# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE


**Diplomová práce**

# Značení monoklonální protilátky radionuklidem $^{99m}$Tc a ověřování její vazebnosti na antigen TU-20


Kateřina Slapničková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Leo Kronrád, DrSc.



Praha 2006

Práce byla vypracována v ÚJV Řež, a.s. v rámci grantu MŠMT mezinárodního projektu EUREKA.

*Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Leo Kronráda, DrSc. Všechny použité prameny jsem řádně citovala.*

Slapničková

*podpis studentky*

*V Praze dne 3. května 2006*

# Obsah

Obsah ... 3
1 Úvod ... 6
2 Cíl diplomové práce ... 7
3 Seznam zkratek ... 8
4 Teoretická část ... 9
4.1 Radionuklidy ... 9
4.1.1 Radonuklidy používané v nukleární medicíně ... 10
4.1.2. Technecium $^{99m}$Tc ... 11
4.2 Značení biomolekul radionuklidy ... 13
4.2.1 Značení protilátky TU-20 $^{99m}$Tc ... 14
4.3 Biomolekuly ... 16
4.4 Imunitní systém ... 16
4.5 Antigeny a protilátky ... 17
4.5.1 Protilátky ... 18
4.5.2 Monoklonální protilátky (MAbs) ... 20
4.5.3 Monoklonální protilátka TU-20 ... 20
4.6 Purifikace značených biomolekul ... 21
4.6.1 Gelová permeační chromatografie ... 21
4.7 Detekce vysokomolekulární frakce ... 22
4.8 Planární chromatografie ... 22
4.8.1 Papírová chromatografie ... 23
4.9 Elektroforéza ... 24
4.9.1 Elektromigrační (elektroforetické) metody ... 24
4.10 Imunoanalytické metody in vitro ... 25
4.10.1 Radioimunochemické metody RIA, IRMA ... 26
4.10.2 Enzymová imunoanalýza EIA ... 27
5 Experimentální část ... 31
5.1 Reagencie, roztoky a pufry ... 31

5.2 Přehled aktivit a konverzních faktorů pro výpočet veličin v radiační ochraně pro radionuklid $^{99m}$Tc ..... 33
5.3 Přístrojové vybavení ..... 34
5.4 Analytické a separační metody ..... 36
5.4.1 Imunoanalýza – ELISA (Enzymme Linked Immunosorbent Assay) ..... 36
5.4.1.1 ELISA souprava ..... 36
5.4.1.2 Příprava roztoků ..... 37
5.4.1.3 Obecný postup ..... 37
5.4.2 Elektroforéza ..... 38
5.4.2.1 Příprava reagencií ..... 38
5.4.2.2 Obecný postup ..... 39
5.4.3 Purifikace ..... 40
5.4.3.1 Obecný postup ..... 40
5.4.4 Detekce vysokomolekulární frakce ..... 40
5.4.4.1 Obecný postup ..... 40
5.4.5 Papírová chromatografie ..... 41
5.4.5.1 Obecný postup ..... 41
5.5 Metody značení ..... 42
5.5.1 Značení protilátky TU-20 $^{99m}$Tc přes bifunkční chelát HYNIC ..... 42
5.5.1.1 Vypracovaný a doporučený postup ..... 43
5.5.2 Značení protilátky TU-20 přímo pomocí 2-merkaptoethanolu ..... 44
5.5.2.1 Vypracovaný a doporučený postup ..... 44
5.5.3 Přímé značení protilátky TU-20 elektrolyticky ..... 45
5.5.3.1 Vypracovaný a doporučený postup ..... 45
6 Výsledky a diskuse ..... 46
6.1 Značení TU-20 $^{99m}$Tc přes bifunkční chelát HYNIC ..... 46
6.1.1 Spektrofotometrie ..... 46
6.1.2 Chromatografie ..... 47
6.2 Značení TU-20 $^{99m}$Tc pomocí 2-merkaptoethanolu ..... 50
6.2.1 Spektrofotometrie ..... 50
6.2.2 Chromatografie ..... 52
6.3 Značení TU-20 $^{99m}$Tc elektrolyticky ..... 54

6.3.1 Spektrofotometrie ..... 54
6.3.2 Chromatografie ..... 55
6.4 Elektroforéza ..... 58
6.5 ELISA ..... 59
6.6 Shrnutí výsledků ..... 61
6.7 Diskuse ..... 65
7 Závěr ..... 67
8 Literatura ..... 68
9 Značení monoklonální protilátky radionuklidem $^{99m}$Tc a ověřování její vazebnosti na antigen TU-20 ..... 71
10 Labeling of monoclonal antibody with radionuclide $^{99m}$Tc and proving its binding on antigen TU-20 ..... 72
11 Přílohy ..... 73
11.1 Chromatogramy stabilit reakčních směsí značené TU-20 $^{99m}$Tc ..... 73
11.1.1 Chromatogramy stability reakční směsi TU-20 – HYNIC – $^{99m}$Tc ..... 73
11.1.2 Chromatogramy stability reakční směsi TU-20 – $^{99m}$Tc (TU-20 redukovaná pomocí ME) ..... 75
11.2 ELISA ..... 77

# 1 Úvod

Termíny **radioaktivní značení** či **značení sloučenin radionuklidy** znamenají záměrnou inkorporaci radioaktivního izotopu určených vlastností do původně neaktivní sloučeniny. Takto modifikované látky nacházejí uplatnění v řadě výzkumných, průmyslových či lékařských aplikací. Jednou z nejdůležitějších je obor *radiofarmacie*, který je prakticky využíván v nukleární medicíně, kde jsou sloučeniny značené radionuklidy včleněné do vhodné lékové formy běžně používány v diagnostické a terapeutické oblasti jako *radiofarmaka*.

**Radiofarmaka** patří do skupiny léčivých přípravků, charakterizovaných obsahem účinných látek o definovaném složení, označených radionuklidem určitých vlastností. Působení radiofarmak na organismus obecně popisuje *farmakodynamika*. Průchod radiofarmak organismem popisuje *farmakokinetika*. Distribuci, pohyb i účinky léčiv lze pak sledovat díky vlastnostem radioaktivního záření zobrazovacími metodami in vivo (scintigrafie, PET, SPECT) či in vitro (RIA, IRMA).

Předmětem této diplomové práce je vývoj optimální metody značení uměle připravené **monklonální protilátky typu IgG1 – TU-20**, která vykazuje vysokou afinitu vůči *β-III-neurotubulinu*, radionuklidem **$^{99m}$Tc**.

**β-III-neurotubulin** je charakteristický degradační protein buněčného cytoskeletu nervové tkáně, který je uvolňován do extracelulárního prostoru při onemocněních vedoucích ke ztrátám periferních neuronů nebo neuronů centrální nervové soustavy. V extracelulárním prostoru je tento degradační protein schopen indukovat autoimunní reakci, tedy tvorbu protilátek.

Pro diagnostiku *neuropatií* a *neurodegenerativních procesů* je tedy β-III-neurotubulin cílovou strukturou a radioaktivně označená protilátka TU-20 $^{99m}$Tc by mohla umožnit diagnostickou aplikaci in vivo.

Pro praktickou aplikaci je však nezbytný vývoj spolehlivých značících metod, které by v minimální míře porušovaly strukturu a imunoreaktivitu biomolekul a označené biomolekuly by vykazovaly dostatečnou biologickou a chemickou stabilitu a čistotu.

# 2 Cíl diplomové práce

Cílem chemických a biochemických studií, jejichž součástí je tato diplomová práce, je vývoj a porovnání metod značení monoklonální protilátky TU-20 proti neurotubulinu radionuklidem $^{99m}$Tc.

Pro ověření možnosti značení monoklonální protilátky TU-20, byly zvoleny tři metody.

*Přímé značení*:

- elektrolyticky,
- pomocí 2-merkaptoethanolu.

*Nepřímé značení*:

- přes bifunkční chelátor HYNIC.

K charakterizaci rozdílů mezi jednotlivými metodami značení byla zvolena následující kriteria:

- chemická čistota,
- chemická stabilita,
- vazebnost $^{99m}$Tc na TU-20,
- biologická stabilita,
- imunoreaktivita.

Pro sledování jednotlivých vlastností byly uplatněny příslušné chemické a biochemické kontrolní metody. Chemická čistota a vazebnost $^{99m}$Tc na TU-20 byly zjišťovány gelovou filtrací a spolu s chemickou stabilitou sledovány pomocí papírové chromatografie. Ke kontrole biologické stability byla využita SDS elektroforéza. Ověřování imunoreaktivity bylo prováděno pomocí ELISA-testů.

Práce byla vypracována v rámci grantu MŠMT mezinárodního projektu EUREKA, jehož řešitelem je radiofarmaceutické pracoviště Ústavu jaderného výzkumu v Řeži.

# 3 Seznam zkratek

| | |
|---|---|
| DMF | N, N - dimethylformamide |
| (El) | elektrolytické značení |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Essay |
| HYNIC | hydrazinonikotinová kyselina |
| MDP | methylendifosfát |
| ME | 2-merkaptoethanol |
| OD | optická hustota |
| PET | pozitronová emisní tomografie |
| Px - konjugát | prasečí protilátka proti myším imunoglobulinům |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SHNIC | hydrochlorid succinimidyl-6-hydrazinonikotinová kyselina |
| SPECT | jednofotonová emisní výpočetní tomografie |
| TEMED | N, N, N‘, N‘ - tetramethylethylendiamine |
| TMB | 3, 3´, 5, 5´- tetrametylbenzidin |
| TRICIN | N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine |
| TRIS | trizma® base |
| TU-20 | monoklonální protilátka |

# 4 Teoretická část

## 4.1 Radionuklidy

Radionuklidy se nazývají jádra atomů nestabilních nuklidů podléhající samovolným přeměnám (mononukleárním přeměnám), při kterých se za emise záření přeměňují v atomová jádra jiných elementů. Samotný jev se nazývá radioaktivita [1].

Radionuklidy vzniklé jadernou reakcí, tedy při srážkách jader atomů s jinou částicí, se nazývají umělé radioaktivní izotopy stabilních elementů [2].

Při radioaktivní přeměně se radioaktivita radionuklidu neustále zmenšuje. Doba, za kterou klesne právě na polovinu původní hodnoty se označuje jako *poločas rozpadu.*

Jaderné záření, které pozorujeme a jsme schopni detekovat, jsou vlastně emitované částice, **α**, **β** a **fotony**, které odpovídají počtu přeměněných jader. Počtem přeměněných jader za jednotku času je definovaná aktivita [3].

Radionuklidy se mimo jiné hojně vyžívají v oblasti lékařství v oboru nukleární medicíny ve formě radiofarmak. Radiofarmaka jsou sloučeniny značené radioaktivními nuklidy, které mají určité konstantní složení, definovanou radionuklidovou a radiochemickou čistotu a definované biologické chování [4].

Radiofarmaka *in vivo* jsou značené sloučeniny, které se po aplikaci do organismu akumulují díky své specifické vazbě v postiženém orgánu a díky vlastnostem radioaktivního záření daného radionuklidu jsou schopny daný orgán zobrazit (radiodiagnostika) či léčit (radioterapeutika).

Radiodiagnostika *in vitro* jsou radioanalytická činidla, která slouží ke zjišťování koncentrace složitých biologických látek v krevním séru – hormonů, imunoglobulinů apod. [5].

### 4.1.1 Radonuklidy používané v nukleární medicíně

V oboru nukleární medicíny se využívají zejména uměle vyrobené radionuklidy. Přehledně lze radionuklidy rozdělit, dle možného využití, na α, β a γ zářiče. *α a β zářiče* se používají vzhledem k vysoké ionizační schopnosti jako *radioterapeutika.* V současnosti se k terapeutickým účelům používají zejména přípravky obsahující $^{131}I$, $^{89}Sr$, $^{90}Y$ a radioaktivní izotopy řady lanthanoidů ($^{153}Sm$, $^{166}Ho$).

V případě značených protilátek se uvažuje zejména tzv. cílená terapie, kdy nedochází k ozáření celého těla, ale jen určitého místa, kam je terapeutický nuklid donesen specifickou protilátkou. Ozářena je pouze cílová struktura, zatímco okolní tkáň není významně porušena. Zde již existuje komerční přípravek Zevalin® na bázi protilátky proti antigenu CD20 značené $^{90}Y$ spolu s diagnostickou variantou téže látky značené $^{111}In$, určené k upřesnění depozice léčivého přípravku v těle pacienta před samotnou terapií [6], [7], [8].

*γ zářiče* jsou určené, díky své vysoké pronikavosti, k *radiodiagnostice.* Nejčastěji užívanými přípravky jsou komerčně vyráběná léčiva na bázi $^{131}I$, $^{123}I$, $^{99m}Tc$, $^{67}Ga$ a $^{201}Tl$. Sloučeniny označené pozitronickými zářiči se využívají pro zobrazování pomocí techniky PET (Positron Emission Tomography). Rutinně je využíván $^{18}F$-fluorodeoxyglukosa, potenciálně využitelné radioizotopy jsou $^{55}Co$, $^{64}Cu$, $^{66}Ga$, $^{68}Ga$, $^{89}Zr$ a $^{124}I$ [7].

Vyrábět radionuklidy lze více způsoby. Nejsnadnějším a nejlevnějším je neutronová aktivace jader v jaderném reaktoru. Ozařováním neutrony vznikají jádra vykazující $\beta^-$ a γ radioaktivitu. Vhodný terčový materiál se ozařuje přímo v kanálech jaderného reaktoru, který je intenzivním zdrojem neutronů [2].

Další používanou metodou je využití štěpných produktů vzniklých štěpení jader uranu v reaktoru. Z těchto štěpných produktů se vhodnými radiochemickými metodami separují potřebné radionuklidy [2].

Poněkud dražším způsobem se vyrábějí pozitronové $\beta^+$ zářiče. K proniknutí protonu do jádra je třeba ho urychlit na vysokou energii, k čemuž se nejčastěji používají cyklotrony. Nejvýhodnější metodou je však využití radionuklidových generátorů [2].

## 4.1.2. Technecium $^{99m}$Tc

$^{99m}$Tc je radionuklid o poločasu $T_{1/2}$=*6,01 hodiny*. Z 99,9963% jde o gama zářič ( Eγ=142 keV), ze zbylých 0,0037% se rozpadá přeměnou $\beta^-$ ($E_\beta$=440 keV) na $^{99}$Ru [8].

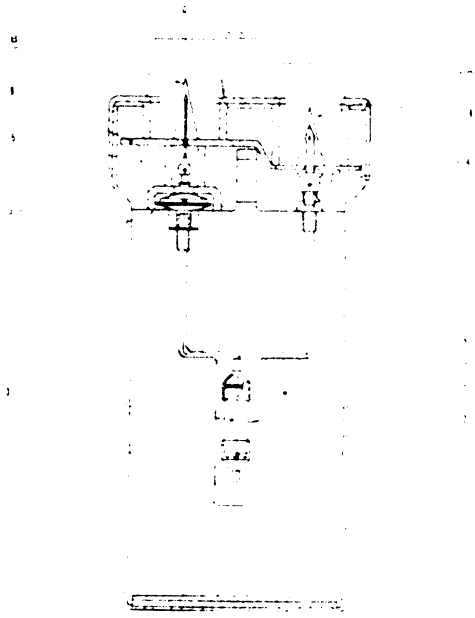
Získává se jako dceřinný radionuklid v tzv. radionuklidovém generátoru z mateřského $^{99}$*Mo* beta rozpadem. Generátory $^{99m}$Tc jsou dodávány řadou výrobců v různém technickém provedení. V tomto případě byl využíván generátor DRYGEN firmy Amersham.

Výroba molybdenu $^{99}$Mo je možná aktivací přírodního molybdenu o izotopovém složení $^{92}$Mo – 14,8%, $^{94}$Mo – 9,3%, $^{95}$Mo – 15,9%, $^{96}$Mo – 16,7%, $^{97}$Mo – 8,6%, $^{98}$Mo – 24,1%, $^{100}$Mo – 9,6%. Nevýhodou této metody je relativně nízká měrná radioaktivita $^{99}$Mo.

Mateřský radionuklid $^{99}$Mo vzniká také při štěpení jader uranu neutrony, $\mathbf{^{235}U + n \rightarrow {}^{99}Mo + {}^{135}Sn + 2n}$. Ze štěpných produktů je nutno izolovat $^{99}$Mo pomocí radiochemických metod.

*Generátor DRYGEN $^{99m}$Tc Technecium generátor*

Generátor DRYGEN je automatizovaný silně stíněný systém umožňující snadnou eluci sterilního roztoku $^{99m}$Tc-technecistanu sodného. Tento roztok je vymýván z chromatografické kolonky oxidu hlinitého, na které je zachycen $^{99}$Mo připravený štěpením a rozpadající se na $^{99m}$Tc [9]. Koncentrace $^{99m}$Tc-technecistanu sodného v eluátu se pohybuje kolem $1{,}85.10^{9}$ – $1{,}85.10^{10}$ Bq/ 5 ml, což odpovídá $2.10^{-8}$ – $2.10^{-7}$ molárnímu roztoku [10].



1) Chromatografická kolona
2) Porézní polyethylenová frita
3) Oxid hlinitý
4) Vstupní jehla
5) Sterilizační filtr s hydrofobní vrstvou
6) Výstupní jehla
7) Olověné stínění
8) Plastová vložka
9) Plastový obal
10) Umělohmotný průhledný kryt
A) Ochranný kryt vstupní jehly
B) Ochranný kryt výstupní jehly

Obr. 1 *Generátor DRYGEN $^{99m}$Tc Technecium generátor*

Radiofarmaka značená techneciem nacházejí uplatnění v nukleární medicíně při scintigrafickém vyšetření a emisním tomografickém zobrazování, morfologickém popisu a testování funkčnosti orgánů. Kolem 80% v současné době klinicky používaných radiofarmaceutických preparátů je značeno krátkodobým metastabilním nuklidem $^{99m}$Tc, jehož nukleární vlastnosti jsou téměř optimální s přihlédnutím k nízké radiační expozici pacientů a efektivní detekci emitovaného gama záření [10].

## 4.2 Značení biomolekul radionuklidy

Biomolekuly vykazují vlastnosti vysoce organizované organické hmoty. Jsou schopny se vzájemně rozpoznávat a selektivně spolu interagovat. Interakce je umožněna díky složité struktuře těchto biopolymerů, vhodnému uspořádání molekuly včetně prostorové orientace vazebného místa [11].

Protilátky a antigeny, dvojice vazebných partnerů, které spolu specificky reagují, lze využít při zkoumání struktur, probíhajících procesů v organismu, ale také k diagnostice a terapeutice v nukleární medicíně. V organismu lze vytipovat látku, jejíž výskyt v organismu, popř. její koncentrační rozmístění, poukazuje na procesy nebo struktury, jež hodláme studovat či podrobit léčbě. K této látce pak musíme nalézt vhodného vazebného partnera, tedy protilátku, která s ní specificky reaguje. Získáme-li ji, v dalším kroku je třeba ji označit vhodným radionuklidem. Je nutné použít co nejšetrnější způsoby značení pro zachování jak fyzikálně chemických, tak i biologických vlastností protilátky.

Značení biomolekul lze provést v principu dvěma způsoby. Pokud je v biomolekule vázán radionuklid přímo, jde o **značení přímé**. Je-li radionuklid na biomolekulu vázán pomocí bifunkčního chelátoru, jde o **značení nepřímé** [10]. V tom případě je možno postupovat dvěma způsoby. Buď se vytvoří konjugát protilátka-chelátor, který se následně nechá reagovat s radionuklidem, nebo se nejprve vytvoří vhodný komplex chelátoru s radionuklidem, který poté reaguje s protilátkou.

