

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vazebnosti receptorově specifických peptidů na
plazmatické bílkoviny

Mezidruhové srovnání vazebnosti somatostatinového analogu DOTA-NOC
značeného ^{90}Y a ^{111}In

Autor: Šárka Křivková

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

Hradec Králové 2008

NÁZEV:

Studium vazebnosti receptorově specifických peptidů na plazmatické bílkoviny

ABSTRAKT:

Vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny patří mezi základní farmakologické parametry. Míra vazby léčiva má významný vliv na distribuci a eliminaci léčiva. Stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny in vitro nám pomáhá předvídat jejich osud po podání do živého organismu. V diplomové práci byla studována vazebnost receptorově specifického peptidu DOTA-NOC značeného ^{90}Y a ^{111}In na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání. Pro stanovení vazebnosti byla použita metoda rovnovážné dialýzy při 37°C . Výsledky ukázaly, že vazebnost ^{90}Y -DOTA-NOC roste v pořadí: lidská < králičí < hovězí < potkaní plazma. Vazebnost ^{111}In -DOTA-NOC roste v pořadí: vepřová < lidská < potkaní < králičí plazma.

KLÍČOVÁ SLOVA:

vazebnost na bílkoviny, DOTA-NOC, ^{111}In , ^{90}Y , mezidruhové srovnání

TITLE:

Study of plasma protein binding of receptor-specific peptides

SUMMARY:

Drug binding to plasma proteins is one of the primary pharmacological parameters. The binding rate has significant effects on drug distribution and drug elimination. In vitro investigation of plasma protein binding helps us foresee their destiny after its administration to a living organism. This dissertation focused on studying plasma protein binding of DOTA-NOC marking by ^{90}Y and ^{111}In in term of interspecies comparison. The binding was determined by methods of equilibrium dialysis at 37°C . Results showed binding of ^{90}Y -DOTA-NOC increases respectively: human < rabbit < bovine < rat plasm. Binding of ^{111}In -DOTA-NOC increases respectively: pork < human < rat < rabbit plasm.

KEYWORDS:

protein binding, DOTA-NOC, ^{111}In , ^{90}Y , interspecies comparison

Děkuji Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc., za odborné a vstřícné vedení mé diplomové práce. Děkuji také všem pracovníkům katedry farmakologie a toxikologie za ochotu a vstřícné jednání.

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

30.5.2008

.....

1 OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | OBSAH..... | 6 |
| 2 | ÚVOD..... | 9 |
| 3 | CÍL PRÁCE..... | 11 |
| 4 | TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 4.1 | VAZBA LÉČIV | 14 |
| 4.1.1 | <i>plazmatické proteiny</i> | <i>14</i> |
| 4.1.1.1 | lidský sérový albumin | 15 |
| 4.1.1.2 | globuliny | 19 |
| 4.1.1.3 | lipoproteiny | 19 |
| 4.1.1.4 | kyselý alfa jedna glykoprotein | 20 |
| 4.1.2 | <i>druhy vazby léčiv na plazmatické bílkoviny</i> | <i>21</i> |
| 4.1.3 | <i>význam vazby léčiv na plazmatické proteiny.....</i> | <i>22</i> |
| 4.1.4 | <i>faktory ovlivňující koncentraci plazmatických proteinů</i> | <i>24</i> |
| 4.2 | METODY MĚŘENÍ VAZBY LÉČIV NA PLAZMATICKÉ PROTEINY | 25 |
| 4.2.1 | <i>rovnovážná dialýza</i> | <i>25</i> |
| 4.2.2 | <i>mikrodialýza.....</i> | <i>26</i> |
| 4.2.3 | <i>ultrafiltrace</i> | <i>27</i> |
| 4.2.4 | <i>gelová chromatografie</i> | <i>28</i> |
| 4.2.5 | <i>mikrosféry albuminu</i> | <i>28</i> |
| 4.2.6 | <i>circulární dichroismus</i> | <i>29</i> |
| 4.2.7 | <i>srovnání jednotlivých metod</i> | <i>30</i> |
| 4.3 | RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ RECEPTOROVĚ SPECIFICKÉ PEPTIDY | 31 |
| 4.3.1 | <i>somatostatin</i> | <i>33</i> |
| 4.3.2 | <i>alfa melanocyty stimulující hormon.....</i> | <i>36</i> |
| 4.3.3 | <i>vasoaktivní intestinální peptid</i> | <i>37</i> |
| 4.3.4 | <i>cholecystokinin-b / gastrin</i> | <i>37</i> |
| 4.3.5 | <i>substance p.....</i> | <i>39</i> |
| 4.3.6 | <i>neurotensin.....</i> | <i>39</i> |
| 4.3.7 | <i>bombesin</i> | <i>40</i> |
| 4.3.8 | <i>gastrin stimulující peptid</i> | <i>40</i> |
| 4.3.9 | <i>další receptorově specifické peptidy</i> | <i>41</i> |
| 4.4 | RADIONUKLIDY UŽÍVANÉ PRO SCINTIGRAFII A TERAPII | 42 |
| 4.4.1 | <i>radionuklidy užívané k scintigrafii.....</i> | <i>43</i> |
| 4.4.2 | <i>radionuklidy užívané pro terapii.....</i> | <i>44</i> |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 46 |
| 5.1 | MATERIÁL..... | 47 |
| 5.1.1 | <i>radioaktivní materiál</i> | 47 |
| 5.1.2 | <i>biologický materiál</i> | 47 |
| 5.1.3 | <i>chemikálie</i> | 48 |
| 5.1.4 | <i>pomůcky</i> | 48 |
| 5.1.5 | <i>přístrojové vybavení.....</i> | 48 |
| 5.2 | METODIKA | 49 |
| 5.2.1 | <i>příprava plazmy</i> | 49 |
| 5.2.2 | <i>stanovení vazebnosti peptidu na plazmatické bílkoviny pomocí rovnovážné dialýzy.....</i> | 49 |
| 5.2.3 | <i>zpracování získaných hodnot</i> | 51 |
| 6 | VÝSLEDKY..... | 52 |
| 6.1 | MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI..... | 53 |
| 6.2 | MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI..... | 57 |
| 7 | DISKUZE..... | 61 |
| 8 | ZÁVĚR..... | 64 |
| 9 | LITERATURA | 66 |
| 10 | SEZNAM ZKRATEK..... | 70 |

2 ÚVOD

Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny je důležitým farmakokinetickým parametrem. Většina léčiv v organismu nebývá přítomna pouze ve volné formě, ale jsou v určitém rozsahu vázána na plazmatické bílkoviny. Avšak pouze volné léčivo, které je schopné přestoupit přes biologické bariéry, dosahuje farmakologického účinku. Vázaná část léčiva pak představuje jakési depo v organismu. Míra vazby léčiva na plazmatické bílkoviny tak může mít dominantní vliv na absorpci, biotransformaci a exkreci.

Vazba léčiv na plazmatické proteiny je reverzibilní, mezi volnou a vázanou frakcí existuje rovnováha. Pokud dojde k poklesu koncentrace volného léčiva, pak se ekvivalentní část uvolní z komplexu léčivo-bílkovina. Vytěsněním léčiva z vazby může dojít k významnému zvýšení koncentrace volného léčiva, a tím i ke zvýšení farmakologického a toxického účinku. To je významné především u léčiv, které se z velké míry váží na bílkoviny a mají nízký distribuční objem.

Metody in vitro stanovení vazby léčiv na plazmatické bílkoviny nám umožňují předvídat jejich možné chování po podání do živého organismu.

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy jsou velmi cennou skupinou léčiv. Vysoká hustota peptidových receptorů na povrchu nádorových buněk umožňuje specifické zobrazení a případně i terapii nádorového onemocnění. Mezi tyto peptidy patří např. cholecystokinin, gastrin, vasoaktivní intestinální peptid, neurotensin, alfa melanocyty stimulující hormon, bombesin. Nejznámějšími a klinicky nejužívanějšími se staly analogy somatostatinu.

Mezidruhové srovnání vazebnosti receptorově specifických peptidů nám může naznačit možné chování léčiva v lidském organismu.

3 CÍL PRÁCE

1. Vypracovat literární přehled o použití radioaktivně značených receptorově specifických peptidů cílených pro diagnostiku a terapii nádorů a dále o stanovení vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny.
2. Stanovit vazebnost ^{90}Y -DOTA-NOC a ^{111}In -DOTA-NOC na bílkoviny plazmy z hlediska mezidruhového srovnání.
3. Dosažené výsledky vzájemně porovnat a zhodnotit z hlediska významu plazmatické vazebnosti studovaných látek pro jejich farmakokinetiku v organismu.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 VAZBA LÉČIV

VAZBA LÉČIV NA PLAZMATICKÉ PROTEINY

V plazmě se setkáváme se třemi základními typy proteinů důležitých pro vazbu léčiva: albumin, glykoproteiny a β -globuliny. Ostatní plazmatické proteiny (např. transferin, globulin vázající tyroxin, globulin vázající pohlavní steroidy) jsou důležité pouze pro transport specifických látek.

VAZBA LÉČIV NA ERYTROCITY

Vazba na červené krvinky se týká především bazických léčiv. Léčivo se může vázat na erytrocytární membránu, která je negativně nabitá anebo proniká přímo do erytrocytu. Na membránu se váže např. imipramin, chlorpromazin, do erytrocytu proniká chinidin či propranolol.

VAZBA LÉČIV NA TKÁŇOVÉ BÍLKOVINY

Mnoho léčiv se může vázat na bílkoviny cílových orgánů nebo se deponovat v tukové tkáni. Při opakovaném podání do organismu se zde léčiva kumulují. Teprve pokles koncentrace volného léčiva vede k uvolnění léčiva z komplexu léčivo-protein. Tato vazba má depotní charakter. Příkladem je např. imipramin v plicní tkáni či vysoce lipofilní látky v tkáni tukové.^[1,2]

4.1.1 PLAZMATICKÉ PROTEINY

Lidská plazma obsahuje asi 70-75g proteinů v 1 litru plazmy, které zároveň tvoří hlavní složku plazmatické sušiny. Chemicky je to složitá směs složená z jednoduchých a složených proteinů.

4.1.1.1 LIDSKÝ SÉROVÝ ALBUMIN

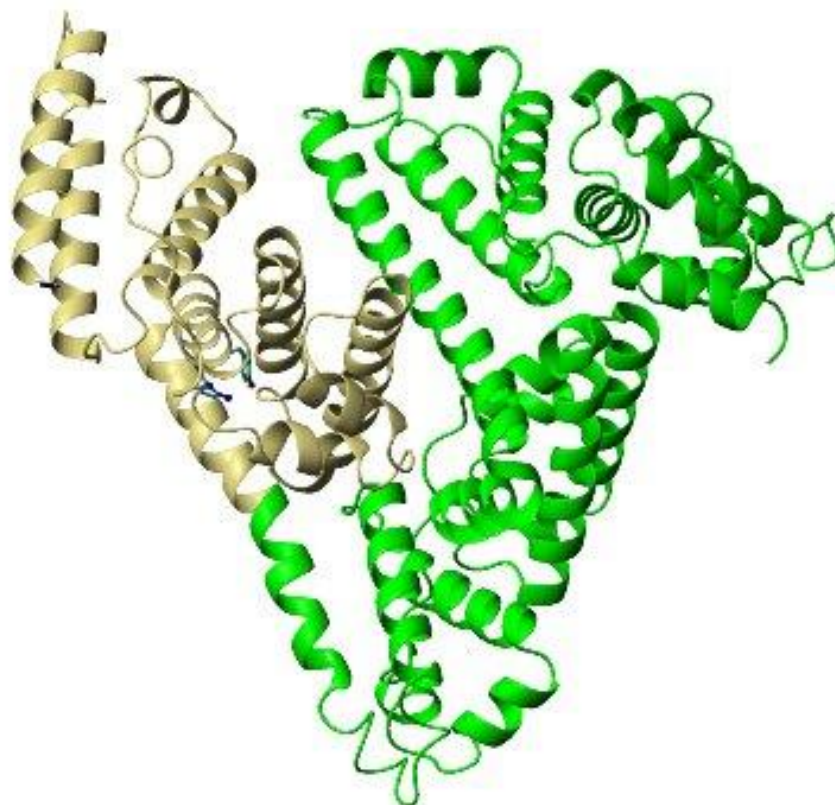
Sérový albumin tvoří 50-60% ze všech bílkovin krevní plazmy. Jeho koncentrace v krvi za fyziologických podmínek dosahuje asi 45 g/l. Kromě krve se vyskytuje i v některých dalších tělních tekutinách, jako je mozkomíšni či tkáňový mok. Slouží jako transportní a depotní protein pro mnoho endogenních i exogenních látek. Albumin se také hlavní měrou podílí na udržování osmotického tlaku krve a může být použit jako zdroj aminokyselin pro různé periferní tkáně. Je syntetizován v játrech, která produkují asi 12 g albuminu za den. Jeho plazmatický poločas je asi 20 dní.

Albumin je složen z polypeptidového řetězce o $M_r \sim 65\ 000$ D. Jeho primární struktura byla objevena v roce 1975. Bylo zjištěno, že řetězec se skládá z 585 aminokyselin, spojených 17 disulfidovými můstky. Při fyziologickém pH má molekula negativní náboj. Protože proteiny nejsou v roztoku statickými strukturami, ale mění se jejich konformační stav v závislosti na podmínkách, existuje mnoho variant molekuly. Tyto změny mohou být způsobeny agregací proteinů, vazbou látek, deaminací či oxidací.

Albumin interaguje s mnoha negativně i pozitivně nabitými léčivy.

