především látky kyselého charakteru, vazba bazických látek není tak významná. Většina léčiv se na albumin váže v jednom ze dvou hlavních vazebných míst označovaných jako vazebné místo I a II.^{1, 8, 9, 10}

Vazebné místo I

Vazebné místo I představuje velmi prostornou oblast molekuly albuminu tvořenou velkým množstvím na sobě navzájem nezávislých vazebných míst, která se ale v některých případech mohou vzájemně ovlivňovat.

Toto místo vytváří jakousi kapsu v subdoméně IIA albuminu, přičemž vnitřní stěny kapsy jsou tvořeny hydrofobními postranními řetězci, zatímco vstup do kapsy je obklopen kladně nabitými zbytky.

Typickými ligandy pro toto místo jsou dikarboxylové kyseliny a objemné heterocyklické sloučeniny se záporným nábojem lokalizovaným uprostřed molekuly. Mohou se zde však vázat sloučeniny velmi rozdílné chemické struktury, což vypovídá o

obrovské flexibilitě tohoto vazebného místa. Možná je také nezávislá vazba dvou rozdílných molekul.

Mezi navázanými ligandy byly pozorovány vzájemné interakce, které mohou být připsány buď částečnému překrývání vazebných míst nebo konformačním změnám v molekule albuminu.

Bylo zjištěno, že na rozdíl od vazebného místa II má mutace jen jediného genu pro toto místo významný vliv na konformaci a teplotní stabilitu celého albuminu.^{8, 11, 12}

Vazebné místo II

Vazebné místo II, označované také jako indolbenzodiazepinové, je v porovnání s vazebným místem I mnohem méně prostorné, proto se na něj nevážou žádné velké molekuly. Nejčastějšími ligandy jsou aromatické karboxylové kyseliny tvořené záporně nabitým zbytkem karboxylové skupiny na jedné straně molekuly, který je oddělen od hydrofobního středu.

Studie ukazují, že toto místo je mnohem méně flexibilní v porovnání s vazebným místem I.⁸ Silná stereoselektivita vazebného místa může být dokumentována na afinitě L-tryptofanu, která je stokrát vyšší než u jeho D-isomeru. Také bylo zjištěno, že vazbu ovlivňuje i malá změna v molekule ligandu. Příkladem mohou být diazepam a jeho fluorovaný derivát fluorodiazepam. První z nich je schopen se na vazebné místo II vázat zatímco druhý ne.^{13, 14}

Vazebné místo II je stejně jako vazebné místo I uspořádané do tvaru jakési kapsy, tentokrát ale na subdoméně IIIA.⁸

1.2.2. α_1 - kyselý glykoprotein

Další významnou plazmatickou bílkovinou je α_1 -kyselý glykoprotein. Jedná se o globulin o molekulové hmotnosti kolem 42 000 D, který je v plazmě obsažen v mnohem menším množství než albumin.⁷ Jeho molekula je složená ze 183 aminokyselin, propojených dvěma disulfidovými vazbami, a pěti uhlovodíkových

řetězců. Přestože jeho trojrozměrná struktura je stále neznámá, dosavadní měření ukazují, že je tento protein ve vodném roztoku převážně ve formě beta-skládaného listu.

Studován byl vliv cukerných řetězců na vazebnost a tato měření naznačují, že vazebné schopnosti α_1 -kyselého glykoproteinu nejsou na přítomnosti ani typu oligosacharidu závislé.⁸

α_1 -kyselý glykoprotein je významný pro vazbu látek steroidní struktury, mnoha látek bazického ale i neutrálního charakteru.

Velký zájem o tuto plazmatickou bílkovinu vyvolalo zjištění, že se na něj výrazně vážou inhibitory proteázy, tedy hlavní léčiva užívaná v kombinacích při léčbě pacientů trpících AIDS. Studie in vitro prokázaly, že přidání α_1 -kyselého glykoproteinu do média vedlo ke snížení antivirového účinku těchto léčiv. Z tohoto poznatku lze usuzovat, že zvýšení plazmatické hladiny α_1 -kyselého glykoproteinu může vést ke snížení účinku léčby inhibitory proteázy.¹⁵

I přesto, že je známo velké množství látek, které jsou schopné vazby na α_1 -kyselý glykoprotein, přesná vazebná místa jsou prozatím neznámá.⁸

1.3. Faktory ovlivňující vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny

Je známo, že vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny se může u různých pacientů výrazně lišit v závislosti na jejich fyziologickém i patologickém stavu. Výrazné zvýšení nebo snížení koncentrace nevázané aktivní frakce léčiva v plazmě může potom znamenat riziko předávkování nebo poddávkování.⁷

Faktorů, které vedou ke zvýšení nebo snížení poměru vázané a nevázané frakce je několik. Jedním z nejdůležitějších je snížení množství plazmatických bílkovin při některých onemocněních. Příkladem může být hypoalbuminemie u jaterních onemocnění. Některé další příklady změny množství albuminu a α_1 -kyselého glykoproteinu v krevní plazmě představuje tabulka 1.^{8, 16}

Výrazné zvýšení volné frakce léčiv bylo zaznamenáno i u pacientů s akutním nebo chronickým ledvinovým selháním. V tomto případě pravděpodobně kromě hypoalbuminemie hraje důležitou roli i nižší interakce mezi léčivem a albuminem. Toto snížení může být zapříčiněno buďto konformačními změnami v molekule albuminu

nebo vazbou endogenních substancí (jako jsou například volné mastné kyseliny nebo tzv. uremické toxiny), které soupeří s léčivem o vazebné místo albuminu.

Nižší vazba léčiv na plazmatické bílkoviny byla zjištěna i u diabetiků. U této skupiny pacientů je její příčinou nejspíše výrazná glykosilace bílkovin, která ovlivňuje jejich konformační a tím i funkční vlastnosti.^{8, 17}

Tabulka 1: Efekt některých jevů na plazmatickou koncentraci albuminu a α_1 - kyselého glykoproteinu.⁷

Zkoumaný jev	Koncentrace albuminu	Koncentrace α_1 - kyselého glykoproteinu
Vyšší věk	↓	↑↔
Věk nižší než 6 měsíců	↓	↓
Těhotenství	↓	↑↓
Obezita	↑↔↓	↑
Chronický alkoholismus	↓	↑
Kouření cigaret	↓	↔
Revmatoidní artritida	↓	↑
Městnavé srdeční selhání	↔	↑
Infarkt myokardu	↓	↑
Akutní/chronické infekce	↓	↑
Nemoci ledvin	↓	↑
Chronické jaterní nemoci	↓	↓↔
Hypothyreóza	↑	↔
Diabetes mellitus	↓↔	↔
Deprese	↓	↑
Akutní pankreatitida	↓	↑

Legenda: ↓- snížení koncentrace bílkoviny
 ↑- zvýšení koncentrace bílkoviny
 ↔- nebyla zaznamenána změna koncentrace bílkoviny

1.4. Druhy vazby léčivo-plazmatická bílkovina

Léčiva jsou na plazmatické bílkoviny vázána několika různými typy vazeb. Patří mezi ně:

- iontová vazba
- nevazebné interakce:
 - vodíková vazba
 - van der Waalsovy síly
 - hydrofobní vazba

Iontová vazba

Iontová vazba je ze všech čtyř uvedených interakcí nejsilnější a pro vazbu mnoha léčiv také nejvýznamnější. Vzniká mezi negativně nabitou karboxylovou skupinou (COO^-) nebo pozitivně nabitou amoniovou skupinou ($\equiv\text{NH}^+$) bílkoviny a opačně nabitou skupinou léčiva.

Vodíková vazba

Vodíková vazba vzniká mezi vodíky polárních skupin (např. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) a atomy s volným elektronovým párem (kyslík a dusík). Příkladem může být vazba mezi volnou fenolickou skupinou tyrosinu bílkoviny a karbonylovou skupinou léčiva.