V současné době se nejvíce studovanými staly monoklonální protilátky, případně jejich jednovláknové fragmenty. Při aplikaci radiofarmaka do organismu zde mají protilátky funkci nosiče, který vhodný radionuklid dopraví do cíle, tedy ke struktuře, na níž se námi zvolená protilátka váže. Další osud značené protilátky, její rozložení v těle, lze zobrazit díky radionuklidu a vhodným detekčním systémům (SPECT kamery, gama kamery) [12].

Radionuklidová technika značení je zatím nenahraditelnou součástí vývoje metod pro diagnostiku in vivo i pro radioterapii. Protilátek, značených terapeutickými radionuklidy, lze využít jako cílená terapeutika, tedy díky specifické vazbě protilátky k ozáření především cílového nádoru.

### 4.2.1 Značení protilátky TU-20 $^{99m}$Tc

*1) Přímé značení*

Nuklid $^{99m}$Tc se používá pro přímé vázání proteinů přes thiolátové skupiny cysteinových reziduí za vzniku vazeb $^{99m}$Tc-cysteinyl-protein. Chemická redukce disulfidových vazeb v proteinech při přípravě thiolátů zvyšuje vázání $^{99m}$Tc. Tato strategie se používá, protože většina proteinů neobsahuje thioláty, ale mnoho jich obsahuje disulfidové vazby [10].

Redukci disulfidových vazeb v proteinu je možno provést reakcí proteinu s vhodným redukčním činidlem (2-merkaptoethanol). Nevýhodou je bohužel časté porušení vyšší struktury redukcí S-S můstků.

$^{99m}$Tc vstupuje do reakce s proteinem v redukované formě. K redukci eluované formy technecia ($^{99m}TcO_4^-$) se běžně požívají redukční činidla jako např. $SnCl_2.2H_2O$ [10].

K přímému značení protilátek se využívají také elektrolytické metody, při nichž se elektrolyzuje směs značené protilátky a radioaktivního technecia (eluátu). Elektrolýzou je uvolňován redukovaný radioaktivní kation $^{99m}$Tc, který se váže na redukovaný disulfid na proteinovém řetězci molekuly protilátky. Podstatnou výhodou elektrolytického značení je pouze malé množství redukčního činidla, které může jinak poškodit molekulu protilátky [12].

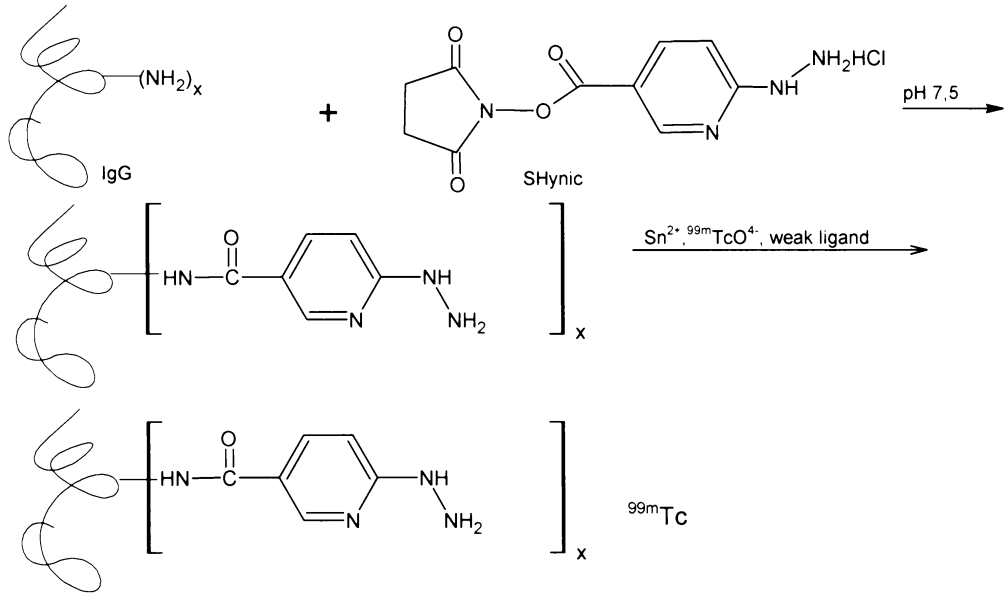
*2) Nepřímé značení*

Nepřímé značení je založeno na použití bifunkčního chelátu pro navázání $^{99m}$Tc na protilátku. Produktem eluovaným z generátoru je aniontová forma technecia ($^{99m}TcO_4^-$), která není příliš reaktivní k ligandům. Redukcí technecistanu na nižší oxidační stavy jsou získány vysoce reaktivní formy, které komplexují s mnoha sloučeninami. Pro radiofarmaceutické účely jsou nejdůležitější Tc(I), Tc(III), Tc(IV) a Tc(V). K redukci technecistanu se nejčastěji používá chlorid cínatý, který je nutno vzhledem k možnosti oxidace vzdušným kyslíkem připravit těsně před použitím [10].

Samotné navázání $^{99m}$Tc na bifunkční chelát je možno provést buď přímo, nebo za využití substituční metody.

Substituční metoda je založena na substituci bifunkčního chelátu s jiným slabým chelátem (co-ligand, weak ligand), který má funkci transchelatačního činidla. $^{99m}$Tc tedy nejprve vytvoří komplex se slabým chelátem, z kterého poté přejde na bifunkční chelát, s nímž vytvoří pevnější vazbu. Jako co-ligandy jsou používány glukonát sodný, tricin, glukoheptonát a další [13], [14], [15], [16], [17], [18].

Jedna z možných substitučních metod značení imunoglobulinů radionuklidem $^{99m}$Tc vyžívá jako bifunkční chelát HYNIC a slabým chelátem je zde tricin. Dvě molekuly tricinu nejprve vytvoří vazby s redukovanou formou $^{99m}$Tc (V), ze kterých po přídavku konjugátu imunoglobulin-bifunkční chelát přechází $^{99m}$Tc do pevnější vazby s bifunkčnícm chelátem HYNIC směrem k jeho volným hydrazinovým skupinám [13], [14], [15], [16], [17], [18].




Obr. 2 *Reakční schéma průběhu nepřímého značení monoklonální protilátky $^{99m}$Tc pomocí chelatačního činidla HYNIC.*

## 4.3 Biomolekuly

Pojem biomolekula chápeme jako molekulovou součást živého organismu. Tyto komplexní biomolekuly jsou tvořeny z opakujících se stavebních jednotek – monomerů (aminokyselin, sacharidů, mastných kyselin), jde tedy o makromolekulární látky s vysokou molekulovou hmotností a složitou strukturou. Vynikají unikátním prostorovým uspořádáním, k němuž se váže jejich biologická funkce. Hlavní komplexní organické biomolekuly buněk a tkání se skládají z nukleových kyselin, proteinů, polysacharidů a lipidů [19].

Živé organismy mají charakteristickou vlastnost, kterou je specifita vzájemného rozpoznávání biomolekul. Ta je dána jejich strukturou, jenž je pro interagující oblasti molekulových partnerů komplementární, takže do sebe zapadají. Specifické interakce mezi partnery nemají charakter pevných kovalentních vazeb, nýbrž elektrostatických interakcí, vodíkových můstků, hydrofobních interakcí a Londonových disperzních sil [19].

Jedním z nejdůležitějších důsledků interakcí, je imunitní reakce. Je založena na principu rozlišení molekul organismu vlastních a nevlastních. Celý imunitní systém se v organismu podílí, spolu s endokrinním systémem, na udržování vnitřního prostředí – homeostázy s jediným cílem, a to - ochránit organismus před infekcí [20], [21].

## 4.4 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Díky své schopnosti rozpoznat škodlivé od neškodného je schopen chránit organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu [22]. Způsob, na němž je založeno rozpoznávání vlastních částí těla od cizích, spočívá v rozeznávání chemických struktur, zejména bílkovin a cukrů jimi vázaných. Každá struktura, kterou lze rozeznat se nazývá antigen. Imunitní systém antigeny vlastního těla zná a toleruje je, avšak na přítomnost neznámých antigenů reaguje tvorbou protilátek [23].

Imunitní systém těla je složen ze dvou hlavních komponent - *B lymfocytů* a *T lymfocytů*. B lymfocyty jsou u vyšších živočichů odvozeny z buněk kostní dřeně. T lymfocyty pocházejí z thymu. Lymfocyty mají na svém povrchu receptory, které jsou

určeny pro každý jednotlivý antigen. B buňky jsou odpovědné za synthesu cirkulujících humorálních protilátek, známých jako imunoglobuliny. T buňky jsou součástí různých důležitých buňkami zprostředkovaných imunologických procesů, jako je rejekce štěpů, reakce z přecitlivělosti a obrana proti maligním buňkám a mnoha virům [24].

## 4.5 Antigeny a protilátky

Antigeny jsou látky, které imunitní systém rozpozná a reaguje na ně [22]. Pokud se dostanou antigeny do organismu, aktivují dvě různé skupiny lymfoidního systému. Jednak dají podnět k tvorbě protilátek, dále vedou k senzibilizaci buněk. Protilátky i senzibilizované buňky mohou specificky reagovat s antigenem. Antigen tedy vzbuzuje v organismu specifickou imunologickou odpověď, tvorbu protilátek a buněčné reakce.

Nejčastějšími antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí exoantigeny. Antigeny pocházející z organismu samotného se nazývají autoantigeny. Jako alergen se označuje exoantigen, který je schopen vyvolat patologickou (alergickou) imunitní reakci. Superantigen je exoantigen, který vyvolá nespecificky aktivaci velkého počtu lymfocytů nezávisle na jejich antigenní specifitě [22].

Antigeny mají dvě základní charakteristické vlastnosti. Imunogennost (schopnost indukovat tvorbu protilátek) a antigennost (schopnost reagovat s protilátkami) [11].

Základní podmínky imunogennosti antigenu jsou cizorodost pro daný organismus, dostatečná molekulová hmotnost a chemická komplexnost struktury.

Imunogenem označujeme látku, která indukuje humorální a buněčnou imunitní odpověď. Ve vztahu k němu rozlišujeme tzv. úplný antigen (imunogen reagující s protilátkami a receptory a T-lymfocytech) a tzv. neúplný antigen – hapten (nízkomolekulární látka, která není imunogen, ale je schopná reagovat s protilátkou in vitro) [11].

Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny. Malá oblast antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory, se nazývá epitop. Specifičnost protilátek je namířena právě proti haptenům nebo epitopům [22].

### 4.5.1 Protilátky

Chemicky jsou všechny protilátky glykoproteiny, náležející do třídy imunoglobulinů [24]. Základní vlastnosti protilátek můžeme kvantitativně popsat rozsahem tzv. imunospecifity a imunoreaktivity.

Imunospecifita je schopnost protilátky selektivně reagovat jen s určitým antigenem, jehož struktura je komplementární k dané strukturální oblasti protilátky. Za imunoreaktivitu se považuje rozsah navázání protilátky na antigen, kde by mělo v ideálním případě dojít ke stoprocentnímu vysycení veškerých vazebných míst na protilátce [11], [21].

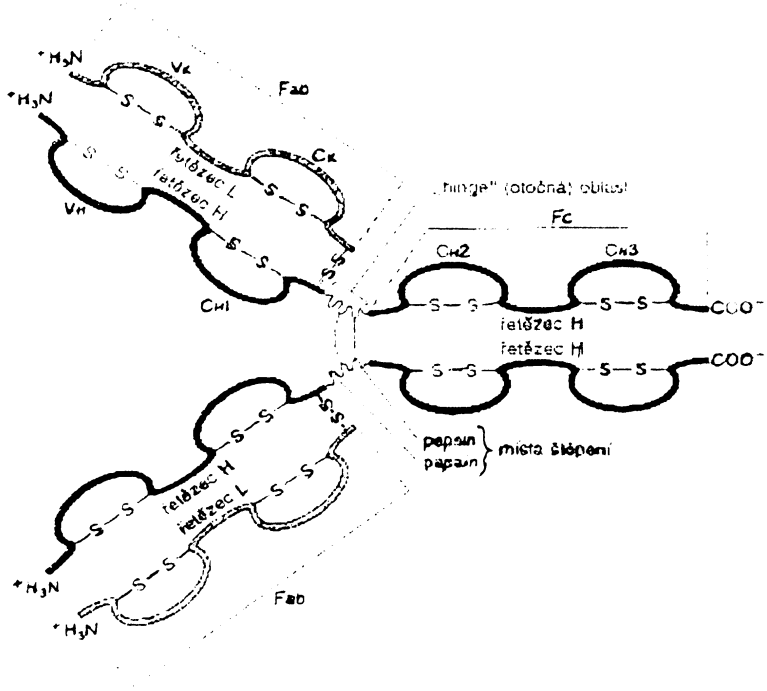
Všechny molekuly imunoglobulinů se skládají ze dvou identických lehkých řetězců (Mr = 23000) a dvou identických těžkých řetězců (Mr = 53000-75000), které tvoří tetrametr pomocí disulfidových vazeb. Těžké řetězce obsahují asi 430 aminokyselinových zbytků a lehké řetězce asi 214 aminokyselinových zbytků. Každý řetězec může být rozdělen do několika specifických oblastí, domén, které mají strukturní nebo funkční význam. Po natrávení imunoglobulinu Papinem vzniknou dva fragmenty se schopností vázat antigen (Fab) a jeden krystalizující fragment (Fc).

Obecně existují dva typy lehkých řetězců, kappa a lambda, které mohou být rozlišeny podle strukturních rozdílů v jejich CL oblastech. Molekula protilátky vždy obsahuje dva kappa nebo dva lambda lehké řetězce, nikdy směs.

Těžké řetězce můžeme rozdělit do pěti tříd, které se rozlišují na základě rozdílnosti v oblastech CH. Liší se v Mr v rozmezí od 50 000 do 70 000 a jsou označovány jako γ, α, μ, δ a ε. Typ těžkého řetězce určuje třídu imunoglobulinu i jeho funkci jako efektoru. Existuje pět tříd imunoglobulinů : IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Konstantní oblasti molekul imunoglobulinů, které tvoří fragment Fc, jsou odpovědné za efektorové funkce různých imunoglobulinů, tedy za vazbu složek komplementu a za vazbu protilátky na buňky, které mají vhodný receptor.

Variabilní oblasti molekul imunoglobulinů se skládají z domén VL a VH a jsou zcela heterogenní. Právě část molekuly imunoglobulinu, která váže specifický antigen, je tvořena amino-koncovými úseky obou řetězců, H i L, tj. doménami VH a VL. Ty nejsou lineárními sekvencemi aminokyselin, ale tvoří globulární oblasti se sekundární a terciální strukturou, čímž ovlivňují vazbu specifických antigenů.




Obr. 3 *Zjednodušený model IgG1, demonstrující čtyřřetězcovou strukturu a domény (VH, CH a další). Označení C přísluší konstantním oblastem. Místa štěpení molekuly působením pepsinu a papainu jsou vyznačena vlnovkami, disulfidické můstky interřetězcové i intrařetězcové jsou vyznačeny symbolem -S-S-.*

Protilátky je možné cíleně vyrábět. Polyklonální protilátky se získávají umělou imunizací zvířat, pro tvorbu monoklonálních protilátek se používá hybridomová technologie, kdy produkční buňky (hybridomy) vznikají umělou fúzí jiných buněk.

Protilátky můžeme charakterizovat na základě jejich izotypů, charakterizujících rozdíly tříd a podtříd, alotypů, což jsou varianty Ig specifické pro každého jedince, idiotypů, tedy antigenní determinanty lokalizované na V doménách a odlišující danou V doménu od ostatních, afinit, udávající pevnost vazby protilátky na antigenní determinantu, avidit, daných sílou interakce protilátky s celou molekulou multivalentního antigenu, titrem protilátek, což je poměr jednotek protilátky k jednotce objemu séra, vyjádřený obvykle jako převrácená hodnota nejvyššího ředění, které ještě dává pozitivní reakci, stabilitou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi [24].

### 4.5.2 Monoklonální protilátky (MAbs)

Metodou vyvinutou Köhlerem a Milsteinem [24] lze získat velké množství jedné monoklonální protilátky, specifické pro jeden epitop, chovající se jako chemické individuum. Součástí metody je buněčná fúze a permanentní buněčná linie - hybridom, produkující specifické protilátky. Plazmatické buňky (buňky produkující protilátky, vznikající z B-lymfocytů po setkání s antigenem, zpravidla isolované ze sleziny myši) se smíchají s myšími myelinovými (nádorovými) buňkami a přenesou se do polyethylenglykolu, který způsobí buněčnou fúzi.

Protilátky produkované hybridomy jsou chemicky, fyzikálně i imunologicky homogenní, neboť jsou produkovány buňkami odvozenými od jednoho buněčného klonu. Proto je pro ně užíváno označení monoklonální protilátky. Ve srovnání s polyklonálními protilátkami mají monoklonální protilátky obvykle nižší afinitu ke svým antigenům. Díky své specifičnosti pro jeden epitop, tedy sníženému riziku nespecifických a křížových imunitních interakcí, se staly užitečnými reagenty v mnoha oblastech biologie a medicíny [24].

### 4.5.3 Monoklonální protilátka TU-20

Jednou z nově připravených monoklonálních protilátek je **TU-20**. Tato protilátka byla připravena jako prostředek k detekci rozpadových produktů neuronálního cytoskeletu [25].

Všechny živé buňky obsahují cytoskelet neboli buněčnou kostru, která je složena z microtubulů, aktiniových a intermediárních filamentů. Cytoskelet neuronů degraduje s časem nejen mechanismy přirozeného stárnutí mozku, ale i v důsledku neurodegenerativních onemocnění (např. Parkinsonova a Huntingtonova choroba). Při rozpadu cytoskeletu buňky se objeví alfa a beta tubulinové podjednotky, elementy dimerního tubulinu, v mozkomíšním moku. β-tubulin má celkem sedm izotypů (I – VII), ale jen jedna z těchto tubulinových tříd, izotyp β-III-neurotubulin, se nalézá téměř výlučně v neuronech [25], [26]. Dle množství auto-protilátek proti tubulinu v mozkomíšní tekutině lze charakterizovat řadu neurodegenerativních chorob a procesů (např. Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu, HIV – přidruženou demenci).

Neurotubulin byl nalezen též v neurogenních nádorech, avšak v nádorech jiného původu se již nevyskytoval [27].

**TU-20, monoklonální protilátka, izotyp myší IgG1** o molekulové hmotnosti 150 000 Da, specificky se vážící na poslední sekvenci aminokyselin (peptidový řetězec z osmi aminokyselin ESESQGPK) C-konce lidské třídy *β-III-neurotubulinu*. Její specifita byla potvrzena pomocí imunochemických testů (ELISA testy, imunoflorescenční mikroskopie) [25].

ScFv fragment TU-20 (single-chain Fv fragment TU-20) je imunoreaktivním fragmentem variabilní části této protilátky (molekulová hmotnost fragmentu je 38 000 Da). Skládá se variabilního lehkého a těžkého řetězce spojeného navzájem biologicky inertním peptidovým linkerem [28]. Pokud označíme TU-20 nebo její fragment vhodným radionuklidem, lze ji použít ke studiu a následně např. k diagnostice či terapii.

## 4.6 Purifikace značených biomolekul

Během značení biomolekul radionuklidy může docházet k částečnému porušení struktury značené látky. V reakční směsi se pak mohou vyskytovat fragmenty jednotlivých molekul, které musí být odstraněny, neboť konečný produkt musí být čistý.

### 4.6.1 Gelová permeační chromatografie

Purifikace reakční směsi se provádí nejčastěji jednoduchou metodou a to gelovou chromatografií (Gel permeation chromatography GPC, známa též pod názvem Size exclusion chromatography SEC) [29].

