

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

STUDIUM RADIOAKTIVNÍHO ZNAČENÍ HYALURONOVÉ
KYSELINY
OXIDATIVNÍ JODACÍ

Školitel diplomové práce: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.

Hradec Králové 2009

Eliška Dvořáčková

Děkuji Ing. Dagmar Čožíkové, PGS studentce katedry biofyziky a fyzikální chemie za pomoc při provádění experimentů, zejména HPLC analýzách a Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za vedení a pomoc při sestavování této diplomové práce. Současně děkuji za poskytnutou modifikovanou hyaluronovou kyselinu pracovníkům firmy Contipro, s.r.o.

1. Obsah

1. Obsah.....	3
2. Úvod a cíl práce.....	5
3. Teoretická část.....	6
3.1. Charakteristika kyseliny hyaluronové	7
3.1.1. Chemická charakteristika	7
3.1.2. Biologické funkce hyaluronové kyseliny	8
3.2. Použití kyseliny hyaluronové	9
3.2.1. Užití hyaluronátu sodného při artróze	10
3.2.2. Užití kyseliny hyaluronové v kosmetice a kosmetické chirurgii	12
3.2.3. Hyaluronan v oftalmologii	15
3.2.4. Role hyaluronové kyseliny při zánětlivé reakci	15
3.3. Farmakokinetika a farmakodynamika kyseliny hyaluronové	16
3.4. Teorie jodace.....	17
3.4.1. Radionuklidy jódu	17
3.4.2. Metody přípravy radioaktivních sloučenin	18
4. Experimentální část.....	23
4.1. Přístroje.....	24
4.2. Chemikálie.....	24
4.3. Metodika.....	25
4.3.1. Radioaktivní značení HA – Tm - 1 oxidativní jodací	25
4.4. Výsledky.....	28
4.4.1. Stanovení aktivity komplexu $^{125}\text{I} - \text{Tm} - \text{HA}$	28
4.4.2. Čistota komplexu $^{125}\text{I} - \text{Tm} - \text{HA}$	29
4.4.3. Stabilita komplexu $^{125}\text{I} - \text{Tm} - \text{HA}$	29
5. Diskuse.....	39
6. Závěr.....	42
7. Souhrn.....	44
8. Abstract.....	46
9. Zkratky	48
10. Použitá literatura.....	49

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

2. Úvod a cíl práce

Hyaluronová kyselina je přírodní, tělu vlastní substance, hlavní součást synoviální tekutiny, obsažená v pojivové, epiteliální a nervové tkáni. Ve velkém množství se nachází v očním sklivci a kůži. Důležitou vlastností kyseliny hyaluronové je její vysoká afinita k vodě, proto má dokonalé hydratační účinky.

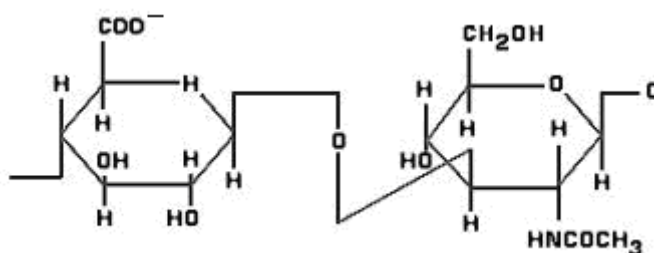
Cíl práce:

- Cílem této práce je prostudovat literaturu týkající se metod jodace.
- Připravit radioaktivně značenou hyaluronovou kyselinu modifikovanou tyraminem oxidativní jodací.
- Provéřit čistotu takto radioaktivně značené hyaluronové kyseliny.
- Provéřit kinetickou stabilitu značeného produktu in vitro, za účelem následného využití této látky při sledování HA in vivo, tj. biodistribuční studie.

3. Teoretická část

3.1. Charakteristika kyseliny hyaluronové (1)

Kyselina hyaluronová (HA , syn. Hyaluronan, Hyaluronát) je přirozeně se vyskytující nesulfonovaný glykosaminoglykan, lineární, nevětvený polysacharid, složený z opakujících se disacharidových jednotek (kyseliny D – glukuronové a N - acetyl – glukosaminu). Navzdory jednoduché primární struktuře, vykazuje rozdílné biologické účinky v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání. Tělo člověka obsahuje asi 15 g hyaluronové kyseliny. Kyselina hyaluronová tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty. Je součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Ve velkém množství se nachází v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži a v místech její degradace v játrech a slinivce. Narozdíl od ostatních glykosaminoglykanů neexistuje žádný důkaz o její vazbě na bílkoviny. Některé bakterie - grampozitivní dokáží tvořit hyaluronan, který má pro ně ochranný význam, neboť vytváří kapsulu okolo celé bakterie.

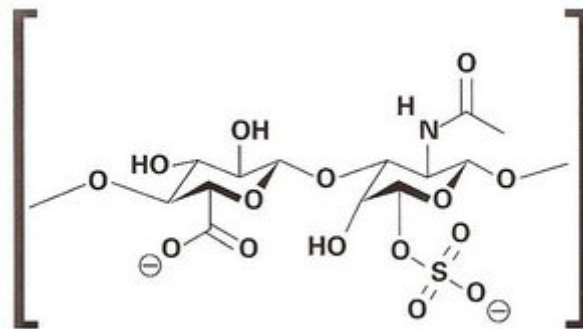


Obr. 1: Struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové

3.1.1. Chemická charakteristika (2,3)

Kyselina hyaluronová je relativně jednoduchý glykosaminoglykan. Je tvořena jedním dlouhým řetězcem z více než 25 000 opakujících se disacharidových jednotek, beta (1 - 4) acetylglukosamin se střídá s beta (1 - 3) glukuronátem, z nichž každá nese záporný náboj. Podobně jako u jiných glykosaminoglykanů je jedním ze sacharidových monomerů každého disacharidu aminocukr. Mnoho glykosaminoglykanů kromě kyseliny hyaluronové, obsahuje další záporně nabitě postranní skupiny, převážně sulfáty. S výjimkou kyseliny hyaluronové se

tyto lineární řetězce kovalentně vážou na proteinové jádro, dávající vznik molekule proteoglykanu. Bylo zjištěno, že v chrupavce se proteoglykanové molekuly vážou s řetězci kyseliny hyaluronové, vytvářejí větší struktury – proteoglykanové agregáty. Vzhledem k tomu, že se na sacharidových částech většiny proteoglykanů nacházejí hojně hydroxylové, karboxylové, případně sulfátové skupiny, jsou tyto struktury vysoce hydrofilní a chovají se jako polyanionty. Sacharidová část v proteoglykanech převažuje, tvoří 80 – 90 % hmotnosti této molekuly. Vzhledem ke zmíněným vlastnostem se proteoglykany mohou prostřednictvím elektrostatického náboje vázat s velkým množstvím kationtů (obvykle sodíkových), jsou to vysoce hydrátové struktury s molekulami obklopenými silnou hydratační vrstvou vody. V plně hydrátovém stavu vyplňují tyto molekuly podstatně větší objem než ve stavu anhydričném. Průměrná délka disacharidového řetězce je přibližně 1 nm, šířka přibližně odpovídá průměru lidského erytrocytu. Její průměrná molekulová hmotnost je kolem 4×10^6 Da.



Obr. 2 : Proteoglykan se sulfátovou skupinou

3.1.2. Biologické funkce hyaluronové kyseliny (1, 5)

Kyselina hyaluronová váže na sebe vodu, které pojme přibližně tisícinásobek své hmotnosti. Dále má schopnost vyměňovat ionty - jednomocné proti dvojmocným kationtům - prostřednictvím negativního náboje proteoglykanu. Brání prostupu virů a bakterií přes pericelulární matrix k buňce. Moduluje zánět indukci cytokinů a chemokinů, zháší volné radikály, ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk. Brání ukládání kolagenu a tím podporuje bezjizevnaté hojení tkáně. Bylo popsáno, že vyšší hladiny kyseliny hyaluronové v ráně fetální tkáně jsou zodpovědné za bezjizevnaté hojení. Popsaný je rovněž analgetický účinek.

V synoviální tekutině slouží kyselina hyaluronová díky svým viskoelastickým vlastnostem jako lubrikans a tlumič nárazů, dále stimuluje endogenní syntézu kyseliny hyaluronové buňkami synoviální membrány, zlepšuje metabolismus chondrocytů a inhibuje degradaci kloubní chrupavky. Vyskytuje se v mezibuněčném prostředí, ve kterém mezi sebou buňky komunikují. Zajišťuje správné fungování komunikačního a řídicího systému buněk. Reaguje s buněčnými povrchovými receptory, v neposlední řadě má schopnost vazby některých toxických těžkých kovů, jako je olovo a kadmium, z prostředí .

