

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmakologie a toxikologie**  
**Oddělení radiofarmak**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Lenka Smolová**

**Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti dvou  
radioaktivně značených komplexů**

**2009**

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

## Mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti dvou radioaktivně značených komplexů

### Abstrakt

Tato práce se zabývá nově připraveným bifunkčním chelátem DTPA-oxn, který má předpoklad k využití pro značení biologických makromolekul. Cílem bylo bifunkční chelát DTPA-oxn radioaktivně označit vhodným radionuklidem, v této práci bylo použito  $^{90}\text{Y}$ . U připraveného komplexu  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn byla stanovena vazebnost na plazmatické bílkoviny u lidské, hovězí, králičí a potkaní plazmy. Ke stanovení vazebnosti byla použita metoda rovnovážné dialýzy při 37 °C. Získané výsledky byly porovnány s výsledky stanovení vazebnosti klinicky rutinně využívaného bifunkčního chelátu DTPA, značeného  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA).

Výsledky ukázaly, že plazmatická vazebnost těchto radioaktivně značených komplexů je nízká. Mezidruhové srovnání ukázalo, že hodnoty vazebnosti získané pro lidskou, hovězí a potkaní plazmu jsou srovnatelné, zatímco hodnoty vazebnosti u králičí plazmy jsou vyšší. Z výsledků lze říci, že vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn nebude, podobně jako  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, faktorem, který může výrazně ovlivnit jeho biologické chování.

## Interspecies comparison of plasma protein binding of two radiolabelled complexes

### Abstract

This paper engages in the newly prepared bifunctional chelate DTPA-oxn which has a potential use in radiolabelling biological macromolecules. The aim of the paper was to prepare a radiolabelled bifunctional chelate DTPA-oxn with a suitable radionuclide, the  $^{90}\text{Y}$  has been used. Binding of  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn to human, bovine, rabbit and rat plasma protein was determined. An equilibrium dialysis at  $37^\circ\text{C}$  was employed for the plasma protein binding determination. The received results received were compared with the results of plasma protein binding of a clinically routinely used bifunctional chelate DTPA radiolabelled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA).

The results showed a low plasma protein binding of these radiolabelled chelates. Interspecies comparison demonstrated that the results obtained for human, bovine and rat plasma are comparable, whereas those obtained for rabbit plasma are higher. This brings a conclusion that the binding of  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA to plasma protein is not a factor that can influence their biological behavior.

Tímto chci poděkovat všem, kdo mi pomohli při zpracování této diplomové práce,  
zejména PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc., za odborné vedení, ochotu,  
cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce.

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

<b>I. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>II. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Farmakokinetika .....</b>	<b>12</b>
1.1 Distribuce.....	12
1.1.1 Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny .....	13
1.1.2 Lidský sérový albumin.....	14
1.1.3 Kyselý $\alpha_1$ -glykoprotein (oromukosoid) .....	15
1.2 Stanovení vazebnosti.....	16
1.2.1 Rovnovážná dialýza .....	16
1.2.2 Mikrodialýza.....	17
1.2.3 Ultrafiltrace .....	18
1.2.4 Gelová filtrace .....	18
1.2.5 Vysokoučinná frontální analýza (HPFA).....	19
1.3 Eliminace .....	20
1.3.1 Metabolismus .....	20
1.3.2 Exkrece.....	20
<b>2. Nukleární medicína .....</b>	<b>21</b>
2.1 Radiofarmaka .....	21
2.1.1 Kontrola radiofarmaceutických přípravků .....	22
2.2 Radionuklidy .....	23
2.2.1 Zdroje radionuklidů.....	23
2.2.2 Technecium.....	24
2.2.3 Yttrium, lutecium.....	25
2.3 Bifunkční cheláty .....	27
<b>III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
<b>1. Použité materiály, přístroje a pomůcky.....</b>	<b>30</b>
<b>2. Metodika .....</b>	<b>32</b>
2.1 Stanovení radiochemické čistoty .....	32
2.2 Stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny.....	32
2.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu $^{99m}\text{Tc}$ .....	33

2.4 Výpočty .....	34
2.4.1 Výpočet radiochemické čistoty $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA.....	34
2.4.2 Výpočet vazebnostních parametrů .....	34
<b>3. Výsledky .....</b>	<b>35</b>
3.1 Experiment s $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA.....	35
3.2 Experiment s $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn .....	41
3.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu $^{99m}\text{Tc}$ .....	47
<b>IV. DISKUZE.....</b>	<b>50</b>
<b>V. ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>54</b>

# **I. ÚVOD A CÍL PRÁCE**



## ÚVOD

Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny je jedním z důležitých faktorů, který ovlivňuje jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku. Po podání léčiva do organismu dochází k jeho absorpci do krevního oběhu, kde se váže na krevní a tkáňové bílkoviny. U každého léčiva je jiný poměr mezi frakcí volnou a vázanou. Stanovení vazebnosti léčiva na plazmatické bílkoviny je předmětem farmakokinetickým výzkumů. [1,2]  
Principem stanovení vazebnosti je často ustanovení rovnováhy mezi frakcí volnou a vázanou, jedná se tedy o nepřímou metodu stanovení.

## CÍL PRÁCE

1. Vypracovat literární přehled o významu vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny a o významu vazebnosti pro jejich farmakokinetiku.
2. Nově připravený komplexan DTPA-oxn radioaktivně označit radionuklidem vhodným pro diagnostické nebo terapeutické použití a stanovit radiochemickou čistotu vzniklého komplexu.
3. U výše uvedeného komplexu určit jeho vazebnost na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání u čtyř živočišných druhů.
4. Dosažené výsledky porovnat s hodnotami získanými o klinicky rutinně využívaného komplexu  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA.

## **II. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1. FARMAKOKINETIKA

Farmakokinetika je součástí farmakologie, která se zabývá osudem léčiva v organismu, sleduje koncentraci léčiva, jež se mění v čase v různých místech organismu. Dělí se na tyto fáze: absorpce - vstřebání podané látky z místa aplikace do krevního oběhu, distribuce - přestup látky z krevního oběhu na místo účinku, metabolismus - chemická přeměna látky vedoucí ke snížení farmakologické aktivity a k usnadnění vylučování, exkrece - vyloučení látky z organismu. [1,2]

Radiofarmaka se většinou aplikují intravenózně, a proto je jejich biologické chování charakterizováno hlavně jejich distribucí, metabolizací a exkrecí. Absorpce je důležitá, jen pokud se radiofarmaka aplikují perorálně. Distribuce a eliminace závisí na průtoku krve, kapilární permeabilitě, nitrobuňčných reakcích, vazbě na krevní komponenty a řadě dalších faktorů. [3]

### 1.1 Distribuce

Distribuce je fází farmakokinetiky, kdy dochází k resorpci léčiva z krevního řečiště do tkání a orgánů. Distribuovaná léčiva mají snahu se v organismu rovnoměrně rozptýlit, tomu brání systém bariér a vazba na plazmatické struktury. Distribuce je ovlivněna mnoha faktory, jako je vazebnost léčiv na bílkovinné struktury, krevní průtok, objem krve, biologické bariéry.

Vazba léčiv na bílkovinné struktury ovlivňuje farmakokinetiku léčiv. Vazba může být vodíková, iontová, mohou ji tvořit i polární vazby. Pevnost vzniklého komplexu závisí na typu vazby. Tento faktor je důležitý, protože pouze volná (nenavázaná) frakce léčiva může přecházet z krve do tkání a pouze volná frakce léčiva může být vyloučena z organismu. Léčivo se může vázat na tyto typy struktur: plazmatické bílkoviny, krevní buňky, tkáňové bílkoviny, specifické receptory.

Průtok krve se udává v mililitrech za minutu. Rychlost prostupu léčiva do daného orgánu a rychlost ustanovení rovnováhy je určena průtokem krve. Do orgánů, které jsou silně prokrveny, léčivo prostupuje rychleji než do orgánů z nižším prokrvením. Při rychlé eliminaci léčiva z organismu bude jeho koncentrace v periférii nízká, na rozdíl od léčiva z pomalou eliminací. Při pomalé eliminaci léčiva může dojít k jeho kumulaci v méně prokrvených orgánech a ve tkáních periférie.

Pro biologickou dostupnost léčiv je významný objem krve. Často se vyjadřuje jako procento z celkové tělesné hmotnosti organismu. Podle velikosti prokrvení daného orgánu nebo tkáně bude růst koncentrace distribuovaného léčiva. V málo prokrvených periferních tkáních, s nízkým procentuálním podílem krve, bude koncentrace léčiva růst pomalu, naopak v silně prokrvených orgánech poroste rychleji.

Mezi biologické bariéry patří hematoencefalická bariéra, placentární bariéra, bariéra mezi krví a varletem. Tyto bariéry ovlivňují distribuci léčiv v organismu. Jsou různě složité, poskytují různě velkou ochranu před škodlivými látkami. Obsahují těsně spojené buňky, takže zabraňují mnoha látkám projít přes bariéru prostou difuzí. [1,2,4]

### **1.1.1 VAZBA LÉČIV NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY**

V plazmě se nacházejí tři základní typy proteinů: albumin, glykoproteiny - kyselý  $\alpha_1$  glykoprotein (více popsány dále) a lipoproteiny. Lipoproteiny významně vážou liposolubilní léčiva, z endogenních látek to jsou např. mastné kyseliny a liposolubilní vitamíny [5]. Plazmatické bílkoviny představují 66 - 85 g/l plazmy. Mezi úkoly plazmatických bílkovin patří humorální imunita, udržování onkotického tlaku, transport látek nerozpustných ve vodě a ochrana některých látek před odbouráním a vylučováním ledvinami. [6]

Téměř všechna léčiva přítomná v lidské plazmě se reverzibilně vážou na bílkoviny krevní plazmy. Tato interakce má několik výsledků. Vazba na bílkoviny zvětšuje rozpustnost v plazmě, zlepšuje transport k cílovým tkáním, což je důležité hlavně pro hydrofóbní, málo rozpustná léčiva. Vazbou se snižuje toxicita a navázaná sloučenina je chráněna před oxidací. Zásadně je také ovlivněn eliminační poločas léčiva. [7]

Vazba vzniká rychle, je reverzibilní, změna koncentrace volné frakce vyvolá změnu koncentrace navázané frakce. Léčiva mohou o vazebné místo na bílkovině soutěžit a navzájem se z vazby vytěsňovat, vazba je saturabilní povahy. V důsledku tohoto soutěžení může dojít ke zvýšení koncentrace vytěsněného léčiva, čímž dochází ke zvýšení jeho účinnosti a zároveň k rychlejšímu vylučování. [8] Významný a podstatný vliv však má pouze vysoká vazebnost, která dosahuje hodnot nad 90 %, dá se také říct, že významná a podstatná je volná frakce přesahující hodnotu 10 %. [9]

Množství faktorů může výrazně ovlivnit vazbu léčiv na bílkoviny krevní plazmy. Mezi tyto faktory patří stavy nemoci, jako je onemocnění ledvin, jater, štítné žlázy, dále je to těhotenství, ke změnám ve vazebnosti dochází rovněž u pediatrických a geriatrických

pacientů. Stanovení koncentrace nenavázané frakce léčiva může být při těchto klinických stavech podstatné pro určení individuálního dávkovacího režimu. [10]

### 1.1.2 LIDSKÝ SÉROVÝ ALBUMIN

Lidský sérový albumin je protein lidské plazmy, který slouží k vazbě, transportu a jako depo pro množství endogenních (např. mastné kyseliny, bilirubin) i exogenních sloučenin. Má velkou vazebnou kapacitu, sloučeniny se můžou na albumin vázat kovalentní i reverzibilní vazbou. Je to jednoduchý protein, má jeden řetěz, skládající se z 585 aminokyselin, obsahuje celkem 35 cysteinů, všechny kromě jednoho (který se často je podílí na kovalentní vazbě) jsou zapojeny do tvorby stabilizujících disulfidických můstků. Albumin obsahuje tři souhlasné domény (I-III), každá z nich se skládá ze dvou subdomén (A a B). Na subdoméně IIA a IIIA jsou dvě hlavní, léčiva vázající strany, označované jako strana I a II. Kromě těchto dvou stran má albumin několik dalších vazebných míst. Albumin má negativní náboj, ale je schopen vazby s negativně i pozitivně nabitými molekulami.

Strana I je formována jako kapsa na subdoméně IIA, byla popsána jako velká hydrofobní dutina. Typickými ligandy se zdají být dikarboxylové kyseliny a/nebo objemné heterocyklické sloučeniny s negativním nábojem, lokalizovaným uprostřed molekuly. Na tuto stranu se váže bilirubin, takže musí být velká. Je též flexibilní, protože váže sloučeniny s velice rozdílnými chemickými strukturami, a to s vysokou afinitou.