Spočívá v dělení látek podle velikosti a tvaru jejich molekul, tzv. molekulově síťový efekt. Reakční směs je nanesena na kolonku, nejlépe v takovém množství, v kterém chceme eluovat frakce. Kolonka je naplněna stacionární fází, semipermeabilním gelem obsahujícím póry. Póry gelu mají určitou velikost, jenž umožňuje oddělení velkých molekul, které nemohou proniknout do pórů gelu a jsou tak unášeny mobilní fází, od molekul malých, které difundují do pórů gelu a jsou zpomalovány. Látky tedy eluují z kolonky, díky postupnému doplňování elučního činidla – mobilní fáze, v pořadí dle klesající molekulové hmotnosti. Jímané frakce pak lze s použitím vhodné detekční metody rozdělit na vysokomolekulární a nízkomolekulární části.

Velmi důležitý je výběr stacionární i mobilní fáze, neboť organické gely ve styku s mobilní fází bobtnají. Stupeň bobtnání je závislý na struktuře polymeru (stupni zesítění) a druhu elučního činidla [30].

## 4.7 Detekce vysokomolekulární frakce

K detekci látek bílkovinné povahy, vedoucí pouze k orientačnímu zjištění, zda jsou ve frakci přítomny bílkoviny, se používá vybarvování rozličnými barvivy [31]. Pro přesné stanovení koncentrace protilátky se využívá spektrofotometrie. Biomolekuly bílkovinné povahy pohlcují záření o vlnové délce 280 nm.

Výhodné je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High performance liquid chromatography HPLC), která umožňuje spojit samotnou filtraci na kolonce spolu s detekcí vysokomolekulární a nízkomolekulární látky [10].

## 4.8 Planární chromatografie

Jednou z nejrozšířenějších analytických metod je chromatografie umožňující účinnou separaci látek nutnou pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – *stacionární* (zakotvené) a *mobilní* (pohyblivé). Různé látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze vše využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Stacionární fází může být pevná látka (papír, $SiO_2$, $Al_2O_3$), ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči. Mobilní fází pak bývá kapalina či plyn. Z hlediska provedení uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fázi pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a další [32].

### 4.8.1 Papírová chromatografie

*Papírová chromatografie* byla po určitou dobu v praxi nejpoužívanější metodou plošné chromatografie. Její největší výhodou je ekonomicky nenáročné chromatografické médium využitelné pro separaci širokého množství látek od anorganických iontů až k složitým biomolekulám.

Základním separačním mechanismem je v případě papírové chromatografie rozdělovací rovnováha mezi vodou či jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. U látek s velkým počtem polárních skupin se často uplatňuje jejich silná interakce přímo s celulózou, v takových případech převládá adsorpční mechanismus dělení. Důležitou charakteristikou použitého chromatografického papíru (jedná se o speciální papír) je průtoková rychlost mobilní fáze – podle ní rozlišujeme chromatografické papíry s rychlým, standardním a pomalým průtokem. Rychlost průtoku významně ovlivňuje dobu separace a samozřejmě i její účinnost.

Chromatografii na papíře provádíme buď ve *vzestupném provedení*, kdy je papír zavěšen v chromatografické komoře a spodním okrajem je namočen do mobilní fáze a nebo v *sestupném provedení*, kdy je papír zavěšen ve vaničce s mobilní fází a ta putuje dolů. Vzorek nanášíme na vyznačený *start.* Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek podle pravidla podobné rozpouští podobné. Proto se pro polární látky používají směsi polárních organických rozpouštědel (alkoholy) s vodou a přídavkem kyseliny či báze, nepolární látky se pak chromatografují ve směsích nepolárních rozpouštědel (v takovém případě je třeba atmosféru komory sytit vodními parami z mističky s vodou). Pohyblivost látky na chromatogramu se vyjadřuje hodnotou $R_F$ , která se určuje jako poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovované látky ku vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla.

Papírovou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je povětšinou i časově velmi pohotová, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení neznámého vzorku v oblasti sledování znečištění životního prostředí, medicíně i chemickém výzkumu [32].

## 4.9 Elektroforéza

### 4.9.1 Elektromigrační (elektroforetické) metody

Elektromigračními či elektroforetickými metodami nazýváme soubor technik, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační technika byla poprvé použita Tiseliem, který s ní v roce 1937 rozdělil směs bílkovin. Později za tento objev obdržel Nobelovu cenu.

Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě [33]. Částice jsou při průchodu okolním médiem vystaveny odporu sil vnitřního tření. Jejich mobilita je tedy výsledkem rovnováhy mezi silou působící na ionty v elektrickém poli a silou vnitřního tření. Síla vnitřního tření se mění s viskozitou prostředí. Proto se změnou teploty dojde ke změně této síly a tudíž ke změně rychlosti pohybu částic. V průběhu elektroforézy dojde k ustavení rovnováhy, která je definována rovnováhou mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření. Při rovnováze budou mít obě síly stejnou hodnotu, ale opačného směru. Je zřejmé, že malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu (pohyblivost), zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní mobilita, tj. mobilita, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, bývá obvykle nižší než teoretická elektroforetická mobilita a je závislá na pH a použitém pufru.

Jednou z nejpoužívanějších modifikací PAGE je elektroforéza v přítomnosti *dodecylsulfátu sodného (SDS; PAGE-SDS).* Metoda je založená na schopnosti bílkovin vázat SDS v množství asi 1,4 mg na 1 mg bílkovin hydrofobní interakcí. Tato vlastnost bílkovin se zdá být univerzální a pravděpodobně souvisí se samotnou podstatou jejich terciární struktury. Množství navázaného SDS je tak velké, že náboje postranních zbytků aminokyselin jsou zanedbatelné vůči náboji sulfátových skupin, které jsou při biologicky relevantních hodnotách úplně disociované. SDS uděluje tedy proteinům uniformní záporný náboj a ty se pak všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly. Později bylo zjištěno, že pohyblivost bílkovin v gelu v přítomnosti SDS je nepřímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti.

V současnosti pravděpodobně nejpoužívanějším technickým provedením PAGE je diskontinuální (disková) elektroforéza. Její název je odvozen od toho, že vzorek

putuje po čas separace přes dva gely s různou porozitou a s různými elektrolyty. Nejpoužívanější je modifikace dle Laemmliho prováděná v přítomnosti SDS. Úkolem prvního gelu (koncentrující; *stacking gel*) je zakoncentrování (fokusace) vzorku do úzké zóny. Takto koncentrovaný vzorek vstupuje do dělícího gelu, jehož separační účinnost je pak vysoká bez ohledu na původní objem vzorku. Rozdílné funkce obou gelů lze dosáhnout vhodnou volbou pH a složení pufru a porozity gelu.

Po skončení elektroforézy je nutné rozdělené bílkoviny detekovat (vizualizovat). Toho lze dosáhnout pomocí barviv, která se s vysokou afinitou vážou na molekuly bílkovin, jako je Amidočerň 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S. Impregnace gelu roztokem barviva a posléze vymytí nespecificky vázaného přebytečného barviva (odbarvení) umožní pozorovat jednotlivé zóny bílkovin jako modré pásy na slabě modrém pozadí [33], [34].

## 4.10 Imunoanalytické metody in vitro

K analytickým účelům lze za určitých podmínek využít počáteční a velice rychlou fázi reakce antigen (Ag) – protilátka (Ab). Reakce probíhá dle rovnice (1), rovnice (2) vyjadřuje kinetickou konstantu celé reakce.

$$Ab + Ag \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} AbAg \qquad (1)$$

$$K = (AbAg) / (Ab)(Ag) \qquad (2)$$

Nutnou podmínkou pro sledování počáteční fáze reakce antigen – protilátka je označení jednoho z reaktantů reakce značenou molekulou, díky které můžeme po proběhnutí reakce kvantitativně stanovit značený volný či vázaný reaktant v AbAg. Pro značení se používají radionuklidy, fluorescenční látky, enzymy a další. V imunochemických metodách se používají jak reakce kompetitivní, tak i nekompetitivní, stanovení heterogenní i homogenní.
Kompetitivní uspořádání lze dále rozdělit na simultánní, kde se reaktanty smíchají najednou (simultánně) nebo postupně [35].

*Kompetitivní simultánní*

Jednotlivé reaktanty (Ag, Ab, Ag – značená) se smíchají najednou a značená a neznačená protilátka spolu soutěží o vazbu na antigenu. Avidita antigenu musí být pro značenou i neznačenou protilátku totožná. Za dodržení této podmínky je tedy pravděpodobnost navázání antigenu na označenou protilátku nepřímo úměrná koncentraci neznačené protilátky (při vysoké koncentraci neznačené protilátky se naváže jen malé množství značené protilátky a naopak).

*Kompetitivní postupné*

U tohoto uspořádání se nejprve smíchá neznačená protilátka s přebytkem antigenu a teprve po ustálení rovnováhy se přidá značená protilátka. Reakce se opět nechá ustálit. Po oddělení se stanoví frakce značené protilátky, která se následně použije k výpočtu koncentrace protilátky neznačené.

*Nekompetitivní uspořádání*

Princip této metody spočívá v ukotvení nadbytku protilátky (antigenu) na povrchu pevné fáze, která se poté nechá reagovat s antigenem.

Metody heterogenní a homogenní se odlišují v jednom kroku stanovení. Metoda, u které je nutné odseparovat značený volný reaktant od jeho vázané formy, se nazývá heterogenní. Homogenní metoda tento krok nepotřebuje [35].

### 4.10.1 Radioimunochemické metody RIA, IRMA

První radioimunochemickou metodou využívající k detekci radioizotopu se stala radioimunochemická metoda RIA. V roce 1959 dva američtí vědci, Yalowová a Berson, náhodou objevili, při studiu metabolismu radioaktivně značeného inzulínu ($^{131}$I), že v oběhu diabetiků existuje protein specificky vážící inzulín, který tak lze stanovit [35].

Radioimunologická analýza patří mezi vazebné testy, které nám umožňují stanovit koncentraci antigenu za využití specifické reakce mezi protilátkou a daným antigenem [26]. Princip stanovení je založen na nepřímé analýze, kdy se protilátka

ukotvená pevnou kovalentní vazbou na nerozpustný nosič či ve formě pevného komplexu, nechá reagovat s roztoky připravené smícháním známého množství značeného antigenu s různými množstvími neznačeného stanovovaného antigenu, které soutěží o vazebná místa protilátky. Do roztoku se poté přidá protilátka proti původní protilátce, což způsobí vznik nerozpustných imunokomplexů, jejichž aktivitu lze po odstředění detekovat. Tímto způsobem získáme referenční křivku závislosti aktivity na koncentraci neznačeného antigenu, kterou dále můžeme použít při stanovení neznámého množství neznačeného antigenu. Stanovení provádíme metodou standardního přídavku.

RIA je vysoce citlivou metodu, jenž nám umožňuje změřit množství antigenu řádově v nano až pikogramech. Umožňuje nám získat mnoho informací o biochemických procesech ligand-receptorových systémů. V současné době je však nahrazována stejně citlivými enzymovými testy ELISA, u kterých není potřeba pracovat s radioaktivním materiálem. Pro stanovení nízkomolekulárních látek však stále zůstává dominantní metodou.

IRMA, tedy imunoradiometrická analýza, je metoda založená na stejném principu jako RIA, s tím rozdílem, že radioaktivně značená je zde protilátka a ne antigen [35], [36].

### 4.10.2 Enzymová imunoanalýza EIA

Enzymoimunochemická stanovení jsou v současné době nejpoužívanějšími metodami pro detekci a kvantifikaci biologicky aktivních makromolekulárních látek vyskytujících se v nízkých koncentracích [26]. Tyto metody lze rozdělit na dvě hlavní techniky. První, heterogenní EIA, je známá jako ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), druhá, homogenní EIA, je označována zkratkou EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) [26].

Testy EIA jsou relativně rychlé, homogenní EIA trvá od desítek sekund, po několik minut, klasická sendvičová EIA trvá několik hodin. Metody EIA jsou stejně spolehlivé a citlivé jako RIA, není třeba používat značené reagencie a lze je hodnotit pouhým okem. Pro kvantitativní testy je nutno použít spektrofotometr. Jejich nevýhodou jsou vysoké nároky na kvalitu vody a nepřítomnost enzymových či substrátových jedů [26].

*Homogenní EIA*

Jde o metodu, kdy s limitovaným kvantem protilátky reaguje směs známého množství značeného antigenu se standardním množstvím neznačeného antigenu. Při vazbě protilátky na značený antigen dochází ke změně enzymové aktivity, a proto není třeba separovat značený antigen vázaný v imunokomplexu od volného. Jde o metodu rychlou a jednoduchou, ale na rozdíl od heterogenní, méně citlivou s náročnější přípravou reagencií. Používá se především ke kvantifikaci nízkomolekulárních látek.

EMIT

Homogenní imunochemická metoda EMIT, je analytická technika, která se používá pro kvantifikaci haptenu (Hp). Používá enzym jako značku konjugovanou s heptenem a reakci enzym-substrát jako detekční systém [35].

*CEDIA*

Tento typ homogenní EIA byl navržen a vyvinut s použitím technik genového inženýrství. Základem je využití dvou inaktivních fragmentů enzymu β-D-galaktosidasy pro měření enzymové aktivity a stanovení koncentrace antigenu [35].

*Heterogenní EIA*

Jde o metodu, kde je nutno oddělit značené reagencie vázané v imunokomplexu od volných. Značkovací molekula enzymu je konjugována s ligandem (antigenem, specifickou protilátkou proti antigenu, nebo protilátkou proti primární specifické protilátce). Základem ELISA testů je imunosorbce na pevné fázi, kde buď antigen, nebo protilátka jsou adsorbovány na povrch pevného nosiče. ELISA testy mohou využívat kompetitivního charakteru vazebné reakce ligand - protilátka, či naopak vycházet z nekompetitivní vazebné reakce. U všech postupů je však nutno separovat vázaný enzymový konjugát od volného enzymového konjugátu. Množství vázaného enzymového konjugátu stanovíme po přidání substrátu měřením katalytické reakce enzym-substrát, poskytující zabarvené, snadno detegovatelné, molekuly produktu [26], [35], [37], [38].

*Kompetitivní imunostanovení ELISA*

U tohoto typu stanovení soutěží o vazbu na limitované množství protilátky vázané na pevnou fázi neznačený antigen s antigenem značeným enzymem. Tato metoda se používá ke stanovení především nízkomolekulárních látek [35].

*Nekompetitivní imunostanovení ELISA*

IEMA (imunoenzymetric assay), nekompetitivní metoda známá též pod názvem sendvičová technika, se používá zejména pro stanovení antigenů, které mají nejméně dva různé antigenní determinanty [35].

*Přímá sendvičová ELISA*

Využívá se převážně k detekci antigenů, avšak lze ji použít i ke stanovení protilátek pomocí antigenů. Antigen vázaný na pevné fázi se nechá reagovat s označenou protilátkou. Po promytí, kterým se oddělí volná protilátka, je do jamek aplikován značený antiglobulin. Po dalším promytí a inkubaci s chromogenem se provede detekce enzymové aktivity komplexu vázaného na pevné fázi na základě optické hustoty zabarvení produktů výsledné reakce [37], [38].

*Nepřímá sendvičová ELISA*

Základem je opětovně reakce protilátky s antigenem zakotveným na pevné fázi. K protilátce inkubované s antigenem v prvním kroku je po promytí přidána protilátka proti původní protilátce, která je inkubována s již existujícím komplexem. Nenavázaná protilátka je opět odstraněna promytím. Pro specifické zabarvení reakce musí být ve vzorku přítomna původní protilátka specifická proti antigenu, na níž reaguje chromogen [26], [37], [38].

*Reagencie pro ELISA testy*

Protilátky, používané v ELISA testech, mohou být monoklonálního i polyklonálního původu. Jsou dodávány ve formě izolované imunoglobulinové frakce nebo jako antiséra. Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat. Monoklonální protilátky lze získat přímým množením v tkáňových kulturách či z ascitických tekutin myší, kterým byly injektovány buňky vyselektovaného hybridomu. Purifikace je prováděna srážením ascitické tekutiny za přítomnosti síranu amonného separací na iontoměničích nebo afinitní chromatografií.

Antigeny pro tuto metodu nemusí být zcela čisté, nesmí však obsahovat jiné antigeny schopné reakce s vyšetřovaným materiálem. Jsou získávány buď purifikací z přírodního materiálu, nebo rekombinantní technologií.

Enzymy vhodné pro ELISA testy by měly splňovat několik kriterií. Enzym by měl být stabilní, schopný vázat se na protilátky a na různé funkční skupiny antigenů, mít nízkou molekulovou hmotnost, vykazovat vysokou enzymovou aktivitu a reakční produkt enzymatické reakce musí být barevný nebo jinak snadno detekovatelný.
Jedním z nejčastěji užívaných enzymů je peroxidáza kořene křenu HRP (Horse-radish Peroxidase – M= 40 000 Da), aktivní skupinou je hemové barvivo (červenohnědé barvivo). Jejím substrátem je peroxid vodíku nebo urea peroxid, ze kterého se díky přítomnosti enzymu uvolňuje kyslík, který následně oxiduje bezbarvý chromogen za vzniku barevných, snadno detekovatených, reakčních produktů.

Chromogeny jsou založeny na bázi aminobenzenu, který se oxiduje na azobenzen. Nejvíce používaným chromogenem je TMB (3, 3´, 5, 5´-tetrametylbenzidin), zejména pro své nemutagenní a nekarcinogenní vlastnosti. V přítomnosti substrátového roztoku se tvoří jasně modré reakční produkty, po zastavení reakce kyselinou se barva mění na žlutou s maximem absorpce při 450 nm.
Dalšími používanými chromogeny pro peroxidázu jsou DAB (3,3´-diaminobenzidin.4HCl), ODP (1,2-diaminobenzen.2HCl) a 5AS (kyselina 5-aminosalycilová).
Jako pevná fáze se nejčastěji používají polystyrenové mikrotitrační jamky o objemu 0,5 ml s plochým dnem uspořádané do destiček 8x12. Dále jsou potřebné automatické pipety, promývače a spektrofotometr pro kvantitativní stanovení [26], [37], [38].

# 5 Experimentální část

## 5.1 Reagencie, roztoky a pufry

Roztoky používané pro značení TU-20 $^{99m}$Tc:

- 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkové (35 % HCl, p.a.) (Lach-Ner),
- 0,1 M roztok hydroxidu sodného (NaOH, p.a.) (LACHEMA) ,
- fyziologický roztok (0,9 % NaCl) (Fresenius Kabi).

Chemikálie používané pro značení TU-20 $^{99m}$Tc:

- N,N-Dimethylformamide ($C_3H_7NO$) (MERCK),
- dihydrát chloridu cínatého ($SnCl_2.2H_2O$, p.a.) (MERCK),
- N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine ($C_6H_{13}NO_5$) (Fluka),
- 2-Mercaptoethanol ($C_2H_6OS$) (SIGMA).

Pufry používané pro značení TU-20 $^{99m}$Tc:

- Fosfátový pufr (0,05 M, pH 7,4),
  příprava: na 1000 ml
  14,407 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4.12H_2O$, p.a.) (Lach-Ner),
  1,536 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($NaH_2PO_4.2H_2O$, p.a.) (LACHEMA),
  pH upraveno pomocí HCl či NaOH [39].

Chemikálie používané pro detekci vysokomolekulární frakce:

- bromfenolová modř ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) (SIGMA),
- ethanol ($C_2H_5OH$) (LACHEMA),
- chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) (LACHEMA),
- kyselina octová (99 % $CH_3COOH$, p.a.) (Lach-Ner).

Pro přípravu gelové kolonky byly použity:

- Sephadex G-25 (SIGMA),
  rozměr částic: 50-150 μm,
  příprava: 4-6 ml vody na 1 gram,
- fosfátový pufr (0,05 M, H 7,4).