3.2. Použití kyseliny hyaluronové (1, 4, 6, 7)

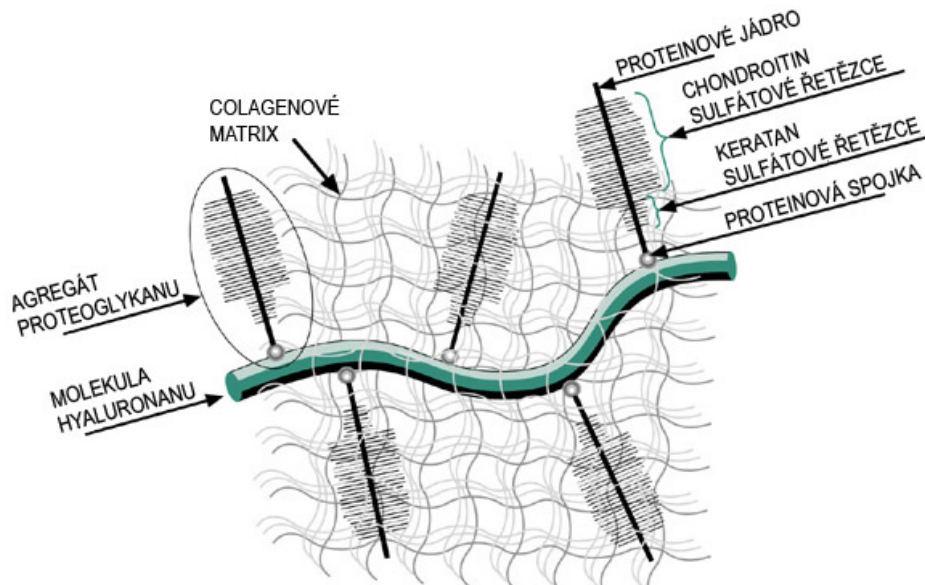
Díky svým unikátním vlastnostem našla kyselina hyaluronová řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích (revmatologii, oftalmologii, kosmetické chirurgii a diabetologii). Již v 60. letech 20 století se využívala kyselina hyaluronová k lokální léčbě popálenin a kožních vředů. Od roku 1979 je na trhu kyselina hyaluronová určená pro použití v oční chirurgii. Chrání jemné oční tkáně, především endotel rohovky, před poškozením během chirurgického výkonu, využívá se i jako náhrada sklivce při operaci šedého zákalu nebo implantaci čočky. Druhé nejširší využití kyseliny hyaluronové představuje intraartikulární aplikace (tzn. viskosuplementace) u pacientů s osteoartrózou. Novou možností je periartikulární aplikace kyseliny hyaluronové při podvrknutí kotníku. Významné je i využití kyseliny hyaluronové k augmentaci v plastické chirurgii (výplň vrásek, vtažených jizev, zvětšení prsou). Současná léčba chronických zánětlivých onemocnění se snaží nespecificky potlačit aktivaci buněk imunitního systému, kde se interakce receptoru CD44 s kyselinou hyaluronovou ukazuje jako nová možnost léčby. Mimo zmíněné fyziologické funkce je hyaluronová kyselina přítomna také u patologických dějů, jejichž průběh lze odhalit na základě změn její koncentrace v krvi nebo na základě přítomnosti jejích fragmentů a degradačních produktů.

Mezi tyto patologické děje patří především revmatoidní artritida, fibróza nebo jiná onemocnění jater a některé další zánětlivé procesy v lidském organismu. Dále má kyselina hyaluronová schopnost adherovat k buněčným liniím lidského myelomu, proto jsou sérové hladiny kyseliny hyaluronové často zvýšené u pacientů s metastázemi. V neposlední řadě nachází uplatnění ve farmaceutické technologii jako transportér účinných látek s řízeným uvolňováním.

Reakcí aktivovaných karboxylových skupin této lineární, biogenní sloučeniny s polyaminem, zejména rovným alkyldiaminem, je možno získat nové zesítené struktury. Zesítené hyaluronové kyseliny mohou být volitelně sulfatovány nebo hemisukcinylovány a jsou vhodné jako náhrada synoviální tekutiny, očního sklivce, jako matrix nových lékových forem s řízeným uvolňováním, jako hojivá a protipřílnavá činidla a pro výrobu cévních protéz, biohybridních orgánů, hojivých přípravků, oftalmologických a otologických prostředků, protéz, implantátů a dalších léčebných pomůcek.

3.2.1. Užití hyaluronátu sodného při artróze (3, 4, 8)

Dotyk mezi jednotlivými kostmi zajišťují vazivová ligamenta a kloubní pouzdro, které těsně uzavírá kloubní dutinu, obsahující bezbarvou synoviální tekutinu. Synoviální tekutina je dialyzát krevní plazmy s vysokou koncentrací hyaluronové kyseliny, která je vylučována B - buňkami synoviální vrstvy. Tato tekutina usnadňuje hladké klouzavé pohyby kloubních ploch, tvořených hyalinní chrupavkou. Dalším úkolem synoviální tekutiny je přivádět živiny a kyslík k bezcévné kloubní chrupavce. Chrupavky jsou tvořeny z proteoglykanů - z chondroitin - sulfátu, keratan - sulfátu, které jsou kovalentně vázány k osovým proteinům. Tyto proteoglykany jsou nekovalentně propojeny s dlouhými molekulami kyseliny hyaluronové a vytváří proteoglykanové agregáty, které interagují s kolagenem. Vysoký obsah hydratační vody vázaný na záporné náboje glykosaminoglykanů účinkuje jako tlumič nárazů či biomechanická pružina. Mechanickými podněty se voda vytlačuje ze základní hmoty kloubní chrupavky do synovie. Když je voda vypuzena, nastupuje další mechanismus, který chrupavce umožní zachovat její pružnost. Je to vzájemné odpuzování elektrostatických nábojů negativně nabitých karboxylových a sulfátových skupin glykosaminoglykanů. Náboje jsou též odpovědné za odkládání glykosaminoglykanových ramen, čímž se vytvářejí prostory pro vodu. Jakmile tlak povolí, voda se do těchto štěrbin mezi glykosaminoglykany opět vrací. K přesunům vody tak dochází v souvislosti s normální funkcí kloubu. Přesuny vody jsou nezbytné pro výživu chrupavkové tkáně a usnadňují výměnu kyslíku a oxidu uhličitého i ostatních molekul mezi synoviální tekutinou a chrupavkou kloubu.



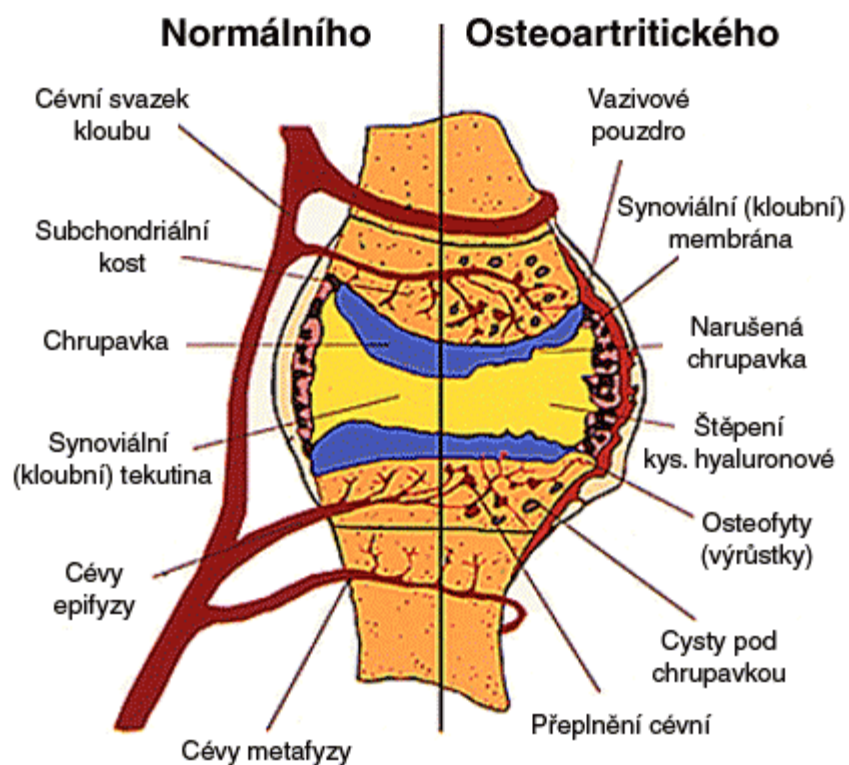
Obr. 3: Schematický nákres stavby chrupavky

Artróza nebo-li osteoartróza je nezánnětlivé onemocnění, při kterém dochází k postupnému odbourávání kloubní chrupavky, tvořící styčné plochy mezi kostmi kloubu. Příčina vzniku je ve většině případů nejasná. Velký vliv na její rozvoj má jednostranné přetěžování kloubů. Méně často se rozvíjí vinou jiného kloubního onemocnění, vrozené vady nebo následkem úrazu. Značný význam mají genetické dispozice. Nepříznivou roli sehrává při rozvoji onemocnění nadváha. Úbytek kloubní chrupavky je spjat s nárůstem obtíží ve smyslu bolesti a postupného omezení hybnosti. V pokročilých stádiích dochází k deformacím a osovým změnám končetiny.

Při artróze dochází složitými biochemickými procesy ke ztrátě vazebné schopnosti mezi kyselinou hyaluronou a bílkovinnou složkou, současně klesá schopnost hydratace. Chrupavka se stává méně pružnou a tím při zátěži méně odolnou. Současně dochází ke změně metabolismu chondrocytů, k útlumu produkce součástí mezibuněčné hmoty. Při delším trvání tohoto procesu může dojít až k obnažení kostí, ke vzniku cyst, deformací a osovým změnám kloubů.