V molekule albuminu se nachází vazebná místa, kam se váží s vysokou afinitou (asociační konstanta v rozmezí $10^4 - 10^6\ M^{-1}$) různá léčiva. Pro vazbu na albumin je charakteristická přítomnost jednoho či dvou vazebných míst s vysokou afinitou a několika míst s afinitou nižší. Vazebné místo je vlastně dutina v povrchu proteinu tvořená ze specifické sekvence aminokyselin.

Bylo navrženo, rozdělit molekulu albuminu na 3 domény (doména 1 1.-190. AMK, doména 2 191.-382. AMK a doména 3 383.-582. AMK) Tyto domény byly dále rozděleny na 3 subdomény (A, B a C).^[3,4,5,6]



Obr. č.1: Struktura lidského sérového albuminu

Vazebné místo I

Toto vazebné místo je typické pro dikarboxylové kyseliny a velké negativně nabitě heterocykly se záporným nábojem ve středu molekuly. Vazebné místo musí být rozlehlé, aby se sem vešly i velké molekuly, např. bilirubin a mohlo se sem vázat několik sloučenin najednou. Na vazebné místo se váží sloučeniny různých chemických struktur, musí být proto velmi flexibilní.

Je to místo vazby mnoha léčiv: warfarinu, fenylobutazonu, salicylátů, indometacinu, tolbutamidu, sulfathiazolu, furosemidu, valproátu, spironolaktону a mnoha dalších. Z endogenních sloučenin se sem váže např. bilirubin a eikosanoidy.^[7,8]

Vazebné místo II

Vazebné místo II je místem vazby aromatických karboxylových kyselin s negativně nabitou karboxylovou skupinou na jednom konci a s hydrofobním centrem na straně druhé. Toto místo je menší a užší než vazebné místo I, protože se sem neváží

velké molekuly jako bilirubin, hemin. Je také méně flexibilní, neboť vazba zde vykazuje silnou stereoselektivitu. Klasickým příkladem je L-tryptofan, který se váže stokrát silněji než jeho stereoizomer D-tryptofan. Mimoto substituce ligandu poměrně malými skupinami má silný vliv na vazebnost. Například diazepam se váže na vazebné místo II, ale jeho fluorovaný derivát flunitrazepam již ne. Stejně na vazebnost působí i methylace u L-tryptofanu.

Je to místo vazby těchto léčiv: diazepamu, ketoprofenu, iopanoátu, ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a dalších.^[7,8]

Další vazebná místa

Zmapovat všechna vazebná místa s vysokou afinitou k určitým ligandům je téměř nemožné. Na albumin se váží další léčiva jako např. probenecid, amitriptylin či digitoxin.

Přestože se pozitivně nabitá léčiva váží hlavně na α_1 kyselý glykoprotein, několik z nich má vysokou afinitu k albuminu.

Zajímavý je i cystein v pozici 34 s volnou thiolovou skupinou, která se neúčastní vazby v disulfidovém můstku. Na tuto skupinu a další mohou být kovalentně navázány léčiva obsahující thiol. Byla nalezena vazba penicilaminu, kaptoprilu nebo N-acetylcysteinu.^[7,8]

Vazba endogenních sloučenin

Lidský albumin má mnoho vazebných míst pro vyšší mastné kyseliny. Ty se váží s nízkou afinitou k vazebnému místu I a s vysokou afinitou k vazebnému místu II. Předpokládá se přítomnost i dalších vazebných míst pro vyšší mastné kyseliny.

Z aminokyselin se váže na albumin pouze L-tryptofan a cystein.

Z anorganických sloučenin se na albumin váže chloridový anion, kation mědi a zinku.^[8]

Vazba steroidních hormonů

Steroidní hormony se v plazmě vážou na transportní proteiny, a to jak na specifické transportní proteiny, tak i na albuminy. Kortikosteroidy vázající globuliny (CBG) váží pouze přirozené kortikoidy. Naproti tomu albumin váže kortikoidy

přirozené i syntetické, ale s nižší afinitou. Takto vázané steroidy jsou dočasně biologicky neaktivní.^[5]

Vazba metabolitů

Na aminovou, hydroxylovou a thiolovou skupinu proteinu se mohou vázat metabolity vzniklé glukuronidizací. Glukuronidizace je hlavní degradační cestou pro sloučeniny s karboxylovou skupinou. Tato elektrofilní skupina se váže na nukleofilní skupinu (-NH₂, -OH nebo -SH) proteinu a vzniká amidová, esterová či thioesterová vazba. Tímto působí lidský albumin jako enzym, protože je schopen katalyzovat hydrolýzu glukuronidových konjugátů zpět na původní léčivo. Zde jsou uvedena některá léčiva, která se metabolizují glukuronidizací a interagují s lidským albuminem: furosemid, kyselina salicylová, kyselina fenofibrová, gemfibrozil, nesteroidní antiflogistika.^[7,8]

Interakce léčiv

Protože albumin má omezený počet vazebných míst a je to flexibilní molekula, může být vazba léčiva ovlivněna jiným léčivem či endogenní sloučeninou. Tyto interakce jsou velmi důležité, neboť změna vazebnosti léčiva může změnit jeho distribuci či eliminaci a ovlivnit tak terapeutický efekt léčiva. To se musí brát v potaz při výběru léčiva a při určení dávkovacího schématu. Vytěsnění z vazby má především význam u léčiv s vysokou vazbou na plazmatické bílkoviny. Protože jejich vytěsnění z vazby způsobí prudký nárůst koncentrace volného léčiva, vzroste tím pádem i jeho biologický účinek.

Tyto interakce byly prokázány v mnoha studiích na orgánech in vitro. Ve skutečnosti se však ukázalo, že k vytěsnění léčiva z vazby jsou potřeba i další faktory.^[7,8]

4.1.1.2 GLOBULINY

Globuliny jsou velice heterogenní skupinou plazmatických bílkovin. Patří sem jak glykoproteiny, tak lipoproteiny. Podle elektroforetické účinnosti je dělíme na α -, β - a γ -globuliny.

Frakce α_1 -globulinů je složená z glykoproteinů (α_1 -kyselý lipoprotein, transkordin, α_1 -antitrypsin) a lipoproteinů (HDL). Do frakce α_2 -globulinů patří α_2 -makroglobulin, haptoglobiny či ceruloplasmin. Do frakce β -globulinů patří transferin a většina lipoproteinů (LDL, VLDL, chylomikrony). γ -globulinová frakce je významná především z imunologického hlediska, protože sem patří imunoglobuliny.^[9]

4.1.1.3 LIPOPROTEINY

Lipoproteiny (LP) jsou sférické částice složené z hydrofóbního nepolárního lipidového jádra, (triacylglyceroly, estery cholesterolu) obklopeného vrstvou amfifilních lipidů (fosfolipidy, cholesterol), a ze specifického apolipoproteinu. LP se rozlišují podle velikosti, hustoty, složení lipidů, místa tvorby a apolipoproteinů. Podle hustoty se tradičně dělí na: chylomikrony, VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediate-density lipoproteins), LDL (low-density lipoproteins) a HDL (high-density lipoproteins).

Chylomikrony, s průměrem 100 až 1 000 nm, jsou největší z lipoproteinů a jejich koncentrace stoupá po jídle. Transportují lipidy ze střeva do periferních tkání, kde dojde k odštěpení vyšších mastných kyselin.

VLDL, o průměru 30 – 80 nm, jsou také bohaté na triacylglyceridy. Jsou syntetizovány v játrech a v menším množství ve střevě. Transportují triacylglyceridy z jater do periferních tkání.

IDL jsou složeny převážně z esterů cholesterolu a jsou to zbytky VLDL.

LDL, s průměrem 18-25 nm, jsou vytvořeny z IDL. Transportují cholesterol z IDL do jater a periferních tkání. LDL jsou hlavními transportéry cholesterolu.

HDL, nejmenší lipoproteiny o průměru 7-12 nm, slouží k přebírání nadbytečného cholesterolu z extrahepatálních buněk a z krve. Tento cholesterol pak odevzdají orgánům produkujícím steroidy.^[2,10]

4.1.1.4 KYSELÝ ALFA JEDNA GLYKOPROTEIN

Kyselý α_1 -glykoprotein (orosomukoid, AGP) je glykoprotein s molekulovou hmotností 41 000 – 43 000 D. Jeho koncentrace v krvi je za fyziologických podmínek 2,5 mg/ml. Bílkovinná část je složená z polypeptidového řetězce o 183 aminokyselinách spojených dvěma disulfidickými můstky. Cukerná část tvoří 45% molekuly. Je syntetizován v játrech, odkud je vylučován do krve.

AGP je plazmatický protein, jehož důležitou funkcí je transport bazických léčiv a steroidních hormonů v krvi. Patří mezi ně např. chlorpromazin, warfarin, progesteron. Váže ale i některá kyselá léčiva, jako je fenobarbital. Ve snaze najít vazebná místa AGP již proběhlo mnoho studií. Z jejich rozporupných výsledků lze usoudit, že AGP obsahuje široké vazebné místo pro vazbu bazických, kyselých i neutrálních léčiv. Kam se na His97 váží kyselá léčiva, Trp122 neutrální léčiva a Trp160 léčiva bazická.

AGP patří mezi bílkoviny akutní fáze. Jeho koncentrace významně stoupá během infekce, zánětu, tkáňového poškození, při onemocnění ledvin, jater nebo i u některých typů rakoviny. Významně se také podílí na imunitních procesech.

Genetický polymorfismus genů pro AGP se projevuje jak u sekvence aminokyselin, tak u cukerné složky.^[7,11,12]

4.1.2 DRUHY VAZBY LÉČIV NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Při fyziologickém pH 7,4 jsou funkční skupiny albuminu disociovány. Karboxylová skupina se disociuje na aniont -COO^- a aminoskupina přijímá proton za vzniku kationtu -NH_3^+ . Na tyto pozitivně a negativně nabitě částice se mohou vázat další ionty.

Léčiva mohou být navázána na albumin pomocí různých vazeb. Jsou vázána převážně iontovými, vodíkovými, popřípadě hydrofóbními vazbami. Jednotlivé vazby se od sebe liší vazebnou energií, která ovlivňuje pevnost komplexu. Tyto vazby jsou však všechny poměrně slabé, proto k pevnému navázání léčiva je potřeba mnoho takových interakcí.

Iontová vazba

Iontová vazba je nejsilnějším typem vazby. Vazby se účastní dvě opačně nabitě částice, mezi kterými působí elektrostatické přitažlivé síly. Účastní se jí karboxylové anionty a amoniové kationty bílkoviny. Pro mnoho léčiv je právě tato vazba nejdůležitější.

Vodíková vazba

Vodíková vazba se vyskytuje mezi vodíkem polární skupiny (-NH_2 , -OH) a volným elektronovým párem elektronegativně nabitého atomu (O, S, N). Bílkoviny mají mnoho míst vhodných k tvorbě vodíkové vazby. Příkladem může být fenolická skupina tyrosinu.

Van der Waalsovy síly

Van der Waalsovy síly patří mezi slabé vazebné interakce. Vazba je charakterizovaná nespecifickými přitažlivými silami mezi nenabitými částicemi.

Hydrofóbní vazba

Hydrofóbní vazba je nejslabším typem vazby. Může vzniknout mezi dvěma aromatickými cykly anebo mezi dvěma nepolárními řetězci. Tímto způsobem se např. váží lipidy na molekulu bílkoviny.^[13]

4.1.3 VÝZNAM VAZBY LÉČIV NA PLAZMATICKÉ PROTEINY

Vazba léčiv na plazmatické proteiny ovlivňuje mnoho farmakokinetických a farmakodynamických parametrů. Pouze volné (nevázané) léčivo může vykazovat biologický účinek, protože je schopné přestupovat do cílových orgánů. Naproti tomu léčivo vázané na proteiny je inaktivní, nemá biologickou aktivitu ani není schopno se eliminovat z organismu. Vázané léčivo má nižší toxicitu a je chráněno vůči oxidaci. Teprve poklesem koncentrace volného léčiva dojde k uvolnění vázaného léčiva z komplexu.

Volná frakce léčiva ovlivňuje distribuční objem. Distribuční objem je farmakokinetický parametr, který nám vyjadřuje vztah množství farmaka v organismu k jeho plazmatické koncentraci.

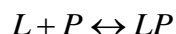
$$V_d = \frac{D}{C_0},$$

kde V_d je distribuční objem, D je množství léčiva podané do organismu, C_0 koncentrace léčiva v plazmě.

Léčiva s nízkým distribučním objemem se vyskytují hlavně v krvi. Léčiva s distribučním objemem 10 - 20 l se vyskytují v extracelulární tekutině. Léčiva s distribučním objemem nad 70 l se kumulují v tkáních. Množství léčiva není ovlivněno pouze hydrofilními či lipofilními vlastnostmi léčiva, ale také distribucí tukové tkáně.

Léčiva s vysokou afinitou ke tkáňovým bílkovinám mají velký distribuční objem, kumulují se v organismu. Naopak léčiva s malou afinitou ke tkáňovým bílkovinám se nacházejí v krvi ve vysoké koncentraci.

Léčiva se váží na plazmatické proteiny na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Léčivo vstupuje do reakce s plazmatickým proteinem a vzniká komplex léčivo-protein. Tento komplex se může zpět disociovat na volné léčivo a protein. Děj lze vyjádřit rovnicí:



Celý proces vazby nám charakterizuje asociační konstanta (K_a), která se vypočítá ze vztahu:

$$K_a = \frac{[LP]}{[L][P]},$$

kde [LP] je koncentrace komplexu, [L] je koncentrace léčiva, [P] je koncentrace proteinu.

Asociační konstanta nám podává informace o afinitě či síle vazby komplexu léčivo-protein. Léčiva s vysokou afinitou k proteinu mají asociační konstantu v rozmezí $10^5 - 10^7$ l/mol. U léčiv s nízkou afinitou k proteinu pak K_a nabývá hodnot v rozmezí $10^2 - 10^4$ l/mol. Disociační konstanta je pak převrácenou hodnotou konstanty asociační.