Ligandy používané při značení TU-20 $^{99m}Tc$ :

- 6-MDP KIT (vyráběn v Ústavu jaderného výzkumu, Řež a.s.),
  složení: 6 mg methylendifosfátu (MDP)
  0,45 mg dihydrátu chloridu cínatého ($SnCl_2.2H_2O$)
  1 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny ($C_7H_6O_4$)
- SHYNIC (vyroben v Ústavu jaderného výzkumu, Řež a.s.).

Chemikálie používané pro kvantifikaci a stanovení vazebné kapacity značené protilátky:

- ELISA-VIDITEST anti-monoklonál proti neurotubulinu, verze IgG1 (VIDIA s.r.o.)

Chemikálie používané pro SDS-PAGE elektroforézu:

- akrylamid ($C_3H_5NO$) (SIGMA),
- N,N‘ – methylenebisacrylamide ($C_7H_{10}N_2O_2$) (SIGMA),
- sodium dodecyl sulfate ($C_{12}H_{25}O_4S.Na$) (SIGMA),
- trizma® base ($C_4H_{11}NO_3$) (SIGMA),
- bromfenolová modř ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) (SIGMA),
- ammonium persulfate ($(NH_4)_2S_2O_8$) (SIGMA),
- N, N, N‘, N‘ – tetramethylethylendiamine ($C_6H_{16}N_2$) (SIGMA),
- Glycine ($C_2H_5NO_2$) (SIGMA),
- bromfenolová modř ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) (SIGMA),
- brilliant blue R 250 ($C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$) (SIGMA).

Monoklonální protilátka TU-20

- Monoklonální protilátka TU-20 (EXBIO Praha, a.s.),
  dodávana ve formě roztoku: 1 ml PBS (Phosphate Saline Buffer),
  15 mM azidu sodného,
  koncentrace: 5,2 mg/ml,
  čistota: > 95 %.

## 5.2 Přehled aktivit a konverzních faktorů pro výpočet veličin v radiační ochraně pro radionuklid $^{99m}$Tc

- zprošťovaní úrovně aktivity a hmotnostní aktivity: $10^7$ Bq a $10^2$ kBq/kg
- absorpce v trávicím ústrojí vyjádřená koeficientem $f_1$ charakterizujícím v modelových výpočtech frakci, která přechází v trávicím ústrojí do tělových tekutin – pro všechny sloučeniny technecia: $f_1 = 0,80$
- absorpce v plicích je vyjádřena typem F, M, S (F - rychle, M - středně, S - pomalu) charakterizující modelovou rychlost, se kterou látka přechází z plic do tělesných tekutin a koeficientem $f_1$ charakterizujícím frakci přecházející z plic do trávicího ústrojí – pro všechny nespecifikované sloučeniny technecia: typ F; $f_1 = 0,80$
- konverzní faktory pro příjem vdechnutím (inhalace) radioaktivních aerosolů ($h_{inh}$) o dvou různých rozměrech a pro příjem požitím (ingesce) ($h_{ing}$) u radiačních pracovníků:
  $h_{inh}$ ($d_{aerosol}$ = 1μm) = $1,2.10^{-11}$ Sv/Bq,
  $h_{inh}$ ($d_{aerosol}$ = 5μm) = $2.10^{-11}$ Sv/Bq,
  $h_{ing}$ = $2,2.10^{-11}$ Sv/Bq [40].

## 5.3 Přístrojové vybavení

**LB 124 Berthold**

LB 124 je univerzální přenosný monitor kontaminace. Slouží k detekci a měření radioaktivní kontaminace beta a gama na povrchu. Přístroj se skládá ze zobrazovací jednotky s mikroprocesorovou elektronikou a ze xenonového proporcionálního detektoru s účinnou plochou okénka 100 mm x 150 mm. Data mohou být volitelně zobrazena jako četnost impulsů (ips) nebo jako plošná aktivita ($Bq/cm^2$). Software obsahuje knihovnu 57 nuklidů s příslušnými kalibračními faktory pro měření plošné aktivity. Veškeré měřené hodnoty se zobrazují na displeji.

**Studnová ionizační komora Bqmetr 4**

Ionizační komora je přístroj určený k měření vyšších hodnot aktivit. Vzorky se měří v uzavíratelných nádobkách jako např. penicilínky, ampule, eppendorfky a další.

Ionizační komora se skládá z měřící části tvořené vlastní ionizační komorou s vestavěným vstupním dílem a zdrojem vysokého napětí a vyhodnocovací části umístěné odděleně.

**ROTANA 460 Hettich**

Uvedený přístroj je laboratorní odstředivka s výkyvným rotorem (90°). Otáčky jsou nastavitelné od 500 do 8000 otáček/minutu v krocích po desítkách. Časovač odstředivky lze nastavit od 1 do 99 minut v minutových krocích nebo od 1 do 59 sekund po sekundových krocích. Jednotlivá nastavení (otáček, času) lze uložit jako program.

**Spektrofotometr SUNRICE pro měření mikrotitračních destiček**

Spektrofotometr SUNRICE se používá k proměření optické hustoty obsahů mikrotitračních jamek po ukončení barevné reakce. Přístroj měří transmitanci prošlého světla, kterou konvertuje do hodnot optické hustoty. Je to automaticky pracující zařízení řízené externím softwarem. Umožňuje selekci jakékoli vlnové délky filtru v rozmezí 340-750 nm.

transmitance $T = I/I_0$ I = detekované světlo,

$I_0$ = emitované světlo,

optická hustota $OD = \log 1/T$.

Ovládání spektrofotometru a transformaci dat do formy tabulek zajišťuje programové vybavení (Magellan) určené k instalaci na řídícím PC. Program zajišťuje ovládání nosiče mikrotitračních jamek, kontrolu stálosti vnitřní teploty, typy použitých filtrů, režim a kinetické podmínky měření.

**RITA STAR – raytest**

Rita (**R**adio **I**sotope **T**hin layer **A**nalyzer) je přístroj umožňující měření chromatogramů radioaktivně značených vzorků, vyvinutých tenkovrstvou papírovou chromatografií. Po změření vzorku obsahujícího radionuklid umožňuje podat informaci o distribuci radioaktivity na chromatogramu a tedy i o distribuci látek značených radionuklidy. Přístroj obsahuje plynovou proporciální sondu pro měření radioaktivního záření. Vzorky jsou měřeny na papírových proužcích o velikosti 1000*200 mm. Ovládání RITA-STARU je zajištěno programovým vybavením určeným k instalaci na řídícím PC. K přístroji je dodáváno softwarové vybavení GINA-star TLC, které umožňuje další zpracování chromatogramů.

**pH metr**

Kompaktní přenosný pH metr inoLab pH 720 s gelovou elektrodou SenTix 41.

**Spektrofotometr Helios UV vis**

Spektrofotometr Helios patří do skupiny přístrojů, které mohou být nezávisle ovládány jak prostřednictvím integrované klávesnice a LCD displeje, tak prostřednictvím připojeného PC. Obsahuje halogenovou a deuteriovou lampu. Je schopen měřit absorbanci v rozmezí od 190 nm do 1100 nm.

## 5.4 Analytické a separační metody

### 5.4.1 Imunoanalýza – ELISA *(Enzymme Linked Immunosorbent Assay)*

Imunoreaktivita monoklonální protilátky TU-20 značené radinuklidem $^{99m}Tc$ byla sledována pomocí ELISA testů. Jedná se o imunoalytické testy ELISA určené pro detekci a charakterizaci myší monoklonální protilátky TU-20 proti neurotubulinu.

V tomto případě byly pro detekci protilátky TU-20 použity komerční kity ELISA firmy VIDIA **ELISA-VIDITEST anti-MONOKLONÁL PROTI NEUROTUBULINU, verze IgG1.** Tyto imunoanalytické testy jsou založeny na principu nepřímé sendvičové ELISY. Neurospecifická část tubulinu (antigen) je imobilizována na povrchu jamek mikrotitračních destiček. Je-li v testovaných vzorcích přítomna příslušná monoklonální protilátka, naváže se na imobilizovaný antigen. Navázaná myší (primární) protilátka v dalším kroku reaguje se zvířecími (sekundárními) protilátkami proti myším imunoglobulinům značenými křenovou peroxidázou. Množství primární protilátky se pak stanoví barevnou enzymatickou reakcí protilátky sekundární, kde jako chromogenní substrát slouží tetrametylbenzidin a peroxid vodíku [37].

#### 5.4.1.1 ELISA souprava

Sada ELISA-VIDITEST anti-monoklonál proti neurotubulinu obsahuje:

- ELISA odlamovací stripy v manipulačním rámečku potažené specifickým antigenem – 12 ks
- myší monoklonální protilátka TU-20 proti neurotubulinu (pozitivní kontrola) 10x koncentrovaná – 0,25 ml
- monoklonální protilátka proti cizímu antigenu (negativní kontrola) 10x koncentrovaná – 0,25 ml
- prasečí protilátka proti myším imunoglobulinům značených peroxidázou (Px-konjugát) – 0,2 ml
- promývací roztok 10x koncentrovaný – 125 ml
- ředící roztok – 125 ml
- chromogensubstrátový roztok TMB – 15 ml

- STOP roztok (kyselina sírová o určité koncentraci) – 30 ml

#### 5.4.1.2 Příprava roztoků

Pro přípravu roztoků je nutné používat deionizovanou nebo destilovanou vodu. Testované vzorky jsou ředěny ředícím roztokem dle očekávaného obsahu protilátky, v tomto případě v poměrech 1:50, 1:100, 1:500. Pracovní koncentrace promývacího roztoku je připravena jeho naředěním v poměru 1:9 ve vhodném objemu vody. Px-konjugát je ředěn ředícím roztokem v poměru 1:100. Všechny roztoky je vhodné připravovat vždy čerstvé, aby byla zaručena mikrobionální čistota.

#### 5.4.1.3 Obecný postup

ELISA soupravu vytemperujeme na laboratorní teplotu.

- Sestavíme si schéma aplikace vzorků,
- připravíme si potřebný počet odlamovacích stripů pro reakci,
- jamky plníme dle schéma aplikace vzorků po 100 µl ředěnými vzorky neznačené protilátky TU-20 o vhodných koncentracích, jejichž proměřením získáme hodnoty optické hustoty do kalibrační křivky, samotným ředícím roztokem pro stanovení pozadí reakce – tzv. blank a samotnými vzorky, inkubujeme 60 minut při laboratorní teplotě,
- odsajeme obsah jamek do pojistné láhve a promyjeme 4x 250 µl promývacího roztoku,
- do všech jamek napipetujeme po 100 µl ředěného Px-konjugátu, inkubujeme 60 minut při laboratorní teplotě,
- tekutinu z jamek poté opět odsajeme a promyjeme 4x 250 µl promývacího roztoku,
- osmiportovou pipetou napipetujeme do všech jamek po 100 µl chromogensubstrátového roztoku (TMB), důležité je pipetovat rychle v pravidelném rytmu, stripy překryjeme alobalem a na temném místě necháme 10 minut inkubovat,
- v průběhu reakce se mění zabarvení do světle modré barvy,
- reakci zastavíme přidáním 100 µl STOP roztoku osmiportovou pipetou, pipetujeme ve stejném rytmu jako při rozplňování chromogensubstrátového

roztoku, aby enzymatická reakce probíhala ve všech jamkách po stejnou dobu, necháme inkubovat 5 minut,

- po přidání STOP roztoku dochází ke změně zabarvení pozitivních jamek žlutě,
- intenzitu barevné reakce změříme na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm za použití referenčního filtru 630 nm,
- měření se provádí nejdříve 5 minut a nejpozději 30 minut po zastavení reakce [37].

## 5.4.2 Elektroforéza

Elektroforéza v přítomnosti SDS – **SDS PAGE** je metoda používaná pro charakterizaci a srovnání bílkovin. Tato metoda je založena na separaci bílkovin, dle rozdílné relativní molekulové hmotnosti. Na základě srovnání relativních mobilit neznámé bílkoviny a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost [33], [34].

V tomto případě byla SDS elektroforéza použita ke kontrole struktury značené protilátky. Kontrola struktury je založena na porovnání elektroforetické pohyblivosti značené a nativní protilátky.

### 5.4.2.1 Příprava reagencií

A - 30 g akrylamidu, 0,8 g N,N-metylenbisakrylamidu doplníme do 100 ml vodou,

B - 1 g SDS doplníme do 10 ml vodou,

C - 36,4 g Tris rozpustíme ve 200 ml vody, dotitrujeme koncentrovanou HCl na pH 8,8 a doplníme do 400 ml vodou,

D - 3 g Tris rozpustíme v 50 ml vody, dotitrujeme koncentrovanou HCl na pH 6,8 a doplníme do 100 ml vodou,

E - 30,3 g Tris, 144 g glycinu, 10 g SDS doplníme do 1 l vodou,

F - 100 mg bromfenolové modři rozpustíme v 10 ml roztoku D,

G - 0,5 g persíranu amonného doplníme do 5 ml vodou,

H - 10 % separační gel – 20 ml A, 30 ml C, 0,6 ml B, 8,8 ml vody, 20 μl TEMED, 0,6 ml G,

L - ekvilibrační roztok – 50 ml C, 1 ml B, 49 ml vody,

I - zaostřovací gel – 1 ml A, 5 ml D, 0,1 ml B, 3,8 ml vody, 5 µl TEMED, 0,15 G,

J - vzorový roztok neredukující – 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4,4 vody, 0,1 ml F,

K - vzorový roztok redukující – 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 0,5 ml ME, 4 ml vody, 0,1 ml F,

M - elektrodový pufr – 100 ml E, 900 ml vody,

N - barvící roztok – 450 ml EtOH, 100 ml koncentrované kyseliny octové, 450 ml vody, 0,5 g Coomassie blue,

O - odbarvovací roztok – 250 ml EtOH, 100 ml koncentrované kyseliny octové, 650 ml vody.

#### 5.4.2.2 Obecný postup

- Sestavíme skleněnou kyvetu pro nalití gelu,
- připravíme separační gel H,
- nalijeme separační gel H do kyvety a necháme zpolymerovat (2 hodiny),
- zalijeme ekvilibračním roztokem L,
- před použitím slijeme ekvilibrační roztok L,
- nalijeme zaostřovací gel I,
- zasuneme plastikovou formu pro vytvoření jamek pro vzorky,
- necháme zpolymerovat (2 hodiny),
- označíme jamky, vyndáme plastikovou formu,
- skleněnou kyvetu umístíme do elektroforetické aparatury a zalijeme pufrem E,
- k 200 µl analyzovaného vzorku přidáme 50 µl redukujícího roztoku K či neredukujícího roztoku J,
- vzorky vaříme ve vodní lázni po dobu 2 minut,
- 20 µl připraveného vzorku naneseme do jamky podvrstvením pod elektrodový pufr pomocí stříkačky Hamilton,
- elektrodovou nádobu uzavřeme víkem a připojíme ke zdroji,
- napětí se nastaví na 10 V na cm délky gelu,

- elektroforézu ukončíme po doputování ostré zóny bromfenolové modři ke spodnímu okraji gelu,
- gel vyjmeme z kyvety a v barvícím roztoku N ho necháme třepat přes noc na laboratorní třepačce,
- poté pozadí odbarvujeme v odbarvovacím roztoku O.

### 5.4.3 Purifikace

Jedním z důležitých parametrů pro hodnocení kvality radiofarmak je chemická čistota. Proto je nutno reakční směs přečistit a jímané frakce s pomocí vhodné detekční metody rozdělit na nízkomolekulární a vysokomolekulární.

V našem případě byla prováděna purifikace konjugátu protilátka-ligand gelovou chromatografií. Jako stacionární fáze byl použit hydrofilní dextranový gel Sephadex G25 a jako mobilní fáze byl zvolen 0,05M fosfátový pufr o pH 7,4.

#### 5.4.3.1 Obecný postup

- Skleněnou kolonku o objemu 10 ml naplníme do požadovaného objemu Sephadexem G25 a promyjeme minimálně 30 ml pufru,
- na kolonku naneseme 1 ml připraveného konjugátu,
- za průběžného doplňování pufru jímáme frakce o objemu 1 ml.

### 5.4.4 Detekce vysokomolekulární frakce

K detekci vysokomolekulární frakce byla využita metoda barvení za přítomnosti bromfenolové modři a chloridu rtuťnatého.

#### 5.4.4.1 Obecný postup

- 8 ul frakce s předpokládaným obsahem bílkoviny naneseme na proužek chromatografického papíru a vysušíme,
- na 5 minut vložíme do 1% roztoku bromfenolové modři v ethanolu syceném chloridem rtuťnatým,
- poté 30 minut odbarvujeme v 0,5% roztoku kyseliny octové,
- frakce s protilátkou zůstává po vysušení žlutě zabarvená.

Přesné stanovení koncentrace monoklonální protilátky TU-20 v jednotlivých frakcích a dále reakčních směsích bylo měřeno spektrofotoetricky, při vlnové délce 280 nm.

### 5.4.5 Papírová chromatografie

Radiochemická čistota diagnostických látek na bázi $^{99m}Tc$ je testována chromatografickými metodami (papírová a tenkovrstvá chromatografie). Jako rozpouštědlo o vysoké polaritě se používá fyziologický roztok [10].

Kontrola čistoty reakční směsi byla v tomto případě sledována pomocí papírové chromatografie. Experimentální uspořádání bylo vzestupné. Chromatografie byla prováděna na chromatografickém papíru firmy Whatman č. 1. Jako mobilní fáze byl zvolen 0,9 % roztok NaCl.

#### 5.4.5.1 Obecný postup

- před použitím nastříháme chromatografický papír na proužky o minimální délce 15 cm a šířky podle počtu nanášených vzorků,
- 8 µl vzorku naneseme na vyznačený start, který by měl být alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze,
- chromatogram umístíme do chromatografické komory,
- vyvíjíme, dokud čelo rozpouštědla neurazí vzdálenost minimálně 10 cm,
- detekci provádíme po vyjmutí papíru a jeho vysušení.

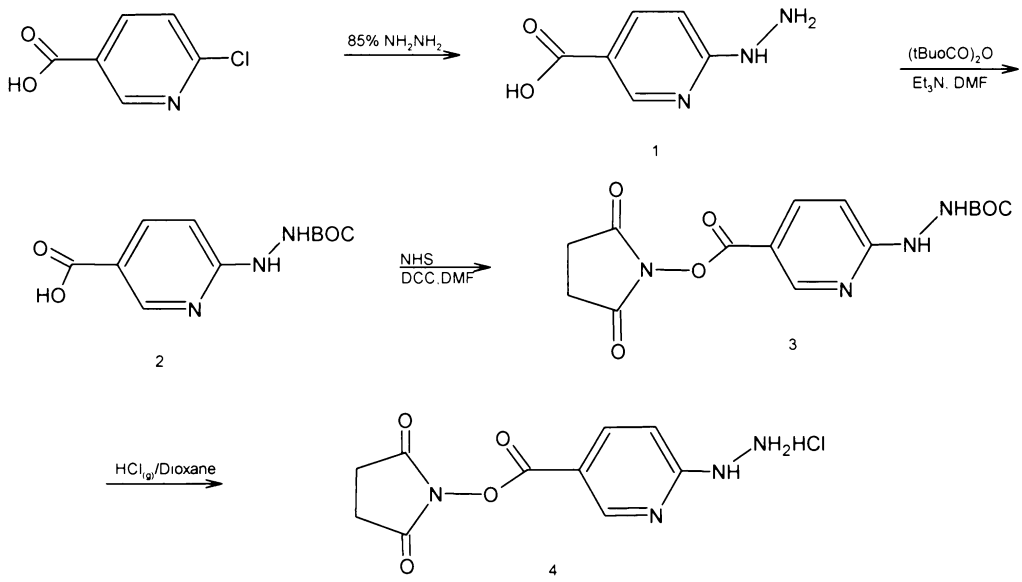
Detekce chromatogramů byla prováděna na RITA-STAR.