Strana II je lokalizována na subdoméně IIIA a obsahuje hydrofobní, rozvětvenou dutinu ve tvaru písmene T. Typickými ligandy této strany, nazvané též indolenbenzodiazepinová strana, jsou často aromatické karboxylové kyseliny negativně nabitě. Tato strana je menší, užší a méně flexibilní (vazba je často silně ovlivněna stereoselektivitou) než strana I. [11]

Protože albumin na limitované množství míst pro vazbu s vysokou afinitou, vazba jednoho léčiva může současně ovlivnit vazbu jiného léčiva. Informace o tom, jak se jednotlivá léčiva ovlivňují ve vazbě, jsou důležité, protože změna ve vazebnosti může měnit distribuční objem, clearance a eliminaci léčiv nebo ovlivnit jejich terapeutický efekt. Proto je užitečné vědět, na kterou stranu albuminu se léčivo bude vázat, čímž se dá ohodnotit velikost rizika plynoucího z potencionální interakce. Efekt této interakce může být menší, než se předpokládá, protože může dojít k novému

navázání na jinou stranu albuminu nebo na jiný typ proteinu. Zvýšení koncentrace volné frakce nemusí vždy znamenat komplikaci terapie, dá se toho využít, pokud chceme zvýšit biologický efekt léčiva. U radiofarmak tak dochází k rychlejší eliminaci látky z těla a ke snížení radiační dávky. [12]

Farmakokinetika léčiv, která se silně vážou na albumin, je ovlivněna koncentrací albuminu. Při snížené koncentraci albuminu (poruchy jater, nefrotický syndrom, špatný zdravotní stav) dochází ke změně farmakokinetiky, např. se zvyšuje koncentrace volné frakce léčiva, dochází k rychlejšímu vylučování z organismu. [8]

### **1.1.3 KYSELÝ $\alpha_1$ -GLYKOPROTEIN (OROSOMUKOID)**

Je to negativně nabitý glykoprotein, který obsahuje až 41 % sacharidů. Má v organismu několik funkcí, vážou se na něj léčiva, a to hlavně steroidy, patří mezi transportní proteiny, další z jeho funkcí se uplatní hlavně při patologických procesech. Působí jako projektivní faktor při infekci a proti toxinům, stimuluje některé buňky imunitního systému.

Kyselý  $\alpha_1$ -glykoprotein má několik vazebných míst, na která se mohou léčiva navázat. Vazbu léčiv na kyselý  $\alpha_1$ -glykoprotein ovlivňuje mnoho okolností, např. koncentrace ligandu a kyselého  $\alpha_1$ -glykoproteinu, pH, přítomnost dalšího ligandu soutěžícího o vazebné místo. Vliv má také věk, pohlaví, těhotenství, hormony, nemoci. [13]

## 1.2 STANOVENÍ VAZEBNOSTI

Stanovovaná terapeutická dávka pro většinu léčiv se udává jako celková koncentrace léčiva v krvi. Nicméně stanovení celkové koncentrace léčiva v krvi neposkytuje potřebné informace z hlediska terapeutického monitorování léčiv. Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny má významný vliv na množství aspektů farmakokinetiky a farmakodynamiky. A pouze volná frakce léčiva je farmakologicky aktivní. Proto určení volné frakce léčiva v krvi je základní pro terapeutické monitorování léčiv. [14]

K určování rozsahu vazby léčiv na plazmatické bílkoviny existuje celá řada metod. Ke stanovení vazebnosti na bílkoviny krevní plazmy se nejvíce používají tyto metody: mikrodialýza, rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody, výběr metody záleží na cíli práce a na chemických vlastnostech stanovované látky. [10,15]

### 1.2.1 ROVNOVÁŽNÁ DIALÝZA

Rovnovážná dialýza je nejvíce využívanou metodou ke stanovení vazebnosti. Rovnovážná dialýza využívá dialyzační komůrky, jež obsahují dva rezervoáry (do jednoho se umístí plazma, do druhého pufr), oddělené semipermeabilní membránou, která by měla být co nejtenčí. Pro běžné využití rovnovážné dialýzy se používají umělé membrány. Srovnání těchto membrán s membránami biologickými ukazuje, že přesnost obou metod je srovnatelná, výhodou biologických membrán je skutečnost, že čas potřebný k ustanovení rovnováhy je mnohem kratší, a proto lze považovat za více spolehlivé. [16] Rovnováha se ustanovuje při fyziologické teplotě těla 37 °C. Doba potřebná k ustanovení rovnováhy záleží na stanovovaném léčivu. Koncentrace léčiva po ustanovení rovnováhy v pufru je koncentrace nenavázaného léčiva  $C_U$ . Koncentrace léčiva po ustanovení rovnováhy v plazmě je celková koncentrace léčiva  $C_T$ . Koncentraci navázaného léčiva  $C_B$  je možno vypočítat jako rozdíl mezi  $C_T$  a  $C_U$ .

$$C_B = C_T - C_U$$

Frakci nenavázaného  $F_U$  a navázaného  $F_B$  léčiva lze vypočítat podle následujících rovnic.

$$F_B = C_B/C_T$$

$$F_U = C_U/C_T$$



Mezi výhody této metody patří její široká použitelnost a komerčně dostupný dialyzační aparát. Velkou předností je možnost kontroly teploty v dialyzačním bloku po celou dobu stanovení. Rovnovážná dialýza je využitelná jak pro malé, tak i pro velké objemy vzorků. Další výhodou je možnost stanovení několika vzorků najednou.

Nevýhodami jsou čas potřebný k dosažení rovnováhy a možnost degradace nestabilních proteinů během stanovení. Vliv na naměřené hodnoty má rovněž vazba léčiva na dialyzační blok nebo na membránu. Nepřesnost měření může též způsobit přestup tekutin do plazmy, který je způsoben osmotickým tlakem plazmatických proteinů. Tím dochází ke zředění plazmy. [10,15]

Dalším důležitým faktorem, který způsobuje nepřesnosti, je Donnanův efekt. Tento efekt ovlivňuje ustanovení rovnováhy na polopropustné membráně za přítomnosti koloidního elektrolytu. Pro aniont nebo kationt koloidní velikosti je membrána nepropustná a přítomnost náboje na jedné straně membrány ovlivňuje difuzi malých nabitých iontů. Výsledkem je nesterájná koncentrace malých nabitých iontů mezi roztoky oddělenými membránou. [10,17,18]

Nedávno bylo představeno zařízení pro rychlou rovnovážnou dialýzu (Pierce Biotechnology) v novém provedení, které nabízí možnost redukování doby stanovení a má vyšší výkonnost. [19]

### **1.2.2 MIKRODIALÝZA**

Mikrodialýza jako jediná metoda umožňuje stanovení in vivo, dovoluje stanovení koncentrace v plazmě, ve tkáních, v mozkomíšním moku a dalších tělních tekutinách. K měření se používá mikrodialyzační sonda, obsahující dialyzační membránu, kterou je třeba chirurgicky implantovat do cévy, tkáně nebo tělní tekutiny, kde sonda musí zůstat po celou dobu měření. Dialyzační pufr je pomalu pumpován přes sondu a nenavázané léčivo v krvi či tkáňové tekutině difunduje přes membránu do sondy podle koncentračního gradientu. Po stanovenou dobu se shromažďuje dialyzát a potom se určí koncentrace nenavázaného léčiva  $C_U$ . Tato metoda měří pouze nenavázanou frakci léčiva a neposkytuje informace o navázané frakci nebo o celkové koncentraci léčiva.

Mezi velké výhody této metody patří použitelnost in vivo. Toho se velmi využívá během základního výzkumu k měření průniku léčiva do specifických orgánů, tkání a do tělních tekutin.

K nevýhodám této metody patří to, že se sonda musí vložit do cévy, tkáně či tělní tekutiny. Vzorek ze sondy je sbírán delší dobu, během níž se mění koncentrace stanovované látky, hlavně pokud se jedná o léčiva s krátkým biologickým poločasem. Objem vzorku je poměrně malý, proto se k vyhodnocení musí použít citlivá analytická metoda. Výsledkem měření je koncentrace nenavázaného léčiva. [10,15, 20]

### 1.2.3 ULTRAFILTRACE

Ultrafiltrace je rychlá, účinná a jednoduchá metoda. Plazma obsahující léčivo se umístí do ultrafiltrační jednotky, která obsahuje filtr, přes který mohou přecházet pouze molekuly s nízkou molekulovou hmotností. Ultrafiltraci lze provést dvěma způsoby, a to centrifugací (negativní tlak) nebo pozitivním tlakem (přetlakem). Při filtrování vzorku plazmy se ultrafiltrát objevuje ve spodní části ultrafiltrační jednotky, ultrafiltrát obsahuje nenavázané léčivo  $C_U$ . [10,15]

Na rozdíl od rovnovážné dialýzy není u této metody třeba používat nefyziologický pufr, což určitě je výhodou. Mezi další přednosti patří rychlost, jednoduchost a účinnost.

Některé nevýhody ultrafiltrace jsou podobné jako u rovnovážné dialýzy, např. se jedná o navázání léčiva na membránu. Během stanovení dochází k růstu koncentrace bílkovin a tím k ovlivnění rovnováhy, proto by měl být čas ultrafiltrace co nejkratší. [14]

### 1.2.4 GELOVÁ FILTRACE

Tato metoda je založena na využití chromatografické kolony, jedná se tedy o chromatografickou metodu. Při chromatografii dochází k ustanovování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi.

Před vlastní chromatografií je nejprve zapotřebí saturovat vazebná místa bílkovin ve vzorku ligandem. Potom se vzorek nanese na kolonu a je eluován roztokem ligandu. Tím se udržuje rovnováha, aby nedocházelo k disociaci komplexu bílkovina-léčivo.

Gelová filtrace umožňuje měření rozsáhle se vážících léčiv v malém objemu plazmy. Její nevýhodou je složitost a časová náročnost. [14]

### 1.2.5 VYSOKOÚČINNÁ FRONTÁLNÍ ANALÝZA (HPFA)

Jde rovněž o chromatografickou metodu, která byla vyvinuta pro stanovení volné koncentrace léčiva na základě gelové filtrace.

Často se využívají stacionární reverzní fáze, jež umožňují stanovení bez předchozí úpravy vzorku. Roztok bílkovin s navázaným léčivem může být tedy přímo nanesen na kolonu. Po nanesení vzorku dochází k jeho zředění mobilní fází, což způsobí úplné uvolnění léčiva z vazby na bílkovinu. Léčivo proniká do mikropórů, kde dochází k jeho zadržování stacionární fází. Pokud pokračuje nanášení vzorku na kolonu (zvyšuje se objem vzorku a tím je potlačeno uvolňování léčiva z vazby), dochází v horních částech kolony k ustanovení rovnováhy. Rovnováha je mezi koncentrací léčiva v mikropórech stacionární fáze a volnou koncentrací léčiva v mobilní fázi v intersticiu (mimo póry). Koncentrace bílkovin je stejná jako koncentrace bílkovin v prvním roztoku, to znamená, že volná koncentrace léčiva je taky stejná. Po ukončení nanášení vzorku dochází k eluování nenavázaného léčiva mobilní fází.

Mezi výhody patří možnost přímé aplikace vzorku na kolonu, která může být plně automatizována, nedochází k absorpci léčiva na membránu ani k Donnanovu efektu, současně je možné stanovení volné i vázané koncentrace léčiva, při využití chirální kolony lze stanovit volnou koncentraci jednotlivých enantiomerů. [14]

### **1.3 ELIMINACE**

Při eliminaci dochází k odstraňování léčiva z organismu na základě metabolismu a exkrece. Rychlost eliminace je závislá na obou těchto pochodech. Výkonnost eliminačních orgánů se hodnotí pomocí farmakokinetického parametru – clearance. Clearance je objem plazmy, který se ireverzibilně očistí od dané látky za jednotku času. [1,2]

#### **1.3.1 METABOLISMUS**

Jedná se o chemickou přeměnu molekuly léčiva, která se též označuje jako biotransformace. Při této chemické přeměně dochází ke zvýšení polaritě léčiva, čímž se usnadňuje druhá fáze eliminace – exkrece. Během metabolické přeměny léčiv dochází k chemické změně molekuly léčiva a tato změna vede k několika typům látek: látky s redukovanou farmakologickou aktivitou, látky s přibližně stejnou farmakologickou aktivitou, látky s výrazně vyšší farmakologickou aktivitou – proléčiva. Proléčiva jsou látky podané v neaktivní formě, jejich farmakologická aktivita se projeví až po metabolizaci.

Metabolismus léčiv se dělí na dvě fáze. V první fázi probíhají různé reakce, jako je oxidace, redukce, hydrolýza, a tato fáze se označuje jako nesyntetická. Druhá fáze je fáze syntetická, kdy dochází ke konjugaci s endogenní molekulou (např. kyselinou glukuronovou, sulfátem, glycinem a dalšími). [1,2]

#### **1.3.2 EXKRECE**

Exkrece může probíhat na několika místech organismu. Mezi hlavní exkreční mechanismy patří renální a biliární exkrece a exkrece plícemi. Při renální exkreci dochází k vylučování léčiv několika mechanismy, mezi něž patří glomerulární filtrace a aktivní tubulární sekrece. Kromě vylučování dochází ke zpětné tubulární reabsorpci a k pasivní zpětné difuzi. [1]

Membrána glomerulu v ledvinách, kde probíhá glomerulární filtrace, dovolí projít pouze molekulám do určité velikosti. Léčiva navázaná na bílkoviny krevní plazmy nemohou přes tuto membránu projít. Podle provedených studií, po aplikaci některých radiofarmak, např. peptidových, lze lokalizovat radioaktivitu v ledvinách. Proto bylo vytvořeno několik strategií, které redukují tuto renální radioaktivitu. [21]

## 2. NUKLEÁRNÍ MEDICÍNA

Je samostatným lékařským oborem, který se zabývá aplikacemi radiofarmak pro diagnostické a terapeutické účely. Diagnostické metody se v nukleární medicíně rozdělují na vyšetření in vivo a in vitro. Při vyšetřeních in vivo se do těla aplikují radiofarmaka a neinvazivním způsobem se studují fyziologické a biochemické procesy v těle, lokalizují se a diferencují patologické změny. Vyšetření in vitro zahrnuje metody (radiosaturační analýza, radioimunoanalýza), jež využívají radioaktivních látek ke stanovení koncentrace např. hormonů nebo protilátek v krvi.