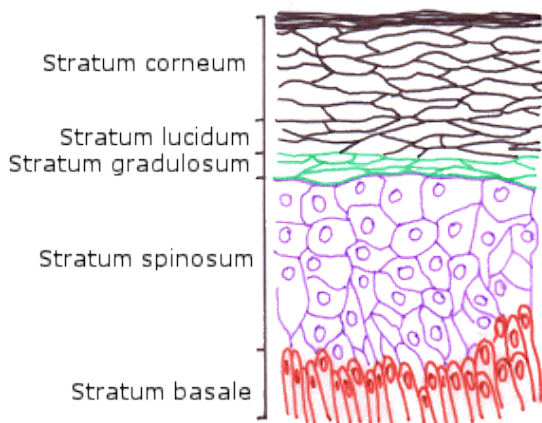
Možnosti, jak zmírnit proces odbourávání kloubní chrupavky a tím zastavit nebo zpomalit rozvoj artrózy, je užívání léčiv nebo doplňků stravy s obsahem kyseliny hyaluronové a chondroitin - sulfátu ve formě tablet. Mnohem účinnější než podání tablet je aplikace intraartikulární injekce, kdy nedochází k metabolismu hyaluronové kyseliny játry, jako u perorálního podání. Významným aspektem při posuzování bezpečnosti této léčby je původ

kyseliny hyaluronové a způsob její sterilizace. Původem je vyvinutá apatogenním streptokokem, je tedy neživočišného původu a nehrozí zde riziko přenosu BSE a jiných zvířecích chorob přenosných na člověka. Jeho bezpečnost ještě zvyšuje sterilizace prováděná v parním autoklávu. Aplikace této léčivé injekce zlepšuje v poškozeném kloubu kvalitu klouzavé schopnosti. Dále zde podporuje endogenní syntézu nové kyseliny hyaluronové buňkami synoviální membrány a zlepšuje metabolismus chondrocytů a zabraňuje degradaci kloubní chrupavky. Zlepšená výživa kloubu vede ke zmírnění bolesti a opět stoupne kloubní pohyblivost.



Obr. 4: Schéma kloubu

3.2.2. Užití kyseliny hyaluronové v kosmetice a kosmetické chirurgii (1, 4, 9, 10)



Obr. 5: Schéma vrstev kůže

Kyselina hyaluronová je základní složkou pojivových tkání člověka. V dnešní době je látkou, na kterou se nejvíce soustředí pozornost výzkumu procesu stárnutí. Jejím úkolem je hydratovat a zjemňovat pokožku, udržovat tvar tkání a posilovat napětí. Hydratace, napětí, pružnost a všechny ostatní vlastnosti pokožky jsou určujícím způsobem ovlivňovány funkcí této kyseliny, která antioxidačním působením chrání proti volným radikálům, podporuje novotvorbu kolagenu a jiné důležité biologické pochody. Výzkumy prokázaly, že postupem času obsah kyseliny hyaluronové významným způsobem klesá a že tento pokles vede ke vzniku vrásek a dalším projevům stárnutí pokožky. Bio - revitalizace umožňuje předcházet a léčit fyziologický pokles koncentrace kyseliny hyaluronové v kůži a přispívat k znovuoobnovení funkcí a návratu hydratace, elasticity a napětí do původního stavu. Receptory pro kyselinu hyaluronovou se nacházejí v kůži, proto se nabízí její vnější použití. Vmasírování do pokožky v okolí bolestivých kloubů a namožených šlach, k omlazování pokožky obličeje, krku a dekoltu. Látka urychluje tkáňovou regeneraci a hojivý proces.

Pro využití v estetické medicíně se kyselina hyaluronová používá v podobě gelu v injekcích. Preparáty se liší podle velikosti částic gelu. To znamená, že se pro korekci hrubších vrásek a hrubších defektů aplikují preparáty s většími částicemi. Lékař tenkou stříkačkou aplikuje kyselinu hyaluronou přímo pod vrásku, čímž se vyplní defekt v podkoží a vráska se změlčí anebo vyhladí. Podstříknutí začínajících, jemných vrásek zpomaluje proces jejich tvorby a oddaluje jiné invazivní procedury omlazení pleti. Kyselina hyaluronová aplikovaná do kůže zvyšuje schopnost kůže vázat vodu, posiluje pružnost a podporuje tvorbu nových kolagenových a elastických vláken. Ošetřené části kůže jsou měkké, poddajné a mají přirozený vzhled.

Mohou se objevit i nežádoucí účinky na tuto aplikaci. V místě vpichu injekce se ihned po aplikaci kyseliny hyaluronové může objevit zvýšená citlivost a svědění a také zarudnutí a otok. Tato reakce se vyskytuje obvykle u jedinců s dráždivou, citlivou kůží a za několik dnů spontánně mizí. Zblednutí ošetřené kůže je způsobeno příliš povrchní aplikací nebo nadměrnou korekcí, hlavně v místech tenkého podkoží. Tento efekt také pomalu spontánně mizí. Nežádoucí reakce je rozpad kůže v případě aplikace gelu do kožní cévky. Pomalu se hojí jizvou.

Ošetřená oblast by se neměla vystavovat silnému teplu (v soláriu nebo v sauně) nebo chladu, dokud počáteční zarudnutí a otok nezmizí. Po dobu šesti hodin by se pacientka neměla dotýkat ošetřené části. Potom je možno omýt se vodou a jemným mýdlem. Používání make - upu se doporučuje také nejdříve za šest hodin po ošetření.

Zvětšení rtů se stává v dnešní době stále více vyhledávaným zákrokem plastických chirurgů. Místo aplikace injekce je však bolestivé, otéká a tento zákrok je poměrně nákladný. Alternativou k injekcím je použití peptidu a kyseliny hyaluronové v lipozomové formě. Jsou hlavními látkami např. v přípravku Lipoceutical, který je ve formě emulze a aplikuje se rozetřením na rty. Tento přípravek stimuluje syntézu kolagenu a glykosaminoglykanu a díky tomu se objem rtů zvětší, podobně jako po aplikaci injekčních výplní na zvětšení rtů. Kromě zvětšení rtů dodávají rtům potřebnou hydrataci a regeneraci. Konkrétně peptid – palmitoyl oligopeptid sehrává důležitou roli při udržování pevnosti a pružnosti pokožky. Kyselina hyaluronová ve formě hyaluronátu sodného sehrává hlavní úlohu v zadržování vlhkosti a zachování integrity struktury pokožky. Zjemňuje pokožku vystavenou slunečnímu záření, vrací jí pružnost a působí jako velmi účinná a regenerační složka v procesu stárnutí. Obě tyto složky jsou součástí plurilamelárního multivezikulárního lipozomu, který má schopnost uvolnit svůj obsah do epidermy.

Další uplatnění kyseliny hyaluronové je při léčbě strií. Strie někdy také nazývané pajizévky jsou trhlinky v kůži, různého zbarvení a velikosti, které vznikají při nadměrném napínání pokožky a škáry důsledkem rychlých změn objemu příslušné části těla. Obvykle jsou způsobeny rychlým ztloustnutím např. v těhotenství, kdy je v důsledku většího růstu dělohy a přibývání podkožního tuku kůže napínána tak, že její schopnost elasticity je překročena. Vyskytují se nejčastěji na břiše, prsou, stehnech a bedrech. Mohou také vzniknout vlivem nadměrné hladiny hormonů např. jako vedlejší účinek léčby steroidy či při Cushingově chorobě, kdy tělo nadměrně produkuje hormony kůry nadledvin. Strie bývají růžové nebo barvy kůže, mohou být ale zbarveny i červeně a časem zblednout až do šeda. Strie představují jeden z nejčastěji a zároveň nejhůře léčitelných kosmetických problémů. Mohou se vyskytovat v jakémkoli věku, ale nejčastěji se objevují v období puberty u dívek. Kyselina hyaluronová v tomto případě podpoří proliferaci a činnosti fibroblastů, což vede ke zvýšené tvorbě kolagenu a elastinu a k urychlené obnově namáhaných vazivových vláken. To je velmi důležité, neboť vazivová vlákna v kůži nejsou schopna odolávat mechanickému zatěžování právě z důvodu pomalé regenerace a celkového zeslabení.

3.2.3. Hyaluronan v oftalmologii (3)

Další typické lékařské uplatnění hyaluronanu je jeho využití v oftalmologii. Hyaluronan sodný nachází uplatnění v chirurgii katarakty. Katarakta je choroba vedoucí ke ztrátě průhlednosti oční čočky. Kritickým problémem u této operace je možnost poranění křehké nitrooční tkáň, zejména endoteliální vrstvy rohovky. Rohovka se skládá z pěti vrstev – epitelu, Bowmanovy membrány, stromatu, Descemetovy membrány a endotelu. Rohovkový epitel je vrstevnatý, a skládá se z pěti až šesti vrstev buněk. V bazální části epitelu nacházíme četné mitózy, které rohovku obdařují znamenitou regenerační schopností, buňky se zde kompletně obnoví přibližně každých sedm dní. Pokud by během operace bylo poškození větší než její reparační schopnost, tekutina by pronikala přes poškozené oblasti a způsobila by edém rohovky. V případě chirurgie katarakty se užije viskoelastický materiál z hyaluronátu sodného k udržení hloubky přední komory a na ochranu endoteliální vrstvy rohovky nebo jiné tkáň proti fyzickému poškození. Hyaluronan funguje jako polstrující materiál nebo mazivo *in vivo*. Využívá se roztok 1 % hyaluronanu sodného s molekulovou hmotností okolo 10^6 Da, vzhledem ke své velké hmotnosti, pomalu mizí z přední komory.

Interakce hyaluronanu s receptory CD44 na povrchu buněk rohovky je spojeno s buněčnou migrací a diferenciací. Byly provedeny pokusy s hyaluronanem a CD44 v králičí rohovce, po poškození se morfogeneze postupně zvyšovala až do 14 dnů po zranění. Pokusy bylo naznačeno, že hyaluronan a CD44 synergicky hrají důležitou roli v hojení epitelu rohovky. Je naděje, že tato kombinace se využije v budoucnu pro hojení rohovky.