V molekule bílkoviny se nachází několik vazebných míst s rozdílnými vlastnostmi. Mohou se zde nacházet specifická vazebná místa s nízkou kapacitou a nespecifická vazebná místa s vysokou kapacitou. Každé toto místo má odlišné vazebné vlastnosti. Vazebná kapacita, vzniklá násobkem počtu vazebných míst a koncentrací bílkoviny, nám udává maximální koncentraci molekul léčiva, které se mohou vázat na vazebné místo bílkoviny.

Vazebná místa s nižší vazebnou kapacitou mohou být nasycena. Vázaná frakce léčiva je pak funkcí koncentrace léčiva, koncentrace bílkoviny, počtu vazebných míst a asociační konstanty. Toto lze vyjádřit rovnicí:

$$C_B = \frac{nPK_a C_U}{1 + K_a C_U},$$

kde C_B je koncentrace vázaného léčiva, C_U je koncentrace volného léčiva, n je počet vazebných míst, P je koncentrace bílkoviny a K_a je asociační konstanta. Při nasycení vazebného místa se C_B již nezvětšuje, při dalším podání léčiva dochází k obrovskému růstu koncentrace volného léčiva.

Pro vazebné místo s vysokou vazebnou kapacitou, kde vazebné místo není saturováno, platí vztah:

$$C_B = nPK_a C_U.$$

Z rovnice vyplývá, že koncentrace vázaného léčiva se mění přímo s koncentrací léčiva volného.^[1,14,15]

4.1.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KONCENTRACI PLAZMATICKÝCH PROTEINŮ

Hladina plazmatických proteinů může během různých fyziologických i patologických stavů kolísat. Při snížení koncentrace plazmatických proteinů může dojít ke zvýšení koncentrace volného léčiva, a tím i ke zvýšení farmakologického a toxického účinku.

Hypoalbuminémie může být důsledkem těchto chorob: akutní pankreatitidy, cirhózy jater, nefrotického syndromu, nemocí GIT, popálenin, chronického alkoholismu, deprese, revmatoidní artritidy, chronické či akutní systémové infekce, diabetu mellitu, tuberkulózy či mnoha dalších. Hypoalbuminémie je normální v dětském věku, těhotenství či u starších osob. Naopak hyperalbuminémie provází hypotyreózu, nespecifické neurózy a psychózy nebo schizofrenii.

Snížení hladiny AGP jsou důsledkem nefrotického syndromu či užívání hormonální antikoncepce. Zvýšení AGP pak způsobuje Crohnova choroba, celikalie, renální selhání, revmatoidní artritida, stres či trauma. Zvýšená hladina AGP je pak i u seniorů.

Lipoproteiny mohou být sníženy u hypotyreózy a traumatu. Naopak zvýšení LP způsobuje diabetes nebo nefrotický syndrom.^[1,14]

4.2 METODY MĚŘENÍ VAZBY LÉČIV NA PLAZMATICKÉ PROTEINY

4.2.1 ROVNOVÁŽNÁ DIALÝZA

Rovnovážná dialýza (RD) je nejužívanější metodou pro stanovení vazby na plazmatické proteiny. Tato metoda využívá dialyzační komůrku, která je rozdělena na 2 části semipermeabilní membránou. Membránou mohou prostupovat pouze nízkomolekulární látky, pro proteiny a léčivo na ně vázané je nepropustná. Jsou dostupné membrány různé tloušťky a hustoty, v případě, že se látka váže na membránu, je třeba vybrat vždy tu nejtenčí.

Plazma a pufr jsou odděleny pomocí membrány. Celý systém je inkubován při fyziologické teplotě 37°C a při této teplotě probíhá ustavení rovnováhy. Doba potřebná k inkubaci se mění s vlastnostmi látek. Ohled se musí brát i na možnou degradaci vazebných bílkovin. Membránu lze před RD namočit do roztoku pufru, aby nedošlo k jejímu poškození.

Pro přesné výsledky by mělo být rovněž upraveno pH plazmy na fyziologickou hodnotu 7,4. Vaznost bílkovin závisí na pH. Také pufr svými ionty může ovlivnit vazbu léčiv na plazmatické bílkoviny. Rovněž osmotický tlak může způsobit nasávání tekutiny z pufru do plazmy. Lze tomu zabránit například zvýšením osmotického tlaku pufru pomocí dextranu. Může také docházet k naředění plazmy, tomu lze zabránit použitím pufru obsahujícího 5,58 g chloridu sodného na 1 litr pufru.

Aby RD byla použitelná, musí být dosaženo ustavení rovnováhy. Rovnováha musí být dosažena mezi volným léčivem v plazmě a volným léčivem v pufru. Proto musí být předběžnými testy stanovena doba potřebná k dosažení rovnováhy. Ta závisí například na poměru povrchu k objemu komůrky. Čím větší je povrch, tím je rovnováha ustavena rychleji. Doba se může zkrátit i třepáním či otáčením.

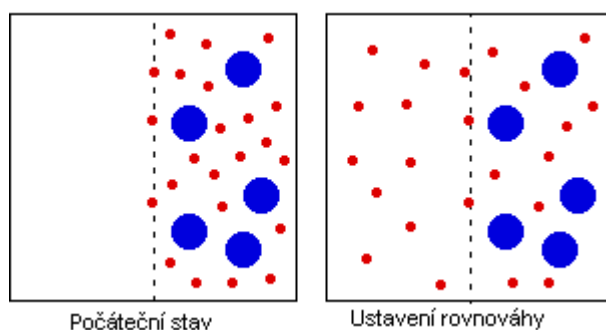
Po ustavení rovnováhy se tekutina odebere z obou komůrek a analyzuje se koncentrace léčiva. V komůrce s plazmou se nachází celková koncentrace léčiva (C_T) složená z koncentrace volného léčiva a léčiva vázaného na plazmatické bílkoviny. V komůrce s pufrém je koncentrace volného léčiva (C_U). Koncentrace vázaného léčiva (C_B) lze spočítat z rozdílu celkové koncentrace a koncentrace nevázaného léčiva. [20,21]

$$C_B = C_T - C_U$$

Volná a vázaná frakce se vypočte ze vzorců:

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

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



Obr. č.2: Difúze přes semipermeabilní membránu

V dnešní době jsou dostupná komerční dialyzační zařízení, jejichž obrovskou výhodou je možnost měření mnoha vzorků najednou, použití malých objemů plazmy, připravenost k okamžitému použití a velký poměr povrchu k objemu. [14,16]

4.2.2 MIKRODIALÝZA

Je to jediná metoda, která umožňuje stanovit koncentraci volného léčiva v plazmě, tkáních a ostatních biologických tekutinách in vivo. Můžeme pomocí ní

sledovat přirozené metabolitní cesty či synaptické funkce. Umožňuje nám in vivo přesné stanovení endogenních sloučenin i v malých objemech.

Mikrodialyzační sonda, obsahující dialyzační membránu, je chirurgicky implantována do krevního řečiště, do tkáňového prostoru či prostoru obsahujícího tekutinu. Pufr je pumpován pomalu přes sondu a volné léčivo ve zkoumané tekutině difunduje přes membránu do sondy na základě koncentračního gradientu. Dialyzát je po čase odebrán a analyzován.

Tato metoda měří pouze volnou frakci léčiva (C_U), nepodává nám informace o celkové (C_T) či vázané frakci (C_B). K určení celkové koncentrace musí být vzorky sebrány a analyzovány odděleně. Vázaná frakce pak může být vypočtena ze vztahu:

$$C_B = C_T - C_U$$

Během měření není dosažena rovnováha, je tedy nutné určit stupeň vyrovnání koncentrace léčiva na obou stranách dialyzační membrány. To lze provést ponořením dialyzační sondy do roztoku pufru o známé koncentraci léčiva.^[14,16,17]

4.2.3 ULTRAFILTRACE

Při této metodě se vzorek plazmy s léčivem umístí do ultrafiltrační jednotky. Jednotka je složena ze dvou částí od sebe oddělených filtrem. Filtr propustí pouze nízkomolekulární látky, plazmatické bílkoviny jsou zadrženy. Ultrafiltrace (UF) využívá negativního či pozitivního tlaku. Po zfiltrování vzorku plazmy se ve filtrátu předpokládá koncentrace volného léčiva (C_U). Z tekutiny neprošlé přes filtr získáme celkovou koncentraci léčiva C_T . Koncentraci vázaného léčiva C_B vypočteme ze stejného vztahu jako při RD.

Pro dosažení přesnosti je ale nutné zachovat nízký objem ultrafiltrátu (10-15%), aby nedocházelo k zkoncentrování plazmatických bílkovin ve vzorku plazmy. Potom může ale být problematické stanovení koncentrace, protože u nízkých objemů nemusí být dosaženo hranice stanovitelnosti. U některých látek zůstává koncentrace volného léčiva stejná i u zkoncentrování bílkovin, proto množství ultrafiltrátu může dosahovat

i 20-40%. Dále může docházet k poklesu celkové koncentrace léčiva přechodem léčiva do ultrafiltrátu. V těchto případech C_T stanovíme jako průměr z hodnot před a po filtraci.

Nevýhodou ultrafiltrace je, že neprobíhá při fyziologickém pH.

Centrifugace je jednoduchá a rychlá metoda. Působením negativního tlaku, tj. odstředivé síly, dochází k rychlému dělení látek podle jejich hmotnosti.

Ultrafiltrace za pozitivního tlaku využívá stlačeného plynu.^[14,16]

4.2.4 GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Gelová chromatografie (GF) je metoda založená na dělení složek podle velikosti molekul. Skládá se z chromatografické kolony, která je naplněna gelem. Celá kolona je pak vymývána mobilní fází. Gel je tvořen inertní polymerní zesítěnou látkou s různou velikostí pórů. Nízkomolekulární látky difundují dovnitř gelu a jsou rozptýleny jak uvnitř, tak vně gelu. Tak se zpomalí jejich chod chromatografickou kolonou. Naopak vysokomolekulární látky částice gelu obtékají a jsou z kolony rychle eluovány mobilní fází.

Tato metoda nám umožňuje měření vazby léčiva i u malého objemu plazmy. Mobilní fází je roztok ligandu. Měříme koncentraci ligandu v eluátu. Disociaci proteinového komplexu je zabráněno dosaženou rovnováhou v chromatografické koloně.^[16,18]

4.2.5 MIKROSFÉRY ALBUMINU

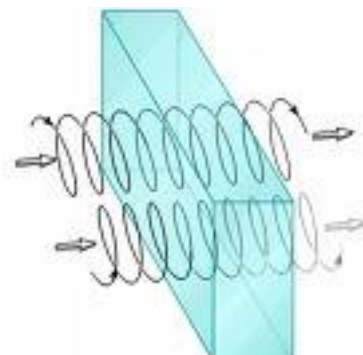
V roce 1973 byla popsána metoda vazby léčiva na albuminové mikrosféry (MA). Mikrosféry jsou suspendovány v pufru. Suspenze se převede do plastové stříkačky s porézním diskem na dně. Po přidání léčiva se stříkačka nechá inkubovat, aby se

ustavila rovnováha. Volná frakce léčiva se získá protlačením přes disk. Mikrosféry albuminu zůstanou a přes porézní disk neprojdou.

Tato metoda je také užívána k objasnění vazby léčiva na albumin či získání informací o interakci mezi léčivem a vazebným místem.^[16]

4.2.6 CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS

Cirkulární dichroismus (CD) je metoda založená na měření hodnot změny absorbance nebo fluorescence Cottonova efektu. Měří se rozdílná absorpce nebo emise pravo a levotočivého kruhově polarizovaného světla při průchodu chirální měřenou látkou. Při měření vzniká křivka cirkulárního dichroismu, která je rozdílem mezi absorpčním spektrem pro vlevo a vpravo kruhově polarizované světlo. Tyto křivky nám umožňují zkoumat konformační změny proteinu při navázání molekuly léčiva.^[16,18]



Obr. č.3: Cirkulární dichroismus

4.2.7 SROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH METOD

| | výhody <input checked="" type="checkbox"/> | nevýhody <input checked="" type="checkbox"/> |
|----|---|---|
| RD | <input checked="" type="checkbox"/> komerční dostupnost dialyzačního zařízení <input checked="" type="checkbox"/> kontrolovaná teplota <input checked="" type="checkbox"/> široká použitelnost | <input checked="" type="checkbox"/> časová náročnost <input checked="" type="checkbox"/> degradace nestabilních proteinů <input checked="" type="checkbox"/> možnost vazby léčiva na membránu <input checked="" type="checkbox"/> naředění krevních bílkovin |
| MD | <input checked="" type="checkbox"/> měření in vivo <input checked="" type="checkbox"/> možnost měření tkáňové koncentrace léčiva | <input checked="" type="checkbox"/> dialyzační sonda musí zůstat vložena v krevním řečišti nebo tkáni <input checked="" type="checkbox"/> nezaznamenaná časové změny koncentrace <input checked="" type="checkbox"/> použití velmi citlivé analytické metody pro velmi se vážající léčiva |
| UF | <input checked="" type="checkbox"/> jednoduchost <input checked="" type="checkbox"/> rychlost <input checked="" type="checkbox"/> široké použití | <input checked="" type="checkbox"/> možnost vazby léčiva <input checked="" type="checkbox"/> K_a se může měnit s koncentrací proteinu <input checked="" type="checkbox"/> malý objem ultrafiltrátu vyžaduje velmi citlivou analytickou metodu |
| GF | <input checked="" type="checkbox"/> šetnost <input checked="" type="checkbox"/> možnost měření malých objemů | <input checked="" type="checkbox"/> časová náročnost |
| MA | <input checked="" type="checkbox"/> jednoduchost <input checked="" type="checkbox"/> cenová dostupnost | <input checked="" type="checkbox"/> vazba léčiva pouze na albumin <input checked="" type="checkbox"/> nekontrolovatelná teplota |
| CD | <input checked="" type="checkbox"/> rychlost | <input checked="" type="checkbox"/> nekontrolovatelná teplota <input checked="" type="checkbox"/> cenová náročnost ^[14,16,17,18] |

4.3 RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ RECEPTOROVĚ SPECIFICKÉ PEPTIDY

Peptidy jsou důležitými regulátory růstu a buněčných funkcí nejenom ve zdravé, ale i v nádorové tkáni. Jsou to malé, nízkomolekulární proteiny složené z méně jak 100 aminokyselinových zbytků a s hmotností nižší než 10 000 kDa. Jejich využití je široké, byly použity v onkologii, kardiologii, neurologii, k zobrazení či léčbě infekce, zánětu, aterosklerózy a trombózy.