Pro diagnostiku jsou nezbytné zářiče gama. Gama záření je záření pronikavé, které se v těle jen částečně absorbuje. Lze ho registrovat pomocí přístrojů se scintilačními detektory. Pro terapii maligních a benigních onemocnění nebo pro paliativní terapii se používají zářiče beta. Beta záření má ve tkáni dosah jen několik mm, prakticky veškerá jeho energie se absorbuje v cílovém ložisku, event. ložiscích. Oba typy zářičů se aplikují v podobě otevřených zářičů (roztoků). [3]

### 2.1 RADIOFARMAKA

Radiofarmaka jsou léky obsahující chemické nebo biologicky aktivní látky, jejichž účinnou složkou je radionuklid, který je zdrojem ionizujícího záření. Obsahují vždy jeden záměrně včleněný radionuklid, který je určen svým poločasem přeměny a dále druhem a energií záření. Radionuklidy používané pro účely nukleární medicíny se připravují uměle ve speciálních zařízeních, a to v cyklotronu nebo v jaderném reaktoru, jež patří mezi primární zdroje radionuklidů. Při přípravě se využívá vhodná, uměle vyvolaná jaderná reakce. Významný je i sekundární zdroj radionuklidů, tvořený tzv. radionuklidovými generátory. V nich vzniká samovolnou radioaktivní přeměnou z mateřského prvku prvek dceřiný. [22]

Diagnostická radiofarmaka se používají ve velmi nízké koncentraci a nemají žádný farmakologický efekt. Převážně jde o kovové komplexy s organickými cheláty, mohou to být i organické molekuly s připojeným nekovovým radionuklidem, jako je  $^{18}\text{F}$  a  $^{125}\text{I}$ .

Terapeutická radiofarmaka jsou navržena tak, aby doručila terapeutickou dávku ionizujícího záření do oblasti onemocnění. Mezi hlavní překážky patří použitelnost terapeutických izotopů a technika jejich specifické lokalizace v nemocné tkáni, jako je nádor. Terapeutickou dávku záření lze doručit třemi různými cestami: externím ozářením, implantátem nebo systémovým podáním. Ideálně by měla terapeutická

radiofarmaka doručit do místa nádoru vhodnou cytotoxickou radiační dávkou pro buňky nádoru a ve stejnou dobu se co nejrychleji vyloučit z krve a zdravých orgánů, aby riziko poškození zdravé tkáně bylo co nejmenší.

Receptorově specifická radiofarmaka jsou založená na tom, že se na receptor v nemocné tkáni váže radioaktivně značený receptorový ligand. Tato radiofarmaka se často skládají z těchto čtyř částí: cílové biomolekuly (tvořené ligandem, který se váže na receptor, např. peptid), chelatační látky, radionuklidu a článku, který může modifikovat farmakokinetiku (např. mění hydrofilitu radiofarmaka a tím ovlivňuje jeho clearance). [23]

### 2.1.1 KONTROLA RADIOFARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVKŮ

Stejně jako všechna ostatní léčiva musí i radiofarmaka splňovat určité požadavky na kvalitu. Protože obsahují radioaktivní prvek, vedle standardních zkoušek se stanovuje radioaktivita a ověřuje se radionuklidová a radiochemická čistota.

Radionuklidová čistota je poměr radioaktivity daného radionuklidu a celkové radioaktivity radiofarmaka, vyjádřený v procentech (Český lékopis 2005).

Radiochemická čistota je poměr radioaktivity daného radionuklidu přítomného v radiofarmaku v určité chemické formě a celkové radioaktivity tohoto radionuklidu, vyjádřený v procentech (Český lékopis 2005). Ke kontrole lze použít jakoukoliv analytickou separaci, nečastěji se používají chromatografické metody. [24]

Při chromatografických metodách dochází k rozdělování stanovovaných látek mezi dvě fáze - jedna je stacionární (nepohyblivá), druhá mobilní (pohyblivá). V průběhu chromatografického procesu dochází k ustanovování rovnováhy stanovovaných látek mezi stacionární a mobilní fází, k separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek k těmto fázím. [25]

Ke kontrole radiofarmak se často používá chromatografie na rychle se vyvíjejících tenkých vrstvách, vyvinutí chromatogramu trvá jen několik minut.

Ke kontrole radiofarmak značených  $^{99m}\text{Tc}$  se používají dvě vyvíjecí soustavy: soustava organická (aceton, ethanol, methylethylketon) a vodná fáze. Při vyvíjení chromatogramu v organickém prostředí dochází k oddělení  $^{99m}\text{Tc}$  ve formě technecistanu (je unášen mobilní fází k čelu chromatogramu) od komplexů  $^{99m}\text{Tc}$  (zůstávají na startu spolu s redukováným hydrolyzovaným techneciem). Při použití vodné fáze se komplex  $^{99m}\text{Tc}$  a technecistan (putují k čelu) odděluje od redukováného

hydrolyzovaného technecia (zůstává na startu chromatogramu). Po usušení chromatogramu se detekuje rozložení aktivity na chromatogramu pomocí vhodných přístrojů. [22]

## 2.2 RADIONUKLIDY

Výběr nejvhodnějšího radionuklidu pro přípravu radiofarmak k diagnostickým i terapeutickým účelům záleží na jeho fyzikálních a chemických vlastnostech.

Radionuklidy pro diagnostiku jsou gama zářiče pro SPECT a pozitronové zářiče pro PET. V generátoru vyprodukované radionuklidy jsou ideální, protože dceřiný radionuklid se dá jednoduše oddělit od mateřského pomocí iontově výměnné chromatografie. Jsou to např.  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{61,62}\text{Cu}$ .

Při výběru radionuklidu pro terapii je třeba zvážit několik faktorů: absorpci a retenci v nádorové tkáni, clearance, poločas, aktivitu, dostupnost, kvalitu a ekonomicky výhodnou možnost produkce ve velkém měřítku. Radiochemická čistota radionuklidu musí být dostatečná a reproduktivní, nečistoty (hlavně radionuklidové nečistoty) mohou ovlivnit značení a radiochemickou čistotu radiofarmak. Jsou to např.  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ . [23]

### 2.2.1 ZDROJE RADIONUKLIDŮ

Mezi zdroje radionuklidů pro využití v nukleární medicíně patří cyklotron a jaderný reaktor, jež jsou primárními zdroji, a dále radionuklidový generátor, který je sekundárním zdrojem.

V jaderném reaktoru lze připravit radionuklidy dvěma způsoby. Za prvé, ozáření terčového materiálu neutrony v reaktoru, jež vyvolávají jaderné reakce, např.  $^{99}\text{Mo}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{32}\text{P}$ . Dále se mohou radionuklidy izolovat ze štěpných produktů, např.  $^{99}\text{Mo}$ ,  $^{131}\text{I}$  aj. Produkce v reaktoru je poměrně levná, protože je možné ozařovat velké množství materiálu.

V cyklotronu neboli v urychlovači nabitých částic se vhodný terčový materiál ozařuje protony, deuterony, částicemi alfa, vznikají např.  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ . Výroba v cyklotronu je nákladnější než výroba v reaktoru. Na pracovištích nukleární medicíny lze využít tzv. lékařských cyklotronů. Uplatňují se při přípravě pozitronových zářičů

s velmi krátkým poločasem, např.  $^{11}\text{C}$  s poločasem přeměny 20 min.,  $^{13}\text{N}$  s poločasem přeměny 2 min.,  $^{18}\text{F}$  s poločasem přeměny 110 min.

Radionuklidové generátory (např.  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{81}\text{Rb}/^{81\text{m}}\text{Kr}$ ,  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ ) se využívají na pracovištích nukleární medicíny. Jsou založeny na existenci dvojice radioaktivních prvků, kde se mateřský radionuklid přeměnou  $\beta^-$  nebo elektronovým záchytem mění na dceřiný radionuklid. Radionuklidový generátor  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  je tvořen kolonkou ze skla, která obsahuje oxid hlinitý s adsorbovaným molybdenem amonným. Při přeměně  $^{99}\text{Mo}$  vzniká  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , který se ve formě technecianu  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  z kolonky odloučí promytím generátoru sterilním fyziologickým roztokem (tomuto promytí se říká eluce). Použitelnost generátoru závisí na výchozí aktivitě, většinou je to přibližně 14 dní. [3,22]

### 2.2.2 TECHNECIUM

Vlastnosti  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  jsou ideální pro diagnostická radiofarmaka – energie záření je 140 keV, poločas přeměny je 6 hodin.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se získává z  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generátoru, poločas přeměny Mo je 67 hodin, takže je možné generátor využívat na pracovištích nukleární medicíny a mít jednoduchý přístup k  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  s krátkým poločasem přeměny. Technecium patří do sedmé vedlejší skupiny, může existovat v oxidačním stavu od -1 až +7, pro radiofarmaka jsou nejdůležitější oxidační stavy +5, +3, +1. Oxidační stav +5 je nejlépe dosažitelný pouze jednoduchým redukováním ze stavu +7, v němž se Tc získává z generátoru jako  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ . [26]

Kvůli krátkému poločasu přeměny  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  je třeba pro radiofarmaka značená  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  vytvořit kit. Kit je sterilní, nepyrogenní a neradioaktivní směs, připravená lyofilizací ve skleněných lahvičkách. Kit obsahuje komplex tvořený z biomolekuly (která zajistí specifické doručení radionuklidu do místa určení) a chelatační látky, redukčního činidla, pokud to je nezbytné. Složky kitu jsou často rozpuštěny v pufru, používaném pro kontrolu pH během procesu radioaktivního značení. Kity mohou obsahovat i další složky (antioxidanty, solubilizační látky), které jsou přítomné kvůli zlepšení stability  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  značených radiofarmak.

Existuje velké množství technik značení  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Výběr metody závisí na biomolekule a na záměru studie (důkaz koncepce nebo vývoj výrobku). Tyto metody můžeme rozdělit do třech hlavních skupin. První skupina používá přístup přímého značení. Obvykle se využívají redukční látky, jež redukují disulfidické můstky na volné thioly.



Volné thioly mohou silně vázat Tc. Tento postup je jednoduše proveditelný, ale použitelný pouze u molekul obsahujících disulfidické můstky. Druhou skupinu technik značení představuje postup, při němž nejdříve vzniká komplex radionuklidu s chelatační látkou. Teprve potom dochází ke spojení tohoto komplexu s biomolekulou v odděleném kroku. Tento postup má lépe definovanou chemii (jako je oxidační stav Tc, počet vazeb Tc) a biomolekula není vystavena podmínkám chelatace, které jsou někdy velmi drsné. Třetí skupinu technik značení reprezentuje postup, který se někdy označuje jako nepřímé značení. Spočívá v tom, že nejdříve dochází k vytvoření komplexu mezi biomolekulou a chelatační látkou a teprve potom se může značení dokončit přímou redukcí  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  v přítomnosti komplexu biomolekuly a chelatační látky.

Nepřímé značení lze provést několika způsoby. Jedním z nich je přímá redukce, kdy dochází k přímé redukcí  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  v přítomnosti komplexu biomolekuly a chelatační látky. Podmínky potřebné při této reakci jsou dány krátkým poločasem  $^{99m}\text{Tc}$ , nízkou koncentrací  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  a chemickou stabilitou komplexu. Tato reakce obecně produkuje směs redukovaných forem  $^{99m}\text{Tc}$ , tento komplex  $^{99m}\text{Tc}$ -biomolekula-chelatační látka může být připraven jako převládající produkt výběrem redukčního činidla a chelatační látky při kontrolovaných podmínkách reakce. Pouze několik redukčních látek lze použít k redukcí u komerčně vyráběných kitů. Nejčastěji se využívá Sn (+2) díky jeho rychlé redukční kinetice. [23]

### 2.2.3 YTTRIUM, LUTECIUM

$^{90}\text{Y}$  je radionuklid, který je produkován v generátoru. Vzniká rozkladem  $^{90}\text{Sr}$ , takže se jedná o  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  generátor.  $^{90}\text{Y}$  vyzařuje vysoce energetické beta záření, které se využívá pro terapii. Jeho poločas je 64 hodin, což je dostatečně krátká doba na to, aby dosáhl svého cíle v organismu a zároveň dostatečně dlouhá doba na to, aby radiofarmakum mohlo být vyrobeno, transportováno a doručeno pro klinické využití.  $^{90}\text{Y}$  je velmi vhodné pro rozvoj receptorově specifických radiofarmak pro terapeutické účely.

$^{177}\text{Lu}$  vyzařuje beta a gama záření, používá se pro terapeutické účely. Poločas přeměny je 144 hodin, což je 6,75 dnů.  $^{177}\text{Lu}$  se připravuje v jaderném reaktoru. Jedna z metod přípravy  $^{177}\text{Lu}$  zahrnuje ozáření  $^{176}\text{Lu}$  v reaktoru. Příprava  $^{177}\text{Lu}$  touto metodou je vysoce výnosná, s dobrou aktivitou a za nízkou cenu.

Lutecium patří mezi lanthanoidy, velmi podobné této skupině 14 chemických prvků je i yttrium. Kvůli podobnému náboji, iontovému průměru a koordinační chemii se yttrium často pokládá za „pseudo-lanthanoid“.