3.2.4. Role hyaluronové kyseliny při zánětlivé reakci (4, 6)

Zánět je ochranným mechanismem organismu proti patogenním mikrobům a dráždivým chemikáliím. Mezi klasické příznaky zánětu patří zarudnutí, otok, provázený zvýšenou teplotou a bolestí. Zánět počíná místním uvolněním chemických mediátorů zánětu, látek různého původu, které vyvolají hlavní děje pro tuto reakci charakteristické, tzv. zvýšení průtoku krve, propustnosti cév, chemotaxe a fagocytózy.

Receptor CD44 se nachází na leukocytech. V prvních fázích zánětlivé odpovědi CD44 umožňuje přestup leukocytů do místa zánětu. Interakce receptoru CD44 a hyaluronové kyseliny ovlivňuje přestup leukocytů a podílí se na přímé interakci mezi buňkami a tkáněmi.

Současná léčba chronických zánětlivých onemocnění se snaží nespecificky potlačit aktivaci buněk imunitního systému. Interakce receptoru CD44 s kyselinou hyaluronovou se nabízí jako podstata nové potenciální možnosti léčby.

3.3. Farmakokinetika a farmakodynamika kyseliny hyaluronové (1, 9)

Farmakokinetika: Perorální dostupnost kyseliny hyaluronové se udává v rozmezí 0 – 13 % a závisí na molekulové hmotnosti, technologickém zpracování a také na způsobu, jakým se tento údaj zjišťuje. Makromolekulární řetězec je před absorpcí enzymaticky štěpen střevní mikroflórou na fragmenty o malé molekulové hmotnosti. Scintigrafickými metodami je prokazatelná distribuce do kloubní chrupavku.

Známý je distribuční objem asi 5,4 l u člověka a plazmatický poločas, který se pohybuje od 3,5 do 6 minut.

Farmakodynamika: Účinek hyaluronové kyseliny je na tkáňové nebo orgánové úrovni zprostředkován vazbou na receptory. Hlavním receptorem pro hyaluronovou kyselinu je receptor CD44.

3.4. Teorie jodace

3.4.1. Radionuklidy jódu (10)

Jód má 36 izotopů a 10 izomerů. Z nich pouze jeden izotop, ^{127}I , který se vyskytuje v přírodě, je stabilní. Z nestabilních izotopů je beta zářič ^{129}I s velice dlouhým poločasem 15 let. Nestabilní izotopy vzniknou například při jaderném štěpení nebo v cyklotronu. V nukleární medicíně jsou důležité tři izotopy: ^{123}I , ^{125}I a ^{131}I . Příprava ^{125}I je v reaktoru z ^{124}Xe reakcí n,γ : $^{124}\text{Xe} (n,\gamma) ^{125}\text{Xe} \rightarrow ^{125}\text{I}$

Často používaným způsobem značení sloučenin v lékařství a v biologii je jodace. ^{123}I je vhodný pro diagnostické metody *in vivo*. Je to čistý gama zářič s energií fotonů 160 keV a má rovněž poměrně krátký poločas 13 hodin. ^{125}I je nejpoužívanějším radionuklidem ve vyšetřovacích metodách *in vitro*. ^{131}I patří k nejvíce užívaným izotopům jódu v klinické praxi, zejména pro radioterapii. Je to smíšený gama a beta zářič, energie fotonů gama je 360 keV a jeho poločas je 8 dní.

Tab. 1: Přehled izotopů jódu

Izotop	výskyt v přírodě	T1/2	typ rozpadu	základní energie MeV	zdroj
^{123}I	{syn.}	13 h	EC, β^- , γ	1,2 + 0.16	123Te
^{125}I	{syn.}	59,408 d	EC	0,186	125Te
^{126}I	{syn.}	13,11 d	EC	2,155	126Te
			β^-	1,258	126Xe
^{127}I	100 %	Stabilní			
^{128}I	{syn.}	24,99 min	β^-	2,118	128Xe
			EC	1,251	128Te
^{129}I	{syn.}	$1,57 \cdot 10^7$ r	β^-	0,194	129Xe
^{130}I	{syn.}	12,365 h	β^-	2,949	130Xe
^{131}I	{syn.}	8,02070 d	β^-	0,971	131Xe
{syn.} = syntetický, EC = elektronový záchyt					

3.4.2. Metody přípravy radioaktivních sloučenin (10 - 20)

Pouze malá část radiofarmak je používána ve formě jednoduchých anorganických sloučenin. Převážná většina radiofarmak jsou organické látky a látky biologické povahy značené vhodným radionuklidem a pro jeho přípravu jsou obvykle používány metody známé z organické chemie, které jsou modifikované, aby mohly probíhat v mikroměřítku, reakce by měla mít vysoký výtěžek a měla by být časově nenáročná. Ve struktuře organických sloučenin používaných jako radiofarmaka je atom nebo skupina atomů nahrazena radioaktivním atomem tak, aby výsledná vazba radionuklidu v organické sloučenině byla dostatečně stabilní a označení specifické. K přípravě značených organických sloučenin pro klinické aplikace jsou používány tři základní metody - výměnná reakce, klasická chemická syntéza a biochemická syntéza.

V průběhu *izotopové výměnné reakce* je jeden či více atomů v molekule nahrazeno radioaktivním izotopem téhož prvku. Reakce tohoto typu jsou používány zejména pro značení látek obsahujících jód pomocí radioizotopů jódu a pro značení pomocí pozitronových zářičů.

V průběhu *biologické syntézy* se nechá růst živý organismus v živné půdě obsahující radioaktivní značkovač. Radionuklid je zabudován do produkovaných metabolitů organismu a tyto metabolity jsou pak chemicky izolovány. Příkladem je vitamín B12 značený radioaktivním kobaltem.

Většina radiofarmak používaných v klinické praxi se připravuje jednoduchým způsobem v příslušných formách a mnoho z nich je možno připravit za použití *komerčně dostupných souprav - kitů*. Vždy je třeba mít na mysli několik důležitých faktorů ovlivňujících stálost složení značených sloučenin. K nejdůležitějším patří chemická stabilita, skladovací podmínky, specifická radioaktivita, radiolýza a doba expirace.

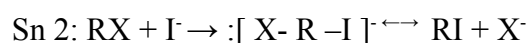
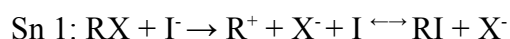
Chemická stabilita závisí na typu vazby mezi radionuklidem a sloučeninou. Sloučeniny s kovalentními vazbami jsou obvykle relativně stabilní za různých fyzikálně chemických podmínek.

Mnoho značených sloučenin je značně citlivých a snadno se rozkládají při zvýšené teplotě nebo působením světla. Proto je vhodné uchovávat radiofarmaka v chladu a v temnu.

Příprava radiofarmak **chemickou syntézou** je založena na klasických metodách organické syntézy. Převážná většina těchto metod však byla modifikovaná na základě požadavků na bezpečnost práce a s přihlédnutím k tomu, že výchozí látka je často velmi drahá. Při tomto typu značení je radionuklid zabudován do molekuly pomocí kovalentní nebo koordinační vazby na vhodné místo struktury organické látky. V nejjednodušším případě dochází k vytvoření chemické vazby pomocí chelatace radioaktivního atomu vhodným chelatačním činidlem (DOTA = tetraazacyklododekantetraoctová kyselina nebo DTPA = diethylenetriaminopentaoctová kyselina). Další možností je substituce kovalentně vázaného vodíku radionuklidu halogenu.

Reakce značení radioaktivním jódem mohou být rozděleny dle mechanismu na nukleofilní a elektrofilní substituce.

Nukleofilní substituce dále dle mechanismu můžeme rozdělit na monomolekulární a bimolekulární, dle počtu molekul, které se účastní tranzitního stavu.



Vzniká-li reaktivní meziproduct z jediné molekuly, například vznik karbokationtu, jedná se o monomolekulární reakci, vzniká-li z více (dvou) molekul, jedná se o substituci bimolekulární. Substrát obsahuje skupiny, které polarizací vazby vytvářejí vhodné podmínky pro nukleofilní atakt. např: Cl-, Br-, I-. Činidlem je jodidový anion.

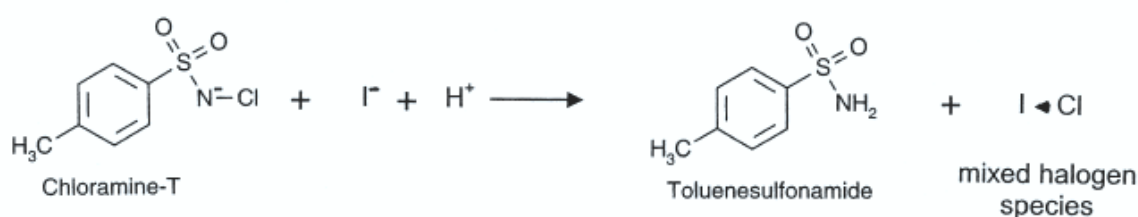
Elektrofilní substituce je charakteristickou reakcí aromatických sloučenin. Její podstatou je náhrada aromaticky vázaného atomu vodíku elektrofilním činidlem. Za elektrofil považujeme I^+ . Elektrofilní substituce dovoluje přímé zavedení skupiny na aromatické jádro. Atakující činidlo vyhledává místo s největší elektronovou hustotou. Atomy, které odpuzují elektrony substituci usnadňují. Substituenty typu halogenů orientují substituci převážně do poloh, ortho a para.