Radioaktivně značené peptidy jsou z chemického hlediska peptidové řetězce složené z 3 až 200 aminokyselin a jsou značeny různými izotopy. Váží se specificky na membránový receptor, tudíž mohou být využity v diagnostice, terapii nebo značené radioterapii.

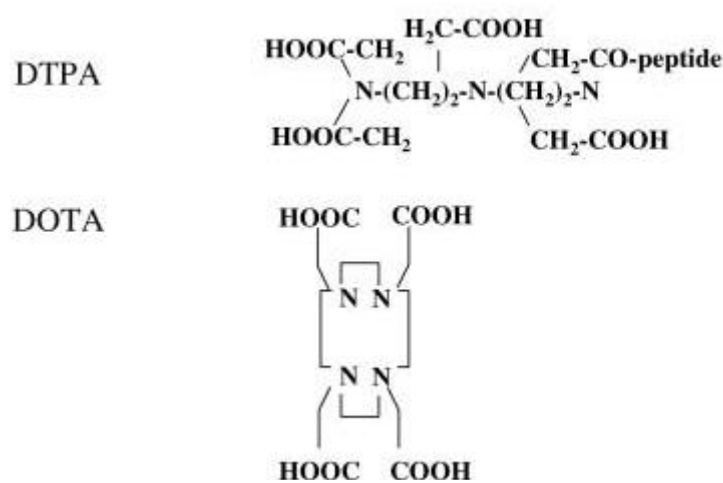
Většina peptidů používaných v nukleární medicíně je složena z relativně malého počtu aminokyselin. Malé peptidy nemají dobře definovatelnou terciární strukturu. Naproti tomu větší peptidy jsou snáze chemicky syntetizovatelné, upravitelné a lépe stabilizovatelné pro zajištění optimálních farmakokinetických vlastností. Jako ochrana před peptidázami lze použít cyklizaci, záměnu AMK za D-řadu či netypické AMK, ochranu konce (např. N-methylace) nebo zkrácení řetězce. Peptidy jsou nejčastěji syntetizovány v roztoku či na pevné fázi. Častější je použití syntézy na pevné fázi, která je rychlá, univerzální a lze připravit více peptidů najednou. Analogy peptidů i komplexy peptidu s chelatačním činidlem jsou v dnešní době již komerčně dostupné.

Mezi největší výhody peptidů patří jejich rychlá farmakokinetika, možnost modifikace exkrece, mohou vykazovat biologickou aktivitu, nejsou imunogenní a mají vysokou vazebnou afinitu k receptorům.

Chelatační činidla

Chelatační činidla slouží k pevnému navázání radionuklidu na molekulu peptidu, bílkoviny nebo specifických protilátek. Zlepší se rovněž i farmakologické parametry.

Nejprve dojde k navázání chelatačního činidla na peptid prostřednictvím amidové vazby, které se účastní karboxylová skupina chelátoru a aminoskupina peptidu. Na tento komplex je pak navázán samotný radionuklid. Mezi chelátory patří např. DTPA, DOTA, EDTA, TETA či desferoxamin. DTPA (diethylenetriaminpentaocetová kyselina) nám slouží k pevnému navázání ^{111}In . DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraocetová kyselina) se hodí jako chelatační činidlo pro terapeutické radionuklidy ^{90}Y a ^{177}Lu .



Obr. č.4: Vzorce chelatačních činidel: DOTA, DTPA

Výběr vhodného radionuklidu

Farmakokinetika značené molekuly závisí také na správném výběru radionuklidu. Musíme vzít v potaz, zda je látka určena k terapii či diagnostice, fyzikální vlastnosti izotopu či charakter nádoru.

Hlavní kritéria vhodnosti PRRT

Klinická:

- Neoperovatelná rakovina s mnohočetnými metastázemi, nádor mozku.

- Neúspěch tradiční léčby.

Molekulárně biologická:

Nádorová exprese adekvátních peptidových receptorů.
Vyjádřený podtyp korespondující s vazebným profilem ligandu.
Vysoká hustota vyjádřených receptorů.
Lokalizace nádorů vně hematoencefalitické bariéry.
Preferovaná homogenní distribuce.
Pokud možno vysoká radiosenzitivita.

4.3.1 SOMATOSTATIN

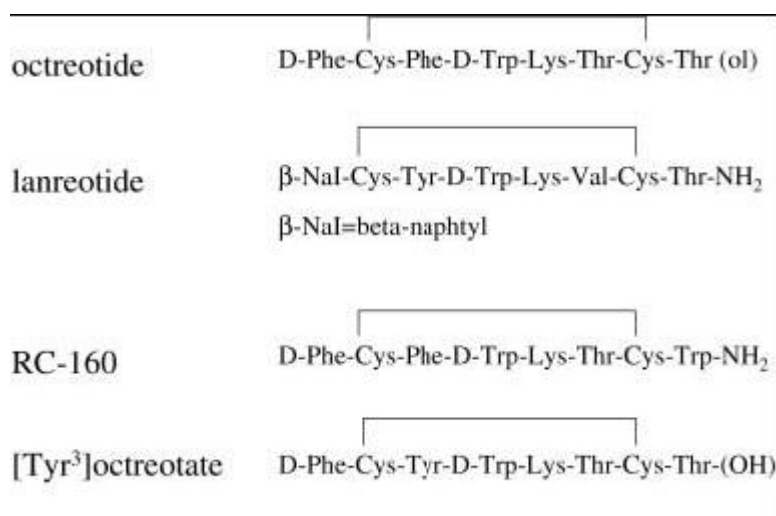
Somatostatin je cyklický peptid syntetizovaný jako pre-pro-hormon v D-buňkách pankreatu. Tento pre-pro-hormon je nejprve zpracován na pro-hormon o 28 aminokyselinách a nakonec na vlastní hormon o 14 aminokyselinách. Všechny jeho formy mají biologickou účinnost. Je přítomen v centrálním nervovém systému (hypothalamu, mozkové kůře, mozkovém kmeni), v gastrointestinálním traktu (žaludku, slinivce, tenkém střevě, tlustém střevě) a dále i jinde v organismu. Na mnoha místech CNS somatostatin působí jako neurotransmitter. Naproti tomu má i hormonální aktivitu – inhibuje vylučování somatotropinu, inzulinu, glukagonu a gastrinu, snižuje motilitu žaludku, sekreci a resorpci v GIT. Současně s VIP a GIP tlumí žaludeční sekreci.

Tento široký inhibiční efekt hormonální sekrece v mnoha žlázách vedl k myšlence možného využití somatostatinu v léčbě nemocí podmíněných nadprodukcí zmíněných hormonů endokrinně aktivními nádory.

Ke své peptidové povaze je nevhodný k perorálnímu užití, proto se musí aplikovat intravenózně. Jeho nevýhodou je krátký biologický poločas. Po intravenózním podání člověku je jeho plazmatický poločas 2 až 3 minuty z důvodu masivní enzymové degradace. Proto začátkem osmdesátých let byly vyvinuty somatostatinové analogy odolnější vůči peptidázám.

Analogy somatostatinu byly připraveny obměnami původní molekuly ve snaze zachovat biologickou funkci. Studiumi jeho struktury a konformační analýzou byla nalezena sekvence, která je nutná pro biologický účinek. Jedná se o fragment Phe-Trp-Lys-Thr, který koresponduje se sedmou až desátou aminokyselinou somatostatinu. Bylo

připraveno mnoho analogů s kratším řetězcem ve snaze připravit sloučeninu s delším poločasem, vyšší afinitou či selektivitou. Například použitím netradičních aminokyselin a zkrácením řetězce na osm aminokyselin. Prvním takovým analogem byl oktreetid acetát, který má po intravenózním podání plazmatický poločas 41 - 58 minut. Mezi stabilnější analogy patří oktreetid (sandostatin, SMS 201-995), lanreetid (BIM23014) či vapreetid (RC160). Tyto sloučeniny se osvědčily v klinických studiích.



Obr. č.5: Vzorce analogů somatostatinu

Účinek somatostatinu je zprostředkován jeho receptory. Somatostatinové receptory (sstr) se nacházejí ve vysoké hustotě na povrchu řady buněk včetně nádorových. Byly objeveny v mozku, hypofýze, slinivce, střevě, štítné žláze, nadledvinkách, ledvinách a v buňkách imunitního systému. Vyskytují se v neuroendokrinních nádorech trávicího traktu, jako je karcinoid, inzulinom či gastrinom, ale také i v malobuněčném karcinomu plic, meningiomu nebo karcinomu štítné žlázy.

Do dnešní doby bylo popsáno 5 různých somatostatinových receptorů. Byly pojmenovány sstr1 – 5 chronologicky dle data objevení. Přičemž sstr2 se nachází ve 2 izoformách: sstr2a a sstr2b. Strukturně sstr patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Vysoká hustota sstr2 receptorů byla nalezena u neuroendokrinních gastrointestinálních tumorů, bronchiálních tumorů, feochromocytomů, neuroblastomů, meduloblastomů, lymfomů, karcinomů prsu atd.

Převaha sstr1 v nádorech prostaty a sarkomech, které ale mohou exprimovat i sstr2 a sstr5. Sstr3 je vyjádřen převážně na povrchu inaktivního adenomu hypofýzy a sstr4 hrají minoritní roli.

Oktreotid má vysokou afinitu k sstr2 receptorům, takže je užíván k zobrazení a léčbě nádorů s vysokou hustotou sstr2. Naproti tomu valpreotid a lanreotid s dobrou afinitou k sstr2 a sstr5 jsou klinicky využívány u nádorů s vysokou expresí sstr2 a sstr5.

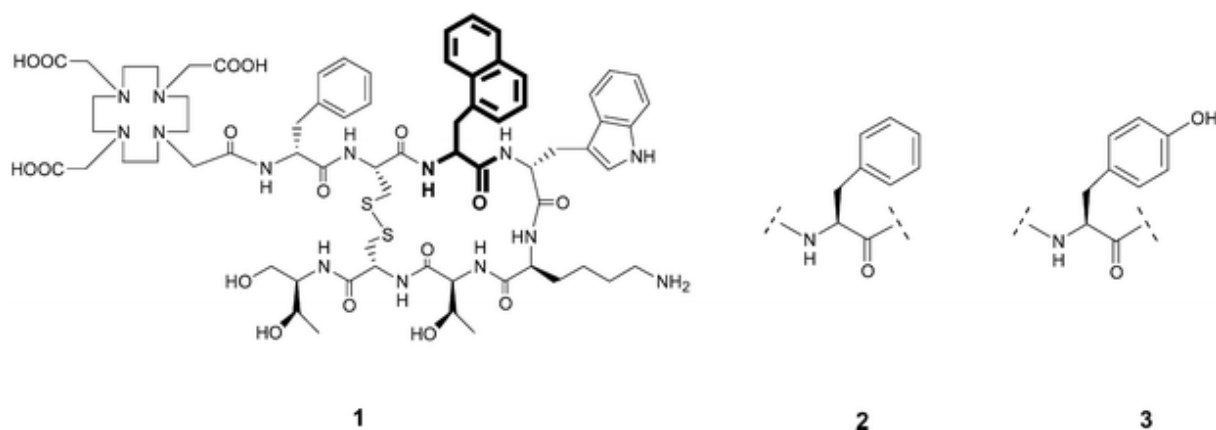
Prvním klinicky používaným derivátem byl v roce 1994 ^{111}In -[DTPA-D-Phe¹]-oktreotid (OctreScan, ^{111}In -pentetreotid). Tato látka se osvědčila pro lokalizaci malých lézí, zmapování rozsahu nemoci, detekci metastáz, detekci relapsu a progresu choroby, monitorování efektu chirurgické léčby, radioterapie nebo chemoterapie. Mimo to mohla být tato sloučenina použita jako podpůrný nástroj pro další nádory jako lymfomy, MTC, malobuněčné karcinomy plic či adenomy hypofýzy. Původně byla navržena pro scintigrafii, ale ^{111}In emituje také Augerovy elektrony, proto ho lze využít i k terapii. Jednou z nevýhod tohoto peptidu je průměrná afinita k sstr2 a zanedbatelná afinita k sstr1, sstr3, sstr4 a sstr5. Navíc DTPA není vhodné chelatační činidlo pro komerční použití při značení β zářičů jako ^{90}Y nebo ^{177}Lu . Pro tyto radioizotopy je výhodnějším chelatačním činidlem DOTA, který tvoří velmi termodynamicky i kineticky stabilní komplexy s těmito kovy. A v neposlední řadě nesmíme opomenout poměrně vysokou cenu indíu 111.

Další důležitou sloučeninu představuje $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid, dekaeptid, úspěšně využitý pro zobrazení v solitárních pulmonálních uzlů, při karcinomu prsu, a dokonce i melanomu. Pro zobrazení primárního adenokarcinomu slinivky byl úspěšně použit ^{111}In -DOTA-lanreotid.