## 5.5 Metody značení

### 5.5.1 Značení protilátky TU-20 $^{99m}$Tc přes bifunkční chelát HYNIC

Jednou z metod značení monoklonálních protilátek radionuklidy je značení za přítomnosti bifunkčního chelátu, jehož úkolem je vytvořit spojení mezi protilátkou a radionuklidem.

V tomto případě byl jako bifunkční chelát zvolen HYNIC (hydrazinonikotinová kyselina). Jako reaktant, pro vytvoření konjugátu protilátka-HYNIC, byl však používán SHYNIC (hydrochlorid succinimidyl-6-hydrazinonikotinové kyseliny).




Obr. 4 *Reakční schéma pro přípravu hydrochloridu sukcinimidyl-6-hydrazin-nikotinové kyseliny.*

Konjugát protilátka-HYNIC se vytvoří po navázání HYNIC na volnou amino skupinu v molekule lysinu obsažené v monoklonální protilátce. Samotné značení konjugátu radionuklidem probíhá po přídavku $^{99m}$Tc a vhodného transchelatačního činidla.

$^{99m}$Tc, který získáme z eluátu ve formě $^{99m}$Tc-technecistanu sodného, je nutno zredukovat. V tomto případě byl jako redukční činidlo používán $SnCl_2.2H_2O$.

Jako transchelatační činidlo byl zvolen tricin [13], [14], [15], [16], [17], [18].

#### 5.5.1.1 Vypracovaný a doporučený postup

- Zásobní roztok HYNIC: 13,9 mg HYNIC rozpustíme v 7 ml DMF,
- 10 µl zásobního roztoku HYNIC a 750 µg protilátky TU-20 smícháme v reakční nádobce a doplníme 0,8 ml fosfátového pufru,
- doba konjugace: 4, 24 hodin,
- konjugát přečistíme a rozdělíme na gelové kolonce (sephadex G 25) na 6 frakcí jímaných po 1 ml,
- objem sloupce kolonky: 3,5 ml, 5 ml, 7,5 ml, 9 ml,
- stanovíme přítomnost vysokomolekulární složky ve frakcích (odbarvením, spektrofotometricky),
- zásobní roztok $SnCl_2.2H_2O$: 12,6 mg $SnCl_2.2H_2O$ rozpustíme v 7,8 ml deoxygenované HCl,
- zásobní roztok tricinu: 140 mg tricinu rozpustíme v 3 ml $H_2O$ a 0,9 ml 0,1M NaOH,
- v přesném pořadí smícháme 100 µl tricinu, 2,5 µl $SnCl_2.2H_2O$ příslušných zásobních roztoků, $^{99m}Tc$ (60MBq), konjugát,
- reakční směs přečistíme na kolonce (objem sloupce kolonky 7,5 ml), popř. následné analýzy provádíme přímo s reakční směsí,
- analýzy: ověření přítomnosti protilátky, popř. zjištění množství – spektrofotometrie,
  ověření vazebnosti protilátky – ELISA,
  kontrola struktury protilátky – elektroforéza,
  zjištění čistoty a stability reakční směsi – papírová chromatografie.

### 5.5.2 Značení protilátky TU-20 přímo pomocí 2-merkaptoethanolu

Přímé značení je založeno na navázání radionuklidu přímo na molekulu monoklonální protilátky. $^{99m}$Tc se v proteinech váže přes thiolátové skupiny cysteinu za vzniku vazby $^{99m}$Tc-cysteinyl-protein. Zvýšení vázání $^{99m}$Tc je zajišťováno redukcí disulfidových vazeb v proteinech [10].

V tomto případě byl jako redukční činidlo pro redukci disulfidových vazeb v proteinech použit merkaptoethanol. Redukce $^{99m}$Tc-technecistanu sodného (eluát) byla prováděna v přítomnosti $SnCl_2.2H_2O$, obsaženého v 6-MDP kitu.

#### 5.5.2.1 Vypracovaný a doporučený postup

- Zásobní roztok merkaptoethanolu: 100 µl merkaptoethanolu do 1 ml destilované vody,
- k 94 µl zásobního roztoku 2-merkaptoethanolu přidáme 750 µg protilátky TU-20 a doplníme do 1 ml fosfátovým pufrem,
- reakční doba: 10 minut,
- reakční směs rozdělíme na gelové kolonce sephadexu G25 na 6 frakcí, jímaných po 1 ml,
- objem sloupce kolonky: 7,5 ml, 9 ml,
- stanovíme přítomnost vysokomolekulární složky ve frakcích (odbarvením, spektrofotometricky),
- 6-MDP kit rozpustíme v 5 ml fyziologického roztoku,
- reakční směs: 10 µl 6-MDP kitu smícháme s eluátem $^{99m}$Tc (60 MBq) a přidáme frakci s vysokomolekulární složkou,
- reakční směs přečistíme na kolonce (objem sloupce kolonky 7,5 ml), popř. následné analýzy provádíme přímo s reakční směsí,
- analýzy: ověření přítomnosti protilátky, popř. zjištění množství – spektrofotometrie,
  ověření vazebnosti protilátky – ELISA,
  kontrola struktury protilátky – elektroforéza,
  zjištění čistoty a stability reakční směsi – papírová chromatografie.

### 5.5.3 Přímé značení protilátky TU-20 elektrolyticky

Pro přímé značení protilátek radionuklidy se také využívají elektrolytické metody. Elektrolýzou aniontové formy technecia ($^{99m}TcO_4^-$), získané z generátoru, dojde k jeho redukci na nižší oxidační stavy a více reaktivní formy.

V našem případě byla elektrolýza prováděna dvěma způsoby. Elektrolýza směsi protilátka-eluát i elektrolýza samotného eluátu, ke kterému byla protilátka poté přidána. Podmínky elektroforézy byly řízeny laboratorním zdrojem a redukce $^{99m}Tc$-technecistanu probíhala za přítomnosti cínové elektrody.

#### 5.5.3.1 Vypracovaný a doporučený postup

- Připravíme 1 ml reakčního objemu:
  60 MBq $^{99m}Tc$ (eluát), doplníme do 1 ml NaCl,
  60 MBq $^{99m}Tc$ (eluát), 144 µl TU-20, doplníme do 1 ml NaCl,
- na laboratorním zdroji nastavíme hodnotu 0,05 mA,
- elektrodu vložíme do reakční směsi a necháme 20 sekund elektrolyzovat,
- reakční doba: 15 minut,
- reakční směs přečistíme na kolonce (objem sloupce kolonky 7,5 ml), popř. následné analýzy provádíme přímo s reakční směsí,
- analýzy: ověření přítomnosti protilátky, popř. zjištění množství – spektrofotometrie,
  ověření vazebnosti protilátky – ELISA,
  kontrola struktury protilátky – elektroforéza,
  zjištění čistoty a stability reakční směsi – papírová chromatografie.

# 6 Výsledky a diskuse

## 6.1 Značení TU-20 $^{99m}$Tc přes bifunkční chelát HYNIC

Experimenty byly prováděny za reakčních podmínek, které byly měněny dle požadavků na reaktivitu, čistotu a stabilitu reakční směsi. Pro dobu konjugace (protilátka-HYNIC) byly zvoleny dva časové intervaly, 4 hodiny a 24 hodin. Čistota reakční směsi byla sledována a zvyšována úpravou objemu gelu (sephadex G25) při purifikaci konjugátu TU-20-HYNIC gelovou permeační chromatografií. Frakce s obsahem vysokomolekulární složky byla následně použita pro značení. Značení bylo prováděno dle postupu viz. kap. 5.5.1.1.

### 6.1.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie frakcí (protilátky) po rozdělení konjugátu TU-20-HYNIC na gelových kolonkách o různých objemech gelu (Sephadex G25). Měření byla prováděna při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru HELIOS. Označené frakce byly použity pro značení.

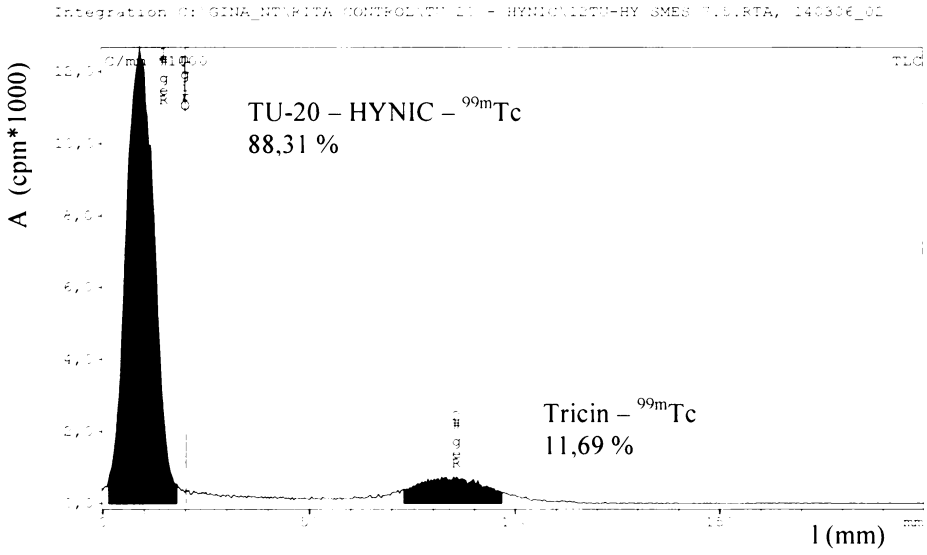
Tab. 1 *Koncentrace TU-20 pro jednotlivé frakce získané dělením konjugátu TU-20-HYNIC o vstupní koncentraci TU-20 750 μg/ml na kolonkách o různých objemech gelu.*

| objem gelu | 3,5 ml | 5 ml | 7,5 ml | 9 ml |
|---|---|---|---|---|
| frakce | koncentrace TU-20 (μg/ml) | koncentrace TU-20 (μg/ml) | koncentrace TU-20 (μg/ml) | koncentrace TU-20 (μg/ml) |
| 1 (TU-20-Hy) | 37 | 0 | 0 | 0 |
| 2 (TU-20-Hy) | 44 | 97 | 0 | 0 |
| 3 (TU-20-Hy) | **310** | **328** | 148 | 0 |
| 4 (TU-20-Hy) | 147 | 119 | **451** | 42 |
| 5 (TU-20-Hy) | 101 | 111 | 46 | **640** |
| 6 (TU-20-Hy) | 66 | 63 | 53 | 22 |

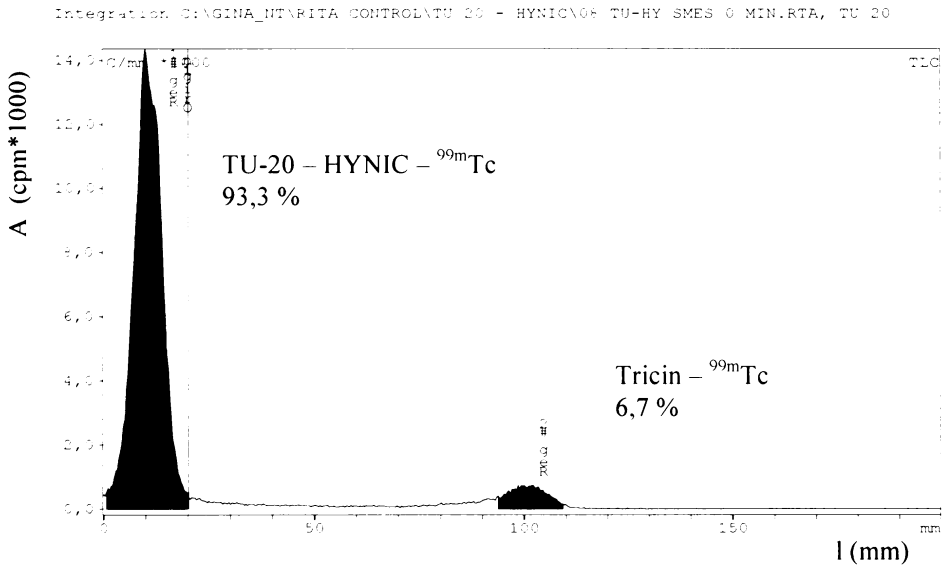
### 6.1.2 Chromatografie

Papírovou chromatografií byla sledována čistota reakčních směsí. Chromatogramy ukazující stabilitu reakční směsi jsou uvedeny v kapitole 11.1.1 - viz. přílohy.

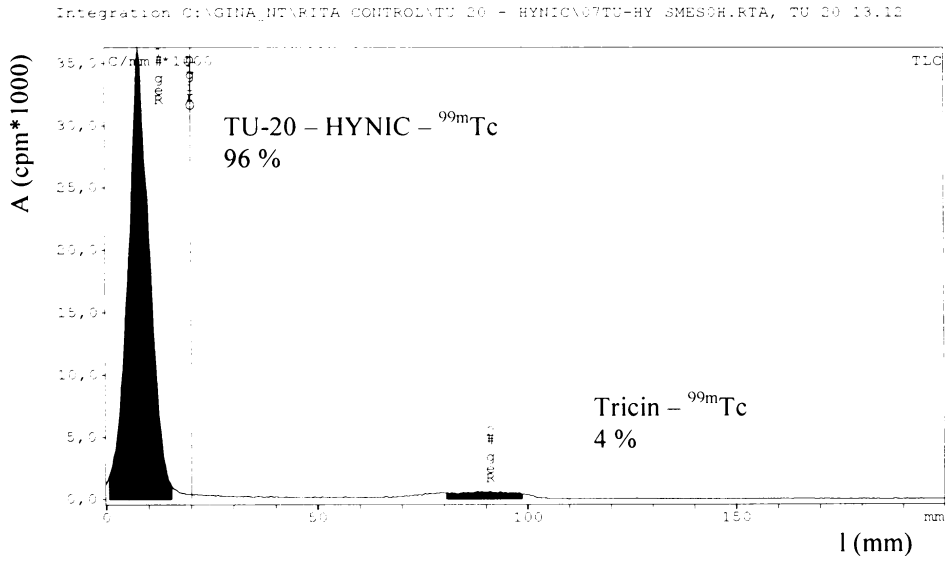
Na chromatogramu jsou zaznamenány dva píky. Na startu můžeme vidět TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc, druhý pík pak odpovídá chelátu TRICIN-$^{99m}$Tc.



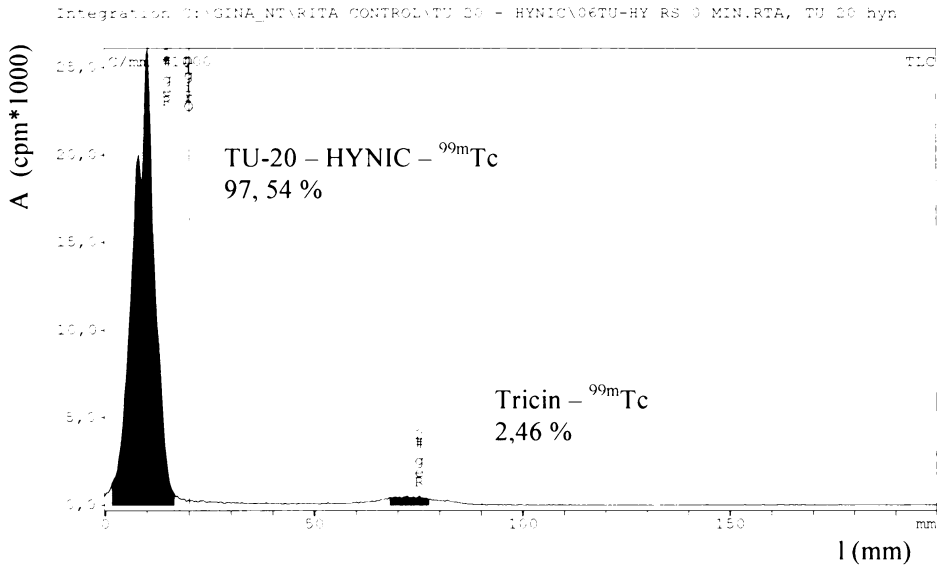

Obr. 5 *Reakční směs TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc. Doba konjugace (TU-20-HYNIC) byla 4 hodiny. Konjugát byl purifikován na kolonce o objemu gelu 7,5 ml.*



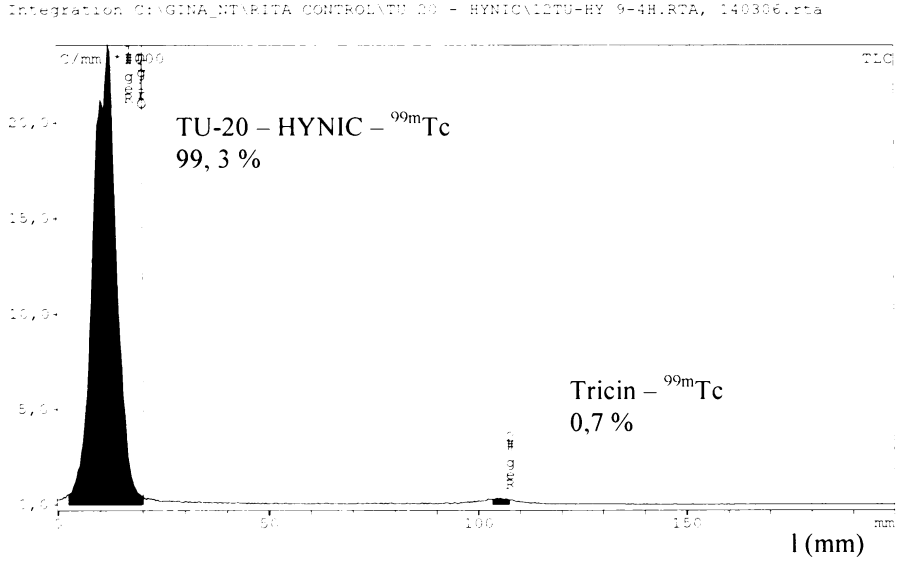

Obr. 6 *Reakční směs TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc. Doba konjugace (TU-20-HYNIC) byla 24 hodin. Konjugát byl purifikován na kolonce o objemu gelu 3,5 ml.*




Obr. 7 *Reakční směs TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc. Doba konjugace (TU-20-HYNIC) byla 24 hodiny. Konjugát byl purifikován na kolonce o objemu gelu 5 ml.*




Obr. 8 *Reakční směs TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc. Doba konjugace (TU-20-HYNIC) byla 24 hodiny. Konjugát byl purifikován na kolonce o objemu gelu 7,5 ml.*




Obr. 9 *Reakční směs TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc. Doba konjugace (TU-20-HYNIC) byla 24 hodiny. Konjugát byl purifikován na kolonce o objemu gelu 9 ml.*

## 6.2 Značení TU-20 $^{99m}$Tc pomocí 2-merkaptoethanolu

Analyzovány byly reakční směsi i frakce vzniklé přečištěním reakční směsi gelovou permeační chromatografií. Čistota reakční směsi byla zajišťována purifikací samotné protilátky TU-20 po jejím zredukování 2-merkaptoethanolem a následně byla přečištěna i reakční směs. Protilátka byla značena podle postupu viz. kap. 5.5.2.1.

### 6.2.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie frakcí (protilátky), po redukci 2-merkaptoethanolem, TU-20 (ME) na gelové kolonce (Sephadex G25). Objemy gelu v kolonkách byly 7,5 ml a 9 ml. Měření byla prováděna při vlnové délce 280 nm. Pro značení byly použity frakce s nejvyšším obsahem TU-20.