Van der Waalsovy síly

Představují slabou vazbu mezi dvěma nenabitými částicemi. Příkladem může být vazba mezi dvěma methylovými skupinami plazmatické bílkoviny a léčiva.

Hydrofobní vazba

Hydrofobní vazba je srovnatelně slabá jako předchozí interakce a může mít dvě podoby. První možností je vznik této vazby mezi dvěma planárními aromatickými kruhy, druhou vazba mezi dvěma jednoduchými alkylovými řetězci.¹⁸

1.5. Metody pro stanovení vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny

Existuje celá řada metod pro stanovení vazebností léčiv na plazmatické bílkoviny. Mezi nejčastěji používané patří rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Dalšími méně využívanými metodami jsou například ultracentrifugace, gelová filtrace, vazba na albuminové mikrosféry nebo cirkulární dichroismus. Každá z metod má své výhody a nevýhody a proto rozhodnutí, která metoda bude v daném případě použita, by vždy mělo vycházet ze zamýšleného účelu měření a z posouzení chemických vlastností ligandu. Rovnovážná dialýza je například metodou, která nejlépe odpovídá fyziologickým podmínkám. Ultrafiltrace je zase nejjednodušším postupem, který může být použit jako pokusná studie před měřením rovnovážnou dialýzou.¹⁹

1.5.1. Rovnovážná dialýza

Rovnovážná dialýza je nejpoužívanějším postupem pro stanovování vazebností látek na bílkoviny plazmy. Metoda je prováděna v zařízení, které obsahuje dialyzační jamky rozdělené semipermeabilní membránou na dvě oddělené komůrky. Dialyzační membrány se navzájem liší velikostí svých pórů a jsou proto vybírány na základě molekulové hmotnosti zkoumané látky. Při samotném měření je do dialyzační jamky vpravena na jednu stranu membrány plazma a na druhou roztok pufru. Buďto k plazmě nebo k roztoku pufru je dále přidáno určité množství stanovované látky. Soustava se nechá dostatečnou dobu inkubovat zpravidla při teplotě 37°C. Přitom léčivo prostupuje přes membránu tak, aby se koncentrace jeho nevázané frakce na obou stranách membrány vyrovnaly. Po dosažení dialyzační rovnováhy jsou plazma i pufr z komůrek vyjmuty a v plazmě je změřena celková koncentrace léčivé látky, zatímco naměřená hodnota v pufru je považována za koncentraci nevázaného léčiva. Z těchto dvou hodnot lze poté odvodit koncentraci léčiva vázaného na plazmatické bílkoviny jako rozdíl celkové koncentrace a koncentrace vázaného léčiva.

Při měření je velmi důležité, aby byl soustavě poskytnut dostatečný čas, který je potřebný pro dosažení rovnovážného stavu. Proto jsou před samotným měřením prováděny předběžné pokusy, které mají stanovit potřebný čas pro ustavení rovnováhy. Měří se při nich koncentrace léčiva v plazmě a v pufru v určitých časových intervalech tak dlouho, dokud se jejich hodnoty v několika po sobě následujících měřeních nepřestanou lišit.

Čas nezbytný pro dosažení dialyzační rovnováhy je významně ovlivněn mnoha parametry. Jeho zkrácení může být dosaženo například rotací nebo třepáním celé dialyzační soustavy během inkubace. Důležitými faktory jsou i parametry dialyzačních komůrek. Čím větší je poměr mezi plochou membrány a objemem komůrky, tím rychleji se rovnováha ustaví. Naopak pokud je hodnota tohoto poměru nižší, ustavení rovnováhy bude trvat déle.

Rovnovážná dialýza je ovlivňována mnoha faktory, které musí být kontrolovány, aby bylo dosaženo přesných výsledků. Během měření je důležité, aby bylo pH přizpůsobeno plazmatickým hodnotám, protože vazba léčiv na plazmatické bílkoviny může být na pH závislá. Protože jde o *in vitro* metodu, roztok pufru není identický se sérem a ionty v něm obsažené mohou ovlivnit navázání látky na bílkoviny. Jednou z možností, jak tomu předejít, je použít plazmatickou vodnou frakci připravenou filtrací plazmy. Překážkou pro toto řešení ale často bývá nutnost použití většího množství plazmy. Díky osmotickému tlaku, který v soustavě působí, také často dochází k přesunu části pufru do prostoru plazmy a to vede ke zředění plazmatických proteinů. Tento problém bývá řešen buďto přidáním dextransu, který zlepší izotonicitu pufru, což vede ve výsledku k menším přesunům, nebo jsou výsledky měření matematicky upraveny.⁷

Problémem může být také schopnost některých látek vázat se na dialyzační membránu v takovém rozsahu, že to může výrazně ovlivnit výsledky experimentu. V tomto případě je pro měření vybrána membrána o co nejmenší tloušťce.¹⁹

Mezi hlavní výhody rovnovážné dialýzy patří především to, že ji lze provést za použití pouze velmi malého objemu vzorku a lze připravit několik vzorků najednou. Naopak její nevýhodou je časová náročnost.^{7, 19}

1.5.2. Ultrafiltrace

Další často využívanou metodou pro stanovení vazebností léčiv na plazmatické bílkoviny je ultrafiltrace. Základem ultrafiltračního zařízení jsou dvě komory navzájem oddělené filtrem, který umožňuje průchod plazmatické vodné frakci a sloučeninám o nižší molekulové hmotnosti, zatímco větší molekuly, jako jsou plazmatické bílkoviny, zadržuje. Po vpravení plazmy obsahující léčivou látku je plazmatická vodná frakce tlačena skrz membránu buďto přetlakem nebo centrifugací do spodní komory. Ta po ukončení procesu obsahuje ultrafiltrát, který představuje koncentraci nevázaného léčiva. Koncentrace vázaného léčiva je potom vypočítána jako rozdíl mezi celkovou koncentrací léčiva a naměřenou hodnotou nevázaného léčiva.

Ultrafiltrace je jednoduchá, rychlá a efektivní metoda, která na rozdíl od rovnovážné dialýzy nevyžaduje pro měření použití nefyziologického pufru. Její nevýhodou je ale to, že koncentrace bílkovin ve vzorku se během centrifugace zvyšuje. Proto, aby byly v horní komoře udrženy přiměřené koncentrace bílkovin, bývá většinou filtrováno jen asi 10-15% původního plazmatického objemu. Pokud je ale měření prováděno u léčiva, které se na bílkoviny plazmy výrazně váže, může být v tak malém množství ultrafiltrátu obtížné zkoumané léčivo vůbec detekovat. V takovém případě, kdy je nezbytné pro měření získat větší množství ultrafiltrátu, se obvykle provádí předběžné zkoušky, které mají za úkol určit, jak velký vliv bude mít odebrání většího množství ultrafiltrátu na měření koncentrace nevázaného léčiva.