Při jodačních reakcích dochází elektrofilní substitucí k záměně vodíkového iontu za kation jódu. Protože nejstabilnější forma jódu je ve vodných roztocích jodid, je třeba tento jodid nejprve vhodnými oxidačními činidly převést do stavu kationtu.

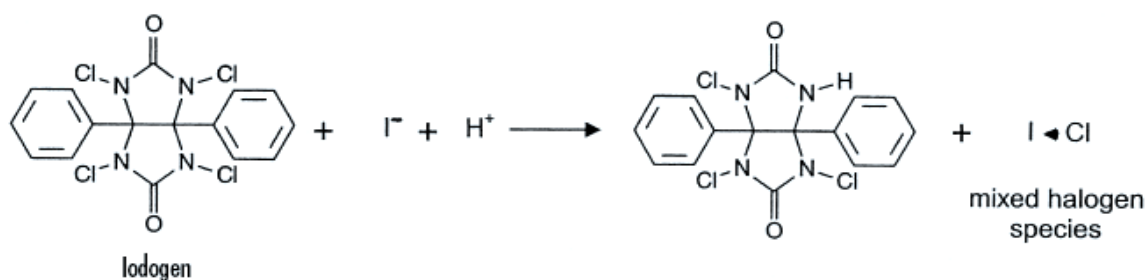
Používaná oxidační činidla

1. jód monochlorid (ICl) – jód představuje kladně nabitou část molekuly

2. chloramin - T (N – chlorotoluensulfonamid) – ke značené látce se přidá chloramin - T a následně roztok radioaktivního jodidu, chloramin - T oxiduje radioaktivní jodid na kationt, kterým se pak značí požadovaná molekula, výtěžek této reakce bývá vysoký, ale chloramin - T může způsobovat denaturaci bílkovin, určitou možností, jak tomu zabránit je použití chloraminu - T imobilizovaného na polystyrenových kuličkách



3. jodogen (1, 3, 4, 6 - tetrachloro – 3 α, 6 α – difenylglykouril) pomocí jodogenu lze značit bílkoviny a buněčné membrány, jodogen je nerozpustný ve vodě, proto se nechá rozpouštět v methylenchloridu, je přenesen do reakční nádoby a rozpouštědlo je odpařeno proudem inertního plynu, vytvoří na stěně reakční nádoby povlak ve tvaru filmu, dále se do reakční nádoby přidá radioaktivní jodid se značenou bílkovinou



4. N - sukcinimidyl – 3 (4 – hydroxyfenyl) propionan – tzv. Bolton – Hunterovo činidlo, kde je nejprve jód navázán na tuto sloučeninu pomocí chloraminu T a činidlo je pak konjugační metodou navázáno na lysinovou aminoskupinu bílkoviny amidovou vazbou.

5. peroxykyseliny – peroxykyselinou je oxidován radioaktivní jodid na kationt, který joduje požadovanou molekulu

Přímá elektrofilní jodace

Zmíněná oxidační činidla oxidují mechanismem přímé jodace. Tato metoda je limitovaná jen pro ty aromáty, které jsou aktivovány nukleofilním substituentem. Klady této metody jsou vysoké výtěžky a snadná proveditelnost, nevýhodou je možnost tvorby směsi izomerů, které jsou někdy obtížně oddělitelné.

Nepřímá elektrofilní jodace

V této metodě jsou použity organokovové sloučeniny jako prekurzory pro elektrofilní radiojodaci aromatických sloučenin. Ve většině případů se používají trialkylstannyl, trialkylsilyl nebo deriváty kyseliny borité. Elektronegativita křemíku je nižší než uhlíku. Proto skupiny obsahující alkylovaný křemík mají kladný indukční efekt. Molekula trialkylboru je planární a obsahuje na atomu boru elektronový sextet ve valenční sféře. Proto je schopna adovat sloučeniny s volným elektronovým párem (Lewisovy báze). Tím lze vysvětlit i snadnou adici boranu na dvojnou vazbu. Výhodou je široké uplatnění pro regioselektivní radiojodaci, nevýhodou je zdouhavá a složitá syntéza organokovových sloučenin.

Radiojodace proteinů

Metoda radiojodace proteinů by měla probíhat rychle a s vysokým výtěžkem a být mírná. Radiojodované proteiny by měly mít vysokou specifitu a být inertní k dehalogenaci. Přímá radiojodace je možná pokud je protein stabilní v oxidačních podmínkách. Alternativou je nepřímá radiojodace pokud je protein nestabilní.

Radiojodace oligonukleotidů

Použití antisense - oligonukleotidů jako diagnostické agens by mělo přinést molekulární zobrazení na úrovni exprese genů. Většina doposud publikovaných metod používala „tailing“ techniku, která spočívala v adici radioaktivně značené prostetické skupiny do polohy 3, 5 oligonukleotidu.

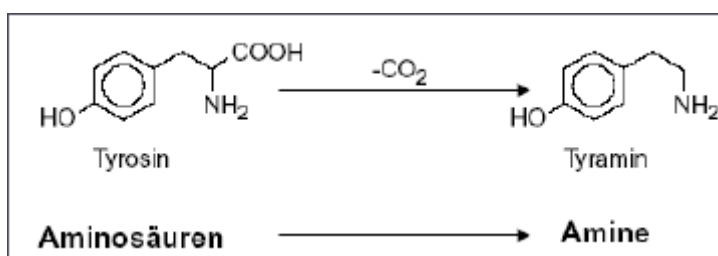
Značení hyaluronanu jódem ^{125}I pomocí modifikace struktury HA tyrosinem (20)

Pro studium metabolismu polysacharidu hyaluronanu nebyla do nedávné doby dostupná radioaktivně značená hyaluronová kyselina o vysoké molekulové hmotnosti a vysoké specifické aktivitě. V současné studii ^{125}I – tyrosin – hyaluronan byl vyroben po předchozí

aktivaci polysacharidu bromkyanem (CNBr). Dosažená specifická aktivita byla 0,1 MBq/mg, kdy byl pro značení použit hyaluronan o hmotnosti 5×10^5 Da.

Značení tyramin – cellobiosy – hyaluronanu jódem ^{125}I (19)

Tato metoda využívá navázání tyramin – cellobiosy na aminoskupinu deacetylovaného hyaluronanu podobně jako u modifikace pomocí tyrosinu. Adukt byl označen jódem před nebo po navázání na hyaluronan. Avšak deacetylace hydrazinem často snižuje délku řetězce hyaluronanu. Vzhledem k tomu, že tyramin – cellobiosa je nedegradibilní, a proto je zachycena v lysozomech v místě absorpce, tohoto se využívá ve studiích *in vivo*.



Obr. 6: Dekarboxylace tyrosinu na tyramin

4. Experimentální část

4.1. Přístroje

HPLC analýza byla provedena na zařízení Shimadzu s pumpou LC – 10 AD a termostatem CTO – 10 A:

Mobilní fáze: 0.2 M octan amonný + 0.05 % azid sodný

Kolony: PL aquagel - OH 60 8 μ m (Agilent), HEMA - BIO 1000 10 μ m (Tessek)

Detektory: radiometrický detektor Raytest (model Gabi Star – Biotech)

Teplota: 40 °C, termostat CTO – 10 A (Shimadzu)

Průtok: 0.8 ml/min, pumpa LC – 10 AD (Shimadzu)

Nástřik: smyčka 200 μ l

Čas analýzy: 35 min

Analytické váhy (Kern)

Elektromagnetická míchačka (Premed)

Automatic Gamma Counter 1480 Wizard™ 3“ (Wallac, Finland)

4.2. Chemikálie

Chlorid sodný (Lachema a.s.)

Dusičnan stříbrný (Penta)

Fosfátový pufr ph = 7,4

připraven z 1 / 15 M roztoku dihydrátu hydrogenfosforečnanu (Sigma - Aldrich) sodného a 1 / 15 M roztoku dihydrogenfosforečnanu (Sigma - Aldrich) sodného v poměru 8 : 2

Filtr PTFE 13 mm, 0,45 μ m (Radanal s.r.o.)

Kyselina hyaluronová modifikovaná tyraminem do nejnižšího stupně (Tm – HA - 1) byla připravena v laboratořích firmy Contipro, s.r.o., Dolní Dobrouč, ČR

Chloramin – T, N - chloro - p - toluensulfonová kyselina (Sigma – Aldrich)

Jodogen, 1, 3, 4, 6 – tetrachloro - 3 α , 6 α – difenylglykouril (Sigma – Aldrich)

Octan amonný, p.a. (Sigma - Aldrich)

¹²⁵I - NaI v 0,04 M NaOH, objemová aktivita 3700 MBq/ml, výrobce Izotop, Budapešť

Sephadex G - 50 M (Sigma - Aldrich)

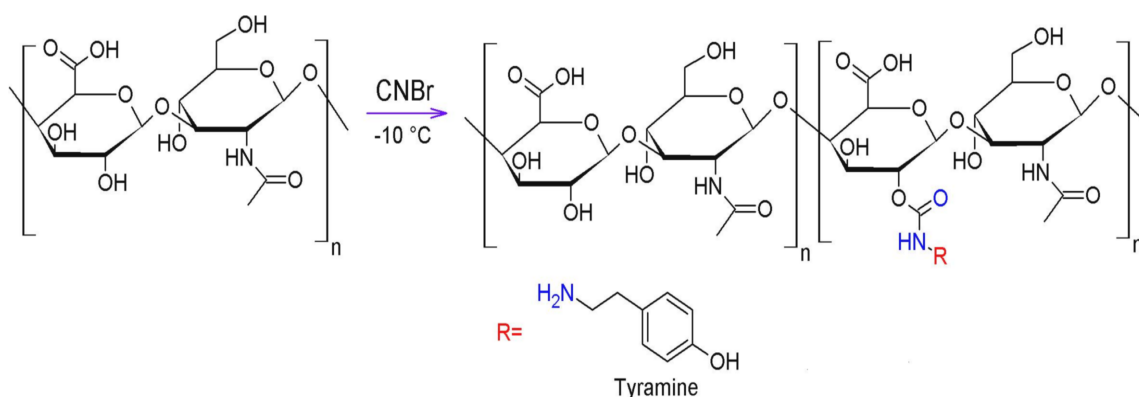
Toluen, p.a. (Lachema a.s.)