Tab. 2 *Koncentrace TU-20 pro jednotlivé frakce získané čištěním směsi TU-20 (ME) o vstupní koncentraci TU-20 750 µg/ml na kolonách o daných objemech gelu.*

| objem gelu | | 7,5 ml | 9 ml |
|---|---|---|---|
| | frakce | koncentrace TU-20 (µg/ml) | koncentrace TU-20 (µg/ml) |
| 1 | TU-20 (ME) | 0 | 0 |
| 2 | TU-20 (ME) | 12 | 1 |
| 3 | TU-20 (ME) | 67 | 3 |
| 4 | TU-20 (ME) | **358** | 93 |
| 5 | TU-20 (ME) | 220 | **530** |
| 6 | TU-20 (ME) | 78 | 46 |

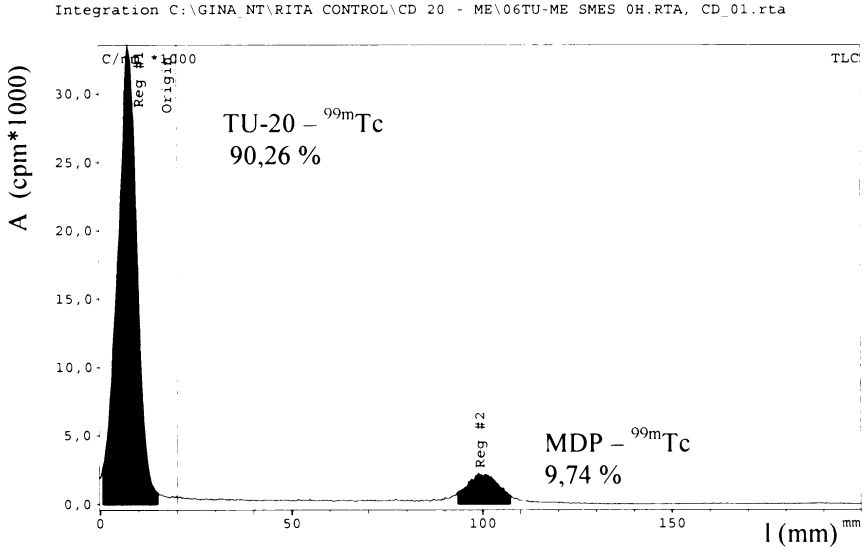
Spektrofotometrie frakcí vzniklých po přečištění reakční směsi gelovou permeační chromatografií.

Tab. 3 *Koncentrace TU-20 frakcí vzniklých purifikací reakční směsi o koncentraci TU-20 358 μg/ml.*

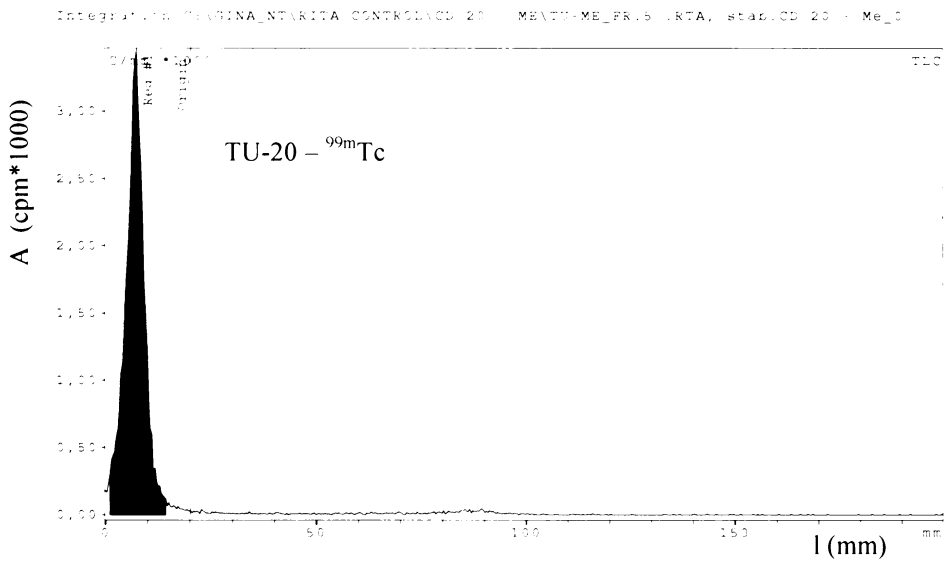
| objem gelu | 7,5 ml |
|---|---|
| frakce | koncentrace TU-20 (μg/ml) |
| 3 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 43 |
| 4 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 83 |
| 5 (TU-20-$^{99m}$Tc) | **173** |
| 6 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 38 |
| 7 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 17 |
| 8 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 9 |

### 6.2.2 Chromatografie

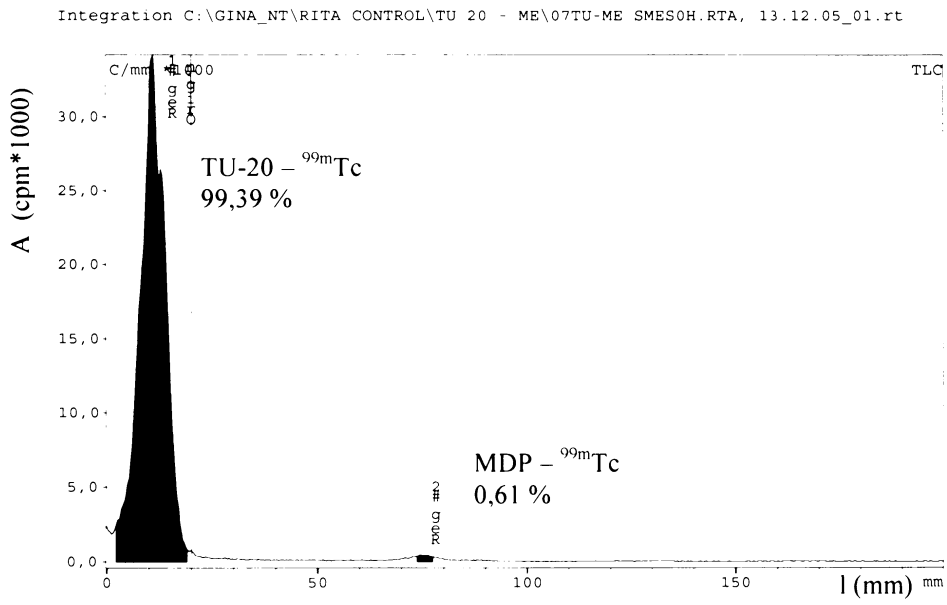
Papírovou chromatografií byla sledována čistota reakčních směsí i frakcí vzniklých jejich purifikací. Stability jednotlivých reakčních směsí a frakcí jsou uvedeny v kapitole 11.1.2 – viz přílohy. Na chromatogramu se objevují dva různé píky. První pík odpovídá směsi TU-20-$^{99m}$Tc, druhý je charakteristický pro MDP-$^{99m}$Tc.




Obr. 10 *Reakční směs TU-20-* $^{99m}$*Tc. Objem sloupce kolony pro dělení směsi TU-20 (ME) 7,5 ml.*




Obr. 11 *5. frakce, vzniklá purifikací reakční směsi o koncentraci TU-20 358 µg/ml.*




Obr. 12 *Reakční směs TU-20-$^{99m}$Tc. Objem sloupce kolony pro dělení směsi TU-20 (ME) 9 ml.*

## 6.3 Značení TU-20 $^{99m}$Tc elektrolyticky

Pro elektrolytické značení byly zvoleny dvě metody. Elektrolýza eluátu aniontové formy technecia ($^{99m}TcO_4^-$) byla prováděna buď bez nebo za přítomnosti protilátky TU-20. Postup práce viz. kap. 5.5.3.1.

### 6.3.1 Spektrofotometrie

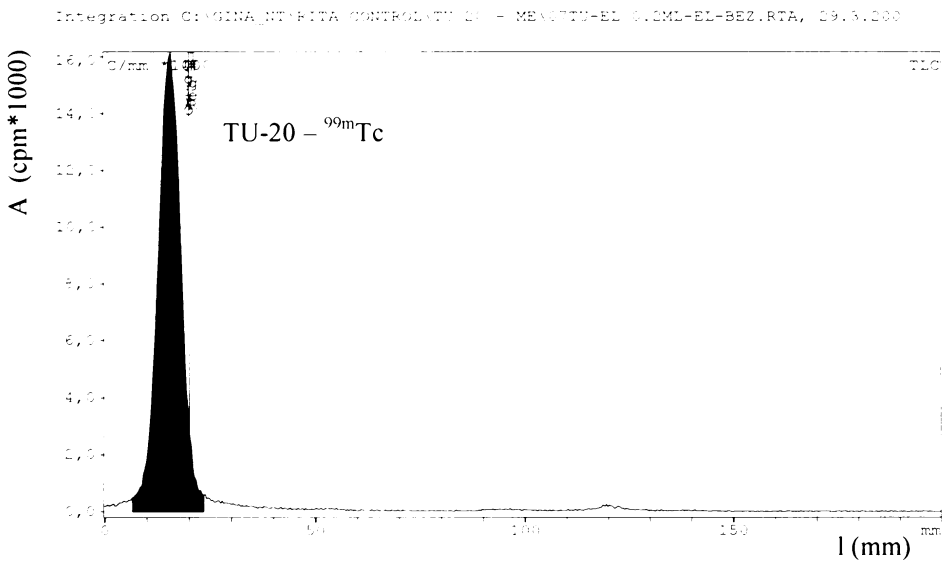
Spektrofotometrie byla prováděna jen u frakcí vzniklých dělením reakční směsi, po elektrolýze, pomocí gelové permeační chromatografie (Sephadex G25). Elektrolyzována byla směs eluátu s protilátkou TU-20. Měření byla prováděna při vlnové délce 280 nm.

Tab. 4. *Koncentrace TU-20 ve frakcích rozdělené elektrolyzované reakční směsi TU-20-$^{99m}$Tc o vstupní koncentraci TU-20 750 μg/ml.*

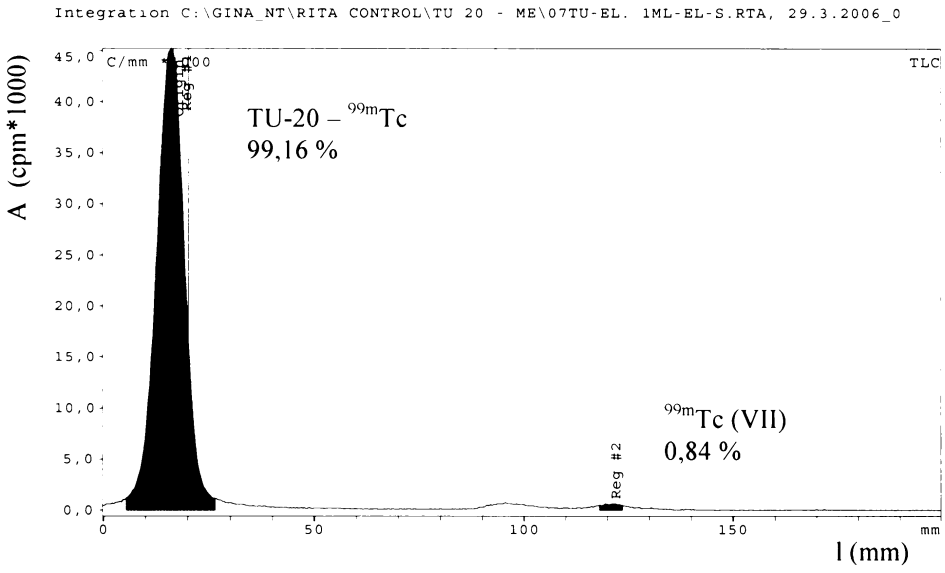
| objem gelu | 7,5 ml |
|---|---|
| frakce | koncentrace TU-20 (μg/ml) |
| 3 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 43 |
| 4 (TU-20-$^{99m}$Tc) | **469** |
| 5 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 73 |
| 6 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 28 |
| 7 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 11 |
| 8 (TU-20-$^{99m}$Tc) | 6 |

### 6.3.2 Chromatografie

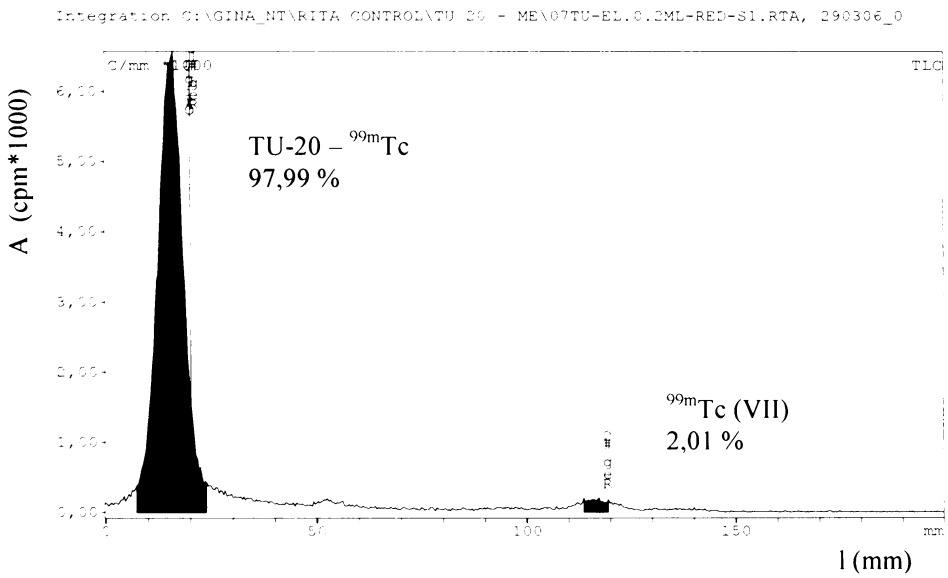
Chromatogramy elektrolyzovaných eluátů samotných i s přítomností protilátky TU-20 byly sledovány za účelem zjištění, zda ve směsi není přítomna neredukovaná forma technecia. Chromatogram nám ukáže maximálně dva píky. První náleží redukované formě technecia buď samotné nebo po purifikaci TU-20-$^{99m}$Tc. Druhý pík odpovídá neredukované formě technecia.



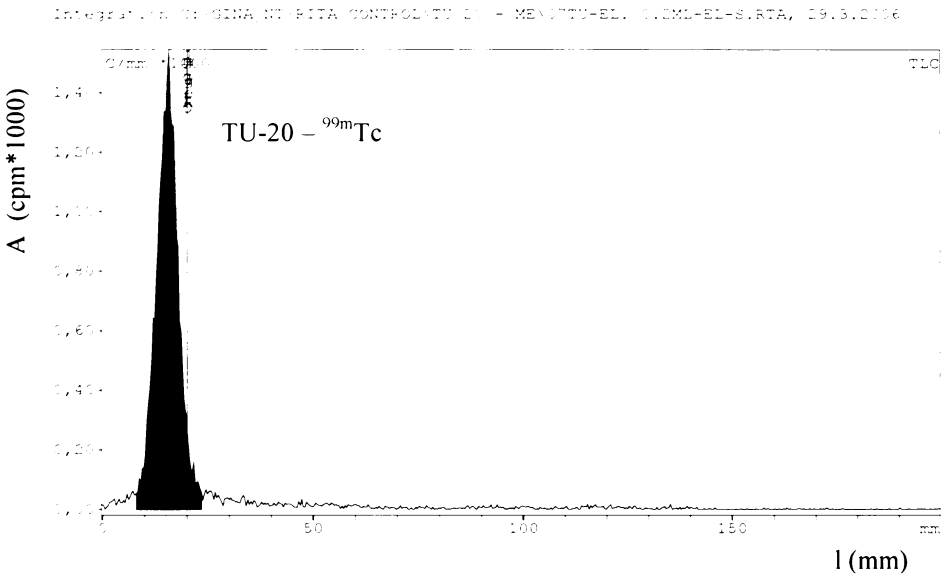

Obr. 13 *Elektrolyticky redukované technecium. Redukován byl 1 ml roztoku o složení 0,2 ml eluátu ($^{99m}TcO_4^-$) a 0,8 ml NaCl.*




Obr. 14 *Reakční směs TU-20- $^{99m}$Tc. Elektrolyzován byl eluát bez přítomnosti protilátky. Doba inkubace TU-20 s $^{99m}$Tc byla 15 minut.*




Obr. 15 *Reakční směsi TU-20- $^{99m}$Tc po elektrolýze eluátu za přítomnosti protilátky. Nanášeno po 15 minutách inkubace po elektrolýze.*



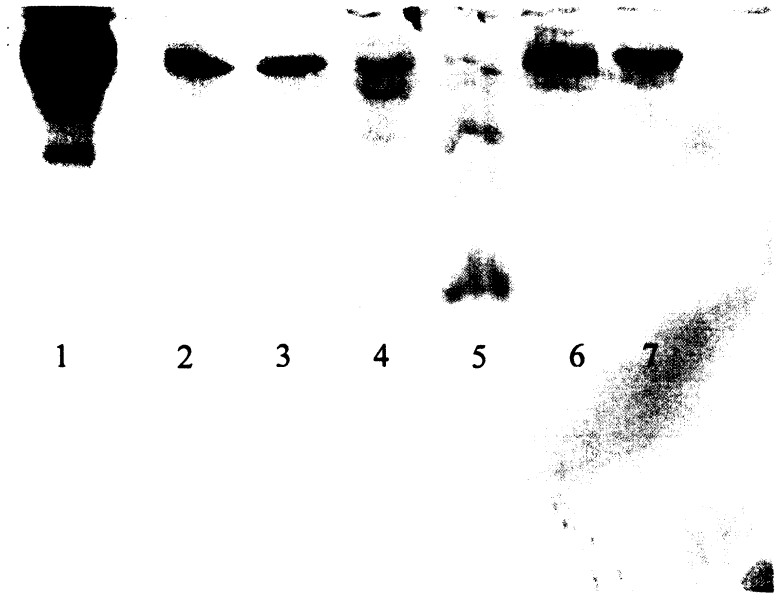

Obr. 16 *4. frakce, získaná dělením reakční směsí na gelové kolonce. Elektrolyzována byla směs eluátu s protilátkou TU-20. Objem gelu v kolonce byl 7,5 ml.*

## 6.4 Elektroforéza

Kontrola struktury značené protilátky byla sledována pomocí SDS-elektroforézy. Byla ověřována u reakčních směsí i frakcí jednotlivých metod značení.

Vzorky:

1. čistá TU-20,
2. TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc,
3. TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc,
4. TU-20 (ME) - $^{99m}$Tc,
5. TU-20 (ME) - $^{99m}$Tc,
6. TU-20- $^{99m}$Tc (El),
7. TU-20- $^{99m}$Tc (El).