I u této metody, stejně jako u rovnovážné dialýzy je po celou dobu nezbytné udržet fyziologické pH a teplotu 37°C, aby byly napodobeny fyziologické podmínky. A stejně jako u předchozí metody hrozí i u tohoto postupu nebezpečí navázání léčiva na filtr, které může také ovlivnit celé měření.^{7, 19}

1.5.3. Gelová filtrace

Další možnou metodou pro stanovení plazmatické vazebnosti léčiv je gelová filtrace. Protože jde ale o metodu velmi zdlouhavou, bývá jen zřídka využívána. Její výhodou je ale možnost použít k měření pouze malé množství plazmy. Tato metoda spočívá v průchodu plazmy nasycené stanovovaným léčivem skrz chromatografickou kolonu naplněnou gelem. Kolonou projdou nejprve větší molekuly bílkovin s navázaným léčivem a až poté jsou eluovány menší molekuly nenavázaného léčiva.¹⁹

1.5.4. Ultracentrifugace

Ultracentrifugace je metoda, při které je oddělení volné frakce léčiva od léčiva navázaného na bílkoviny dosaženo centrifugací plazmy ve zkumavce, která není předělena žádnou membránou. Jde o alternativní metodu k rovnovážné dialýze a ultrafiltraci. Na rozdíl od nich je její výhodou to, že měření není zkresleno vazbou stanovovaných látek na použitou membránu a není potřeba využít nefyziologického pufru, jako je tomu u rovnovážné dialýzy. Naopak za nevýhody metody mohou být považovány chyby stanovení volné frakce léčiva způsobené fyzikálními jevy, jako jsou sedimentace a zpětná difuze.^{19,20}

1.5.5. Vazba na albuminové mikrosféry

Předností této metody je její jednoduchost. Suspenze albuminových mikrosfér a pufru je přenesena do injekční stříkačky, která je na spodní části opatřena porézní

destičkou. K suspenzi je přidána stanovovaná látka a stříkačka je inkubována při pokojové teplotě do ustavení rovnováhy. Nevázanou frakci léčiva potom získáme vytlačení suspenze ze stříkačky přes porézní destičku. Albuminové mikrosféry s navázaným léčivem zůstávají uvnitř stříkačky.

Zásadní nevýhodou této metody je to, že se při ní stanovuje vazba léčivé látky pouze na albumin. Z tohoto důvodu není využívána při přesných měřeních rozsahu plazmatické vazebnosti léčiv.¹⁹

1.5.6. Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus je spektroskopická metoda, která je založená na měření změn absorbance nebo fluorescence Cottonova efektu molekuly vázané na plazmatický protein. Molekula navázaná na léčivo vytváří vnější Cottonův efekt a tím pozměňuje běžné dichroické spektrum proteinu.¹⁹ Výhodou této metody je především to, že kromě stanovení vazebnosti léčiva umožňuje také získat další informace například o stereochemii komplexu léčivo-plazmatická bílkovina nebo o mechanismu vazby.²¹

2. Radiofarmaka

Radiofarmaka mohou být charakterizovaná jako léčiva, která ve své struktuře obsahují radioaktivní atomy a jsou určena pro podání člověku k diagnostice nebo terapii nemocí. Převážně jde o malé organické nebo anorganické sloučeniny, ale využívány jsou i velké makromolekuly, jako například monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty.

Podle účelu využití jsou radiofarmaka dělena do dvou základních skupin a to na diagnostická a terapeutická.

Diagnostická radiofarmaka

Diagnostická radiofarmaka slouží k detailnímu zobrazení morfologie jednotlivých orgánů nebo tkání a především k testování jejich fyziologických funkcí. Do této skupiny se řadí radiofarmaka značená izotopy emitujícími γ záření pro zobrazení pomocí jednofotonové emisní tomografie (SPECT) nebo pozitrony pro pozitronovou emisní tomografii (PET).²²

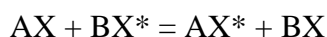
Terapeutická radiofarmaka

Úkolem těchto radiofarmak je doručení terapeutických dávek záření do místa postiženého chorobou. Terapie může probíhat několika způsoby. Patří mezi ně vnější ozařování, implantace zdroje záření (tzv. Brach therapy) nebo systematické podávání radiofarmaka. Léčba, při které je do místa nádoru chirurgicky vpraven zdroj záření a ponechán v něm po určitou dobu, je vhodná pouze pro léčbu dostupných nádorů. Důležitou roli hraje například při terapii nádorů prostaty. Naopak pro léčbu metastazujících nádorů je vhodnější systematické podávání receptorově specifických radiofarmak, která umožňují zacílení terapie pouze na nádorové tkáně.^{22, 23}

2.1. Příprava radiofarmak

Protože většinu radiofarmak tvoří látky organické nebo biologické povahy, využívají se při jejich přípravě převážně metody známé z organické chemie, které jsou ale upraveny tak, aby bylo možné pracovat v mikroměřítku. Důležité je, aby reakce byla časově nenáročná, probíhala s vysokým výtěžkem a také aby výsledné radiofarmakum bylo dostatečně stabilní. Pro přípravu značených organických sloučenin existují tři základní metody.

První z nich je výměnná reakce, při které dochází k nahrazení některého z atomů organické sloučeniny radioaktivním izotopem podle reakce:



kde X je stabilní atom a X* jeho radioaktivní izotop. Tato reakce je využívána, pokud je zaměřovaný atom v připravované sloučenině již přítomný a je vázán labilní vazbou. Jde v převážné většině o jednoduché jednostupňové reakce, při kterých vznikají specificky značené sloučeniny o vysoké měrné aktivitě a čistotě. Tuto metodu ale nelze použít v případě, kdy reakce neprobíhá s dostatečnou rychlostí nebo současně probíhají vedlejší reakce, které vedou ke vzniku radiochemických nečistot. Výměnná reakce se v praxi využívá například pro značení radiofarmak pomocí izotopů jodu.

Druhou možností přípravy je biochemická syntéza. Metoda využívá činnosti živých mikroorganismů, které dokážou biochemickými procesy z určitých jednoduchých sloučenin, obsažených v kultivačním médiu, vytvořit požadovanou organickou sloučeninu. Pokud pak medium obsahuje i radionuklid, zabudují ho mikroorganismy do struktury výsledné sloučeniny. Tento postup se využívá v případě, kdy je příprava požadované sloučeniny jinými způsoby příliš náročná nebo neproveditelná.

Třetím způsobem přípravy je chemická syntéza, která je poupravená tak, aby mohla být prováděna s využitím pouze velmi malého množství výchozích látek a aby výtěžek reakce a výsledná radiochemická čistota byly co nejvyšší. Radionuklid je pak k určitému místu molekuly poután buďto kovalentní nebo koordinační vazbou.

Nejjednodušší možností pro značení organických sloučenin chemickou syntézou je chelatace radionuklidů pomocí chelatačních činidel. Zvláštní skupinu chelatačních činidel potom tvoří tzv. bifunkční chelatační činidla, která jsou s oblibou využívána pro značení nejrůznějších organických sloučenin, jako jsou například receptorově specifické peptidy nebo protilátky.²⁴

2.2. Receptorově specifická radiofarmaka

Radiofarmaka lze dělit také podle jejich biodistribuce po aplikaci do organismu. Jednu skupinu pak tvoří ty, jejichž biodistribuce je závislá pouze na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech, zatímco druhá skupina zahrnuje radiofarmaka, jejichž osud v organismu je ovlivněn schopností specificky se vázat na receptory pouze určitých tkání. Tyto látky jsou pak označovány jako receptorově specifická radiofarmaka.

Receptorově specifická radiofarmaka jsou obecně složena ze čtyř částí:

- radionuklidu
- biomolekuly schopné specifické vazby
- farmakokinetiku ovlivňující části
- bifunkčního chelatačního činidla.²²

2.2.1. Radionuklid

Radionuklid představuje zdroj záření. V současné době je známo přes 2000 radoaktivních izotopů 104 chemických prvků. Ne všechny jsou ale pro využití

v nukleární medicíně vhodné. Kromě požadavků na výrobní a cenovou dostupnost musí radionuklid vyhovovat i z hlediska fyzikálních charakteristik. Patří mezi ně především:

- druh emitovaného záření
- energie emitovaného záření
- fyzikální poločas přeměny.

Druh emitovaného záření

β^- záření

Radionuklidy produkující β^- záření se využívají při terapii nádorových a jiných onemocnění. Protože má toto záření dosah v řádech pouhých milimetrů, je absorbováno především v cílové tkáni a příliš neovlivňuje okolí. Využití nalézají především čisté β^- zářiče. Současně emitované γ záření totiž výrazně zvyšuje ozáření okolních tkání, ale na terapeutický efekt nemá zásadní vliv.