Bifunkční chelát vhodný pro lanthanoidy a  $^{90}\text{Y}$  musí splňovat několik podmínek. Musí tvořit komplex s vysokou termodynamickou stabilitou a kinetickou netečností. Kinetická netečnost určuje velikost disociace radionuklidu z komplexu s chelátem, např. komplexy s makrocyclickým chelátem jsou mnohem více kineticky netečné oproti komplexům s DTPA. Ionty Y a lanthanoidů jsou velké a potřebují 8 - 9 donorových atomů, proto většina bifunkčních chelátů vhodných pro tyto radionuklidy obsahuje aspoň osm donorových atomů. DOTA a její deriváty jsou zvláště užitečné pro terapeutická radiofarmaka značená  $^{90}\text{Y}$  a lanthanoidy. Makrocyclická kostra tvořená DOTA kolem radionuklidu je dobře uspořádaná tak, že tvoří komplexy s extrémně vysokou stabilitou a kinetickou netečností, což se považuje za velkou výhodu. Na druhou stranu kinetika radioaktivního značení komplexu DOTA a biomolekuly je pomalá a závisí na okolních podmínkách, jako je koncentrace DOTA-biomolekula, pH, teplota reakce, doba zahřívání a další. Radioaktivní značení při pokojové teplotě je velmi pomalé, a proto je kvůli úspěšnému radioaktivnímu označení potřebné zahřívání na vyšší teplotu ( $> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

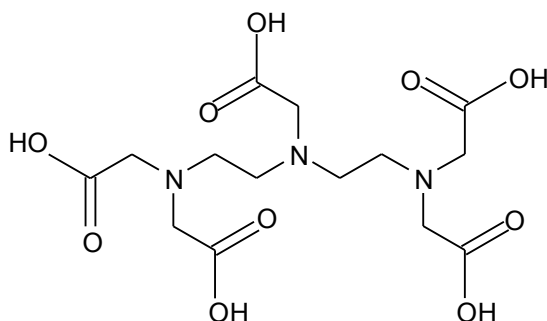
Obecně zde existují tři přístupy, jimiž lze připojit biomolekulu na bifunkční chelát, které jsou zde pro příklad popsány s DOTA. První přístup připojení biomolekuly je na jeden z uhlíkových atomů makrocyccku. Druhý přístup připojení biomolekuly je na jedno ze čtyř chelatačních ramen, tvořených kyselinou octovou. Při třetím přístupu připojení je biomolekula konjugována opět s jedním ze čtyř acetylů za vzniku této vazby CO-NH.

[23]

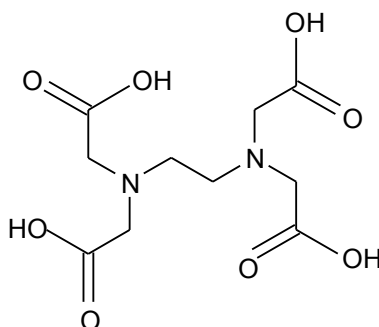
## 2.3 BIFUNKČNÍ CHELÁTY

Užitečné a prospěšné využití kovových radionuklidů si vyžádalo rozvoj chelatačních látek. Byly označeny jako „bifunkční cheláty“, protože jednak mohou vázat kovový radionuklid, jednak poskytují chemicky reaktivní funkční skupinu. Komplex radionuklidu a chelátu musí být dostatečně stabilní. Pouze dostatečně stabilní komplexy se dají prakticky využít, protože výsledek ztráty nebo disociace radionuklidu je spojen s toxicitou v případě využití pro terapii a se špatnou zobrazovací kvalitou v případě využití pro diagnózu.

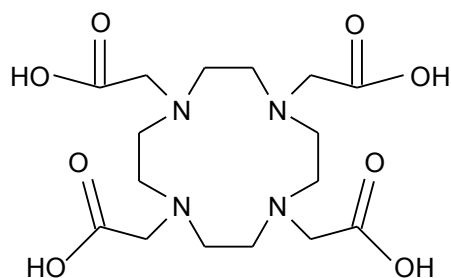
Radionuklidy se liší svými vlastnostmi a koordinační chemií, proto neexistuje žádný bifunkční chelát, který by byl vhodný pro všechny radionuklidy. Mezi bifunkční cheláty patří ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina (DOTA). Koordinační číslo těchto sloučenin je 6-8. DOTA je makrocyclický chelát s 12členným kruhem, dále existuje několik dalších makrocyklických chelátů, jejichž kruh je ještě větší. Je to např. TETA s 14členným kruhem, která tvoří stabilní komplexy s radionuklidy mědi, PEPA s 15členným kruhem a HEHA s 18členným kruhem.



Obr. 1 DTPA - diethylentriaminpentaoctová kys.



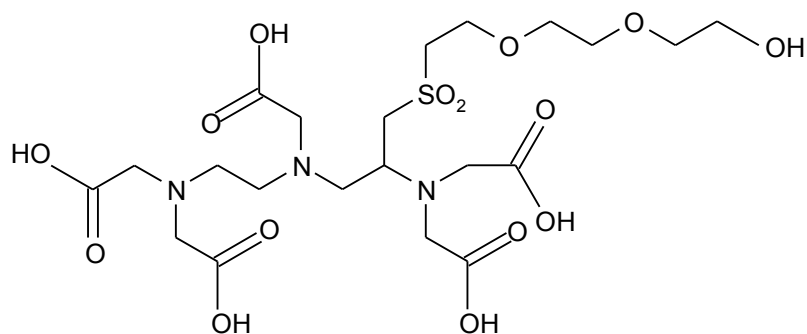
Obr. 2 EDTA - ethylendiamintetraoctová kys.



Obr. 3 DOTA - 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina

Další cheláty jsou odvozovány od těchto základních sloučenin. Bifunkčních chelátů existuje celá řada a stále vznikají nové. Základní struktura většinou zůstává stejná nebo je podobná, k obměnám dochází v postranním řetězci. [27]

Při vypracovávání této diplomové práce byl použit nový bifunkční chelát DTPA-oxn. V rámci provedených experimentů (popsaných v experimentální části) byla stanovena vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn na bílkoviny krevní plazmy.



Obr. 4 DTPA-oxn

### **III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

# 1. POUŽITÉ MATERIÁLY, PŘÍSTROJE A POMŮCKY

## Biologický materiál

Při experimentech byla použita plazma čtyř živočišných druhů:

- Plazma lidská – odebraná zdravému dárci, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Plazma hovězí – heparinizovaná krev, dodaná společností LabMediaServis, s. r. o., centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Plazma králičí – heparinizovaná krev, odebraná králíkovi plemene Český albín, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Plazma potkaní – heparinizovaná krev, odebraná potkanovi kmene Wistar, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.

## Testované látky

- Komplex  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA

Pro přípravu komplexu byl použit DTPA kit pro přípravu injekce, výroba ÚJV Řež. Jedna lahvička kitu obsahuje sterilní komponenty v lyofilizované formě, a to 10,00 mg DTPA a 0,45 mg  $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . K obsahu lahvičky byl přidán 1 ml sterilního eluátu z generátoru technecia o aktivitě 638 MBq na 10 ml zředěný 2 ml sterilního izotonického roztoku NaCl.

- Komplex  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn

DTPA-oxn je chelát, připravený a dodaný firmou Azacykles, s. r. o., Vitry. Jedná se o bifunkční chelát, jehož cílem je komplexace vybraných kovových radionuklidů a jejich vazba na biologické makromolekuly.

Pro přípravu komplexu se použil ligand DTPA-oxn, z něhož byl připraven roztok o koncentraci 1 mg na 1 ml. 6  $\mu\text{l}$  roztoku ligandu se přidalo k 20  $\mu\text{l}$  pufru o pH 5,5 a potom se přidalo 0,1  $\mu\text{l}$  izotopu  $^{90}\text{Y}$ . Před provedením experimentu byl komplex zředěn 100  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru o pH 7,41.

### **Látky pro stanovení radiochemické čistoty**

- Pro stanovení radiochemické čistoty  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA byly potřeba dvě chromatografické soustavy – jedna s ethanolem a druhá s 0,9% roztok NaCl.
- Pro stanovení radiochemické čistoty  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn byl použit jako chromatografická soustava pufr o pH 6,5.
- Chromatografický papír ITLC SG (Silica Gel Impregnated Glass Fibre Sheets) Gelman Sciences Inc.
- Radiochromatograf Automatic TLC – Linear Analyzer, BERTHOLD.

### **Další pomocné látky**

Pufr o pH 7,41, připravený ze dvou dílů roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,9075 g/100 ml) a z osmi dílů  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2,39 g/100 ml) – použit pro rovnovážnou dialýzu.

## 2. METODIKA

### 2.1 Stanovení radiochemické čistoty

Pro kontrolu radiochemické čistoty jsem použila chromatografii na tenké vrstvě (TLC) s pomocí chromatografického papíru ITLC SG.

U komplexu  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  jsem jeden vzorek v množství 10  $\mu\text{l}$  nanasla na start automatickou pipetou a po vysušení vyvíjela v 0,9% roztoku NaCl a druhý v ethanolu. Po vysušení jsem chromatogramy vyhodnotila na přístroji Automatic TLC – Linear Analyzer a radiochemickou čistotu vypočítala podle vzorce. Při chromatografii v 0,9% roztoku NaCl putuje komplex  $^{99m}\text{Tc}$  a  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  s čelem mobilní fáze a redukované hydrolyzované technecium zůstává na startu. Při vyvíjení v ethanolu putuje s čelem mobilní fáze  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , zbytek zůstává na startu.

U komplexu  $^{90}\text{Y-DTPA-oxn}$  jsem vzorek v množství 10  $\mu\text{l}$  nanasla na start automatickou pipetou, nechala vysušit a potom vyvinout v pufru o pH 6,5. Po vysušení jsem chromatogram vyhodnotila na přístroji Automatic TLC – Linear Analyzer.

### 2.2 Stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny

Plazmatickou vazebnost jsem stanovila metodou rovnovážné dialýzy. Základem je použití dialyzačního bloku, jehož součástí jsou dva kotouče z umělé hmoty. V každém kotouči je osm dialyzačních komůrek, tyto kotouče do sebe zapadají. Při skládání dialyzačního bloku se mezi tyto dva kotouče vkládá vhodná semipermeabilní membrána (celofán). Připravený blok se naplní vzorky. Objem 0,45 ml plazmy byl vždy dialyzován proti stejnému objemu fosfátového pufru o pH 7,41 přes semipermeabilní celofánovou membránu. Každým druhem plazmy jsem vždy naplnila čtyři komůrky. Stanovení se provádí ve vytemperovaném termostatu při 37 °C a během stanovení dialyzační blok rotuje. V průběhu stanovení dochází k ustanovení rovnováhy mezi obsahy jednotlivých komůrek. Doba potřebná k ustanovení rovnováhy se liší podle velikosti molekuly.

U experimentu s komplexem  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  a  $^{90}\text{Y-DTPA-oxn}$  byl postup vždy stejný, do 2,5 ml každé ze čtyř živočišných druhů plazmy jsem přidala 25  $\mu\text{l}$  komplexu a naplnila dialyzační blok. Po 4 hodinách jsem odpipetovala z každého vzorku 2krát 100  $\mu\text{l}$  plazmy a pufru do označených měřicích lahvíček a změřila aktivitu na automatickém gama counteru WALLAC. Z každého živočišného druhu jsem stanovila 8 vzorků.



### 2.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu $^{99m}\text{Tc}$

V experimentu s komplexem  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA jsem jako izotop použila  $^{99m}\text{Tc}$ , proto jsem při experimentu s DTPA-oxn chtěla použít stejný izotop  $^{99m}\text{Tc}$ . Provedla jsem čtyři pokusy o naznačení DTPA-oxn pomocí  $^{99m}\text{Tc}$ . V každém z těchto pokusů jsem použila různá množství pufru, ligandu, izotopu a redukčního činidla. Redukční činidlo bylo připraveno různými způsoby.

1) pufr pH 5,5 – 100  $\mu\text{l}$ ; ligand DTPA-oxn (1 g/1 ml) – 100  $\mu\text{l}$ ; izotop  $^{99m}\text{Tc}$  – 100  $\mu\text{l}$ ; redukční činidlo (chlorid cínatý 20  $\mu\text{l}$ , fyziologický roztok 2 ml)

2) pufr pH 5,5 – 50  $\mu\text{l}$ ; ligand DTPA-oxn (1 g/1 ml) – 300  $\mu\text{l}$ ; izotop  $^{99m}\text{Tc}$  – 0,5 ml; redukční činidlo (chlorid cínatý/fyziologický roztok – 1 g/1 ml)

3) pufr pH 5,5 – 50  $\mu\text{l}$ ; ligand DTPA-oxn (1 g/1 ml) – 100  $\mu\text{l}$ ; izotop  $^{99m}\text{Tc}$  – 0,5 ml; redukční činidlo (chlorid cínatý – 0,01089 g a 0,1 mol/l HCl – 1,085 ml) – 10  $\mu\text{l}$

4) ligand DTPA-oxn (1 g/1 ml) – 100  $\mu\text{l}$ ; izotop  $^{99m}\text{Tc}$  – 0,5 ml; redukční činidlo (chlorid cínatý – 0,01089 g a 0,1 mol/l HCl – 1,085 ml) – 50  $\mu\text{l}$

Ani u jednoho z provedených pokusů nebylo dosaženo požadované radiochemické čistoty (použity dvě chromatografické soustavy – jedna s ethanolem a druhá s 0,9 % roztokem NaCl). Proto se tento komplex nemohl použít pro experiment stanovení vazebnosti.