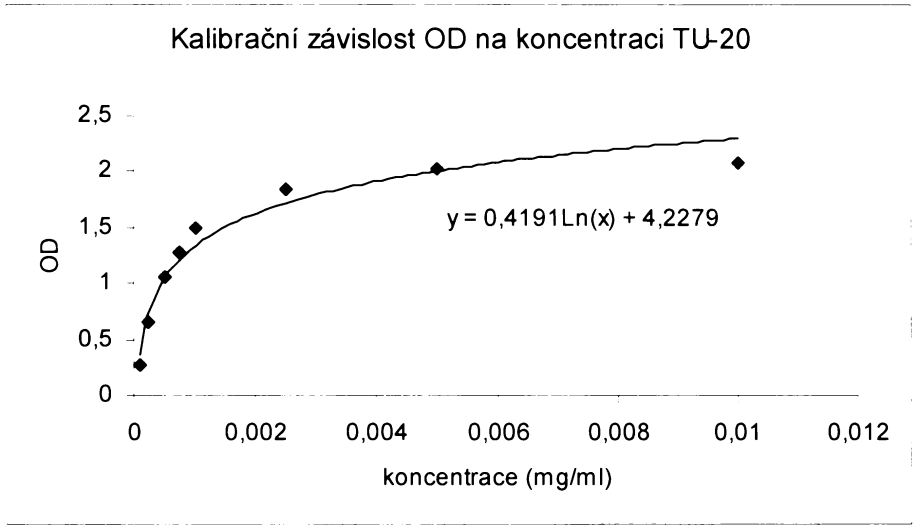



Obr. 17 *SDS-elektroforéza prováděna s výše uvedenými vzorky obarvenými neredukujícím barvícím roztokem v poměru 4:1, elektrolyzováno při 100V, 3hodiny.*

## 6.5 ELISA

Imunoreaktivita byla ověřována pomocí ELISA testů pro všechny reakční směsi i jednotlivé frakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm za použití referenčního filtru 630 nm na spektrofotometru SUNRICE. Výstupní data naměřená spektrofotometrem SUNRICE společně s přípravou kalibrace jsou uvedena v kapitole 11.2 – viz přílohy.

*Kalibrace:*




Graf 1 *Kalibrační křivka TU-20.*

Vzorky:

1. značení pomocí HYNIC (reakční směs, kolona 5 ml),
2. značení pomocí HYNIC (reakční směs, kolona 7,5 ml),
3. značení pomocí HYNIC (reakční směs, kolona 9 ml),
4. elektrolytické značení (reakční směs, eluát elektrolyzován s TU-20),
5. elektrolytické značení (reakční směs, eluát elektrolyzován bez TU-20),
6. elektrolytické značení (4. frakce, redukce s TU-20),
7. značení TU-20 redukované pomocí ME (reakční směs, kolona 7,5 ml),
8. značení TU-20 redukované pomocí ME (reakční směs, kolona 9 ml),
9. značení TU-20 redukované pomocí ME (5. frakce, kolona 7,5 ml).

Tab. 5 *Přehled koncentrací a dalších parametrů výše uvedených vzorků.*

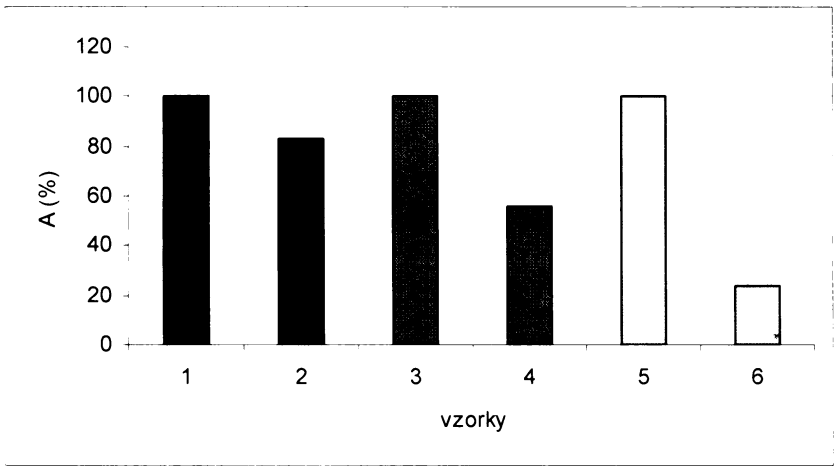
| vzorky | celková koncentrace TU-20 (μg/ml) | koncentrace biologicky aktivní TU-20 (μg/ml) | imunoreaktivita (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 328 | 306,50 | **93,45** |
| 2 | 451 | 402,64 | **89,28** |
| 3 | 640 | 578,67 | **90,42** |
| 4 | 750 | 705,24 | **94,03** |
| 5 | 750 | 703,81 | **93,84** |
| 6 | 469 | 441,80 | **94,20** |
| 7 | 358 | 140,88 | **39,35** |
| 8 | 530 | 278,36 | **52,52** |
| 9 | 173 | 79,88 | **46,17** |

## 6.6 Shrnutí výsledků

***Vazebnost $^{99m}$Tc na protilátku TU-20***

Vzorky:

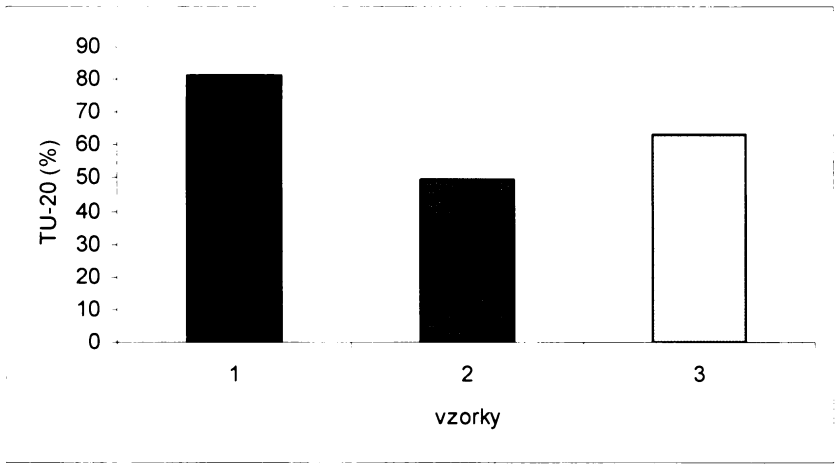
1. reakční směs - TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc,
2. purifikovaná reakční směs - TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc,
3. reakční směs - TU-20 (ME)- $^{99m}$Tc,
4. purifikovaná reakční směs - TU-20 (ME)-$^{99m}$Tc,
5. reakční směs - TU-20-$^{99m}$Tc (El),
6. purifikovaná reakční směs - TU-20-$^{99m}$Tc (El).




Graf 2 *Zastoupení aktivity (v %) v jednotlivých vzorcích. Vzorky 1, 3 a 5 představují reakční směsi. Vzorky 2, 4 a 6 pak jednotlivé frakce vzniklé purifikací příslušné reakční směsi.*
*Vzorky 2, 4 a 6 ukazují výsledné množství radionuklidu (v %), které vytvořilo vazbu s protilátkou TU-20.*

Vzorky:

1. TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc,
2. TU-20 (ME)-$^{99m}$Tc,
3. TU-20-$^{99m}$Tc (El).

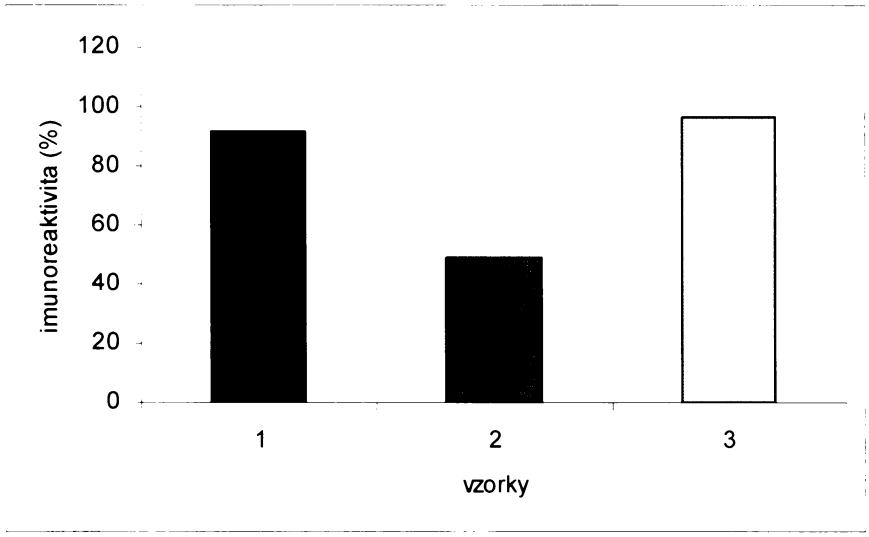



Graf 3. *Procentuální zastoupení protilátky TU-20 ve výsledném značeném preparátu. Z původního množství TU-20 vstupujícího do přípravy značeného preparátu 100%. (750 μg/ml).*

***Imunoreaktivita***

Vzorky:

1. TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc,
2. TU-20 (ME)- $^{99m}$Tc,
3. TU-20-$^{99m}$Tc (El).

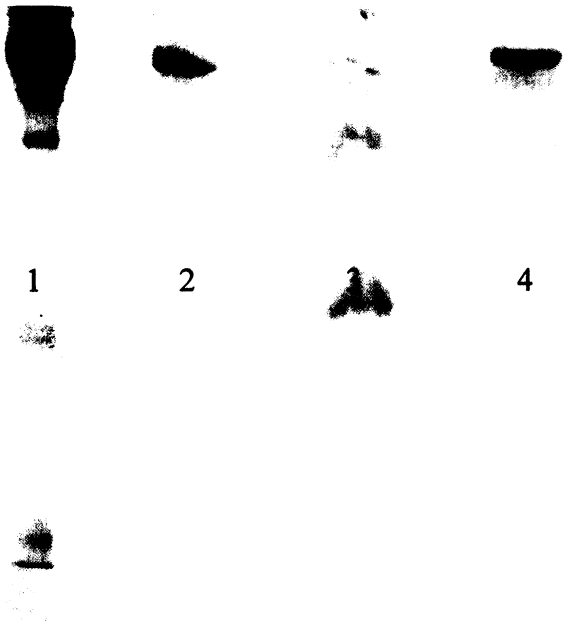



Graf 4 *Imunoreaktivita značené TU-20 různými metodami.*

***Biologická stabilita***

Vzorky:

1. TU-20 - čistá,
2. TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc,
3. TU-20 (ME)-$^{99m}$Tc,
4. TU-20-$^{99m}$Tc (El).




Obr. 18 *SDS-elektroforéza prováděna s výše uvedenými vzorky obarvenými neredukujícím barvícím roztokem v poměru 4:1, elektrolyzováno při 100V, 3hodiny.*

## 6.7 Diskuse

*Chemická čistota a stabilita reakční směsi*

Imunoglobulin TU-20 patří mezi makromolekuly o velké molekulové váze. Ze směsi s jednoduchými molekulami o malé molekulové váze ji nejlépe odseparujeme za použití gelové filtrace. V tomto případě byly čištěny směsi obsahující TU-20-HYNIC nebo TU-20 (ME). Zkoušeny byly kolonky o různých objemech gelu (Sephadex G25). Všechny kolonky, jejichž objemy gelů byly 3,5 ml, 5ml, 7,5 ml a 9 ml, vykazovaly dobrou separační schopnost. Nejvyšší koncentrace TU-20 po separaci však byly nalezeny ve všech případech u vzorků purifikovaných na kolonce o objemu gelu 9 ml.

V případě přímého značení elektrolyticky bylo nutno gelovou filtrací přečistit reakční směsi. Pro oddělení nenavázného $^{99m}$Tc od samotné značené protilátky TU-20-$^{99m}$Tc.

Chemická stabilita byla sledována papírovou chromatografií. Vzhledem k nízkému poločasu radionuklidu $^{99m}$Tc byl zvolen časový interval nanášení a měření vzorků po 10 minutách, po dobu 4 hodin. Kromě snižování aktivity v proměřených vzorcích nebyly sledovány žádné odchylky.

*Vazebnost $^{99m}$Tc na protilátku*

Můžeme říci, že nejvyšší vazebnost prokazuje radionuklid $^{99m}$Tc na protilátku TU-20 značenou přes bifunkční chelát HYNIC. Reakční směs není dále nutné purifikovat. U TU-20 redukované 2-merkaptoethanolem můžeme pozorovat, že reakční směs je čistá a prokazuje vysokou vazebnost radionuklidu na protilátku, avšak po purifikaci reakční směsi jsme schopni získat maximálně polovinu značené protilátky z původního množství obsaženého v reakční směsi. Jedná se opět o projev silného porušení struktury protilátky. Pro značení přímo elektrolyticky je nutno směs purifikovat a z výsledků můžeme vidět, že získané množství takto značené protilátky je nejnižší.

*Biologická stabilita*

Biologická stabilita, tedy struktura značené protilátky, byla kontrolována SDS – elektroforézou. Struktura značené protilátky zde byla porovnána se strukturou protilátky nativní. Výsledky ukazují na vysokou biologickou stabilitu pro protilátky značené metodami přes bifunkční chelát HYNIC a přímého elektrolytického značení. K rozsáhlému porušení struktury TU-20 však dochází při její redukci 2-merkaptoethanolem.

*Imunoreaktivita*

Zachování specifické vazby značené protilátky TU-20 na antigen bylo sledováno ELISA testy. Vysokou imunoreaktivitu prokazovaly protilátky s neporušenou biologickou strukturou, tedy značené přes bifunkční chelát HYNIC a přímo elektrolyticky. Protilátka, jejíž struktura byla porušena během redukce 2-mekaptoethanolem, měla díky porušeným vazebným místům i velice sníženou imunoreaktivitu.

Případné pozitivní či negativní odchylky ve výsledných hodnotách jsou způsobeny vysokou citlivostí metody. U výsledných hodnot odpovídajících vzorkům s obsahem protilátky redukované pomocí 2-metkapoethanolu můžeme vidět značné odchylky při srovnání parametrů různých koncentrací protilátky a příslušné imunoreaktivity. Což je způsobeno vždy odlišnou přítomností neporušených vazebných míst protilátky v každém vzorku. Nikdy si tedy nemůžeme být jisti, nakolik bude struktura TU-20 porušena.

# 7 Závěr

V této práci jsem se zabývala vývojem a porovnáním metod značení monoklonální protilátky TU-20 proti neurotubulinu radionuklidem $^{99m}$Tc. Pro porovnání jednotlivých metod byla zvolena následující kriteria:

- chemická čistota,
- chemická stabilita,
- vazebnost $^{99m}$Tc na TU-20,
- biologická stabilita,
- imunoreaktivita.

Ze všech tří metod, které byly vybrány pro tyto studie, nejlépe splnila všechna kritéria metoda nepřímého značení TU-20 $^{99m}$Tc přes bifunkční chelát HYNIC. Výsledný preparát vykazuje vysokou biologickou i chemickou stabilitu, specifická vazba protilátky na antigen po značení zůstává zachována, výtěžek značené protilátky je vysoký a reakční směs není nutno již dále purifikovat.

Vysoká biologická i chemická stabilita stejně jako imunoreaktivita výsledného preparátu byla prokázána i u metody přímého elektrolytického značení. Zde je však nutné purifikovat reakční směs, což s ohledem na přítomnost radionuklidu je nevýhodou této metody. Další nevýhodou této metody je přítomnost protilátky v neredukované formě, tedy málo vazebných míst pro radionuklid, čímž i získání velmi malého množství označeného preparátu.

Jako velmi nevýhodná se zdá být metoda za využití redukce protilátky 2-ME. Přítomnost redukčního činidla velmi poškozuje strukturu, tedy biologickou stabilitu i imunoreaktivitu protilátky TU-20.

Výsledný preparát, připravený metodou nepřímého značení přes bifunkční chelát HYNIC, je nyní předmětem dalších experimentů. Ověřuje se biodistribuce značené protilátky v orgánech myší, možnost lyofilizace preparátu a příprava kitu.

# 8 Literatura


1. Navrátil, O.: Jaderná chemie, Academia, Praha 1985.
2. Ullman, V.: Jaderná a radiační chemie (dostupné na URL: http://astronuklfyzika.cz, 12.9. 2005).
3. Majer, V.: Základy jaderné chemie, STNL, Praha 1981.
4. Vítek, P.: Radiační synovectomie (dostupné na URL: http://www.hippokrates.avonet.cz/Revmatologie/Knihovna/Onemocneni%20klo ubu/radia%e8n%ed_synovectomie.htm, 10.10. 2005).
5. Radionuklidy a jejich využití (dostupné na URL: http://www.2zskolin.cz/jadfyz/rad/radionuklidy.html, 10.10. 2005).
6. Zevalin – Ibritumomab tiuxetan (dostupné na URL: http://www.zevalin.com/, 4.11. 2005).
7. Kairemo, K., J.: Department of Clinical Chemistry, Helsinky Univerzity Central Hospitál, National Library of Medicine, 1999 (dostupné na URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/, 12.2. 2006).
8. Firestone, R., B.; Shirley, V., S,: Table of isotopes, Volume 1, John Wiley & sons, 1999.
9. Návod k $^{99m}$Tc-techneciovému generátoru: DRYGEN $^{99m}$Tc Technetium generátor.
10. Kohlíčková, M.; Jedináková-Křížová, V.; Melichar, F.: Chem. Listy 92, 643-655, 1998.
11. Rosypal, S.: Úvod do molekulární biologie, díl druhý, GRAFEX, Brno 2000.
12. Lázníček, M.; Komárek, P.: Základy radiofarmacie, KAROLINUM, Praha 1998.
13. Verbeke, K.; Hjelstuen, O.; Debrock, E.; Cleynhens, B.; De Roo, M.; Verbruggen, A.: Nucl. Med., vol.16, 942-957, 1995.
14. Abrams, M. A.; Juweid, M.; Schwartz, D. A.; Hauser, M. M.; Gaul, F. E.; Fuccello, A. J.; Rubin, R. H.; Strauss, H. W.; Fischman, A.: J. Nucl. Med., vol. 31, 2022-2028, 1990.

15. Babich, J. W.; Solomon, H.; Pike, C.; Kroon, D.; Graham, W.; Abrams, M. J.; Tompkins, R. G.; Rubin, R. H.; Fischman, A. J.: J. Nucl. Med., vol. 34, 1964-1974, 1993.
16. Decristoforo, C.; Mather, S. J.: Bioconjugate Chem., vol. 10, 431-438, 1999
17. Larsen, S. K.; Salomon, H. F.; Caldwell, G.; Abrams, M. J.: Bioconjugate Chem., vol. 6, 635-638, 1995.
18. Edwards, D. S.; Liu, S.; Ziegler, M. C.; Harris, A. R.; Rocker, A. C.; Heminway, S. J.; Barrett, J. A.: Bioconjugate Chem., vol. 10, 884-891, 1999.
19. Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia, Praha 1999.
20. Hynie, S.: Základy farmakologie, TRITON, Praha 1999.
21. Bartůňková, J.; Šedivá, A.: Imunologie – minimum pro praxi, TRITON, Praha 2001.
22. Hořejší, V. ; Bartůňková, J.: Základy imunologie, TRITON, Praha 2001.
23. Vokurka, M.; Hugo, J.: Praktický slovník medicíny, Maxdorf, Praha 1998.
24. Murray, R. ; Granner, D. ; Mazyes, P. ; Rodwell, V.: Harperova Biochemie, H&H, Praha 2002.
25. Monoclonal Antibody to β III-tubulin (Neutron Specific Isoform) [Anti- β III-tubulin Mab (TU-20)], Exbio, Praha 2002 (dostupné na URL: http://www.exbio.cz, 16. 1. 2006).
26. Mančal, P.: Metody enzymové imunoanalýza, Ústav očkovacích látek, Praha 1987.
27. Dráberová, E.; Lukáš, Z.; Ivany, D.; Viklický, V.; Dráber, P.: Histochem. Cell. Biol., vol. 109, 231-239, 1998.
28. An, G.; Don, N.; Sbal, B.; Zhu, M.; Ruan, C.: Expresion and Charakterization of the ScFv Fragment of Antiplatelet GP III a Monoclonal Antipody SZ-21 (dostupné na URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov, 3. 12. 2006).
29. Protein Purification: Gel Filtration (dostupné na URL: http://www.piercenet.com/proteomics).
30. Gelová chromatografie (dostupné na URL: http://cs.wikipedia.org/wiki/GelováÅ_chromatografie, 17.10. 2005).
31. Hais, I. M.; Macek, K.: Papírová chromatografie, ČSAV, 1959.