β^+ záření

Tzv. anihilační záření vzniká v případě, kdy se pozitron uvolněný z jádra atomu ve tkáni spojí s elektronem a v místě anihilace se uvolní do opačných směrů dva fotony o energii 512 keV. Ty jsou poté využívány pro diagnostiku pomocí tzv. pozitronové emisní tomografie (PET).

γ záření

γ záření emitované jádry atomů je v nukleární medicíně využíváno při diagnostických vyšetřeních. Část fotonů záření proniká tkáni a umožňuje jejich detekci mimo tělo pacienta, část je ve tkáni absorbována a způsobuje radiační zátěž. V praxi

jsou využívány pouze čisté γ zářiče, protože současné β záření kvalitu zobrazení neovlivní, ale zbytečně zatěžuje pacienta.

Charakteristické rentgenové záření

Charakteristické rentgenové záření vzniká při přechodech elektronů v elektronovém obalu, u radiofarmak nejčastěji v důsledku tzv. elektronového záchytu, kdy je jádrem pohlcen elektron z atomového obalu. Volné místo, které po elektronu v obalu vznikne, je zaplněno elektronem z vyšší slupky a přebytečná energie je vyzářena ve formě charakteristického rentgenového záření. V nukleární medicíně se tento druh záření uplatňuje například při použití radionuklidů ^{201}Tl a ^{125}I .

α záření

Jde o jádro ^4_2He s vysokou ionizační schopností a velmi krátkým dosahem. I když ho tyto vlastnosti předurčují pro terapeutické využití, není v praxi využíván. Příčinou je velmi krátký dosah záření alfa a zvýšené riziko možného zdravotního poškození pracovníků v důsledku vnitřní kontaminace při práci s otevřenými zářiči.

Energie emitovaného záření

Za ideální energii záření vydávaného diagnostickým radionuklidem jsou považované hodnoty v rozmezí 100-200 keV. Nižší hodnoty než 30 keV vedou k výrazné absorpci záření ve tkáni, zatímco vyšší hodnoty způsobují zhoršení kvality diagnostických výsledků.

Pro energii terapeutického β záření nejsou obecně stanoveny žádné limity. Využívají se radionuklidy s energií od několika set keV do 2,7 MeV.

Fyzikální poločas přeměny

Příliš dlouhý poločas přeměny diagnostického radionuklidu znamená vysokou radiační zátěž pro organismus. Příliš krátký poločas neposkytuje dostatek času pro přípravu radionuklidu a kvalitní vyšetření sledovaného děje v organismu po jeho aplikaci. Za radionuklid s optimálními rozpadovými vlastnostmi je považován izotop ^{99m}Tc , jehož fyzikální poločas je šest hodin.^{25, 26, 27}

2.2.2. Biomolekula schopná specifické vazby

Tato část radiofarmaka plní úlohu nosiče, který umožňuje doručení radionuklidu k cílové tkáni. Podmínkou je, aby buňky cílové tkáně obsahovaly na svém povrchu velké množství specifických receptorů, ke kterým vykazuje biomolekula vysokou afinitu. Mezi sloučeniny, které umožňují zacílení účinku radiofarmaka, patří především monoklonální protilátky a receptorově specifické peptidy.²²

2.2.3. Farmakokinetiku ovlivňující část

Úkolem farmakokinetiku ovlivňující části je pozměnit kinetiku vylučování radiofarmaka tak, aby bylo dosaženo co nejvyššího vychytávání radiofarmaka v cílové tkáni a zároveň aby jeho množství v ostatních částech organismu bylo co nejnižší. Může mít například podobu jednoduchého uhlíkatého řetězce, jehož integrace do léčiva způsobuje zvýšení lipofility nebo krátké peptidové sekvence, jako je například polyaspartamová kyselina, která naopak zvyšuje hydrofilní vlastnosti a renální clearance. Pokud tuto spojku tvoří polyethylenglykol, vede to ke zpomalení vylučování radiofarmaka játry.^{22, 28, 29, 30}

2.2.4. Bifunkční chelatační činidlo

Bifunkční chelatační činidla jsou sloučeniny, které umožňují navázání radionuklidu na biomolekulu. Jak už jejich název napovídá, všechna bifunkční chelatační činidla obsahují ve své molekule 2 důležité funkční skupiny. První z nich je nezbytná pro vazbu radionuklidu, zatímco druhá umožňuje vznik kovalentní vazby mezi činidlem a značenou sloučeninou. Chelát tak umožňuje snadné značení složitých molekul tím, že mezi nimi a radionuklidem vytvoří pevný spojovací můstek.³¹

2.3. Bifunkční chelatační činidla

Protože se jednotlivé radionuklidy navzájem výrazně liší svými vlastnostmi, jako je například atomový poloměr nebo náboj, nelze pro všechna značení použít jeden univerzální bifunkční chelát, ale je nutné vybrat ten, který má pro značení daným radionuklidem nejvhodnější vlastnosti. Při výběru je podstatné posoudit především:

- náboj radionuklidu
- velikost dutiny chelátu pro vázaný radionuklid
- koordinační číslo chelátu
- charakter vazebných skupin chelátu.

Kromě těchto čtyř základních vlastností je důležité posoudit také rychlost vzniku a rozkladu daného komplexu.

Všechny uvedené vlastnosti spolu navzájem souvisí a jejich vhodný výběr je zásadní především pro stabilitu celého výsledného komplexu, která je v praxi velice důležitá. Předčasný rozklad komplexu by totiž mohl vést ke zvýšení toxicity při jeho terapeutickém využití nebo k nekvalitním výsledkům v případě diagnostiky.^{31, 32}

2.3.1 Značení biomolekul pomocí chelatačních činidel

Pro přípravu značených peptidů pomocí bifunkčních chelátů volíme jeden ze dvou možných postupů.

Při prvním z nich je nejdříve připraven komplex peptid-ligand, který je poté radioaktivně značen. Tento postup výrazně zjednodušuje proces značení, ale velmi často vyžaduje takové podmínky, které jsou pro komplex nepřípustné. Může například dojít k rozkladu celé molekuly zapříčiněnému vysokou teplotou, k ovlivnění cysteinových skupin peptidů redukčními činidly nebo hydrolyze citlivých skupin v silně bazickém prostředí.

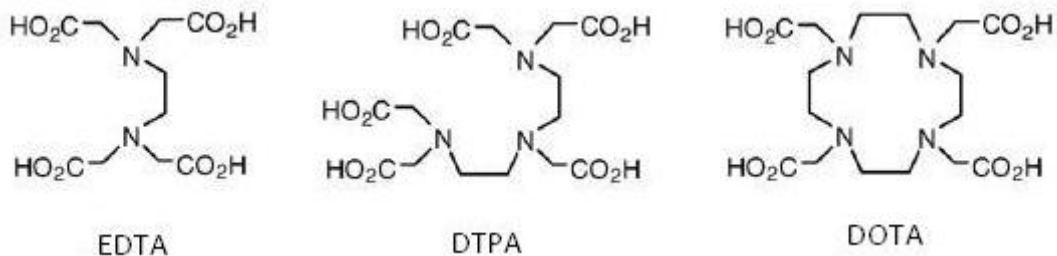
Druhou možností je nejprve označit radionuklidem ligand a ten poté navázat na biomolekulu. Tento postup je vhodný pro technecium, protože znemožňuje jeho nesespecifické navázání. Nevýhodou v tomto případě je ale ztížení následného čištění a kontroly kvality komplexu.