## 2.4 Výpočty

### 2.4.1 Výpočet radiochemické čistoty $^{99m}\text{Tc-DTPA}$

Oba chromatogramy jsem rozdělila na dvě poloviny, z každého chromatogramu byly změřeny dvě hodnoty aktivity:

$A_{1d}$  – aktivita startu v 0,9% NaCl,  $A_{2d}$  – aktivita startu v ethanolu

$A_{1h}$  – aktivita čela v 0,9% NaCl,  $A_{2h}$  – aktivita čela v ethanolu

V 1. chromatografické soustavě (0,9% roztok NaCl) je množství koloidu dáno vztahem:

$$\% \text{ koloidu} = A_{1d} / (A_{1d} - A_{1h}) \times 100$$

Ve 2. chromatografické soustavě (ethanol) je množství volného  $\text{TcO}_4^-$  dáno vztahem:

$$\% \text{ TcO}_4^- = A_{2h} / (A_{2d} - A_{2h}) \times 100$$

Výsledná radiochemická čistota je dána množstvím komplexu  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  (vyjádřeno v procentech):

$$\% \text{ komplexu} = 100 - \% \text{ koloidu} - \% \text{ TcO}_4^-$$

### 2.4.2 Výpočet vazebnostních parametrů podle práce Wright a spolupracovníků [10]

$C_U$  – aktivita v pufru, resp. koncentrace volného léčiva

$C_T$  – aktivita v plazmě, resp. celková koncentrace léčiva

$C_B$  – koncentrace vázaného léčiva

$$C_B = C_T - C_U$$

$F_B$  – frakce vázaného léčiva

$$F_B = C_B / C_T = (C_T - C_U) / C_T$$

$F_U$  – frakce volného léčiva

$$F_U = C_U / C_T$$

Průměrné výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1 Experiment s $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA

- Stanovení radiochemické čistoty

Stanoveno tenkovrstvou chromatografií na ITL-SG ve dvou soustavách (0,9% roztok NaCl, ethanol), jež dovolují kvantifikovat podíl radiochemických nečistot, a to koloidu  $^{99m}\text{Tc}$  (0,9% roztok NaCl) a technecistanu (ethanol).

$$A_{1d} = 1589,0 \quad A_{1h} = 343697,8 \quad A_{2d} = 649050,1 \quad A_{2h} = 158,6$$

$$\% \text{ koloidu} = A_{1d} / (A_{1d} - A_{1h}) \times 100 = 1589,0 / (1589,0 - 343697,8) \times 100 = 0,46 \%$$

$$\% \text{ TcO}_4^- = A_{2h} / (A_{2d} - A_{2h}) \times 100 = 158,6 / (649050,1 - 158,6) \times 100 = 0,024 \%$$

$$\% \text{ komplexu} = 100 - \% \text{ koloidu} - \% \text{ TcO}_4^- = 100 - 0,46 - 0,024 = 99,51 \%$$

**Radiochemická čistota připraveného komplexu je 99,51%.**

- Stanovení vazebnosti komplexu  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na bílkoviny krevní plazmy

Metoda stanovení: rovnovážná dialýza při 37 °C po dobu 4 hodin.

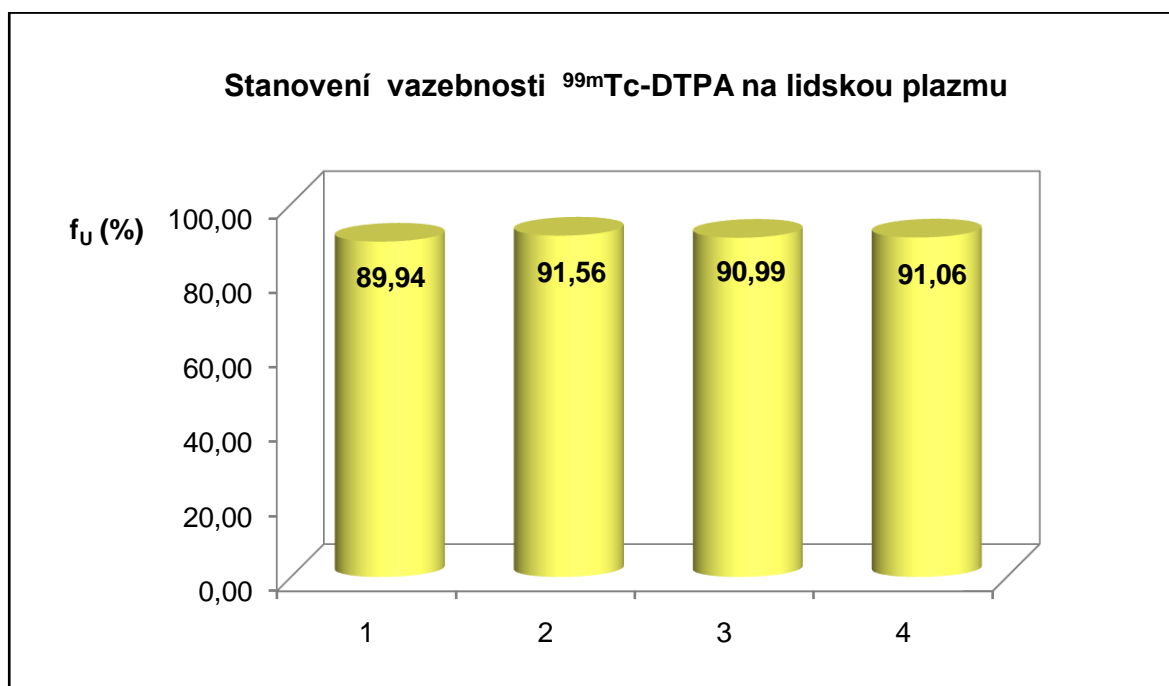
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

Výsledky pro jednotlivé živočišné druhy jsou uvedeny v tabulkách 1 – 4 a na grafech 1 – 4, souhrnně pak v tabulce 5 a na grafu 5.

**Tabulka 1 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	278362,8	254807,0		
1A	290680,2	257015,5		
Průměr	<b>284521,5</b>	<b>255911,3</b>	<b>89,94</b>	10,06
2	260206,3	246186,5		
2A	277441,2	246094,5		
Průměr	<b>268823,8</b>	<b>246140,5</b>	<b>91,56</b>	8,44
3	259421,2	240065,6		
3A	270799,8	242378,3		
Průměr	<b>265110,5</b>	<b>241222,0</b>	<b>90,99</b>	9,01
4	259906,4	242302,1		
4A	274167,6	244026,9		
Průměr	<b>267037,0</b>	<b>243164,5</b>	<b>91,06</b>	8,94
Průměr			<b>90,89 ± 0,34</b>	

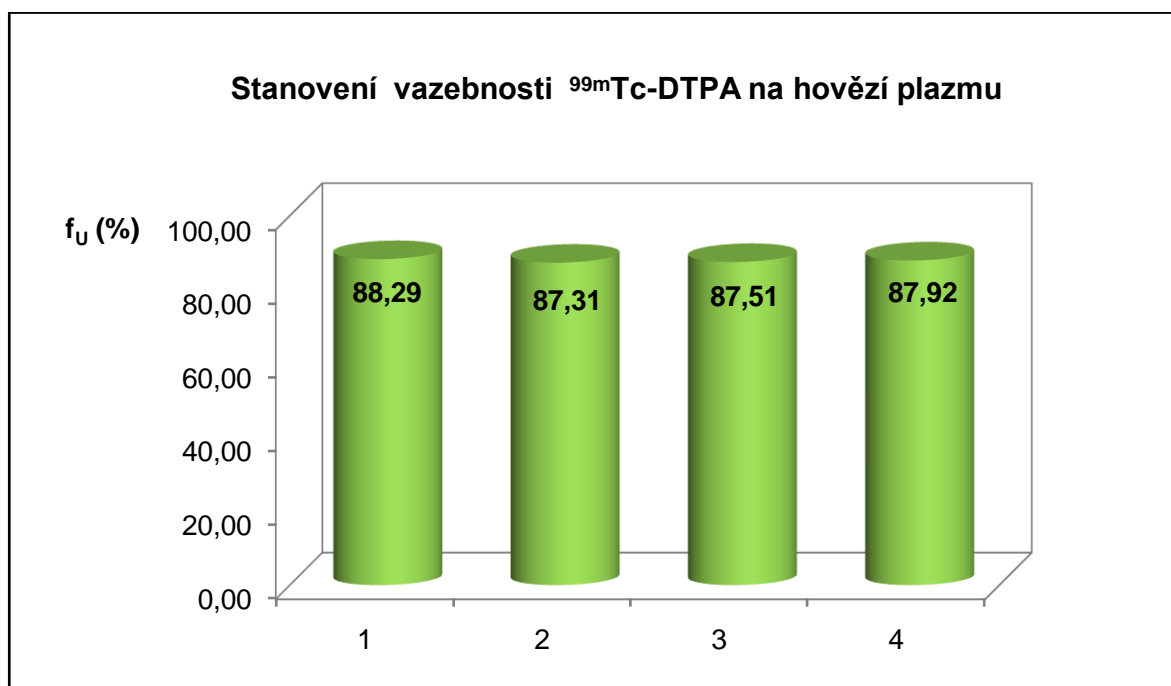
**Graf 1 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 2 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	304720,2	270817,7		
1A	311245,5	272997,5		
Průměr	<b>307982,9</b>	<b>271907,6</b>	<b>88,29</b>	11,71
2	270071,1	241463,4		
2A	286169,3	244212,3		
Průměr	<b>278120,2</b>	<b>242837,9</b>	<b>87,31</b>	12,69
3	263729,3	235865,3		
3A	277704,2	237916,9		
Průměr	<b>270716,8</b>	<b>236891,1</b>	<b>87,51</b>	12,49
4	254796,2	229360,7		
4A	270047,7	232065,2		
Průměr	<b>262422,0</b>	<b>230713,0</b>	<b>87,92</b>	12,08
Průměr			<b>87,76 ± 0,22</b>	

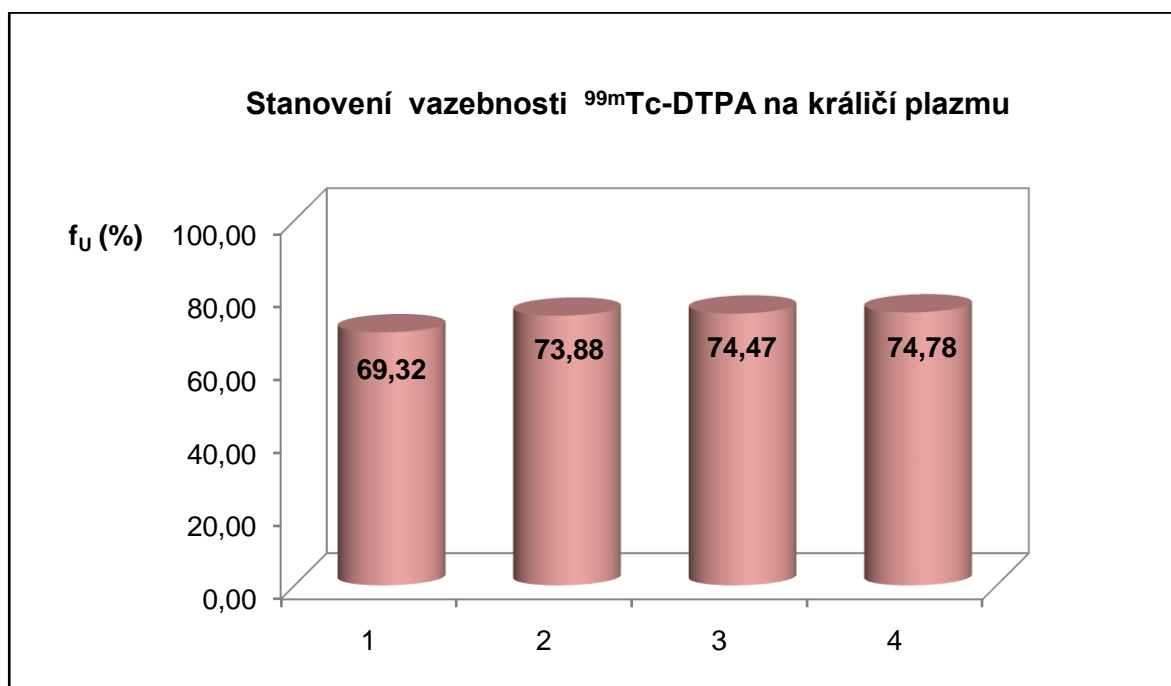
**Graf 2 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 3 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	47777,7	33829,4		
1A	50289,2	34149,1		
Průměr	<b>49033,5</b>	<b>33989,3</b>	<b>69,32</b>	30,68
2	202332,3	153330,9		
2A	214011,3	154245,9		
Průměr	<b>208171,8</b>	<b>153788,4</b>	<b>73,88</b>	26,12
3	370615,6	282281,6		
3A	397119,3	289418,5		
Průměr	<b>383867,5</b>	<b>285850,1</b>	<b>74,47</b>	25,53
4	365233,1	278739,6		
4A	390750,4	286555,0		
Průměr	<b>377991,8</b>	<b>282647,3</b>	<b>74,78</b>	25,22
Průměr			<b>73,11 ± 1,28</b>	

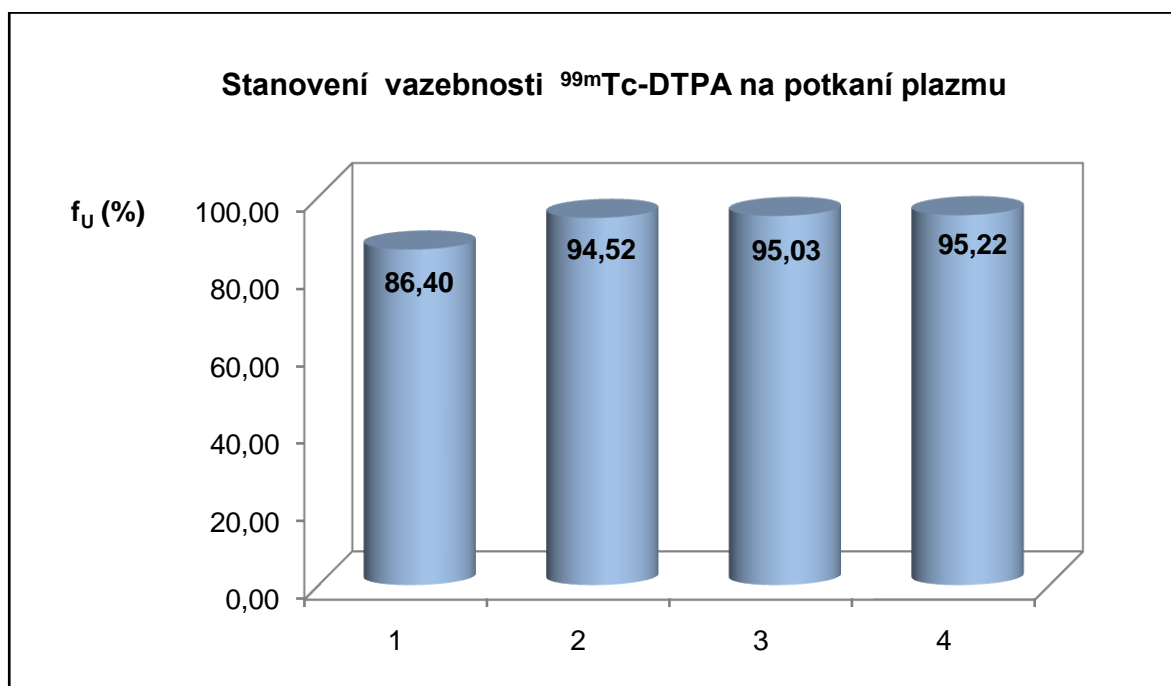
**Graf 3 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 4 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	259441,7	222500,7		
1A	258390,6	224897,3		
Průměr	<b>258916,2</b>	<b>223699,0</b>	<b>86,40</b>	13,60
2	248737,3	239169,3		
2A	260778,7	242449,3		
Průměr	<b>254758,0</b>	<b>240809,3</b>	<b>94,52</b>	5,48
3	252887,8	246390,4		
3A	270824,5	251311,6		
Průměr	<b>261856,2</b>	<b>248851,0</b>	<b>95,03</b>	4,97
4	254048,7	247007,5		
4A	271660,8	253596,5		
Průměr	<b>262854,8</b>	<b>250302,0</b>	<b>95,22</b>	4,78
Průměr			<b>92,80 ± 2,14</b>	