Pro terapii se ukázaly jako nevhodnější látky značené β zářiči jako ^{90}Y nebo ^{177}Lu . Mezi velmi slibné sloučeniny patří ^{90}Y -DOTA-TOC, ^{90}Y -DOTA-LAN a ^{177}Lu -DOTA-TATE. Liší se od sebe rozdílnou afinitou k somatostatinovým receptorům. DOTATATE, vzniklý záměnou alkoholické skupiny na C-konci za skupinu karboxylovou, má nejvyšší afinitu k sstr2. DOTA-LAN má nižší afinitu k sstr2, ale zobrazuje i sstr5.

V experimentální části diplomové práce jsme použili ^{111}In -[DOTA-1-Nal³]-oktreotid a ^{90}Y -[DOTA-1-Nal³]-oktreotid (^{111}In -, ^{90}Y -DOTA-NOC), vzniklý záměnou aminokyseliny v pozici 3 oktreotidu. DOTA-NOC má vysokou afinitu k sstr2, sstr3

a k sstr5. Afinita k sstr1 a sstr4 je velmi nízká anebo zcela žádná. Preklinické studie zatím ukazují, že ^{111}In -DOTA-NOC má nadřazené postavení v doposud studovaných somatostatinových analogích. A předpokládá se to i podobně pro ^{90}Y -DOTA-NOC. Vysoký záchyt ^{111}In -DOTA-NOC byl pozorován v těchto orgánech: nadledviny, slinivka, žaludek a hypofýza.



Obr. č.6: Vzorce analogů somatostatinu 1 – DOTA-NOC, 2 – DOTA-OC, 3 – DOTA-TOC

A mezi nejnovější analogy patří ^{111}In -[NaI³-Thr⁸]-oktreotid (DOTA-NOCATE) a ^{111}In -[Bz-Thi³-Thr⁸]-oktreotid (DOTA-BOCATE). Receptorové studie ukázaly vysokou afinitu k sstr2, sstr3 a sstr5.^[22,23,24,25,26,27,28,29]

4.3.2 ALFA MELANOCYTY STIMULUJÍCÍ HORMON

α – melanocyty stimulující hormon (α – MSH) je peptid složený z 13 aminokyselin. Vzniká štěpením molekuly propiomelanokortinu na adrenokortikotropní hormon o 39 AMK a následným štěpením na 13 AMK α - MSH v periferních tkáních (střevo, placenta, mužský reprodukční systém). MSH navozuje melanogenezi, která vede ke ztmavnutí kůže. α – MSH hraje dominantní roli v regulaci buněčného růstu melanomu. Bylo popsáno 5 druhů melanokortinových receptorů (mcr), ale pouze mcr1

může být použit při kontrole růstu melanomu. Přítomnost receptorů s vysokou afinitou k MSH byla prokázána pomocí vazebných studií s ^{125}I -MSH na myších a lidských buňkách melanomu.^[3,30]

4.3.3 VASOAKTIVNÍ INTESTINÁLNÍ PEPTID

Vasoaktivní intestinální peptid (VIP) je lineární peptid složený z 28 AMK. Nachází se v celém gastrointestinálním traktu, mozkové kůře, hypothalamu, ve dřeni nadledvin a autonomních gangliích. Způsobuje mohutnou vasodilataci, ovlivňuje pohyby a sekreci v GIT (tlumí sekreci žaludku a stimuluje střevní sekreci) a je také neuromodulátorem a neurotransmiterem. Působí synergicky s noradrenalinem. VIP receptory byly lokalizovány v mnoha nádorových buňkách, jako např. gastrointestinální adenokarcinom, karcinom dlaždicových buněk, karcinom prsu, karcinomu vaječníku, karcinom endometria, karcinom močového měchýře atd.

VIP jako ligand receptorů vyjádřených v gastrointestinálním adenokarcinomu byl poprvé značen ^{123}I a jeho analogy $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Preklinické studie však ukázaly rychlou degradaci v několika minutách po intravenózním podání. Navíc VIP je velmi účinná látka a již její malá množství mají toxický účinek. To vyžaduje důkladné přečištění látky před podáním do organismu.^[6,21,30]

4.3.4 CHOLECYSTOKININ-B / GASTRIN

Gastrin a cholecystokinin jsou peptidy přítomné v GIT a CNS. Gastrin působí zvýšení sekrece žaludeční sekrece, ovlivňuje také pohyby GIT a má i další funkce. Cholecystokinin působí sekreci pankreatické lipázy. Tyto funkce jsou zprostředkovány

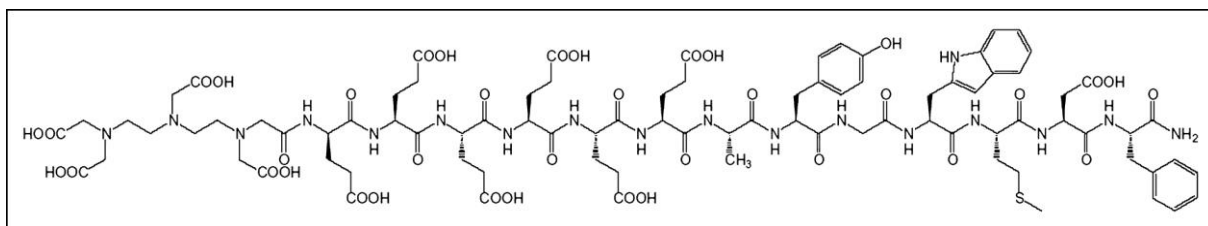
dvěma specifickými receptory – CCK-B/gastrin a CCK-A. Jsou přítomny ve zdravé tkáni, ale i v mnoha nádorech.

CCK-A receptory se nacházejí ve slinivce, žlučníku, žaludeční sliznici a dalších částech hladké svaloviny gastrointestinálního ústrojí. Ve slinivce jsou spojeny se sekrecí enzymů a inzulínu z beta buněk.

CCK/B receptory jsou široce vyjádřeny v centrálním nervovém systému, slinivce a žaludku. Jsou zodpovědné za vylučování žaludeční kyseliny, pepsinogenu a histaminu. Byly nalezeny v gastroenteropatických neuroendokrinních tumorech (např. v kolorektálním karcinomu), malobuněčném karcinomu plic, astrocytomu či stromatálním karcinomu vaječníků. CCK/B receptory byly nalezeny v 90% případů medulárních karcinomů štítné žlázy (MTC).

Mezi analogy gastrin patří např. minigastrin, CCK-8.

První studie s gastrinem proběhly v roce 1990, kdy byl použit jodovaný gastrin jako potenciální radiofarmakum. Takto značený gastrin se velmi specificky navázal v medulárních buňkách karcinomu štítné žlázy u pacienta s metastázující MTC. Z dalších studií analogů CCK a gastrinu vzešel jako potenciální látka minigastrin. Prvním klinicky testovaným byl ^{90}Y -[DTPA⁰,(D)Glu¹]-minigastrin s vysokou afinitou k CCK-BR, ale pro jeho vysokou hemotoxicitu a nefrotoxicitu byl výzkum ukončen.^[21,30,31,32]



Obr. č.7: Struktura CCKB-selektivního analogu DTPA-D-Glu-Glu⁵-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH₂ (minigastrin).

4.3.5 SUBSTANCE P

Substance P je undekapeptid patřící do rodiny tachykininů. SP byla nalezena v GIT, dřeni nadledvin, bazálních gangliích a hypothalamu. V GIT působí kontrakci hladké svaloviny, v CNS působí jako neurotransmitter a modulátor. V kůži působí vasodilataci. Hraje také důležitou roli v přenosu bolesti. SP receptory byly nalezeny v glioblastomu, karcinomu štítné žlázy a karcinomu prsu.

⁹⁰Y-DOTAGA-substance P je poteciálním kandidátem pro PRRT nádorů mozku. Tento analog je zaměřen proti NK1 receptorům vyjádřených v lidském glioblastomu. Jeho nevýhodou je metabolická nestabilita.^[21,30]

4.3.6 NEUROTENSIN

Neurotensin, peptid složený z 13 AMK, byl nalezený v GIT a CNS. Tlumí žaludeční sekreci a vyprazdňování žaludku, působí vazokonstrikci. V CNS byl lokalizován v buňkách obsahujících společně noradrenalin s katecholaminem. Stejně jako ostatní regulační peptidy má funkci neurotransmiteru a neuromodulátoru. Jeho receptory byly nalezeny v duktálním karcinomu slinivky, proto může být využit k jeho diagnostice.

^{99m}Tc a ¹¹¹In-DTPA/DOTA–značený neurotensin (NT) byl testován in vitro a in vivo pro jeho vysoký potenciál v zobrazení karcinomu slinivky. Dále byly použity ^{99m}Tc-NT(8–13) analogy neurotensinu s delším plazmatickým poločasem. Perspektivní se zdají některé analogy NT značené ¹¹¹In, které jsou poměrně stabilní s vysokou afinitou k NT receptorům. Byl i experimentálně použit izotop ¹⁸⁸Re pro možné využití v terapii.^[4,21,30]

4.3.7 BOMBESIN

Bombesin je tetradekapeptid izolovaný z kůže žáby rodu *Bombina bombina* patřící do skupiny peptidů sdílejících dekaeptidové homology na jejich C-terminálním konci. Bombesinu podobné peptidy byly později objeveny u různých savců. Lidským analogem je gastrin stimulující peptid (GRP).^[30]

4.3.8 GASTRIN STIMULUJÍCÍ PEPTID

Gastrin stimulující peptid (GRP) je složen z 27 aminokyselin a z dekaeptidu neuromedinu B. Má širokou farmakologickou aktivitu. Působí jako neurotransmiter. V centrálním nervovém systému a GIT má několik regulačních funkcí. Stimuluje uvolňování gastrointestinálních hormonů, sekreci žaludeční kyseliny, nadledvinkovou a hypofyzární sekreci. Působí na termoregulaci, pocit sytosti, srdeční rytmus, kontrakci hladkého svalstva či na imunitní funkce.

Bombesin a gastrin působí pomocí receptorů. Jsou známy 4 subtypy těchto receptorů: GRP-R (GRP receptor, BB2), NMB-R (neuromedin B receptor, BB1), BB3-R a BB4-R. GRP receptory se fyziologicky nachází ve slinivce, prsu, gastrointestinálním traktu, neuroendokrinních buňkách nervového systému, plicích. Byly nalezeny v nádorech prostaty, gastrinomu a v nádorech prsu společně s BB3 receptory.

Radioaktivně značené peptidy pro zobrazení GRP receptorů jsou určeny jak pro zobrazení, tak pro terapii. Byly zkoumány deriváty značené ^{99m}Tc. ^{99m}Tc-BBN jako možná látka k využití pro scintigrafii, ale ukázalo se, že podléhají velmi rychle enzymové degradaci. Proto se pro úspěšné zobrazení nehodí.

Pro potenciální terapii byly použity ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu a ¹⁶⁶Ho značené BBN/GRP analogy, které se ve studiích na zvířatech ukázaly velmi perspektivní. V dalších studiích byly použity analogy BBN[6-14] navázané na DTPA a DOTA značené ¹¹¹In.^[4,20,30]

4.3.9 DALŠÍ RECEPTOROVĚ SPECIFICKÉ PEPTIDY

Ve výzkumu jsou i další receptorově specifické peptidy. Receptory GLP (glukagon podobný peptid) byly nalezeny na povrchu insulinomů a v nízké hustotě i u gastrinomu. Receptory CRF (kortikotropin uvolňující faktor) byly identifikovány u hypofyzárního adenomu produkujícího adrenokortikotropní hormon a paragangliomu. Receptory neurokininu vyjádřeny u gliomu. Neuropeptid Y receptory nalezeny u rakoviny prsu, karcinomu ovaria a nádorů nadledvin.^[30]

4.4 RADIONUKLIDY UŽÍVANÉ PRO SCINTIGRAFII A TERAPII

BETA ZÁŘIČE

Při β^- přeměně dochází k emisi elektronu z jádra. Zářiče emitující β^- mají milimetrový dosah v tkáních, a proto se hodí k terapii. Mezi užívané izotopy patří: ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re .

Pro diagnostiku jsou perspektivní pozitronové zářiče. Emitovaný pozitron totiž při průchodu vnějším prostředím interaguje s elektronem, dochází k tzv. anihilaci, za zániku obou částic a vzniku dvou fotonů s opačnou dráhou. To nám umožňuje trojrozměrné zobrazení pozorované tkáně. Nejužívanějším je ^{18}F , dále pak ^{15}O , ^{11}C či ^{13}N .

GAMA ZÁŘIČE

Gama záření tvoří proud fotonů bez náboje a hmotnosti. Zbavuje jádra nadbytečné energie. Pro svou vysokou pronikavost a malou ionizaci se využívá pro diagnostiku. Nejvýznamnějším radionuklidem je $^{99\text{m}}\text{Tc}$, dále se používá ^{111}In , ^{123}I , ^{67}Ga .

ALFA ZÁŘIČE

Alfa částice jsou pozitivně nabitá jádra helia ^4_2He . Mají krátký dosah (50-80 μ) a vysokou energii (5-8 MeV). Tyto vlastnosti nám nabízí perspektivní využití v terapii mikrometastáz a velmi malých reziduí. Proto by alfa zářiče mohly být využity v terapii leukémie, lymfomů, gliomů či melanomů. Mezi alfa zářiče patří např. ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{211}At , ^{213}Bi . Tyto radionuklidy: ^{213}Bi , ^{211}At , a ^{225}Ac byly již v různých studiích zkoumány in vitro a in vivo. Tyto studie již prokázaly aktivitu, bezpečnost a vhodnost použití α částic v léčbě některých vybraných indikací. Prvním na člověku použitým alfa zářičem byl izotop ^{213}Bi .