Chelát je většinou na značenou sloučeninu vázán pomocí peptidové vazby, která vzniká mezi karboxylovou skupinou ligandu a aminoskupinou biomolekuly. Karboxylová skupina může být také nahrazena skupinou esterovou, která pak reaguje ještě ochotněji. Pokud je využita thiokyanátová skupina ligandu, vzniká stabilní spojka ve formě thiourey.^{33, 34, 35}

2.3.2. Deriváty polyaminokarboxylových kyselin

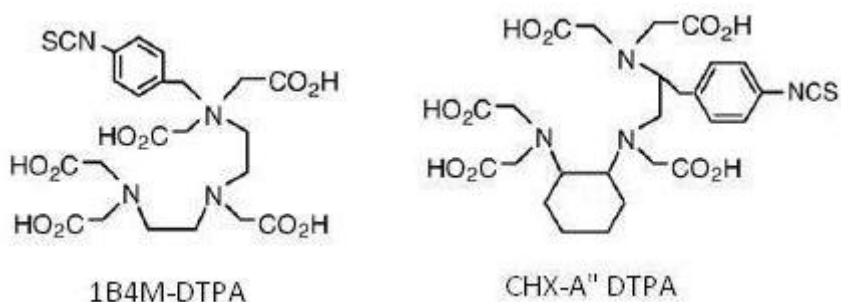
Mezi nejstudovanější bifunkční chelatační činidla patří deriváty polyaminokarboxylových kyselin, jako jsou například diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) a 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA) (obr.2). Od nich jsou potom odvozovány další deriváty.

Obr.2: Chemické struktury derivátů polyaminokarboxylových kyselin EDTA, DOTA, DTPA.



Deriváty EDTA byly původně představeny jako cheláty vhodné pro značení ^{111}In a ^{90}Y . Pro svoji omezenou stabilitu byly ale později nahrazeny deriváty DTPA, které nabízejí vhodnější vlastnosti.³¹ Největšími výhodami značení pomocí derivátů DTPA jsou časová nenáročnost a vysoké výtěžky reakce i za běžných podmínek. Nevýhodou ale představuje kinetická labilita těchto značených sloučenin, která často vede k uvolnění radionuklidu z komplexu a zvyšuje tak radiační toxicitu necílových orgánů.²⁸ Od tohoto chelátu bylo později zásahem do struktury odvozeno mnoho dalších derivátů. Příkladem by mohl být 1B4M-DTPA, známý také pod označením tiuxetan (obr. 3), který se v praxi využívá ke značení radiofarmaka Zevalinu.^{31, 36} Jedná se o myší monoklonální protilátku, která se po označení ^{90}Y využívá k terapii pacientů s folikulárním lymfomem.³⁷ Jiným příkladem je derivát CHX-A''DTPA (obr. 3), který je významný proto, že byl použit jako chelatační činidlo při prvním klinickém zkoušení protilátky značené α -zářičem ^{213}Bi .^{31, 38}

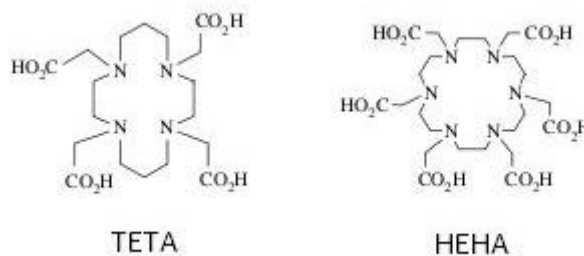
Obr. 3: Chemické struktury vybraných derivátů DTPA.



Dalším derivátem polyaminokarboxylových kyselin je DOTA, chelát s vynikající stabilitou, jehož strukturu tvoří dvanáctičlenný makrocyclický kruh. Původně byl vyvinut pro komplexy s ^{111}In , ^{86}Y , ^{90}Y , radiolanthanoidy, ^{213}Bi , ^{212}Pb a ^{225}Ac a opět od něj bylo odvozeno při hledání struktur s výhodnějšími vlastnostmi mnoho derivátů.³¹ Jeho největší nevýhodou jsou ale pomalá reakční kinetika během chelatace a výrazná závislost na reakčních podmínkách, jako jsou teplota, pH, koncentrace a typ pufru a přítomnost dalších kovových iontů. Často je při značení pomocí DOTA nezbytné zahřátí reakční směsi, protože při pokojové teplotě probíhá značení velmi pomalu, s nízkým výtěžkem a nutností následného chromatografického čištění. Zvýšená teplota může ale zásadním způsobem pozměnit vlastnosti značené biomolekuly. Například u monoklonálních protilátek může vést k významné ztrátě imunoreaktivitu.²⁸

Zkoumány byly i cheláty s větším makrocyclickým kruhem než má DOTA. Příkladem může být TETA (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina), chelát se čtrnáctičlenným kruhem, který vykazuje stabilitu při značení radioaktivní mědi (obr.4). Pro vazbu jiných radionuklidů se ale neosvědčil. Osmnáctičlenný chelát HEHA (1,4,7,10,13,16-hexaazacyklooktadekan-1,4,7,10,13,16-hexaoctová kyselina) byl zase vyvinut pro vazbu s ^{225}Ac , při které vykazuje vynikající stabilitu (obr.4).³¹

Obr. 4: Chemické struktury bifunkčních chelátů TETA a HEHA.



EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. MATERIÁL

1.1. Biologický materiál

Krevní plazmy byly získány centrifugací heparinizované krve při 5 500 otáčkách po dobu 5 minut.

- lidská krev- heparinizovaná krev odebraná zdravému dárci
- hovězí krev- heparinizovaná krev dodaná společností LabMediaServis s.r.o.
- potkaní krev- heparinizovaná krev odebraná potkanovi kmene Wistar
- králičí krev- heparinizovaná krev odebraná králíkovi plemene Český albín

1.2. Přístroje

- Gama counter, Wallac, 1480 Wizard 3
- TLC analyzér RITA STAR (Raytest)
- Termostat TCH 100, Laboratorní přístroje Praha
- centrifuga U-32R, Biotech
- zařízení pro otáčení kotoučů při rovnovážné dialýze

1.3. Pomůcky:

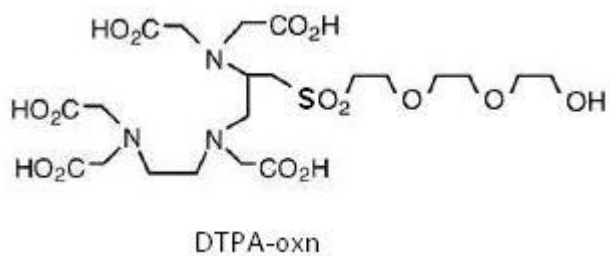
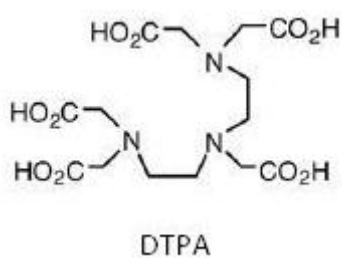
- dialyzační kotouče

- celofánová semipermeabilní membrána
- stacionární fáze pro tenkovrstvou chromatografii ITLC-SG (Gelman, USA)
- injekční stříkačky, jehly
- laboratorní sklo
- měřicí zkumavky
- vyvíjecí soustava pro chromatogram

1.4. Chemikálie:

- $^{111}\text{In-InCl}_3$ v 0,04 M HCl (Amersham)
- 10^{-3}M roztok DTPA o pH 5 (Sigma- Aldrich)
- roztok DTPA-oxn (1 mg/ml) (Azacycles s.r.o., Vitry)
- fosfátový pufr o pH 7,41
- acetátový pufr o pH 6,5
- 10% roztok octanu amonného
- methanol

1.5. Struktury značených bifunkčních chelatačních činidel:



2. METODIKA

2.1. Příprava jednotlivých vzorků:

¹¹¹In-DTPA:

složení:

- 100 μ l 0,5M acetátového pufru o pH 6,5
- 100 μ l 10^{-3} M roztoku DTPA o pH 5
- 1 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ v 0,04 M HCl

Připravený roztok značené sloučeniny jsme nechali stát po dobu 5 minut za pokojové teploty.

Po 25 μ l značené sloučeniny jsme přidali ke 2,5 ml každého druhu krevní plazmy.