4.3. Metodika

4.3.1. Radioaktivní značení HA – Tm - 1 oxidativní jodací (21)

Teorie: Ke značení hyaluronové kyseliny radionuklidem ^{125}I byla použita tyraminem modifikovaná HA.

1. Vlastní postup přípravy (provedený pracovníky firmy Contipro, s.r.o., ČR): Kyselina hyaluronová se nechá po dobu 5 min aktivovat kyanobromidem (použije se dvou molární nadbytek dimerní HA) při nízké teplotě (-10 až -5 °C) a vysokém pH (pH = 11, 0,25 M uhličitanového pufru). Po aktivaci se přidá ekvimolární část tyraminu k dimerní hyaluronové kyselině. Tato směs se poté míchá 24 hodin při pokojové teplotě. Dále se hyaluronová kyselina vysráží pomocí 100 % 2 - propanolu a promyje se čtyřikrát v desetinásobku 80 % 2 - propanolu. Dále se suší promytím 100 % 2 - propanolem, toto promytí se opakuje dvakrát a poté se produkt suší v sušárně při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin.



Obr. 7: Aktivace hyaluronové kyseliny kyanobromidem při teplotě -10 °C pro reakci s tyraminem

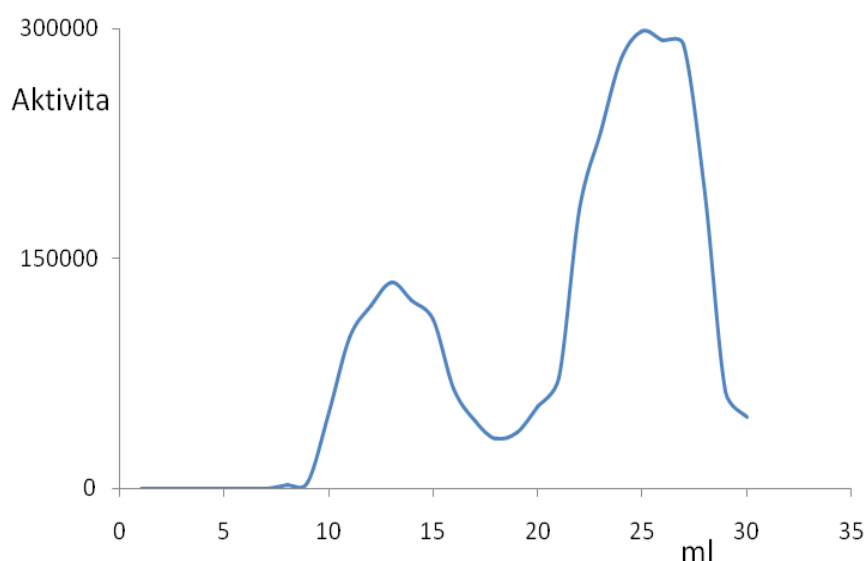
1.1. Radioaktivní značení s chloraminem - T

Nejprve byla vyzkoušena metoda oxidativní jodace s použitím levného a snadno dostupného chloraminu - T:

2,3 mg HA – TM - 1 bylo rozpouštěno do druhého dne v 1,5 ml 0,05 M fosfátového pufru pH = 7,4 (rozpouštění nebylo úplné). Suspenze byla přefiltrována PTFE filtrem 0,2 μm .

Ke 200 μl přefiltrovaného nasyceného roztoku byly přidány 2 μl roztoku izotopu $^{125}\text{I} - \text{NaI}$ a 2 μl ($\sim 2 \mu\text{g}$) roztoku Chloraminu - T v 0.05 M fosfátovém pufru $\text{pH} = 7,4$ (koncentrace 1 mg/ml).

Soustava byla míchána 1 minutu a ihned poté byl celý objem reakční směsi pro zastavení reakce a přečištění nanesen na kolonu 1 x 29 cm plněnou Sephadexem G - 50 v prostředí destilované vody a byly jímány frakce po 1 ml. Jak ukazuje následující graf č. 1, zřejmě díky krátkému reakčnímu času došlo pouze k částečnému označení Tm - HA, ale vedle toho i k frakcionaci struktury, které se projevilo rozšířením píku vysokomolekulární formy (oxidační činidlo je přítomno ve fázi reakce). Proto byl jako oxidační činidlo zvolen jodogen, který není přítomen ve fázi reagujících látek a je šetrnější k biologicky aktivním makromolekulám. Jodogen se velmi těžko rozpouští ve vodě, a proto se připravují reakční nádoby, které obsahují toto oxidační činidlo na stěnách.



Graf č. 1: Eluční profil reakční soustavy při značení HA – Tm - 1 jodem - ^{125}I oxidativní jodací chloraminovou metodou (separace HA z oxidujícího prostředí na koloně Sephadexu G - 50 v H_2O)

1.2. Příprava lahviček s jodogenem

Do kónické reakční lahvičky (Pierce) bylo napipetováno 10 μl jodogenu v toluenu (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) a rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku.

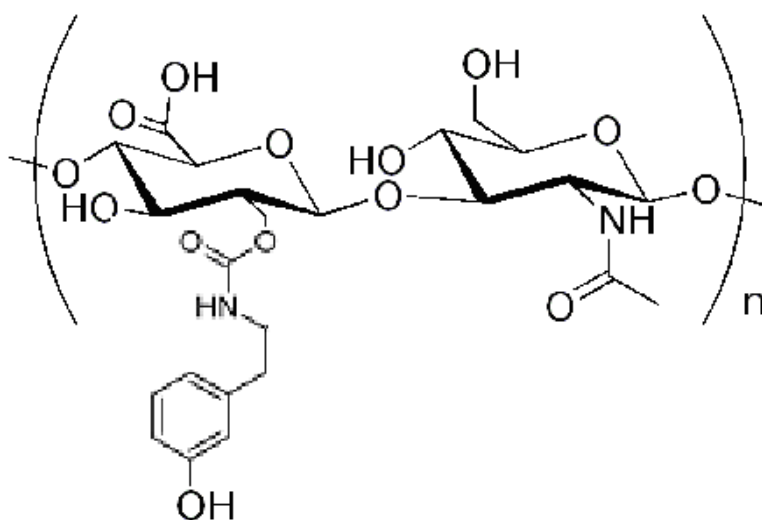
1.3. Příprava roztoku modifikované hyaluronové kyseliny

0,23 mg HA – Tm - 1 bylo do druhého dne rozpuštěno v 1,15 ml 0,05 M fosfátového pufru pH = 7,4 ($c_m = 0,2 \text{ mg} / \text{ml}$)

1.4. Jodace a rozdělení reakční soustavy

Nádobka s jodogenem byla nejprve propláchnuta 1 ml destilované vody a poté do ní bylo napipetováno 500 μl roztoku modifikované hyaluronové kyseliny přefiltrované přes PTFE filtr 0,20 μm a dále byly přidány 2 μl roztoku ^{125}I (NaI) v 0,04 M NaOH. Reakce probíhala na magnetické míchačce po dobu 10 min. Poté byla zastavena nanesením reakčního roztoku na skleněnou kolonu (30 x 1 cm) naplněnou Sephadexem G – 50 s mobilní fází 0,15 M octanem amonným. Po odkapání 6 ml mobilní fáze od nanesení vzorku bylo jímáno 30 frakcí po 20 kapkách (= cca 1 ml).

teorie: Ke značení hyaluronové kyseliny radionuklidem ^{125}I byl použit tyramin, neboť kyselina hyaluronová nemá vhodnou funkční skupinu pro přímé navázání radionuklidu. Tyramin se naváže na sekundární alkohol v poloze dvě D - glukuronové kyseliny za vzniku karbamátové vazby (NCOOH).



Obr. 8. D - glukuronová kyselina v sekvenci s navázaným tyraminem

Značení jódem komplexu hyaluronové kyseliny s tyraminem se použije metoda přímé jodace s oxidačním činidlem jodogenem.

skleněná kolona: Při jímání jednotlivých frakcí jsme využily princip adsorpční gelové permeační chromatografie. Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce, adsorbent nepohyblivá fáze = modifikovaný dextran – uvnitř gelu jsou póry, jedná se o molekulové síto. Kolonou protéká eluční činidlo octan amonný – toto činidlo je zvoleno dle polaritý dělených molekul. Molekuly větší než jsou póry procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako eluční činidlo. V pórech gelu jsou zachyceny malé molekuly – slabou polární vazbou je zachycena část nenavázaného radionuklidu, který je přítomen v hydrolizované formě.