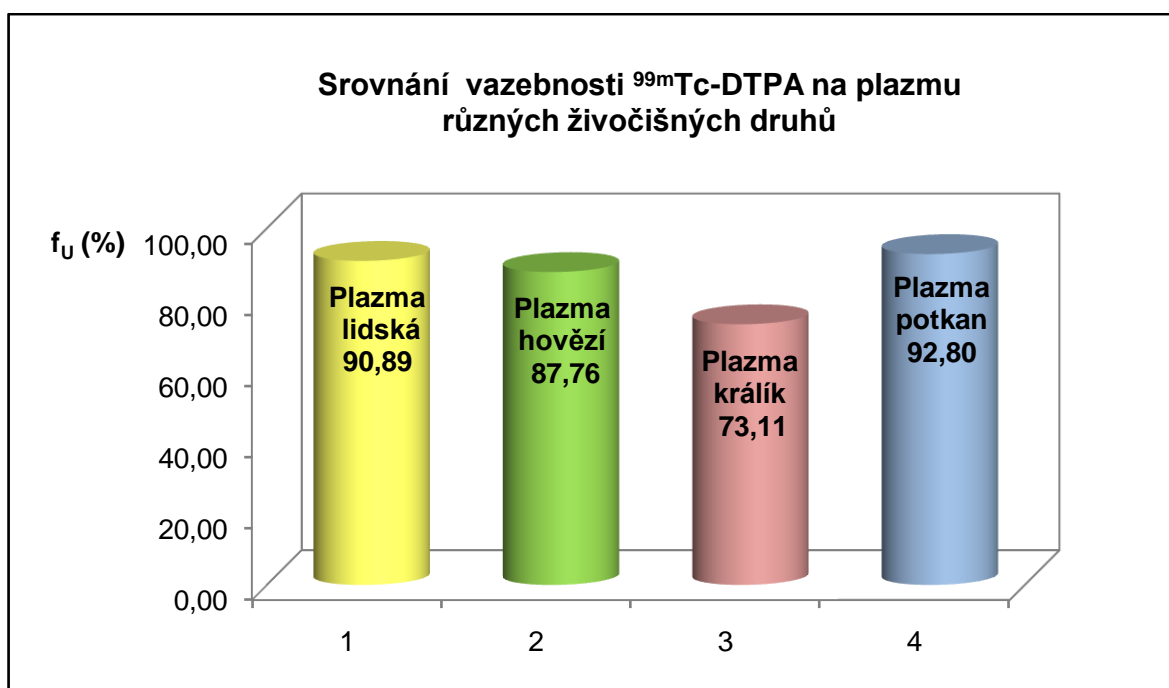
**Graf 4 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 5 Srovnání vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Srovnání vazebnosti $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
$f_U$ (%)	90,89 ± 0,34	87,76 ± 0,22	73,11 ± 1,28	92,80 ± 2,14

**Graf 5 Srovnání vazebnosti  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

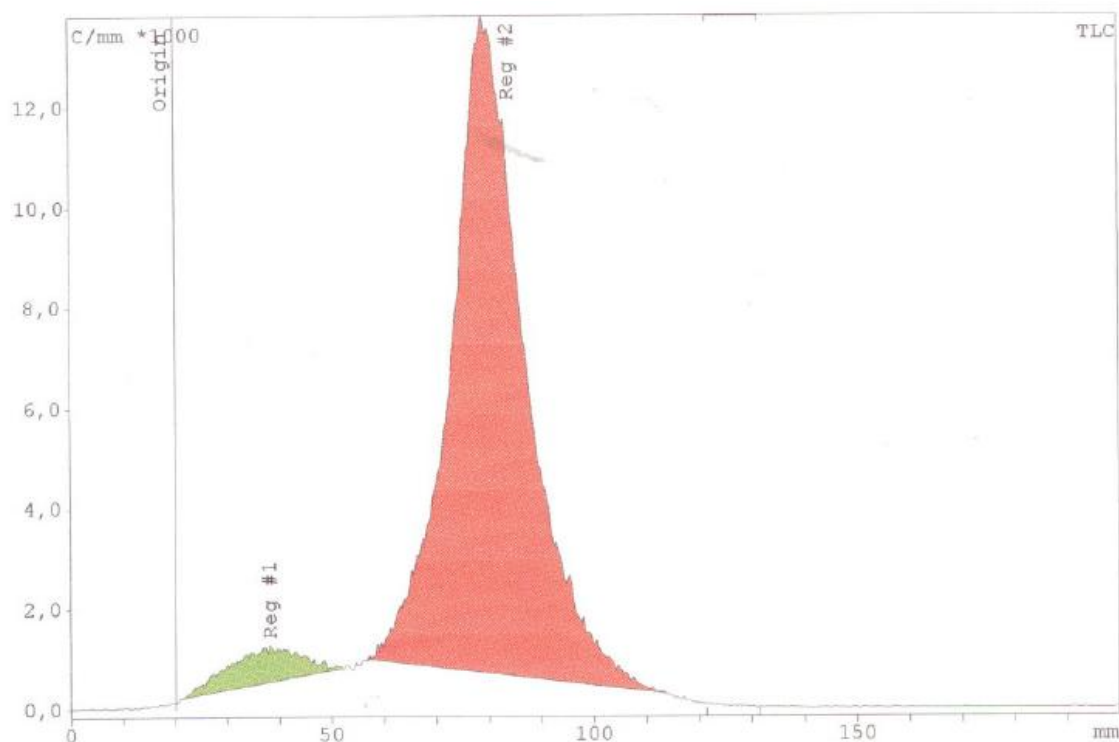




### 3.2 Experiment s $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn

- Stanovení radiochemické čistoty

Tenkvrstvá chromatografie  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu),  
mobilní fáze: pufr o pH 6,5



- Stanovení vazebnosti komplexu  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn na bílkoviny krevní plazmy

Metoda stanovení: rovnovážná dialýza při 37 °C po dobu 4 hodin.

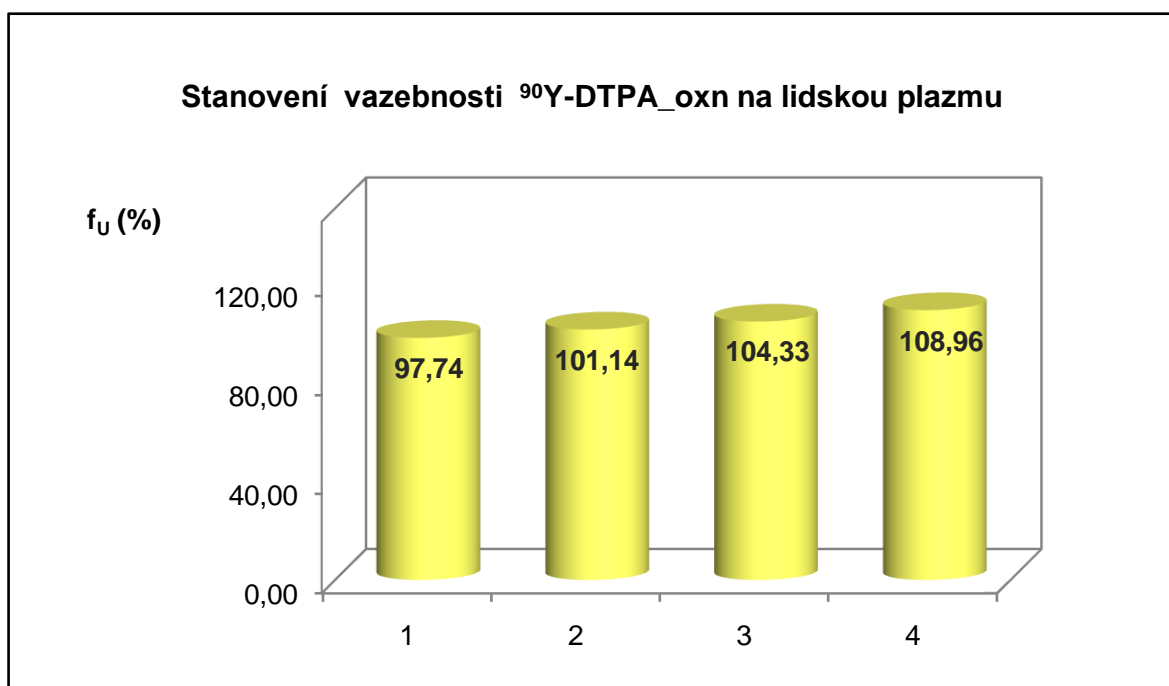
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

Výsledky pro jednotlivé živočišné druhy jsou uvedeny v tabulkách 6 – 9 a na grafech 6 – 9, souhrnně pak v tabulce 10 a na grafu 10.

**Tabulka 6 Výsledky stanovení vazebnosti <sup>90</sup>Y-DTPA\_oxn na lidskou plazmu  
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f <sub>U</sub> (%)	f <sub>B</sub> (%)
1	25 451,7	25 189,4		
1A	25 622,6	24 728,2		
Průměr	<b>25 537,2</b>	<b>24 958,8</b>	<b>97,74</b>	2,26
2	24 793,6	26 542,8		
2A	25 439,5	24 261,5		
Průměr	<b>25 116,6</b>	<b>25 402,2</b>	<b>101,14</b>	-1,14
3	24 455,0	26 898,1		
3A	25 338,1	25 049,9		
Průměr	<b>24 896,6</b>	<b>25 974,0</b>	<b>104,33</b>	-4,33
4	23 877,9	26 165,6		
4A	25 295,7	27 412,3		
Průměr	<b>24 586,8</b>	<b>26 789,0</b>	<b>108,96</b>	-8,96
Průměr			<b>103,04 ± 2,39</b>	

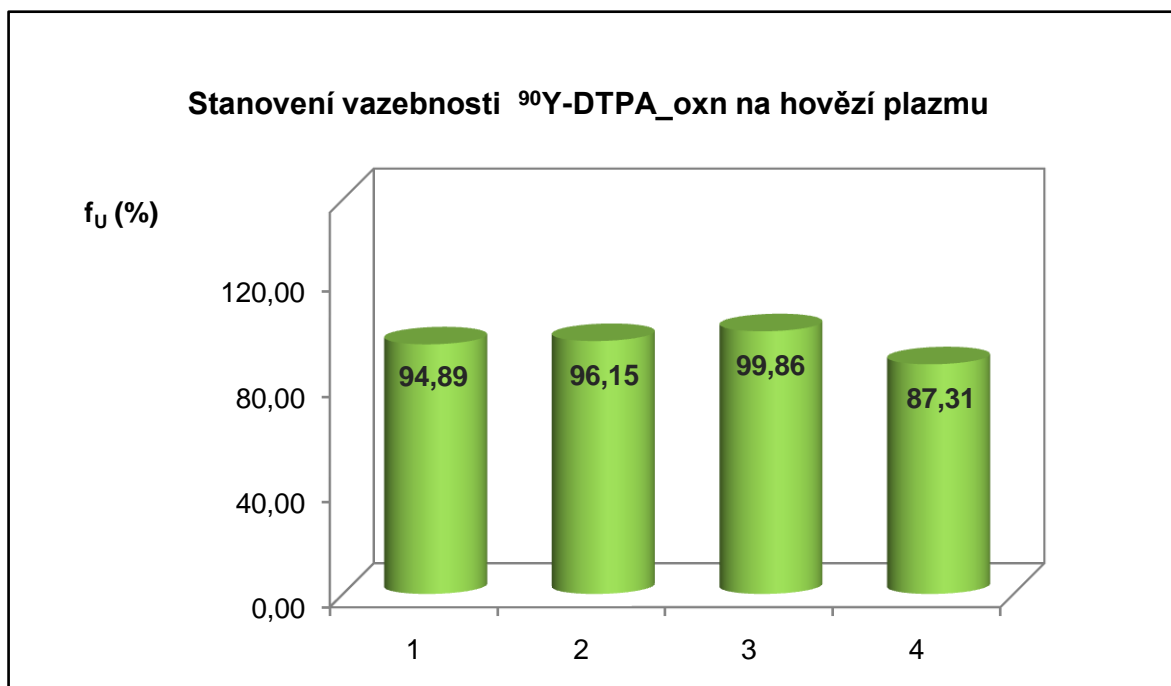
**Graf 6 Výsledky stanovení vazebnosti <sup>90</sup>Y-DTPA\_oxn na lidskou plazmu  
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 7 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	7 133,2	6 805,6		
1A	7 103,1	6 703,4		
Průměr	<b>7 118,2</b>	<b>6 754,5</b>	<b>94,89</b>	5,1
2	19 912,8	20 361,7		
2A	22 197,0	20 125,0		
Průměr	<b>21 054,9</b>	<b>20 243,4</b>	<b>96,15</b>	3,9
3	31 298,4	31 919,1		
3A	32 574,8	31 862,8		
Průměr	<b>31 936,6</b>	<b>31 891,0</b>	<b>99,86</b>	0,1
4	29 741,3	26 399,9		
4A	30 766,5	26 431,9		
Průměr	<b>30 253,9</b>	<b>26 415,9</b>	<b>87,31</b>	12,7
Průměr			<b>94,55 ± 2,63</b>	