¹¹¹In-DTPA-oxn:

složení:

- 84 μ l 0,5 M acetátového pufru o pH 6,5
- 6 μ l roztoku DTPA-oxn (1mg/ml)
- 10 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ v 0,04 M HCl

Připravený roztok značené sloučeniny jsme nechali stát po dobu 15 minut při teplotě 40°C.

Po 20 μ l značené sloučeniny jsme přidali k 2,5ml každé krevní plazmy.

2.2. Kontrola radiochemické čistoty:

Postup:

Stanovení radiochemické čistoty jsme provedli pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu ITLC-SG. Na start proužku tenké vrstvy jsme nanесли 1 μl vzorku a nechali vyvíjet v mobilní fázi složené z 10% octanu amonného a methanolu v poměru 1:1 do vzdálenosti asi 10 cm. Po vyjmutí a důkladném vysušení jsme chromatogram nechali vyhodnotit TLC analyzérem.

Zpracování získaných údajů:

Značené komplexy $^{111}\text{In-DTPA}$ i $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ jdou na chromatogramu s čelem, zatímco nežádoucí $^{111}\text{InCl}_3$ zůstává na startu. Výsledky měření ukazují grafy 1 a 2.

2.3. Stanovení vazebnosti radiofarmaka na bílkoviny krevní plazmy:

Postup:

Stanovení vazebnosti jsme prováděli metodou rovnovážné dialýzy přes semipermeabilní membránu v rotujícím kotouči při 37 °C.

Základem zařízení pro tuto metodu jsou 2 plexisklové kotouče s 8 plochými jamkami na jedné straně. Z každé jamky vede tenký kanálek na povrch kotouče. Mezi kotouče jsme vložili celofánovou membránu a poté jsme je na sebe navzájem přiložili tak, aby jamky na sebe naléhaly a vytvořily tak 8 komůrek předělených polopropustnou membránou.

Do každé komůrky jsme poté kanálkem pomocí injekční stříkačky vpravili na jednu stranu membrány 0,45 ml plazmy s obsahem značeného komplexu a na druhou stranu 0,45 ml roztoku fosfátového pufru a kanálek jsme uzavřeli pryžovou zátkou. Pro každý druh plazmy jsme stanovili 4 vzorky. Při plnění jsme pečlivě dbali na to, abychom jehlou nepoškodili membránu oddělující obě strany komůrky. Naplněný kotouč jsme poté umístili do termostatu, kde jsme ho ponechali po dobu 4 hodin.

Po uplynutí stanovené doby jsme kotouč z termostatu vyjmuli a odebrali z každé strany komůrky dvakrát 100 μl vzorku do měřících zkumavek. Vzorky jsme měřili na automatickém gama metru po dobu 60 sekund.

Zpracování získaných údajů:

Z naměřených hodnot aktivit jednotlivých vzorků plazmy a pufru jsme vypočítali, jaká část z celkového množství značeného komplexu je v plazmě nenavázaná na plazmatické bílkoviny podle vztahu:

$$f_u = \frac{A_{\text{pufru}}}{A_{\text{plazmy}}} \times 100$$

kde

f_u ... frakce volného léčiva v plazmě v procentech

A_{pufu} ... aktivita v pufu

A_{plazmy} ... aktivita v plazmě.

Dále jsme ze stanovených hodnot volného léčiva v plazmě f_u vypočítali pro všechna měření provedená pro jednu zkoušenou látku u jednoho druhu plazmy aritmetický průměr a směrodatnou odchylku dle vztahů:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \left(\sum_1^n X_i \right)$$

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

kde

\bar{X} ... aritmetický průměr

$S_{\bar{x}}$... směrodatná odchylka

n ... počet měření

X_i ... výsledky jednotlivých měření.

VÝSLEDKOVÁ ČÁST

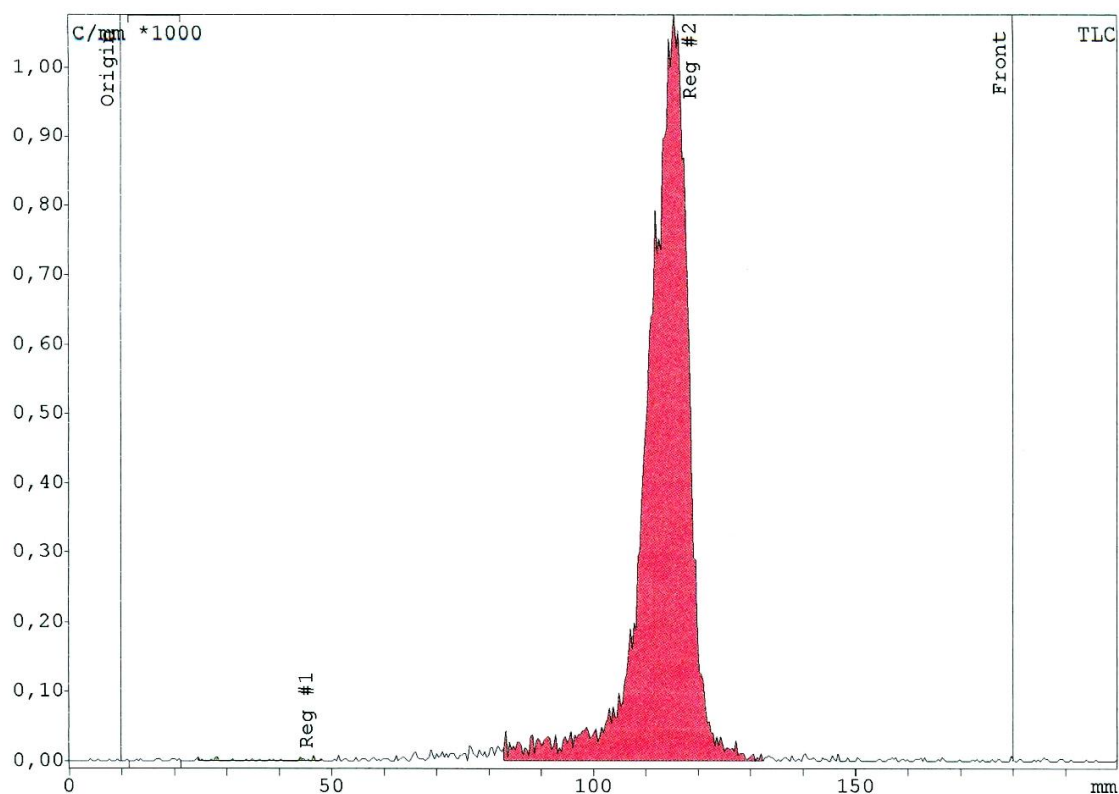
V experimentální části této diplomové práce byly pro dva značené komplexy $^{111}\text{In-DTPA}$ a $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ stanoveny:

- radiochemická čistota
- vazebnost na bílkoviny lidské plazmy a plazmy tří živočišných druhů.

Kontrola radiochemické čistoty byla provedena metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu ITLC-SG. Výsledné hodnoty radiochemické čistoty komplexů jsou uvedeny v grafech č.1 (pro komplex $^{111}\text{In-DTPA}$) a č.2 (pro komplex $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$).

Plazmatická vazebnost komplexů byla studována metodou rovnovážné dialýzy při 37°C . Souhrnné výsledky vazebností na bílkoviny lidské, hovězí, králičí a potkaní plazmy jsou uvedeny v tabulce č.1 (pro komplex $^{111}\text{In-DTPA}$) a v tabulce č.2 (pro komplex $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$). Výsledný rozsah plazmatické vazebnosti v tabulkách vyjadřuje hodnota f_u , která udává, jaká část značeného komplexu v procentech se v plazmě vyskytuje v nevázané formě.

Graf č.1: Radiochemická čistota komplexu ^{111}In -DTPA změřená pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu ITLC-SG.