32. Planární chromatografie (dostupné na URL: http://chemie.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm, 1.3. 2006).
33. Stanovení relativní molekulové hmotnosti bílkovin metodou PAGE-SDS (dostupné na URL: http://www.fch.vutbr.cz, 12.1. 2006).
34. Elektroforéza v přítomnosti SDS (dostupné na URL: http://orion.chemi.muni.cz/biochem/vyuka/navody/sdspage.htm, 21.2. 2006).
35. Novák, F.: Úvod do klinické biochemie, Karolinum, Praha 2002.
36. Immunoradiometric Assays (dostupné na URL: http://147.46.172.75/division/laboratory, 26. 11. 2005).
37. ELISA Protocol (dostupné na URL: http://www.biowww.net, 2. 12. 2005).
38. Virology Down Under: Enzyme Linke Immunosorbent Essay (dostupné na URL: http://www.uq.edu.au/vdu/ELISA, 2. 12. 2006).
39. Český lékopis 2005, 1. díl, Grada Publishing, 2005.
40. Vyhláška Státního úřadu pro jadernou bezpečnost č. 307/ 2002 sb., o radiační ochraně.

# 9 Značení monoklonální protilátky radionuklidem $^{99m}$Tc a ověřování její vazebnosti na antigen TU-20

Předmětem této studie je vývoj metod značení uměle připravené **monoklonální protilátky typu IgG1 – TU-20**, která vykazuje vysokou afinitu vůči *β-III-neurotubulinu*, radionuklidem **$^{99m}$Tc**.

**β-III-neurotubulin** je charakteristickým degradačním proteinem buněčného cytoskeletu nervové tkáně, vznikajícím při onemocněních vedoucích ke ztrátám periferních neuronů nebo neuronů centrální nervové soustavy. Pro diagnostiku *neuropatií* a *neurodegenerativních procesů* je tedy β-III-neurotubulin cílovou strukturou a radioaktivně označená protilátka TU-20 $^{99m}$Tc by mohla teoreticky umožnit diagnostickou aplikaci in vivo.

V tomto případě byly zvoleny tři metody značení protilátky TU-20 radionuklidem $^{99m}$Tc. **Nepřímé značení** přes bifunkční chelát **HYNIC**, **přímé značení** elektrolyticky a přímé značení protilátky TU-20 redukované **2-merkaptoethanolem**.

Pro sledování jednotlivých vlastností byly zavedeny příslušné chemické a biochemické kontrolní metody. Chemická čistota byla zajišťována pomocí gelové filtrace a spolu s chemickou stabilitou sledována papírovou chromatografií. Ke kontrole biologické stability byla využita SDS elektroforéza. Ověřování imunoreaktivity bylo prováděno pomocí ELISA-testů.

Nalezené výsledky ukázaly, že nejvýhodnější metodou značení protilátky TU-20, je nepřímé značení přes bifunkční chelát HYNIC a nejméně účinnou metodou se ukázalo být značení protilátky TU-20 redukované 2-merkaptoethanolem.

***Klíčová slova***:

- monoklonální protilátka,
- TU-20,
- $^{99m}$Tc,
- HYNIC,
- 2-merkaptoethanol,
- značení radionuklidem.

# 10 Labeling of monoclonal antibody with radionuclide $^{99m}$Tc and proving its binding on antigen TU-20

The subject of this thesis is development of methods of labeling artificially prepared **monoclonal antibody type IgG1 – TU-20** which shows high affinity towards *β-III- neurotubulin* with radionuclide **$^{99m}$Tc**.

**β-III- neurotubulin** is a characteristic degradational protein of cellular cytoskeleton of nervous tissues, which originates with disorders which lead to losses of peripheral neurons or neurons of central nervous system. For diagnostics of *neuropathic* and *neurodegenerative processes* is therefore β-III- neurotubulin the goal structure and radioactive labeled antibody TU-20 $^{99m}$Tc could theoretically enable diagnostical application in vivo.

In my case there were chosen three methods of labeling antibodies with TU-20 radionuclide $^{99m}$Tc. **The indirect labeling** was ensured through the bifunctional chelator **HYNIC**, **the direct labeling** by electrolytic way and the direct labeling of antibody TU-20 reduced by **2- mercaptoethanol**.

For observing of each single feature there were used appropriate chemical and biochemical control methods. The chemical purity was ensured by the gel filtration and together with chemical stability it was checked by paper chromatography. To control the biological stability SDS electrophoresis was used. Checking the imunoreactivity was provided by ELISA- tests.

The results we found show that the optimal method for labeling the antibody TU-20 is the indirect labeling through the bifunctional chelator HYNIC and the least effective method of labeling the antibody TU-20 reduced by 2- mercaptoethanol.

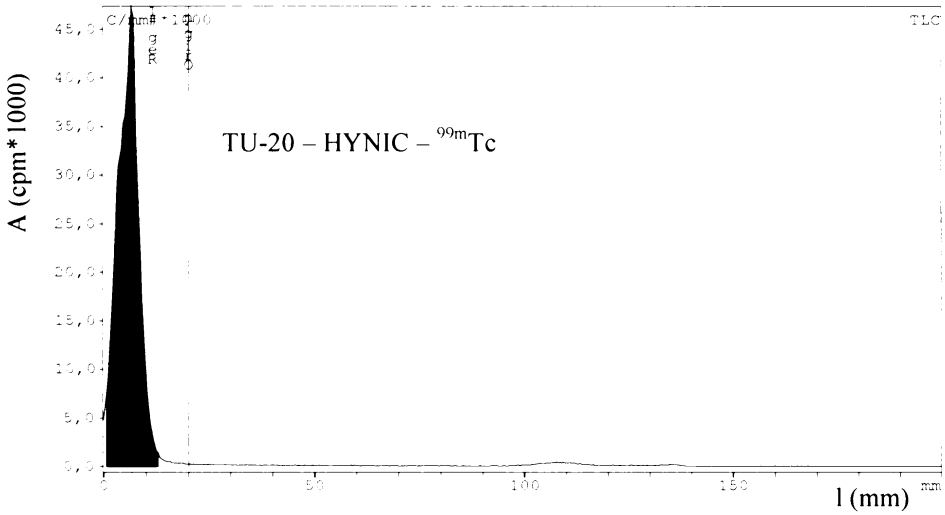
**Keywords:**

- monoclonal antibody,
- TU-20,
- $^{99m}$Tc,
- HYNIC,
- 2-mecaptoethanol,
- radiolabeling.

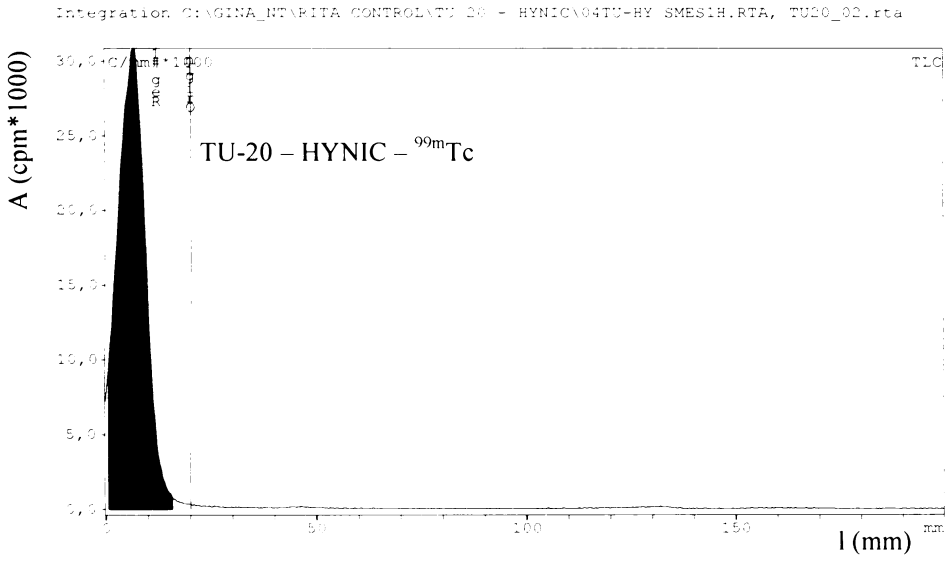
# 11 Přílohy

## 11.1 Chromatogramy stabilit reakčních směsí značené TU-20 $^{99m}$Tc

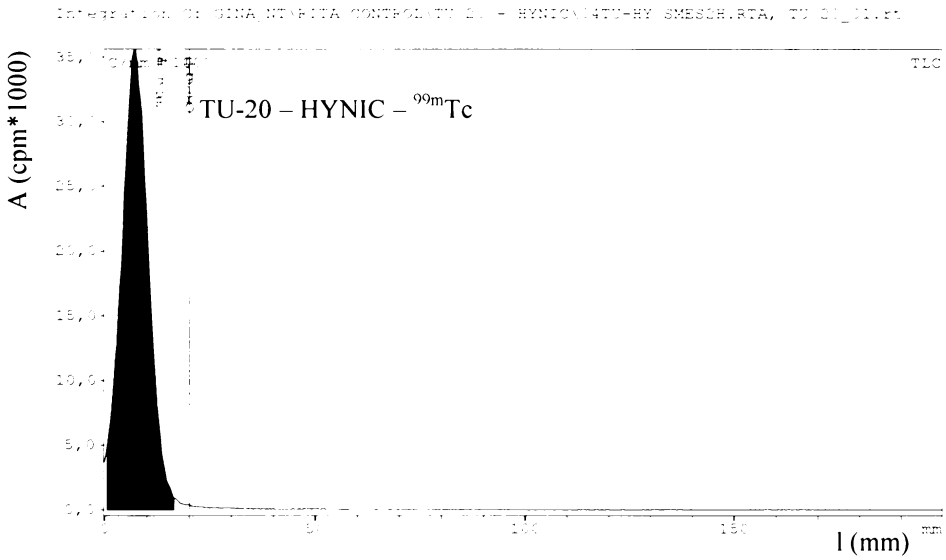
### 11.1.1 Chromatogramy stability reakční směsi TU-20-HYNIC-$^{99m}$Tc



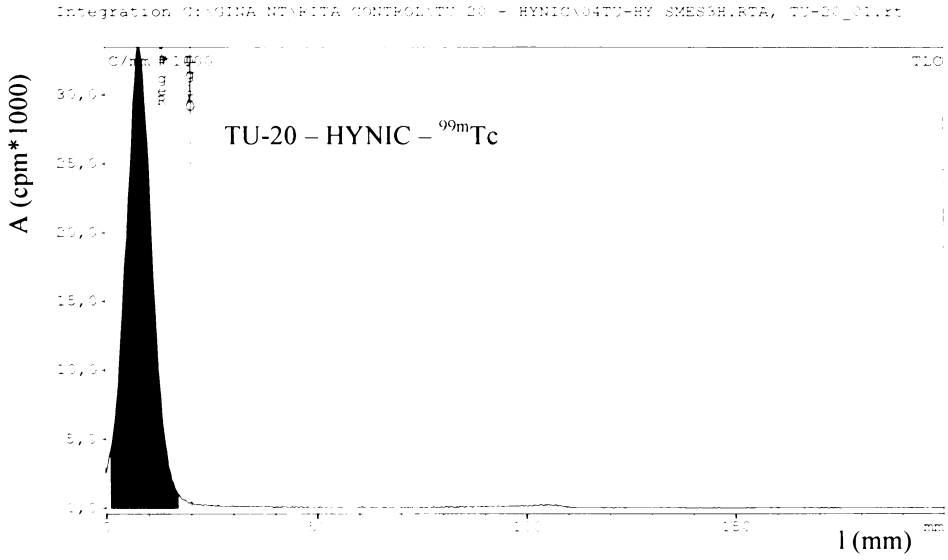

Obr. 19 *Reakční směs TU-20-HYNIC-* $^{99m}$*Tc ihned.*




Obr. 20 *Reakční směs TU-20-HYNIC-* $^{99m}$*Tc po 1. hodině.*

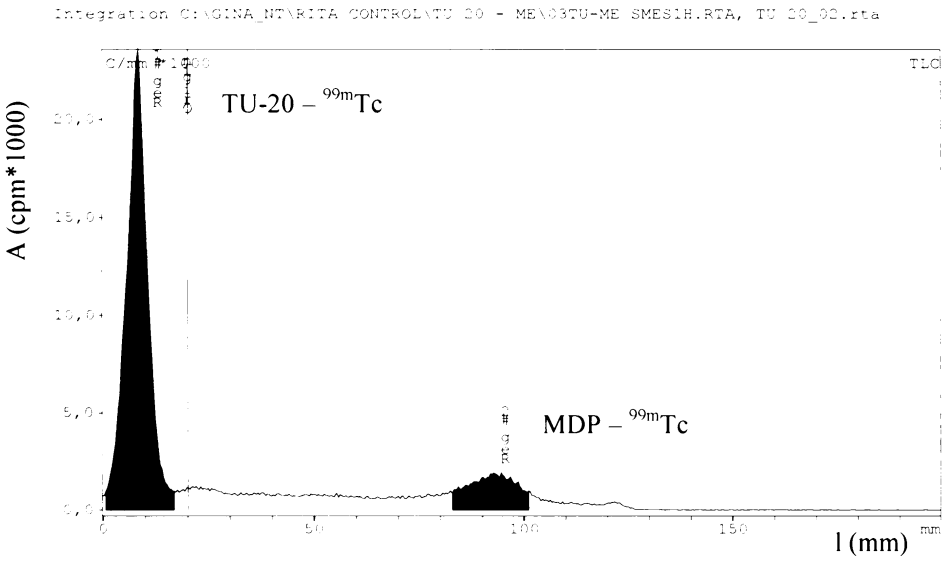



Obr. 21 *Reakční směs TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc po 2. hodině.*

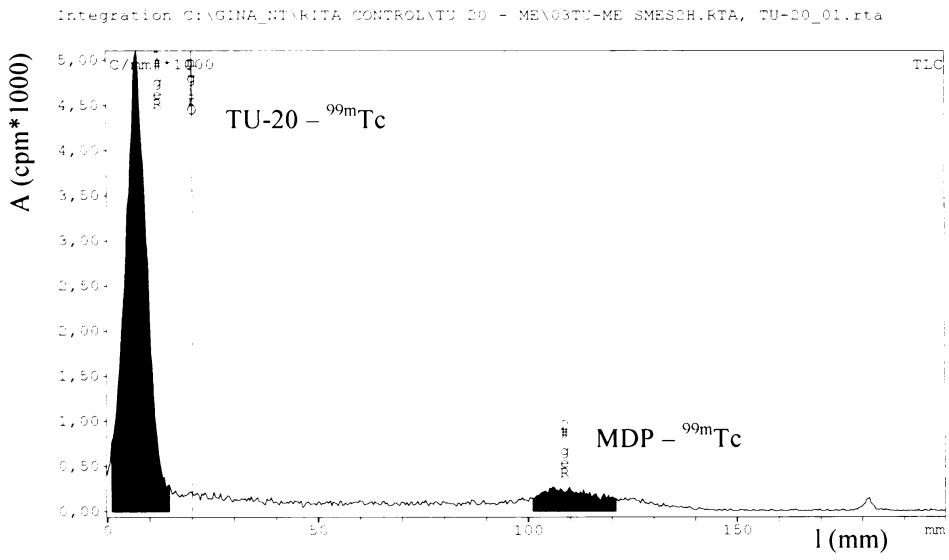



Obr. 22 *Reakční směs TU-20-HYNIC- $^{99m}$Tc po 3. hodině.*

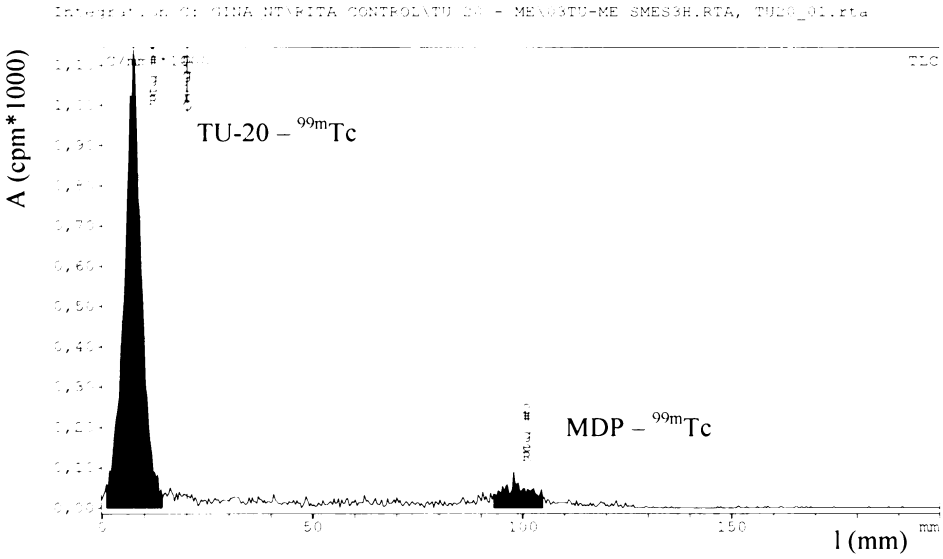
### 11.1.2 Chromatogramy stability reakční směsi TU-20- $^{99m}$Tc (TU-20 redukovaná pomocí ME)




Obr. 23 *Reakční směs TU-20- $^{99m}$Tc po 1. hodině.*




Obr. 25 *Reakční směs TU-20- $^{99m}$Tc po 2. hodině.*




Obr. 26 *Reakční směs TU-20- $^{99m}$Tc po 3. hodině.*

# 11.2 ELISA

Tab. 6 *Výstupní data naměřená spektrofotometrem SUNRICE. Žlutě označené hodnoty odpovídají OD pro kalibraci, modře označené hodnoty jsou OD blancku, ostatní naměřené hodnoty OD odpovídají jednotlivým vzorkům viz. kap. 6.5.*

| <> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0,2628 | 0,3282 | 1,1571 | 1,143 | 0,5896 | 0,5834 |
| B | 0,624 | 0,726 | 1,267 | 1,2618 | 0,0184 | 0,0111 |
| C | 0,9996 | 1,1742 | 1,413 | 1,4198 | 0,018 | 0,0408 |
| D | 1,2504 | 1,3554 | 1,5114 | 1,4872 | 0,0156 | 0,0666 |
| E | 1,455 | 1,5654 | 1,5031 | 1,4938 | 0,0156 | 0,0276 |
| F | 1,8474 | 1,893 | 1,3176 | 1,289 | 0,0126 | 0,0156 |
| G | 2,055 | 2,058 | 0,825 | 0,8236 | 0,0178 | 0,018 |
| H | 2,1012 | 2,1192 | 1,1122 | 1,1072 | 0,0163 | 0,0182 |

Tab. 7 *Příprava kalibrace a naměřené hodoty. : 18,2 µl TU - 20 doplněno 981 µl ředícího roztoku.*

| ředění | blanck | koncentrace (mg/ ml) | OD | OD - blanck |
|---|---|---|---|---|
| k1:100ul k5 + 900ul řr | 0,0223 | 0,0001 | 0,2955 | 0,2732 |
| k2:250ul k5 + 750ul řr | | 0,00025 | 0,6750 | 0,6527 |
| k3:500ul k5 + 500ul řr | | 0,0005 | 1,0869 | 1,0646 |
| k4:750ul k5 + 250ul řr | | 0,00075 | 1,3029 | 1,2806 |
| k5:100ul k8 + 900ul řr | | 0,001 | 1,5102 | 1,4879 |
| k6:250ul k8 + 750ul řr | | 0,0025 | 1,8702 | 1,8479 |
| k7:500ul k8 + 500ul řr | | 0,005 | 2,0565 | 2,0342 |
| k8:100ul [illegible] + 900ul řr | | 0,01 | 2,1102 | 2,0879 |