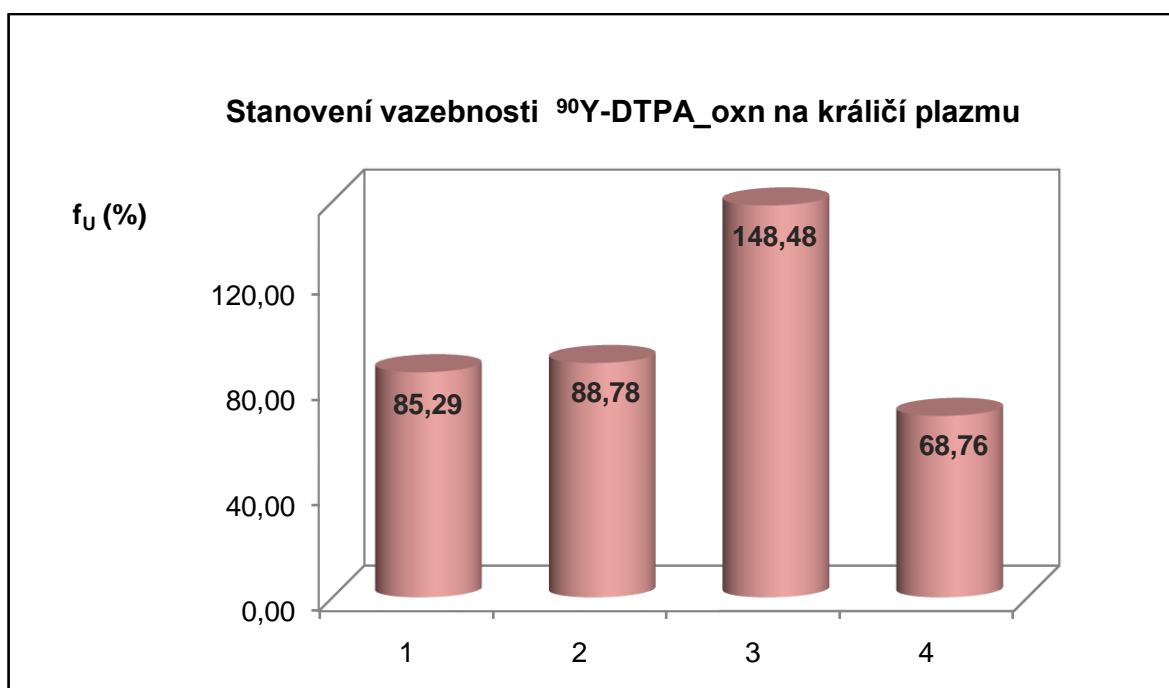
**Graf 7 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 8 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	13 639,9	12 853,7		
1A	14 759,4	11 368,2		
Průměr	<b>14 199,7</b>	<b>12 111,0</b>	<b>85,29</b>	14,7
2	17 696,7	17 737,5		
2A	21 166,0	16 765,7		
Průměr	<b>19 431,4</b>	<b>17 251,6</b>	<b>88,78</b>	11,2
3	10 100,2	15 658,4		
3A	10 739,7	15 285,3		
Průměr	<b>10 420,0</b>	<b>15 471,9</b>	<b>148,48</b>	-48,5
4	17 207,5	13 411,2		
4A	19 041,2	11 514,5		
Průměr	<b>18 124,4</b>	<b>12 462,9</b>	<b>68,76</b>	31,2
<b>Průměr</b>			<b>97,83 ± 17,44</b>	

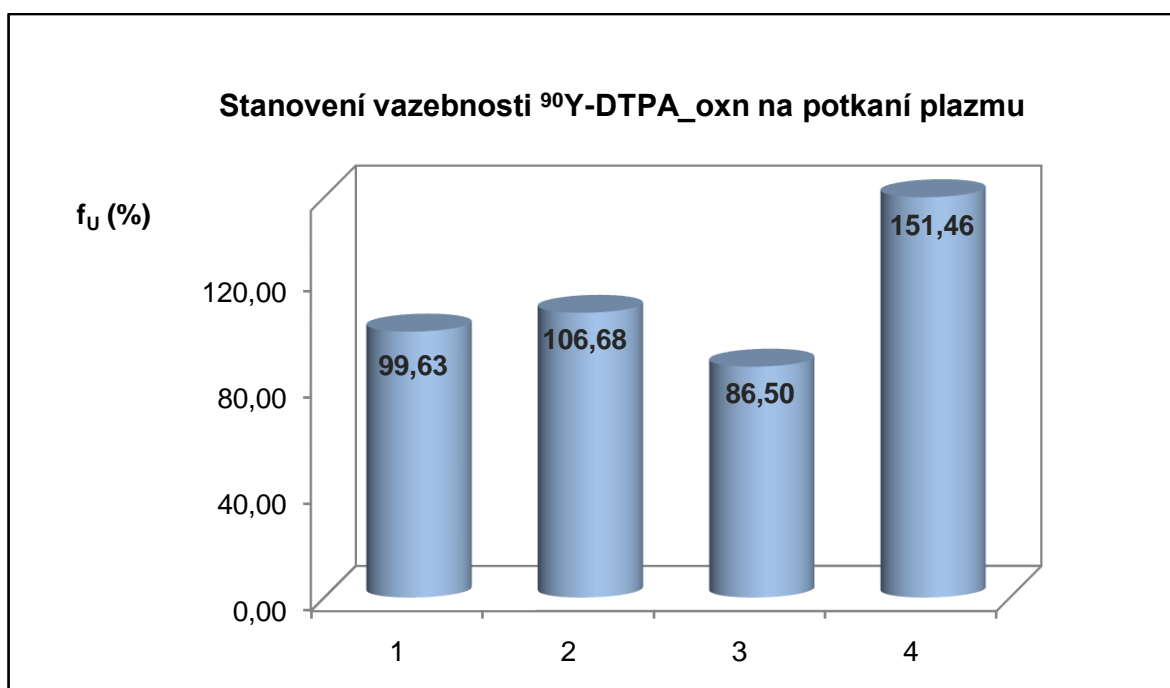
**Graf 8 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 9 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na potkaní plazmu  
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	$f_U$ (%)	$f_B$ (%)
1	14 390,4	14 456,2		
1A	15 186,9	15 012,1		
Průměr	<b>14 788,7</b>	<b>14 734,2</b>	<b>99,63</b>	0,37
2	13 763,2	15 920,5		
2A	15 179,0	14 953,9		
Průměr	<b>14 471,1</b>	<b>15 437,2</b>	<b>106,68</b>	-6,68
3	19 757,4	18 021,6		
3A	20 608,2	16 894,0		
Průměr	<b>20 182,8</b>	<b>17 457,8</b>	<b>86,50</b>	13,50
4	10 849,1	15 998,6		
4A	11 404,4	17 706,4		
Průměr	<b>11 126,8</b>	<b>16 852,5</b>	<b>151,46</b>	-51,46
Průměr			<b>111,07 ± 14,10</b>	

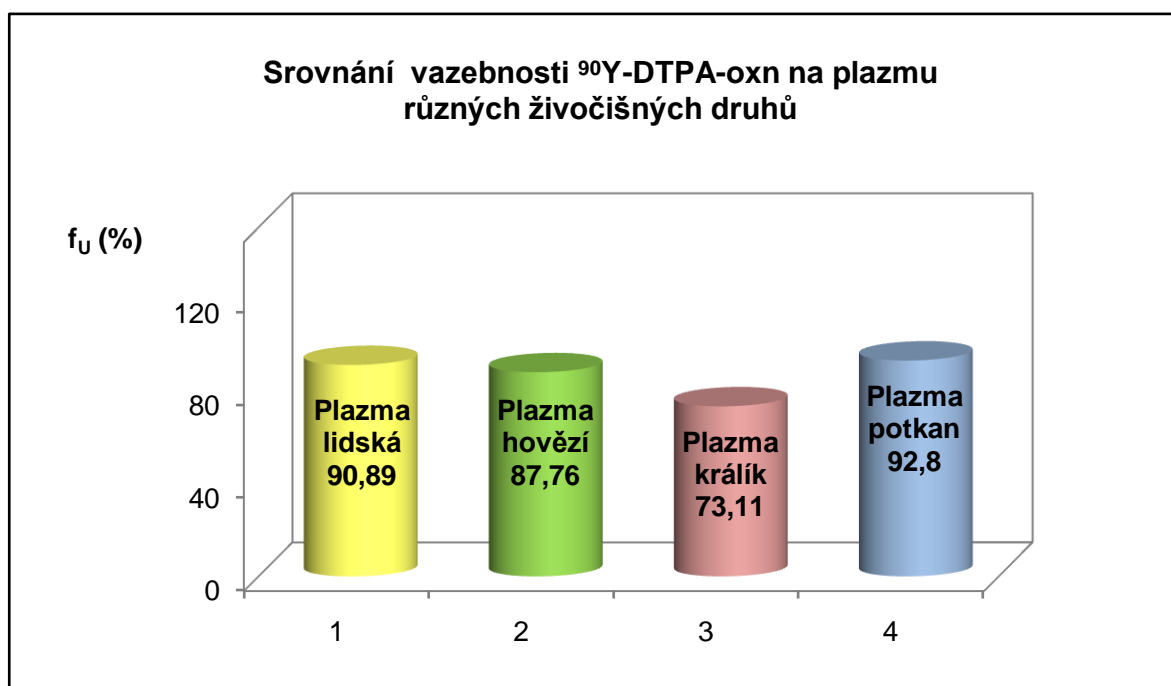
**Graf 9 Výsledky stanovení vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na potkaní plazmu  
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



**Tabulka 10 Srovnání vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na plazmu čtyř živočišných druhů - stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**

Srovnání vazebnosti $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
$f_U$ (%)	90,89 ± 2,39	87,76 ± 2,63	73,11 ± 17,44	92,8 ± 14,10

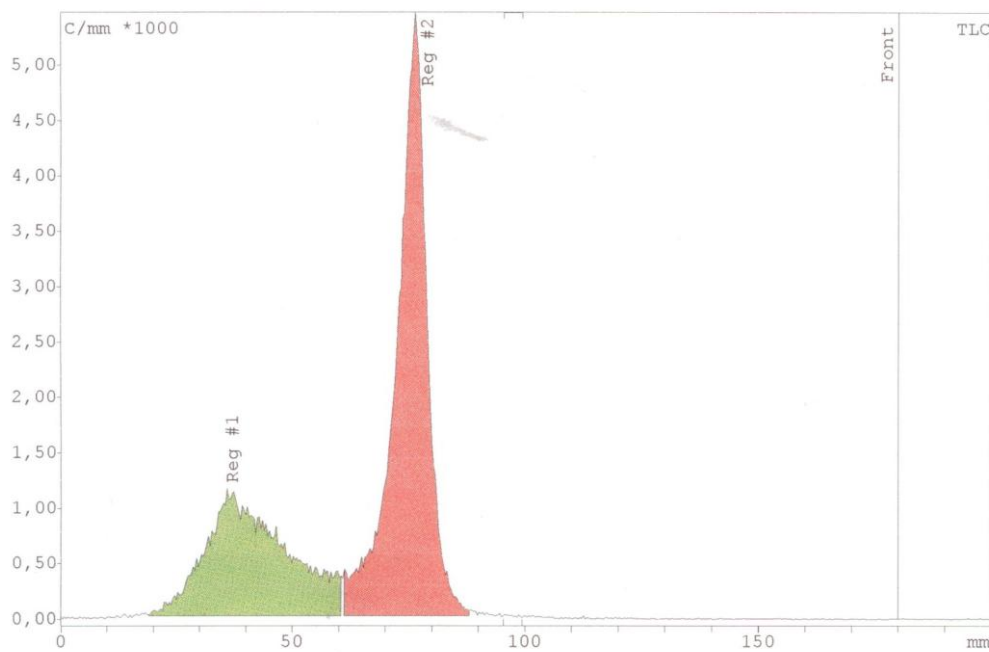
**Graf 10 Srovnání vazebnosti  $^{90}\text{Y}$ -DTPA\_oxn na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



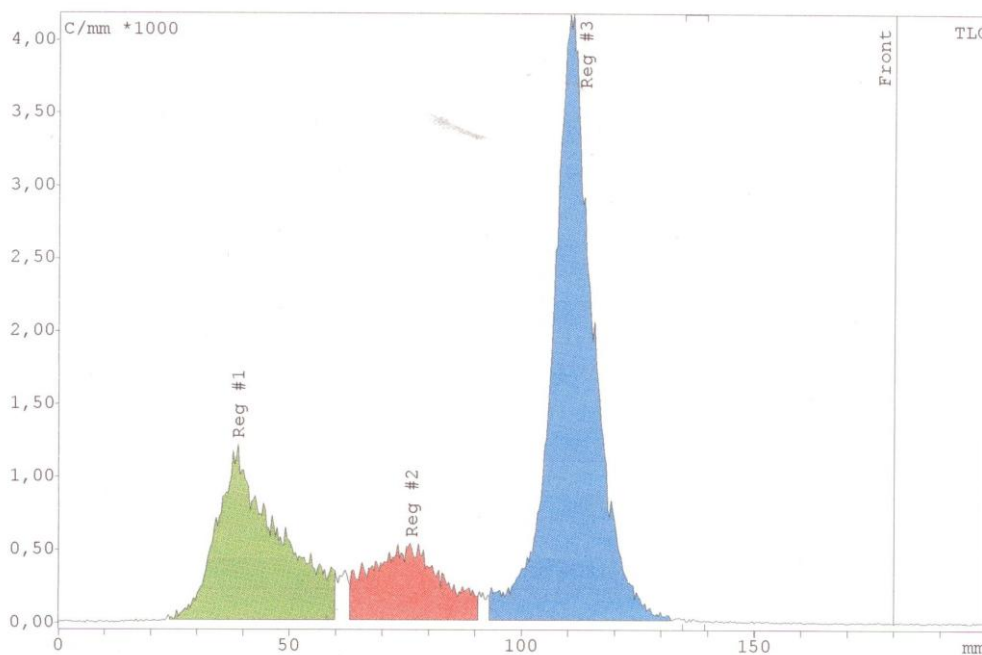
### 3.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu $^{99m}\text{Tc}$