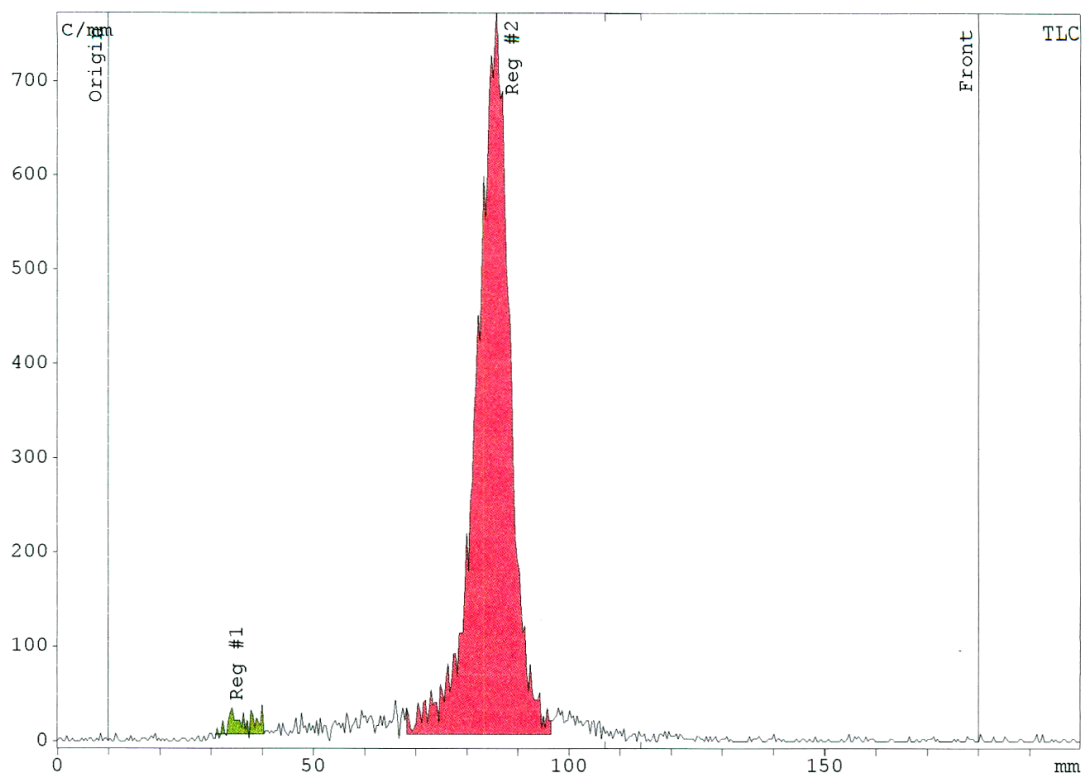
Sample description

Measurement: In-DTPA_Petra.rta, started: 10.4.2008 11:56
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,205	0,02	DD	1,667	0,02
Reg #2	0,621	97,92	DD	9678,000	99,98
Sum in ROI				9679,667	
Total area				9883,333	
Area RF				9890,333	
BKG1				0,9091	
Remainder RF				210,67	2,13
Remainder (Tot)				203,67	2,06

Graf č.2: Radiochemická čistota komplexu ^{111}In -DTPA-oxn změřená pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu ITLC-SG.



Sample description

Measurement: In-DTPA_oxn P.rta, started: 29.9.2008 9:29
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 3,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,144	1,92	DD	109,211	1,85
Reg #2	0,444	102,24	DD	5804,316	98,15
Sum in ROI				5913,526	
Total area				5677,105	
Area RF				5855,526	
BKG1				7,3206	
Remainder RF				-58,00	-0,99
Remainder (Tot)				-236,42	-4,16

Tabulka č.1: Hodnoty vazebnosti komplexu $^{111}\text{In-DTPA}$ na bílkoviny krevní plazmy člověka a tří živočišných druhů stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C.

LIDSKÁ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u	
	1	17913,2	20671,5	115,4	
	2	17350,2	21145,9	121,9	
	3	18904,8	21596,2	114,2	
	4	18089,0	21119,8	116,8	
	Aritmetický průměr				117,1
	Směrodatná odchylka				3,4

HOVĚZÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u	
	1	17179,0	19392,2	112,9	
	2	17804,2	20623,7	115,8	
	3	17639,0	20414,1	115,7	
	4	17340,3	20329,5	117,2	
	Aritmetický průměr				115,4
	Směrodatná odchylka				1,8

KRÁLÍČÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u	
	1	18155,5	20409,9	112,4	
	2	18152,4	20686,3	114,0	
	3	18169,1	20404,6	112,3	
	4	18220,7	20371,2	111,8	
	Aritmetický průměr				112,6
	Směrodatná odchylka				0,9

POTKANÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u	
	1	19232,0	21362,8	111,1	
	2	20613,0	23020,1	111,7	
	3	19035,6	20654,7	108,5	
	4	18521,7	21157,0	114,2	
	Aritmetický průměr				111,4
	Směrodatná odchylka				2,3

Tabulka č.2.: Hodnoty vazebnosti komplexu $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ na bílkoviny krevní plazmy člověka a tří živočišných druhů stanovené metodou rovnovážné dialýzy při 37°C.

LIDSKÁ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u
	1	7658,8	8173,9	106,7
	2	7686,3	8233,5	107,1
	3	7699,6	8183,2	106,3
	4	7492,8	8257,5	110,2
	Aritmetický průměr			107,6
	Směrodatná odchylka			1,8

HOVĚZÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u
	1	8278,0	9105,0	110,0
	2	8308,3	8670,5	104,4
	3	7657,5	8282,2	108,2
	4	7647,5	8529,6	111,5
	Aritmetický průměr			108,5
	Směrodatná odchylka			3,1

KRÁLÍČÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u
	1	8450,1	9110,1	107,8
	2	7704,7	8338,0	108,2
	3	7353,2	8238,9	112,0
	4	7741,2	8060,0	104,1
	Aritmetický průměr			108,0
	Směrodatná odchylka			3,2

POTKANÍ PLAZMA	číslo vzorku	A_{plazmy}	A_{pufru}	f_u
	1	7959,4	8948,4	112,4
	2	7561,4	8041,1	106,3
	3	7141,9	8427,2	118,0
	4	7544,6	8685,7	115,1
	Aritmetický průměr			113,0
	Směrodatná odchylka			5,0

DISKUZE

Vazebnost na plazmatické bílkoviny může být jedním z faktorů, které ovlivňují chování látek v biologickém systému. Je to dáno tím, že přes biologické bariéry může z centrálního distribučního kompartmentu pronikat pouze ta část látky, která je ve volné formě (není navázána na plazmatické bílkoviny). Cílem této diplomové práce bylo stanovit plazmatickou vazebnost nově syntetizovaného bifunkčního chelátu DTPA-oxn značeného ^{111}In . Základem struktury tohoto chelátu je DTPA běžně používaná v nukleární medicíně k funkčnímu vyšetření ledvin nebo značení biologických makromolekul. Obměna struktury DTPA byla cílena na získání nového chelatonu s vyšší stabilitou vazby radionuklidu a snazší možností připojení na biologickou makromolekulu. Na oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy byla studována farmakokinetika a biodistribuce chelátu DTPA-oxn značeného ^{111}In v rámci projektu TANDEM „Cílená superkancerostatika nové generace pro léčbu leukémie“. Tato diplomová práce má doplnit informace o základních farmakokinetických parametrech studované látky. Vazebnostní experimenty byly prováděny také s komplexem ^{111}In -DTPA, který sloužil jako standardní srovnávací látka.

Prvním dílčím cílem bylo ověření radiochemické čistoty komplexů ^{111}In -DTPA a ^{111}In -DTPA-oxn. Výsledky tenkovrstvé chromatografie na ITLC-SG v systémech složených z 10% octanu amonného a methanolu v poměru 1:1 ukázaly, že radiochemická čistota byla u obou komplexů vyšší než 98%.