4.4.1 RADIONUKLIDY UŽÍVANÉ K SCINTIGRAFII

^{99m}Tc

Technecium je nejužívanějším prvkem v nukleární medicíně. Důvodem jsou velmi dobré fyzikální vlastnosti. Je to čistý γ zářič o energii 140 keV, která je výhodná pro detekci scintilační kamerou. Jeho poločas je 6,02 hodiny, což je ideální doba pro mnoho aplikací. Je připravován v $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generátoru, takže je dostupný a cenově výhodný v dosti vysoké kvalitě.

Techneciem se dají sloučeniny značit třemi způsoby: přímé značení, postkonjugační značení komplexu peptisu a chelátu anebo značení chelátu.

^{111}In

Indium 111 se přeměňuje elektronovým záchytem s poločasem 67,4 hodin (2,8 dne) za emise záření gama s energií 173 keV (87 %) a 247 keV (94 %). Vedle záření gama dochází k emisi záření rentgenového, Augerových a konverzních elektronů. Vyrábí se v cyklotronu $\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$.

^{123}I

Jod 123 je přeměněn elektronovým záchytem s poločasem 67,2 hodin (2,8 dne) za emise gama záření o energii 159 keV (84%) a 27 keV (71%). Současně také dochází k emisi záření roentgenového. Připravuje se v cyklotronu $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$.

^{67}Ga

Gallium 67 se přeměňuje elektronovým záchytem na stabilní ^{67}Zn s poločasem 13 hodin za emise gama záření o energii 93 keV (38%), 185 keV (24%) a 300 keV (16%). Dochází také k emisi Augerových, konverzních elektronů a roentgenova záření. ^{67}Ga je připravováno v cyklotronu $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$.

^{18}F

Fluor 18 s poločasem 1,83 hodin patří mezi pozitronové zářiče. Emituje pozitrony o maximální energii 635 keV (97%). Připravuje se v cyklotronu $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

^{64}Cu

Měď 64 emituje pozitrony o energii 654 keV (19%), elektrony o energii 573 keV (40%) a γ záření o energii 1346 keV (41%) a poločas je 12,8 hodin.^[33,34,35,36,37]

4.4.2 RADIONUKLIDY UŽÍVANÉ PRO TERAPII

^{90}Y

Yttrium 90 je čistý β^- zářič s poločasem 64,1 hodin (2,7 dne). Dochází k emisi elektronů o energii 2280 keV.

^{131}I

Jod 131 je kombinovaný β a γ zářič s poločasem 193 hodin (8,04 dne). Emituje elektrony o energii 610 keV a γ záření o energii 364 keV.

^{177}Lu

Lutecium 177 je radiolanthanoid podobný svými vlastnostmi ^{131}I . Má ale vyšší chemickou stabilitu. Je to smíšený β a γ zářič emitující elektrony o energii 498 keV (79%), 176 keV (12%) a 385 keV (9%) a γ záření o energii 210 keV. Poločas rozpadu je 160,8 hodin (6,7 dne).

^{68}Ga

Gallium 68 je β^+ zářič s poločasem 1,14 hodin. Emituje β^+ záření o maximální energii 1895 keV (90%) a γ záření o energii 820 keV (10%). Připravuje se v $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru.

^{32}P

Fosfor 32 je čistý beta zářič o poločase 343,2 hodin (14,3 dne). Emituje elektrony o maximální energii 1700 keV.^[33,34,35,36,37]

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 RADIOAKTIVNÍ MATERIÁL

^{90}Y -DOTA-1-Nal³-oktreotid

K 10 μg peptidu v 0,4M acetátovém pufru a 0,24M gentisovou kyselinou bylo přidáno 10 μl roztoku radionuklidu v 0,04M kyselině chlorovodíkové. Roztok byl promíchán a po inkubaci při teplotě 90-95°C po dobu 25 minut byla provedena HPLC. Výsledná koncentrace peptidu v přípravku byla upravena na 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

^{111}In -DOTA-1-Nal³-oktreotid

K 10 μg peptidu v 0,4M acetátovém pufru s 0,24M gentisovou kyselinou bylo přidáno 10 μl roztoku radionuklidu v 0,04M kyselině chlorovodíkové. Roztok byl důkladně promíchán a inkubován 25 minut při teplotě 90-95°C. Výsledná koncentrace peptidu v přípravku byla upravena na 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.1.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

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

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

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

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

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

5.1.3 CHEMIKÁLIE

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

Isotonický fosfátový pufr pH 7,4 (1,82 g KH_2PO_4 a 19,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v 1000 ml roztoku)

Destilovaná voda

5.1.4 POMŮCKY

Dialyzační kotouč vlastní výroby

Injekční stříkačky 1 ml

Injekční jehly

Pipety

Laboratorní sklo

Měřicí lahvičky

Celofán

5.1.5 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Gama counter, Wallac, 1480 Wizard 3

Centrifuga U-32R, Biotech

Termostat TCH 100, Laboratorní přístroje Praha

Otočné zařízení pro rovnovážnou dialýzu vlastní výroby

5.2 METODIKA

5.2.1 PŘÍPRAVA PLAZMY

Odebranou krev jsme zcentrifugovali při 5 500 otáčkách po dobu 5 minut a plazmu odlili do nových zkumavek, tak abychom získali jen čirou tekutinu. Pokud plazma nebyla stále čirá, zcentrifugovali jsem ji ještě jednou případně ještě přefiltrovali. Plazma byla uchována v mrazícím boxu. Teprve těsně před pokusem jsme ji rozmrazili. K jednomu pokusu bylo potřeba alespoň 2,5 ml plazmy každého živočišného druhu.

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

5.2.2 STANOVENÍ VAZEBNOSTI PEPTIDU NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY POMOCÍ ROVNOVÁŽNÉ DIALÝZY

Nejprve jsme si připravili vzorky plazmy a pufru. Fosfátový izotonický pufr o pH 7,4 jsme připravili ze 2 dílů dihydrogenfosforečnanu draselného a osmi dílů dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu draselného. Potom jsme k 2,5 ml plazmy přidali 2,5 µl radioaktivně značeného peptidu. Koncentrace peptidu ve vzorku je tedy 1 ng v 1 ml. Skleněné zkumavky s plazmou a peptidem jsme potom protřepali, aby došlo k dokonalému promíchání.

Ke stanovení vazebnosti receptorově specifických peptidů na plazmatické proteiny jsme použili rovnovážnou dialýzu. Jako dialyzační aparát jsme použili plastové kotouče, které jsou k sobě těsně připevněny pomocí 8 šroubů. V každém kotouči je 8 mělkých otvorů o průměru asi 2 cm a ke každému z nich vede z obvodové strany kotouče úzký kanálek. Po sestavení dialyzačního aparátu se otvory obou kotoučů překrývají. Kotouče jsou od sebe odděleny pomocí semipermeabilní membrány, která je propustná pouze pro nízkomolekulární látky. Celé takto sestavené zařízení je pomocí středového otvoru upevněno na otočnou hřídel.

Pro mezidruhové stanovení vazebnosti receptorově specifických peptidů jsme pro každou živočišnou plazmu použili 4 dialyzační komůrky. Nejprve jsme pomocí 1 ml injekční stříkačky a jehly odebrali 0,5 ml radioaktivně značené plazmy, kterou jsme ihned opatrně vstříkli pomocí kanálku do předem označených komůrek. Při práci s jehlou jsme museli být opatrní, aby nedošlo k perforaci membrány. Kanálek jsme uzavřeli pomocí pryžového uzávěru. Potom jsme nabrali 0,5 ml fosfátového pufru a vstříkli ho do protilehlé komůrky. Kanálek jsme opět uzavřeli. Takto jsme postupovali vždy ve stejném pořadí do zaplnění celého kotouče. Ten jsme potom nasadili na otočnou hřídel a dali inkubovat na dobu 20 hodin při teplotě 37°C.

Po 20 hodinách jsme začali odebírat vzorky pro měření. Postupovali jsme ve stejném pořadí jako při plnění. Nejprve jsme odebrali vzorek plazmy a pak příslušný vzorek pufru. Vzorky jsme opatrně odebrali pomocí 1 ml injekční stříkačky s jehlou do zkumavky s víčkem.

Ze vzorků jsme pak pomocí pipety odměřili 100 μ l do plastové měřicí zkumavky se šroubovacím uzávěrem. Pak jsme všechny vzorky změřili na gama counteru. Do jedné měřicí lahvičky jsme ještě napipetovali 100 μ l destilované vody, abychom případně zjistili zamoření gama counteru.

5.2.3 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH HODNOT

Z gama counteru jsme zjistili aktivity jednotlivých vzorků. Pro stanovení volné frakce jsme použili vztah:

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

kde f_U je volná frakce peptidu.

Pak jsem vypočetli volnou frakci peptidu v procentech dle vzorce:

$$\%f_U = f_U * 100 ,$$

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

A z tohoto procentuálního vyjádření pak vázanou frakci podle vztahu:

$$\%f_B = 100 - \%f_U ,$$

kde $\%f_B$ je vázaná frakce vyjádřená v procentech.

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

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

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

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

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

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

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft®Excel 2002.

6 VÝSLEDKY

6.1 MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI

⁹⁰Y-DOTA-NOC NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

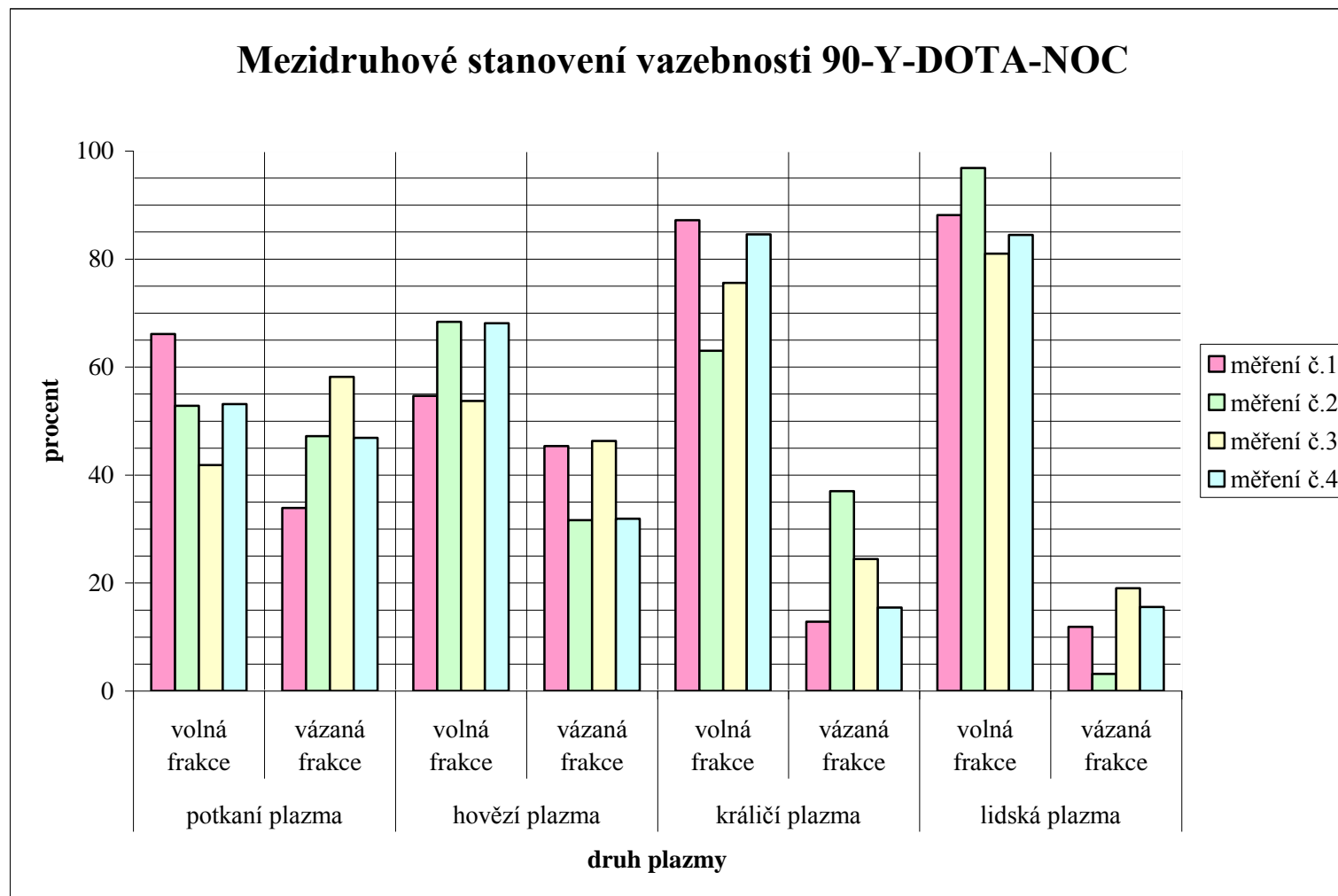
Mezidruhové srovnání vazebnosti je znázorněno v tabulce č.1, grafu č.1 a grafu č.2. Pro stanovení vazebnosti peptidu ⁹⁰Y-DOTA-NOC na plazmatické bílkoviny jsme použili jako metodu rovnovážnou dialýzu a vzorky jsme dialyzovali po dobu 20 hodin. Pro mezidruhové srovnání jsme použili plazmu potkaní, hovězí, králičí a lidskou.