#### 3.3.1 Stanovení radiochemické čistoty $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn

Tenkvrstvá chromatografie  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu),  
mobilní fáze: ethanol

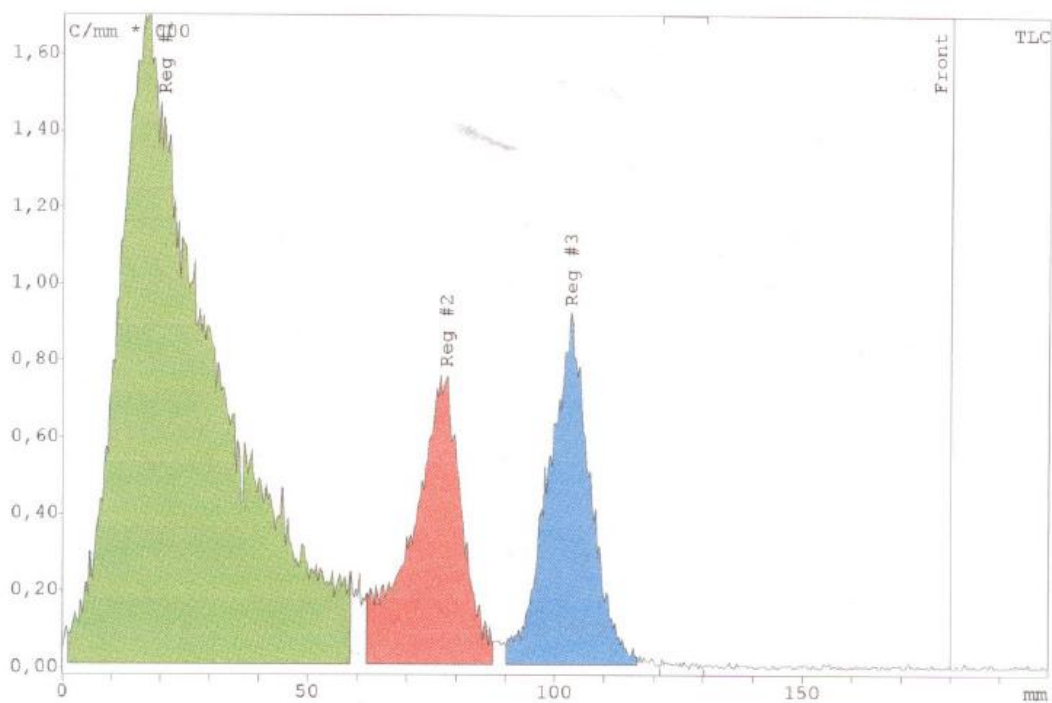


Tenkvrstvá chromatografie  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu),  
mobilní fáze: fyziologický roztok

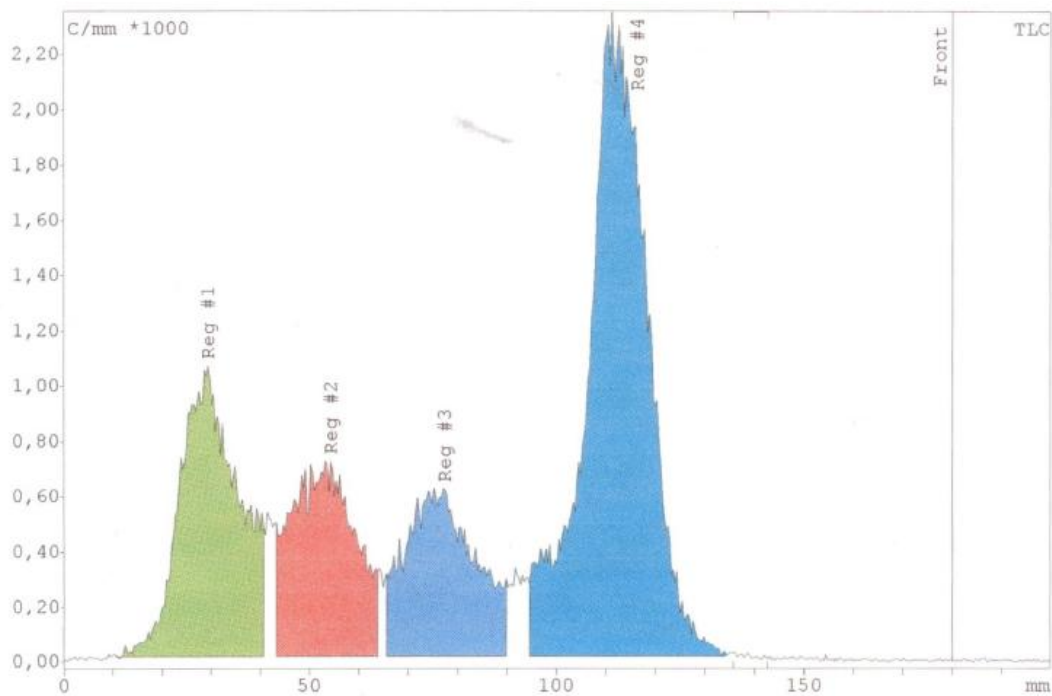


### 3.3.2 Stanovení radiochemické čistoty $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn

Tenkovrstvá chromatografie  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu),  
mobilní fáze: ethanol



Tenkovrstvá chromatografie  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu),  
mobilní fáze: ethanol





Vzhledem k tomu, že chelát DTPA-oxn se nepodařilo označit  $^{99m}\text{Tc}$  s dostatečnou radiochemickou čistotou pro provádění biologických experimentů, vazebnostní studie s touto látkou se neprováděly.

## **IV. DISKUZE**

Součástí předklinického vyšetření nově vyvíjených léčiv je i stanovení jejich farmakokinetiky, včetně parametrů charakterizujících jejich vazbu na plazmatické bílkoviny. Přes biologické membrány může k místu účinku, biotransformace a eliminace prostupovat pouze ta část léčiva, která není vázána na plazmatické bílkoviny. Parametr vazebnosti na plazmatické bílkoviny je tedy jedním z významných faktorů, které ovlivňují farmakokinetiku léčiv. Cílem předložené diplomové práce bylo stanovit plazmatickou vazebnost nově syntetizovaného, radioaktivně značeného bifunkčního chelátu DTPA-oxn z hlediska mezidruhového srovnání a výsledky porovnat s běžně využívaným bifunkčním chelátem DTPA. Studované cheláty mají perspektivu využití pro značení biologických makromolekul, jako jsou monoklonální protilátky nebo receptorově specifické peptidy.

Mezidruhové srovnání vazebnosti na plazmatické bílkoviny komplexu  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  ukázalo, že tato vazebnost je relativně nízká. Vazebnost  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  na lidskou, hovězí a potkaní plazmu je velmi podobná (frakce volné látky je přibližně 90 %), zatímco u králičí plazmy byla zjištěna vazebnost podstatně nižší (volná frakce komplexanu přibližně 73 %). Tento výsledek je poněkud neočekávaný a jedno z možných vysvětlení je rozdílná afinita králičího albuminu k  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  při porovnání s albuminem dalších studovaných živočišných druhů. Vzhledem k tomu, že se vazebnostní experimenty prováděly současně pro všechny živočišné druhy, lze vyloučit vliv parametrů, jako je radiochemická čistota komplexu, doba provádění experimentu, případně i vliv teploty na tuto vazebnost.

Původním záměrem bylo porovnat výsledky vazebnosti stanovené u  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  s hodnotami získanými pro  $^{99m}\text{Tc-DTPA-oxn}$ . Protože se nepodařilo připravit poslední jmenovaný komplex s dostatečnou radiochemickou čistotou a přítomné radiochemické nečistoty by mohly výrazně ovlivnit dosažené výsledky vazebnosti, další vazebnostní studie se neprováděly s  $^{99m}\text{Tc-DTPA-oxn}$ , ale s komplexem DTPA-oxn, značeným  $^{90}\text{Y}$  ( $^{90}\text{Y-DTPA-oxn}$ ).

Vazba chelátu  $^{90}\text{Y-DTPA-oxn}$ , která byla stanovena v této diplomové práci, se velmi podobala výsledkům získaným pro  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ , a to jak z hlediska velikosti vázané frakce, tak z hlediska mezidruhového srovnání. Nejvyšší vazebnost byla i v tomto případě nalezena pro králičí plazmu. Vysoké hodnoty směrodatné odchylky pro průměrné výsledky u králičí a potkaní plazmy, způsobené výraznými rozdíly v hodnotách vazebnosti stanovených v jednotlivých experimentech, relativizují možnost jednoznačných závěrů při mezidruhovém srovnání dosažených výsledků.

## **V. ZÁVĚR**

1. Metodou rovnovážné dialýzy při 37 °C byla studována vazebnost vybraných radioaktivně značených chelátů na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání (lidská, hovězí, králičí a potkaní plazma).
2. Výsledky získané u komplexů  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA ukázaly, že vazebnost je nízká, vazebnost na bílkoviny lidské, hovězí a potkaní plazmy je srovnatelná, zatímco vazebnost na králičí plazmu je větší.
3. Komplex  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-oxn nebyl připraven s radiochemickou čistotou přijatelnou pro biologické experimenty, a proto se pokusy stanovení jeho plazmatické vazebnosti neprováděly.
4. U komplexu  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn naměřené výsledky ukázaly, že vazebnost je také nízká, a podobně jako u komplexu  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA je vazebnost na lidskou, hovězí a potkaní plazmu srovnatelná, kdežto vazebnost na králičí plazmu je opět větší.
5. Výsledky ukázaly, že vazebnost  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-oxn nebude, podobně jako  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA, faktorem, který může výrazně ovlivnit jeho biologické chování.

## **VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Štaud F., Přednášky z obecné farmakologie, FaF 2007
- [2] Lüllmann H. a kol., Farmakologie a toxikologie, Grada publishing Praha 2004, 35-61
- [3] Mysliveček M. a kol., Nukleární medicína – 1. díl, UP Olomouc 2007, 9 a 24
- [4] Dostálek M. a kol., Farmakokinetika, Grada publishing Praha 2006, 92-106
- [5] Herve F. a kol., Drug-binding in plasma – A summary of recent trends in the study of drug and hormone-binding, Clin Pharmacokinet 1994, 26 (1), 44-58
- [6] Silbernagl S., Despopoulos A., Atlas fyziologie člověka, Grada publishing Praha 2004, 88
- [7] Dawidowicz Andrzej L. a kol., Anomalous relationship between free drug fraction and its total concentration in drug-protein system II. Binding of different ligands to plasma proteins, Eur J Pharm Sci 2008, 35 (1-2), 136-141
- [8] Lüllman H., Mohr K., Hein L., Barevný atlas farmakologie, Grada publishing Praha 2007, 30-31
- [9] Gillette J. R., Overview of drug-protein binding , Ann N Y Acad Sci 1973, 226, 6-17
- [10] Wright Jennifer D. a kol., Measurement and analysis of unbound drug concentrations, Clin Pharmacokinet 1996, 30 (6) 445-462
- [11] Chuang VT., Otagiri M., Stereoselective binding of human serum albumin, Chirality 2006, 18 (3),159-16
- [12] Kragh-Hansen U. a kol., Practical aspects of ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumine, Biol Pharm Bull 2002, 25 (6), 695-704
- [13] Israili Z. H., Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs, Drug Metab Rev 2001, 33 (2), 161-235
- [14] Liu Z., Li F., Huang Y., Determination of unbound drug concentration and protein-drug binding fraction in plasma, Biomed Chromatogr 1999, 13 (4), 262-266
- [15] Pacifini GM., Viani A., Methods of determining plasma and tissue binding of drugs, Clin Pharmacokinet 1992, 23 (6), 449-468

- [16] Hinderling P., Comparative Evaluation of Equilibrium Dialysis Methods Employing Biological and Artificial Membranes for the Determination of Protein Binding of Drugs, *Therapeutic Drug Monitoring* 1987, 9 (3), 331-336
- [17] Oravcova J. a kol., Drug-protein binding studies (New trends in analytical and experimental methodology), *J Chromatogr B* 1996, 667 (1), 1-28
- [18] Chalabala M., *Technologie léků*, Galén Praha 2001, 73
- [19] Nigel J. W. a kol., Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding, *Journal of pharmaceutical sciences* 2008, 97 (10), 4586-4595
- [20] Tsai T. H., Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques, *Journal of chromatography B* 2003, 797 (1-2), 161-173
- [21] Akizawa H. a kol., Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12), 1319-1328
- [22] Lázníček M., Komárek P., *Základy radiofarmacie*, Karolinum Praha 1998, 27-34 a 64-65
- [23] Liu S., Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12), 1347-1370
- [24] *Český lékopis*, Grada Praha 2005
- [25] Klimeš J. a kol., *Kontrola léčiv I.*, Karolinum Praha 2006, 26-28
- [26] Jurisson S., Cutler C., Smith S. V., Radiometal complexes: characterization and relevant in vitro studies, *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 52 (3) 222-234
- [27] Brechbiel M. W., Bifunctional chelates for metal nuclides, *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 52 (2) 166-173