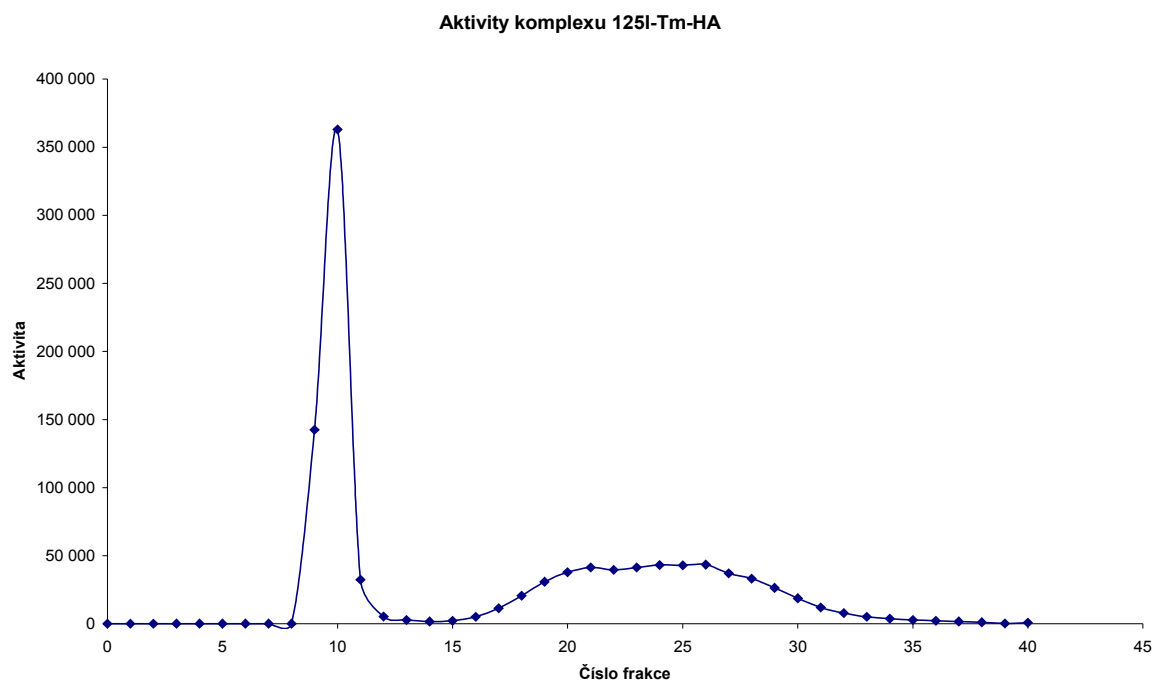
4.4. Výsledky

4.4.1. Stanovení aktivity komplexu ^{125}I – Tm – HA

Postup stanovení aktivity:

Aktivita frakcí byla stanovena pomocí detektoru Automatic Gamma Counter 1480 WizardTM 3“ (Wallac) a zpracována v programu Excel.

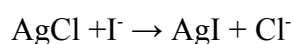
Příklad chromatografie značeného produktu na Sephadexu G - 50 je uveden na grafu č.2.



Graf č. 2: Příklad gelové permeační chromatografie ^{125}I – HA – Tm - 1 na Sephadexu G - 50 v 0,15 M octanu amonném

Frakce s největší aktivitou byly spojeny pro další použití (frakce 9, 10). Protože následná HPLC analýza ukazovala stále, i po přečištění na Sephadexu, přítomnost nízkomolekulární radioaktivity, bylo provedeno přečištění frakcí přes sraženinu AgCl připravenou smícháním 1 ml 0,2 M chloridu sodného s 1ml 0,1 M dusičnanu stříbrného v poměru 1:1 a nanesením na filtr.

Sraženina chloridu stříbrného nám slouží k odstranění zbytků volného jodidu (který je ve stopové koncentraci podle reakce):



Radiochemická čistota byla dále potvrzena HPLC analýzou na přístroji Shimadzu s gelovou kolonou (viz. část 4.4.2.).

4.4.2. Čistota komplexu ^{125}I – Tm - HA

Čistota označeného produktu byla určována pomocí HPLC chromatografu Shimadzu pro gelovou chromatografii. Mobilní fáze byla stejná jako v případě gelové permeační chromatografie na Sephadexu – octan amonný. Kolony (PL aquagel - OH 60 μm)(Agilent), HEMA – BIO 1000 10 μm (Tessek).

Jak ukazuje záznam HPLC analýzy označené hyaluronové kyseliny z prvního dne (graf č. 2), vykazuje vzorek přečištěný na Sephadexu a na sraženině chloridu stříbrného vysokou radiochemickou čistotu s pouze méně než jedním procentem nízkomolekulární formy radioaktivity.

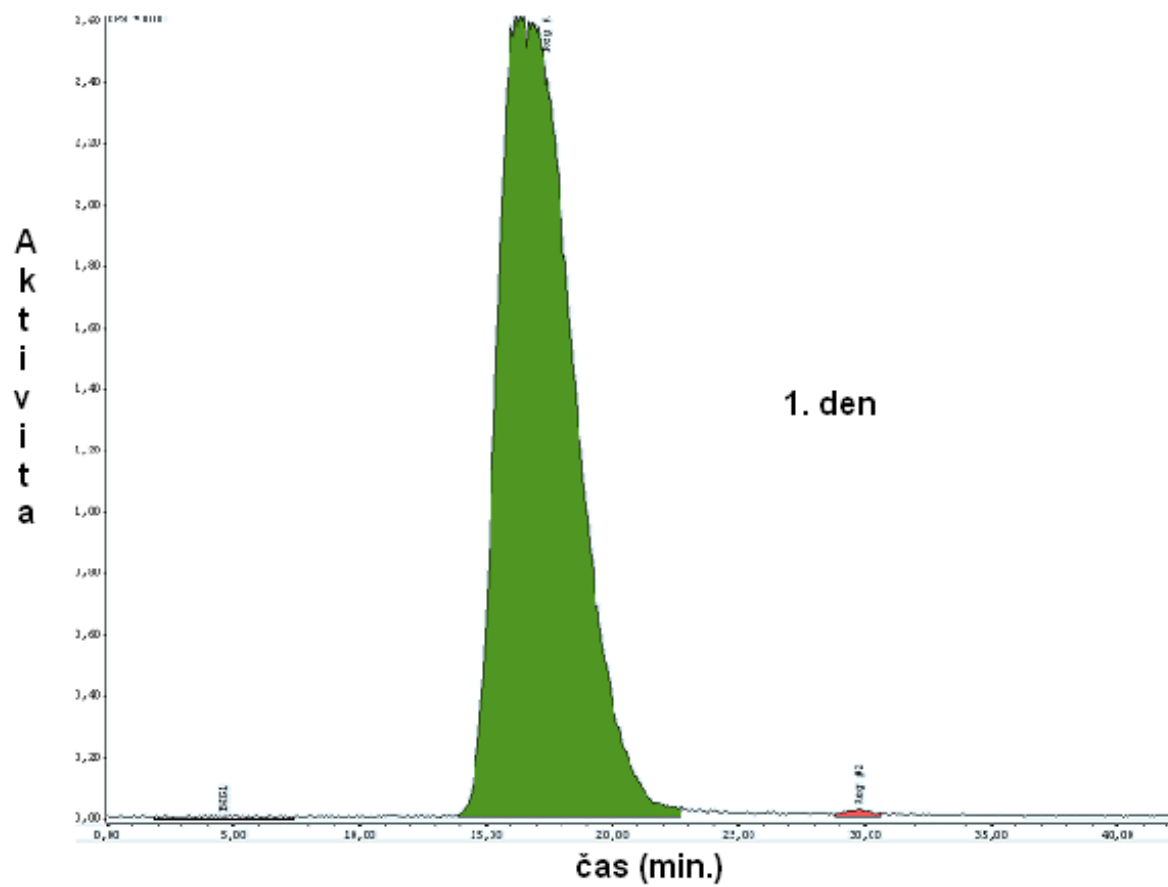
4.4.3. Stabilita komplexu ^{125}I – Tm - HA

Stabilita radioaktivně značeného produktu při jeho uchování v lednici (při 4 °C) byla zjišťována v průběhu deseti dnů pomocí HPLC analýzy.