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

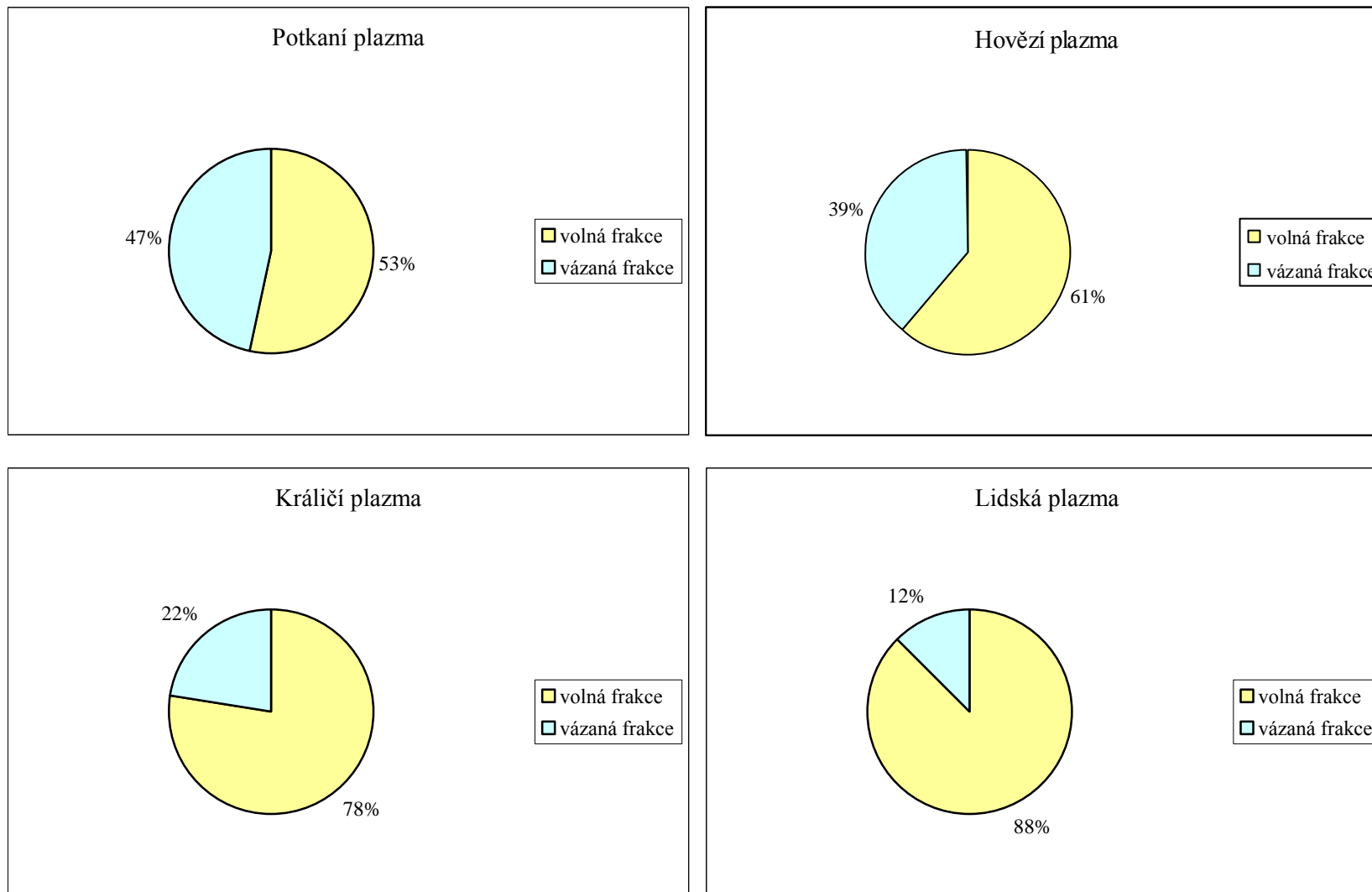
| druh plazmy | potkaní plazma | | hovězí plazma | | králičí plazma | | lidská plazma | |
|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce |
| měření č.1 | 66,08 | 33,92 | 54,63 | 45,37 | 87,17 | 12,83 | 88,14 | 11,86 |
| měření č.2 | 52,79 | 47,21 | 68,38 | 31,62 | 63,02 | 36,98 | 96,87 | 3,13 |
| měření č.3 | 41,85 | 58,15 | 53,73 | 46,27 | 75,58 | 24,42 | 81,00 | 19,00 |
| měření č.4 | 53,11 | 46,89 | 68,11 | 31,89 | 84,54 | 15,46 | 84,43 | 15,57 |
| průměr | 53,46 | 46,54 | 61,21 | 38,79 | 77,58 | 22,42 | 87,61 | 12,39 |
| směr.odchylka | 4,94 | 4,94 | 4,06 | 4,06 | 5,45 | 5,45 | 3,41 | 3,41 |
| t-test | 0,0019 | 0,0019 | 0,0027 | 0,0027 | 0,1790 | 0,1790 | - | - |

Tab. č.1: Mezdruhové srovnání vazebnosti ⁹⁰Y-DOTA-NOC

Mezidruhové stanovení vazebnosti ^{90}Y -DOTA-NOC



Graf č.1: Mezidruhové srovnání vazebnosti ^{90}Y -DOTA-NOC



Graf. č.2 Mezi druhové srovnání vazebnosti ^{90}Y -DOTA-NOC

6.2 MEZIDRUHOVÉ SROVNÁNÍ VAZEBNOSTI

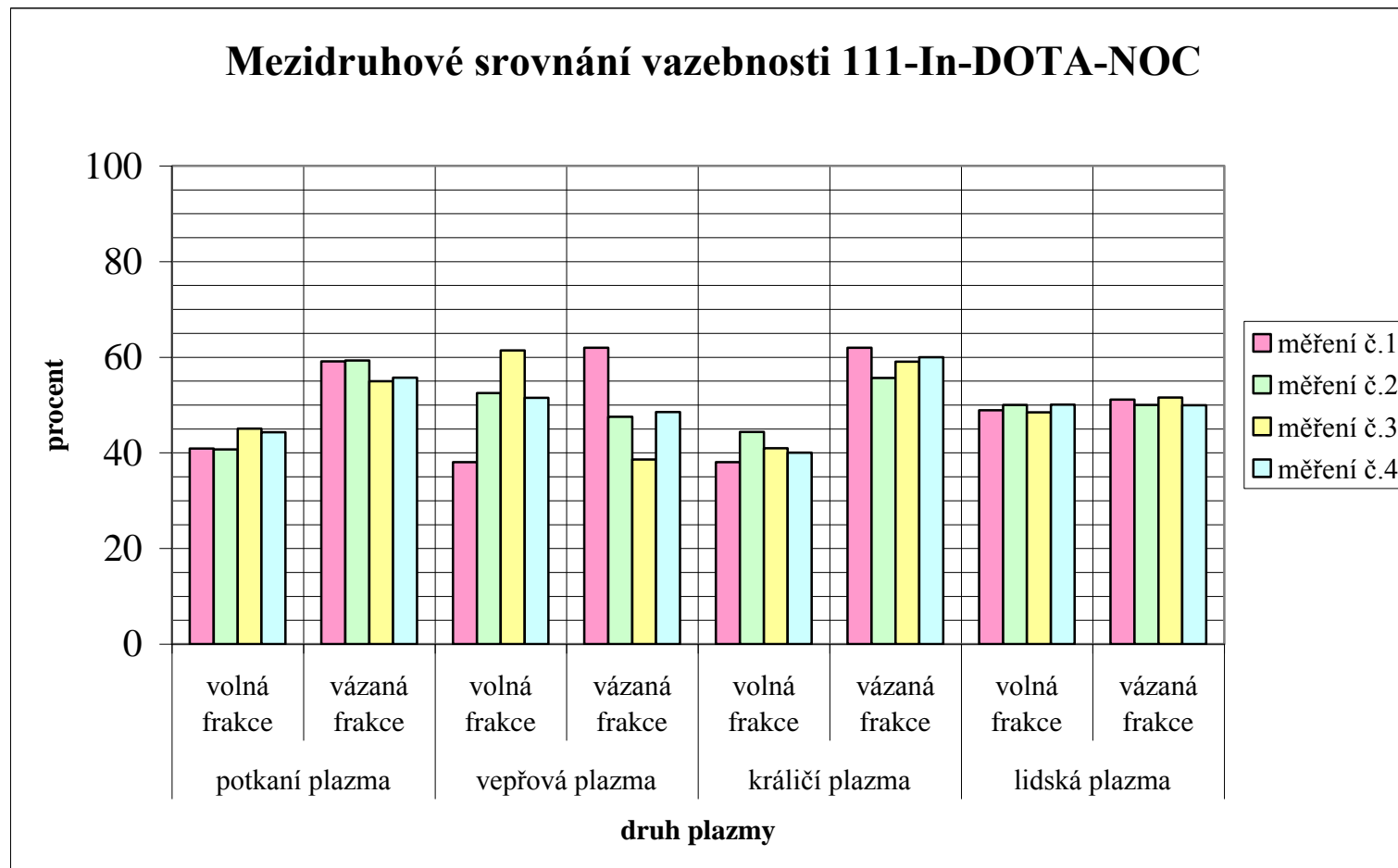
¹¹¹In-DOTA-NOC NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Mezidruhové srovnání vazebnosti je znázorněno v tabulce č. 2, grafu č.3 a 4. Pro stanovení vazebnosti peptidu ¹¹¹In-DOTA-NOC na plazmatické bílkoviny jsme použili jako metodu rovnovážnou dialýzu a vzorky jsme dialyzovali po dobu 20 hodin. Pro mezidruhové srovnání jsme použili plazmu potkaní, vepřovou, králičí a lidskou.

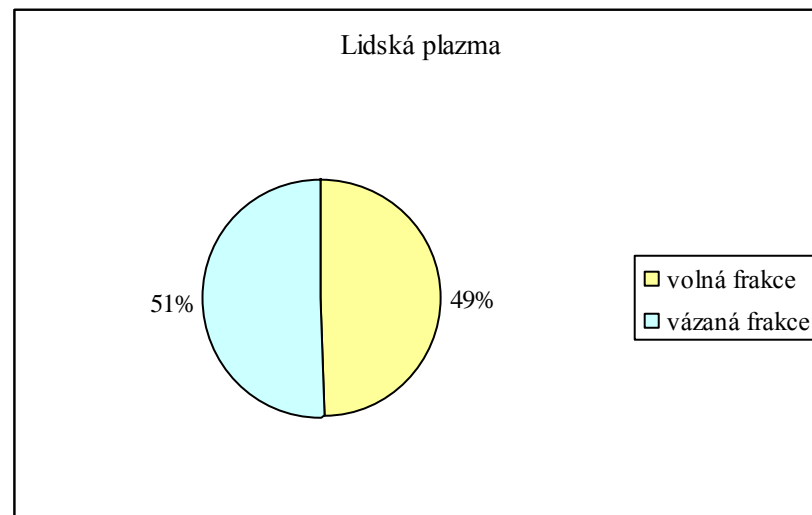
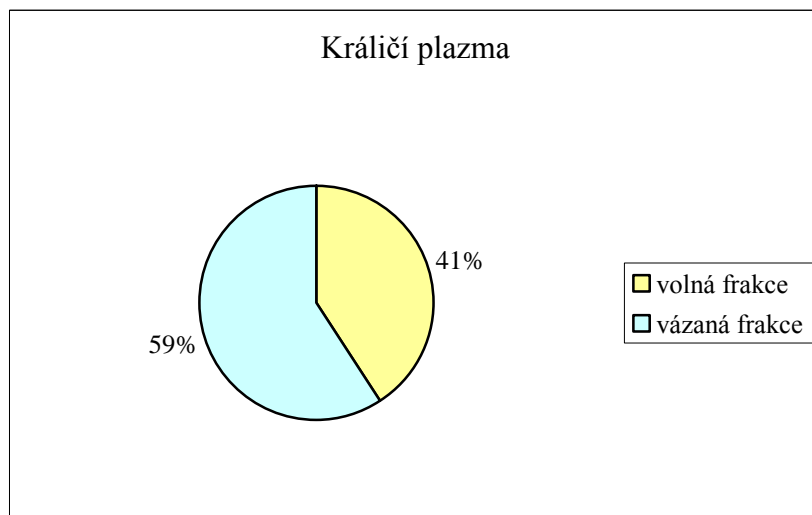
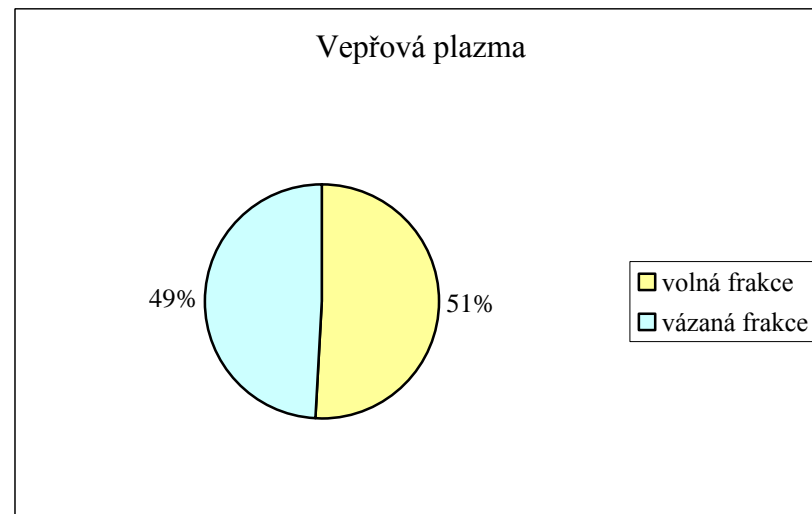
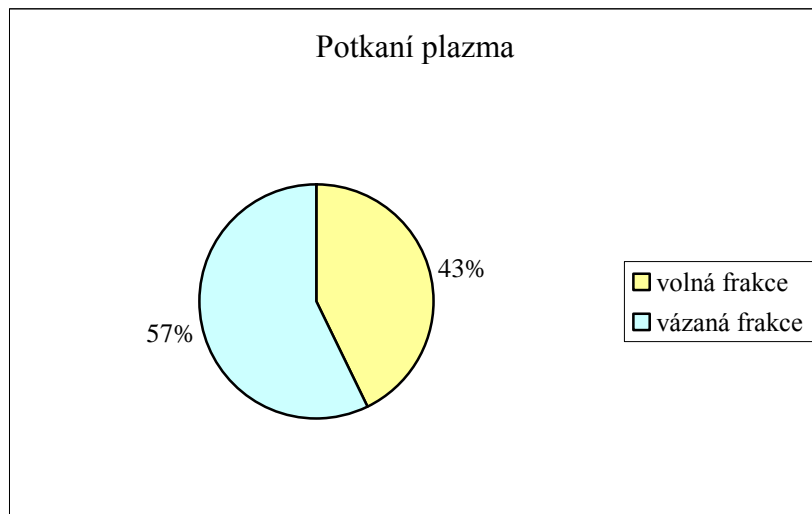
V tabulce č.2 jsou vyobrazeny výsledky jednotlivých měření jako procentuální vyjádření volné, respektive vázané frakce peptidu, průměr těchto hodnot a směrodatná odchylka. V grafu č.3 jsou graficky znázorněny hodnoty všech měření a v grafu č.4 pouze průměrné hodnoty u jednotlivých živočišných druhů.