Vazebnost byla studována metodou rovnovážné dialýzy při teplotě 37°C tak, aby výsledky byly získány za podmínek co nejvíce se blížících fyziologickým. Stanovená frakce volné látky byla u všech živočišných druhů u obou studovaných komplexů (^{111}In -DTPA i ^{111}In -DTPA-oxn) vyšší než 100%. Tento výsledek je z fyzikálního hlediska nemožný a vysvětlení je třeba hledat především ve vlivu Donnanových rovnováh, kdy stejný náboj molekul bílkovin (především albuminu) a studovaných komplexů způsobuje vyšší koncentraci volného komplexu v nebílkovinném kompartmentu než v kompartmentu obsahujícím bílkoviny.

I když je velmi obtížná přesná kvantifikace vlivu Donnanových rovnováh na koncentraci studovaných látek v bílkovinném a nebílkovinném kompartmentu, lze z uvedených výsledků vyvodit závěr, že vazebnost ^{111}In -DTPA a ^{111}In -DTPA-oxn na

plazmatické bílkoviny je u všech studovaných živočišných druhů velmi malá a z farmakologického hlediska zcela bezvýznamná.

ZÁVĚR

- 1) Metodou rovnovážné dialýzy při 37°C byla studována vazebnost komplexů $^{111}\text{In-DTPA}$ a $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ na bílkoviny lidské, hovězí, králičí a potkaní plazmy.
- 2) Hodnoty stanovené radiochemické čistoty byly 99,98% pro $^{111}\text{In-DTPA}$ a 98,15% pro $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$.
- 3) Stanovená hodnota frakce studovaného komplexu vázaného na plazmatické bílkoviny byla jak pro $^{111}\text{In-DTPA}$ tak i pro $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ u všech studovaných živočišných druhů vyšší než 100%. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben vlivem Donnanových rovnováh na koncentraci volné látky v kompartmentu obsahujícím bílkoviny a v bezbílkovinném kompartmentu.
- 4) Z výsledků získaných v této diplomové práci vyplývá, že podobně jako u $^{111}\text{In-DTPA}$ (radiofarmaka rutinně využívaného v nukleární medicíně) je i vazebnost nově připraveného komplexu $^{111}\text{In-DTPA-oxn}$ na plazmatické bílkoviny velmi malá (metodou rovnovážné dialýzy nekvantifikovatelná) a z farmakokinetického hlediska zcela nevýznamná.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Eybl V.: Vybrané kapitoly z obecné farmakologie. Část 1. Karolinum. Praha. 2003. (str. 46-47)
2. Květina J., Herink J., Vopršalová M.: Farmakologie pro farmaceuty. Díl 1, obecná farmakologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Brno. 2003 (str. 17)
3. Štaud F.: Přednášky z obecné farmakologie pro posluchače 3. ročníku Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, oboru Farmacie. 2007.
4. Lincová D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén. Praha. 2007. (str. 36)
5. Hervé F., Urien S., Albengres E., Duché J.C., Tillement J.P.: Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding. Clin. Pharmacokinet., 26(1): 44-58(1994).
6. Trojan S. a kol.: Lékařská fyziologie. Grada Publishing. Praha. 2003. (str. 111-113)
7. Wright J.D., Boudinot F.D., Ujhelyi M.R.: Measurement and analysis of unbound drug concentrations. Clin. Pharmacokinet., 30(6): 445-462. 1996.
8. Otagiri M.: A molecular functional study of the interactions of drugs with plasma proteins. Drug Metab. Pharmacokinet., 20(5): 309-323. 2005.
9. Murray R.K. et al.: Harperova biochemie. H + H. Jinončany. 2001. (str. 704)
10. Bertucci C., Domenici E.: Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: Metodological approaches and physiological relevance. Curr. Med. Chem., 9(15):1463-81(2002).
11. Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M.: Characterisation of site I on human serum albumin: Concept about the structure of a drug binding site. Biochem. Biophys. Acta, 1295:147-157(1996). Citováno dle (5).
12. He X.M., Carter D.C.: Anatomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature, 358: 209-215 (1992). Citováno dle (5).
13. 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(6): 695-704. 2002.

14. Chuang V.T., Otagiri M.: Flunitrazepam, a 7-nitro-1,4-benzodiazepine that is unable to bind to the indole-benzodiazepine site of human serum albumin. *Biochem. Biophys Acta.*, 1546:337-345(2001). Citováno dle (6).
15. Israili Z.H., Dayton P.G.: Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug. Med. Rev.*, 33(2): 161-235(2001).
16. Sakai T., Maruyama T., Sako T., Ahmed S., Zuidema X., Fujiyama S., Otagiri M.: Stereoselective serum protein binding of ketoprofen in liver diseases. *Enantiomer.*, 4:477-482 (1999). Citováno dle (5).
17. Nakajou K., Watanbe H., Kragh-Hansen U., Muruyama T., Otagiri M.: The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1623: 88-97 (2003). Citováno dle (5).
18. Nilsson J.L.G.: Chemical aspects of drug interaction. *Pharma International.*, 1/1971.
19. Pacifici G.M., Viani A.: Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences. *Clin. Pharmacokinet.*, 23(6): 449-468. 1992.
20. Liu Z., Li F., Huang Y.: Determination of unbound drug concentration and protein-drug binding fraction in plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 13: 262-266. 1999.
21. Ascoli G.A., Domenici E., Bertucci C.: Drug binding to human serum albumin: Abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. *Chirality*, 18: 667-679. 2006.
22. Liu S.: Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 60(12):1347-70. 2008.
23. Volkert V.A., Hoffman T.J.: Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, 99:2269-2292(1999). Citováno dle (11).
24. Lázníček M., Komárek P.: *Základy radiofarmacie*. Karolinum. Praha. 1998. (str. 34-36)
25. Mysliveček M., Kamínek M., Koranda P., Hušák V.: *Nukleární medicína-1.díl*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 2007. (str. 11-16)

26. Owunwanne A., Patel M., Sadek S.: The handbook of radiopharmaceuticals. Chapman & Hall. London. 1995. (str. 16-17)
27. Sampson C.B: Textbook of radiopharmacy: Theory and Practise. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam. 1994. (str. 4-6)
28. Liu S.: The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev., 33: 445-461. 2004.
29. Liu S., Edwards D.S.: Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. Top. Curr. Chem., 222:259-278(2002). Citováno dle (11).
30. Liu S., Edwards D.S.: Bifunctional chelators for target specific therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. Bioconjug. Chem., 12(2001). Citováno dle (11).
31. Brechbiel M.W.: Bifunctional chelates for metal nuclides. Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag., 52(2): 166-173. 2008.
32. Packard A.B., Kronauge J.F., Brechbiel M.W.: Metalloradiopharmaceuticals II: diagnosis and therapy. Springer. New York. 1999. (str. 45-116) Citováno dle (14).
33. Blok D., Feitsma R.I.J., Vermeij P., Pauwels E.J.K.: Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. Eur. J. Nucl. Med., 26: 1511-1519.
34. Kowalski R.J., Falen S.W.: Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. Second edition. American Pharmacists Association. Washington. 2004. (str. 260)
35. Fritzberg A.R., Abrams P.G., Beaumier P.L. et al.: Specific and stable labelling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85:4025-4029(1988). Citováno dle (15).
36. Chinn P., Braslawsky G., White C., Hanna N.: Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. Cancer. Immunol. Immunother., 52:257-280(2003). Citováno dle (14).
37. Micro-verze AISLP- ČR 2008.4 pro MS Windows.
38. Jurcic J.G., Larson S.M., Sgouros G., McDevitt M.R., Finn R.D., Divgi C.R. et al.: Targeted α particle immunotherapy in humans. Blood., 100:1233-9(2002). Citováno dle (14).