| druh plazmy | potkaní plazma | | vepřová plazma | | králičí plazma | | lidská plazma | |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce | volná frakce | vázaná frakce |
| měření č.1 | 40,87 | 59,13 | 38,04 | 61,96 | 38,04 | 61,96 | 48,86 | 51,14 |
| měření č.2 | 40,72 | 59,28 | 52,46 | 47,54 | 44,38 | 55,62 | 50,02 | 49,98 |
| měření č.3 | 45,06 | 54,94 | 61,43 | 38,57 | 40,97 | 59,03 | 48,46 | 51,54 |
| měření č.4 | 44,32 | 55,68 | 51,49 | 48,51 | 40,02 | 59,98 | 50,05 | 49,95 |
| průměr | 42,74 | 57,26 | 50,86 | 49,15 | 40,85 | 59,15 | 49,35 | 50,65 |
| směr.odchylka | 1,13 | 1,13 | 4,82 | 4,82 | 1,32 | 1,32 | 0,41 | 0,41 |
| t-test | 0,0065 | 0,0065 | 0,7755 | 0,7755 | 0,0052 | 0,0052 | - | - |

Tab. č. 2 Stanovení vazebnosti ¹¹¹In-DOTA-NOC



Graf. č . 3 Mezidruhové stanovení vazebnosti ¹¹¹In-DOTA-NOC



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

7 DISKUZE

Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny je důležitým farmakokinetickým parametrem. Většina léčiv v organismu nebývá přítomna pouze ve volné formě, ale jsou v určitém rozsahu vázána. Avšak pouze volné léčivo, které je schopné přestoupit přes biologické bariéry dosahuje farmakologického účinku. Vázaná část léčiva pak představuje jakési depo v organismu. Míra vazby léčiva na plazmatické bílkoviny tak může mít dominantní vliv na absorpci, biotransformaci a exkreci.

Vazba léčiva je ovlivněna strukturou plazmatické bílkoviny i strukturou léčiva. U plazmatických bílkovin má hlavní vliv pořadí aminokyselin a prostorové uspořádání vazebného místa. U radioaktivně značeného receptorově specifického peptidu pak hlavně struktura peptidu, ale i použitý radionuklid a chelatační činidlo. Rozhoduje jak struktura molekuly tak i další fyzikálně-chemické vlastnosti jako je např. lipofilita léčiva.

Měření volné frakce léčiva je významné hlavně u léčiv s vysokou vazebností (nad 90%). U těchto léčiv může dojít vytěsněním z vazby s plazmatickými bílkovinami k prudkému vzrůstu farmakologického účinku a k toxickým účinkům.

Receptorově specifické peptidy jsou převážně eliminovány ledvinami mechanismem glomerulární filtrace. Rychlost vylučování těchto látek je dána součinem glomerulární filtrační rychlosti a frakcí volného léčiva v krvi. Ze vztahu vyplývá, že čím více se léčivo váže na plazmatické proteiny, tím je pomalejší jeho eliminace z organismu.

V diplomové práci jsme stanovovali vazebnost na plazmatické bílkoviny u receptorově specifického peptidu DOTA-NOC značeného dvěma radionuklidy, a to ^{90}Y a ^{111}In . Vazebnost jsme stanovovali metodou rovnovážné dialýzy při 37°C a inkubační dobou 20 hodin. Dále jsme provedli mezidruhové srovnání vazebnosti u čtyř živočišných druhů. U ^{90}Y -DOTA-NOC jsme použili plazmu lidskou, králičí, potkaní a hovězí. U ^{111}In -DOTA-NOC jsme použili plazmu lidskou, králičí, potkaní a vepřovou.

U ^{90}Y -DOTA-NOC jsme zjistili statisticky významné rozdíly u plazmy hovězí a potkaní ve srovnání s plazmou lidskou. Výsledky ukázaly, že vazebnost roste v pořadí: ^{90}Y -DOTA-NOC roste v pořadí: lidská < králičí < hovězí < potkaní plazma.

U ^{111}In -DOTA-NOC jsme zjistili, že se vazebnost statisticky nelišila u žádné živočišné plazmy vzhledem k plazmě lidské. Výsledky ukázaly, že vazebnost ^{111}In -DOTA-NOC roste v pořadí: vepřová < lidská < potkaní < králičí plazma.

Při porovnání vazebností ^{90}Y -DOTA-NOC s ^{111}In -DOTA-NOC na plazmatické bílkoviny lze konstatovat, že vazebnost ^{90}Y -DOTA-NOC je u všech srovnatelných živočišných druhů (potkan, králik, člověk) nižší než vazebnost ^{111}In -DOTA-NOC. Tento závěr je poněkud překvapivý, avšak ukazuje, že i zvolený radionuklid může významně ovlivnit vazebnost receptorově specifického peptidu DOTA-NOC na bílkoviny plazmy.

8 ZÁVĚR

1. Byla studována vazebnost receptorově specifického peptidu DOTA-NOC značeného ^{90}Y a ^{111}In na bílkoviny plazmy z hlediska mezidruhového srovnání. Ke stanovení vazebnosti byla použita metoda rovnovážné dialýzy při 37°C .
2. Výsledky ukázaly, že plazmatická vazebnost ^{90}Y -DOTA-NOC roste v pořadí: lidská < králičí < hovězí < potkaní plazma. Statisticky významné rozdíly jsme našli u plazmy potkaní a hovězí vzhledem k plazmě lidské.
3. Výsledky ukázaly, že plazmatická vazebnost ^{111}In -DOTA-NOC roste v pořadí: vepřová < lidská < potkaní < králičí plazma. Mezi jednotlivými plazmami jsme nenalezli statisticky významné rozdíly ve vazebnosti.
4. Vazebnost DOTA-NOC na bílkoviny plazmy u potkana, králíka a člověka byla vyšší pro ^{111}In -DOTA-NOC při porovnání s ^{90}Y -DOTA-NOC.
5. Vzhledem k tomu, že studované peptidy jsou z organismu vylučovány převážně mechanismem glomerulární filtrace v ledvinách, bude rozsah plazmatické vazebnosti ovlivňovat rychlost jejich vylučování z organismu.

9 LITERATURA

- 1) Dostálek M. a kol.: Farmakokinetika, Grada Publishing, Praha, 2006
- 2) Lullmann H. a kol.: Barevný atlas farmakologie, Grada Publishing, Praha, 2001
- 3) Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. a kol.: Harperova biochemie, Nakladatelství H+H, Jinončany, 2002
- 4) Trojan S. a kol.: Lékařská fyziologie, Grada Publishing, Praha, 2003
- 5) Kragh-Hansen U.: Molecular aspects of ligand binding to serum albumin, *Pharm. Reviews*, 33(1):17-53, 1981
- 6) Alberts B. a kol.: Základy buněčné biologie; Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998
- 7) Otagiri M.: A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20(5):309-323, 2005
- 8) Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M.: Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin; *Biol Pharm Bull.*, 25(6):695-704, 2002
- 9) Duchoň J.: Lékařská chemie a biochemie; Avicenum, Praha, 1991
- 10) Kishor M.W., Ramaswamy M, Kwong M. a kol: Role of plasma lipoproteins in modifying the toxic effects of water-insoluble drugs: studies with cyclosporine A, *AAPS PharmSci.*, 4(4):E30, 2002
- 11) Fournier T., Ramaswamy M, Kwong M.: Alpha-1-acid glycoprotein, *Biochim Biophys Acta.*, 1482(1-2):157-71, 2000
- 12) Dente L., Pizza M.G., Metspalu A. a kol.: Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein, *EMBO J.*, 6(8):2289-96, 1987
- 13) Nilsson J.G.: Chemical aspects of drug interaction; Pharma International,
- 14) Wright J.D. Boudinot F.D., Ujhelyi M.R.: Measurement and analysis of unbound drug concentrations; *Clin Pharmacokinet.*, 30(6):445-62., 1996
- 15) Vallner E.J.: Binding of drugs by albumin and plasma protein, *J Pharm Sci.*, 66(4):447-65, 1977
- 16) Pacifici G.M., Viani A.: Methods of determining plasma and tissue binding of drugs; *Clin Pharmacokinet.*, 23(6):449-68 1992
- 17) Yanjun L., Peris J., Zhong L. a kol.: Microdialysis as a tool in local pharmacodynamics, *AAPS Journal.*, 8(2): E222-E235, 2006
- 18) Posser V. a kol.: Experimentální metody biofyziky; Academia, Praha, 1989
- 19) Signore A., Annovazzi A, Chianelli M. a kol.: Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy, *Eur J Nucl Med.* ,28(10):1555-65, 2001

- 20) Panigone S., Nunn A.D.: Lutetium-177-labeled gastrin releasing peptide receptor binding analogs: a novel approach to radionuclide therapy, *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 50(4):310-21, 2006
- 21) Reubi J.C.: Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future, *J Nucl Med.*, 46 Suppl 1:67S-75S, 2005
- 22) Breeman W.A., de Jong M, Kwekkeboom D.J. a kol.: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives, *Eur J Nucl Med*, 28(9):1421-9, 2001
- 23) M. Hejna, Schmidinger M., Raderer M.: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?, *Annals of Oncology* 13: 653–668, 2002
- 24) Cai R.Z., Szoke B., Lu R. a kol.: Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83(6):1896-900, 1986
- 25) Bohuslavizki K.H.: Somatostatin receptor imaging: current status and future perspectives, *J Nucl Med.*, 42(7):1057-8, 2001
- 26) Reubi J.C.: Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy, *endocrine reviews*, 24(4):389–427, 2003
- 27) Pelosi G., Volante M., Papotti M. a kol.: Peptide receptors in neuroendocrine tumours of the lung as potencial tools for radionuclids diagnosis and therapy, *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 50(4):272-87, 2006
- 28) Wild D., Schmitt J.S., Ginj M. a kol.: DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals, *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 30(10):1338-47, 2003
- 29) De Jong M., Kwekkeboom D., Valkema R. a kol.: Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions; *Eur J Nucl Med*, 30(3):463–469, 2003
- 30) Heppeler A., Froidevaux S., Eberle A.N. a kol.: Receptor targeting for tumour localisation and therapy with radiopeptides, *Curr Med Chem.*,7(9):971-94, 2000
- 31) Britz-Cunningham S.H., Adelstein S.J.: Molecular targeting with radionuclides: state of the science; *J Nucl Med*, 44(12):1945–1961, 2003
- 32) Aloj L., Caracò C., Panico M. a kol.: In vitro and in vivo evaluation of ¹¹¹In-DTPAGlu-G-CCK8 for Cholecystokinin-B receptor imaging, *J Nucl Med.*, 45(3):485-94, 2004
- 33) Lázníček M., Komárek P.: *Základy radiofarmacie*, Karolinum, Praha, 1998

- 34) Komárek P., Rabišková M. a kol.: Technologie léků, Galén, Praha, 2006
- 35) Sgouros G., Ballangrud A.M., Jurcic J.G. a kol.: Pharmacokinetics and dosimetry of an a-particle emitter labeled antibody: ^{213}Bi -HuM195(Anti-CD33) in patients with leukemia, J Nucl Med., 40(11):1935-46, 1999
- 36) Cremonesi M. Ferrari M., Bodei L. a kol.: Dosimetry in peptide radionuclide receptor therapy: a review, J Nucl Med., 47(9):1467-75, 2006
- 37) Lewington V.J.: Bone-seeking radionuclides for therapy, J Nucl Med. 46 Suppl 1:38S-47S, 2005

10 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|----------------|---|
| AGP | kyselý alfa-1-glykoprotein |
| AMK | aminokyselina |
| CCK-A | cholecystokinin A |
| CCK-B | cholecystokinin B |
| CD | cirkulární dichroismus |
| C _B | koncentrace vázaného léčiva |
| C _T | celková koncentrace léčiva |
| C _U | koncentrace volného léčiva |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazocykloodekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina |
| DTPA | diethylenetriaminpentaoctová kyselina |
| GF | gelová filtrace |
| HDL | high-density lipoproteins |
| IDL | intermediate-density lipoproteins |
| K _a | asociační konstanta |
| LDL | low-density lipoproteins |
| MA | mikrosféry albuminu |
| MD | mikrodialýza |
| MSH | melanocyty stimulující hormon |
| MTC | karcinom štítné žlázy |
| NOC | [DOTA-1-Nal ³]-oktreotid |
| RD | rovnovážná dialýza |
| sstr | somatostatinové receptory |
| UF | ultrafiltrace |
| VIP | vazoaktivní intestinální peptid |
| VLDL | very low-density lipoproteins |