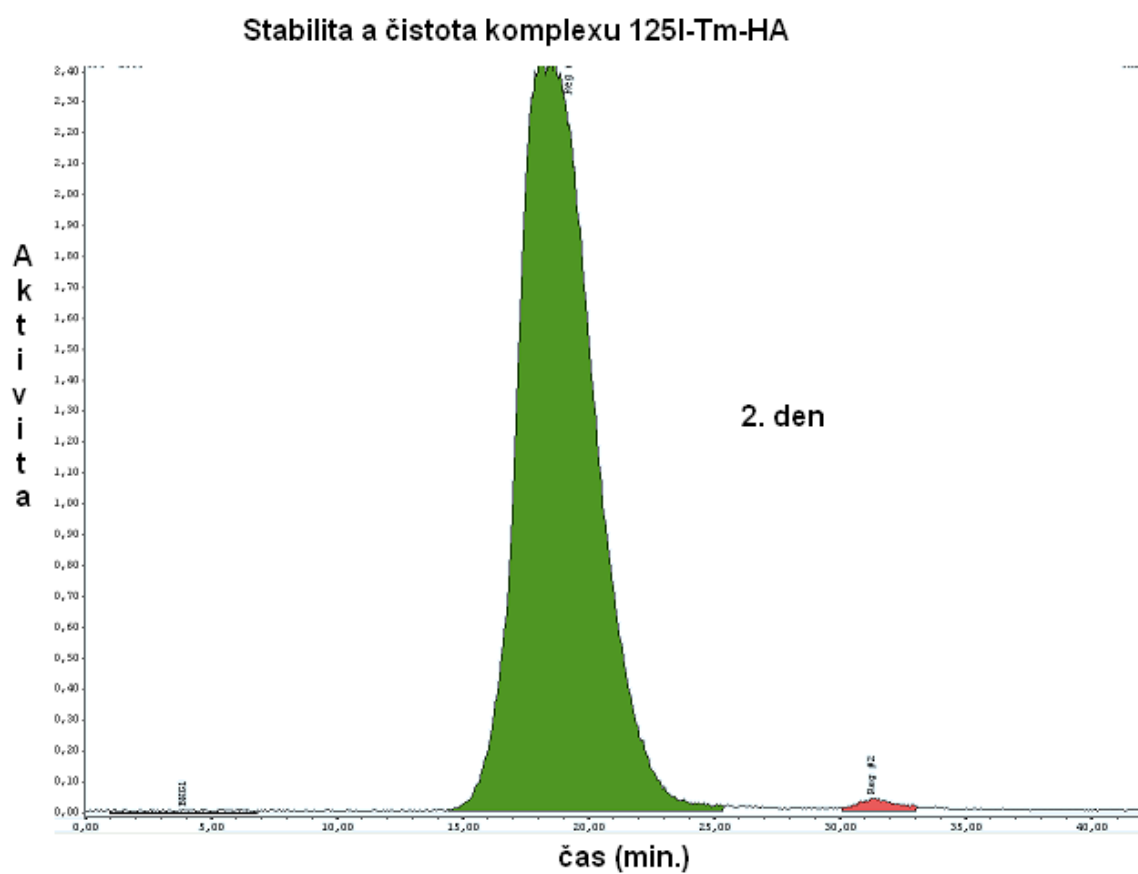
Pík, který vykazuje nepatrnou aktivitu a objevuje se okolo 30 min, patří radiochemickým nečistotám. Tyto nečistoty mohou představovat určité množství nenavázaného radionuklidu nebo radionuklid navázaný na přítomné chemické nečistoty. Vzhledem k tomu, že se výška tohoto píku snížila po filtraci přes AgCl, jde o volný jodid.

V průběhu desetidenního měření bylo zjištěno velice pomalé uvolňování nízkomolekulární radioaktivity z vazby na hyaluronovou kyselinu. Čistota komplexu v průběhu celého měřeného intervalu byla vysoká (aktivita uvolněná z vazby na HA – TM - 1 byla pouze řádu několika procent). Rozhodující krok pro čistotu komplexu je filtrace přes sraženinu chloridu sodného s dusičnanem sodným v poměru 1 : 1, kde je zachycena volná forma jodidu na stříbrné ionty.

Stabilita a čistota komplexu ^{125}I -Tm-HA

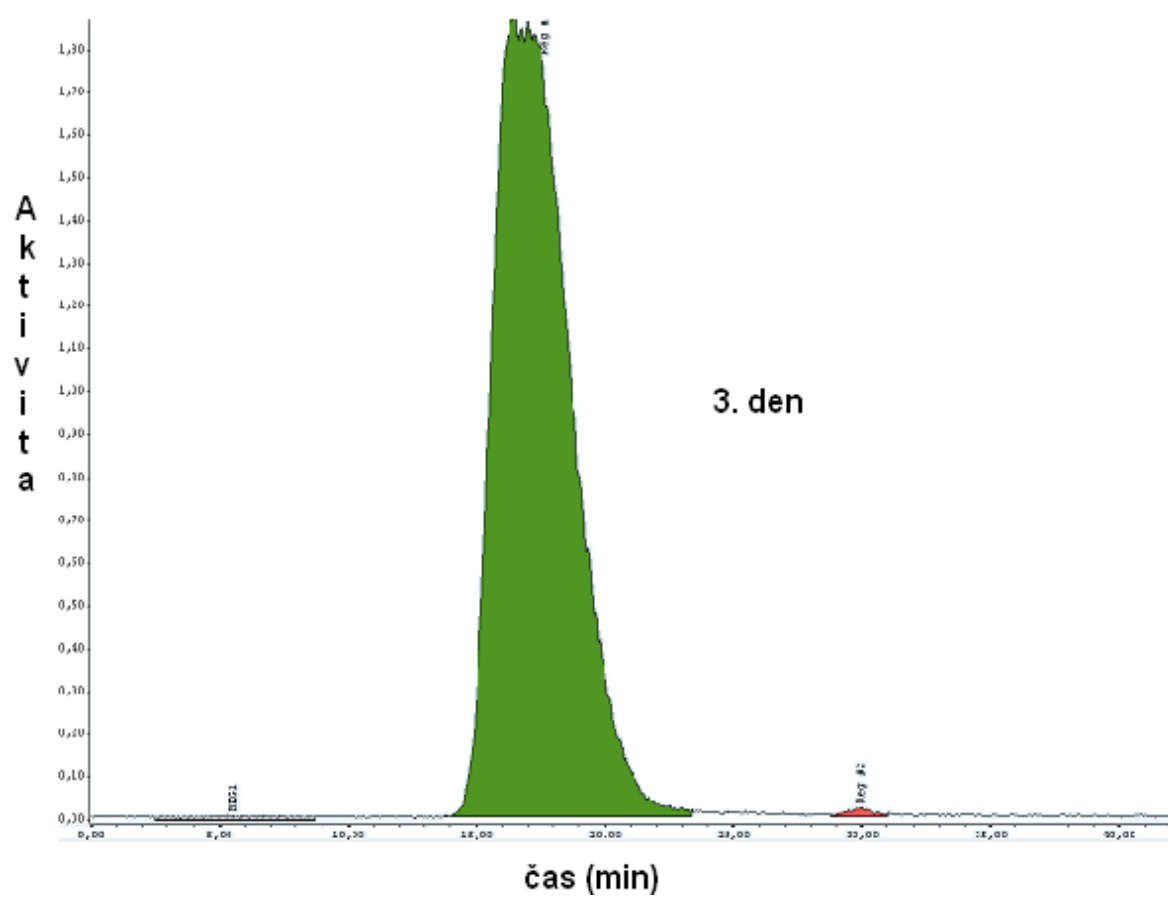


Graf. č. 3: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA ihned po přípravě a přečištění na Sephadexu G - 50 a filtrací přes AgCl

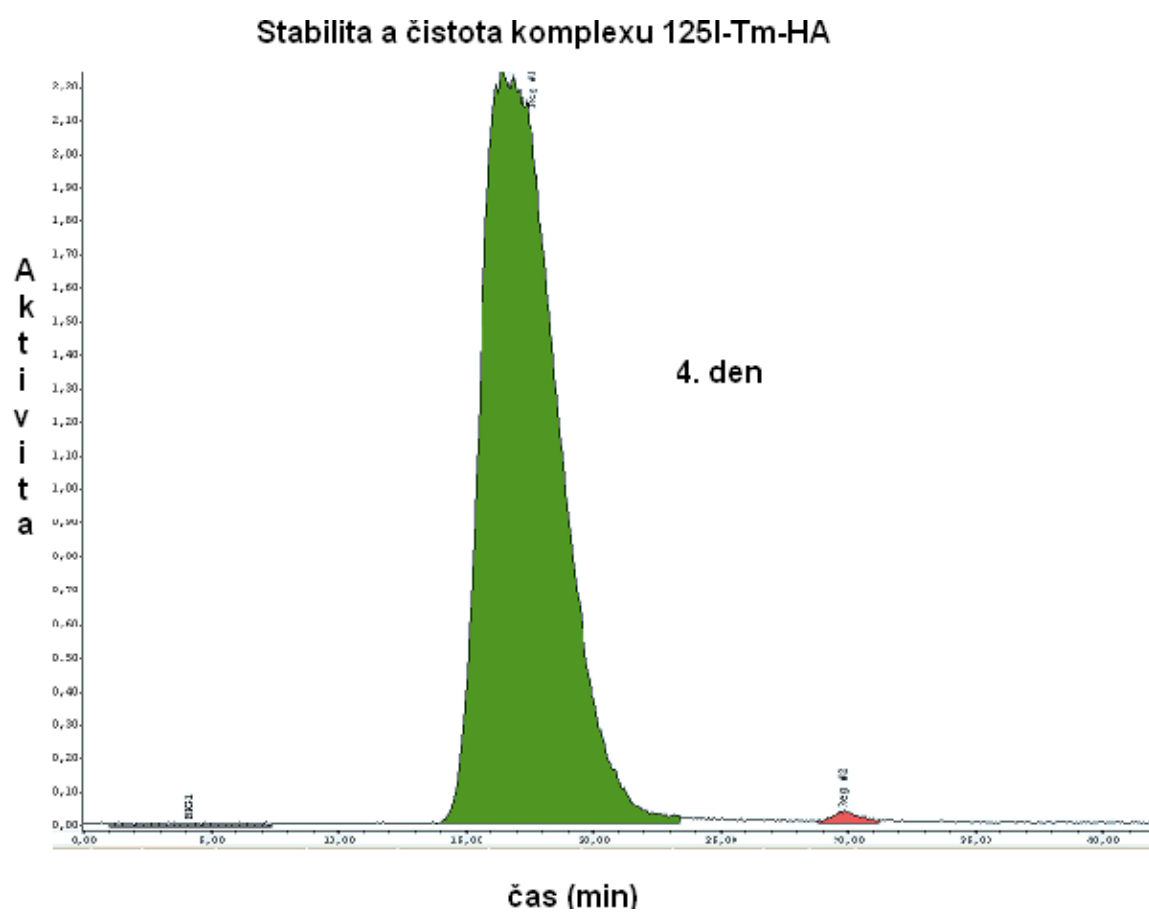


Graf. č. 4: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 24 hodin od přípravy a přečištění

Stabilita a čistota komplexu ^{125}I -Tm-HA

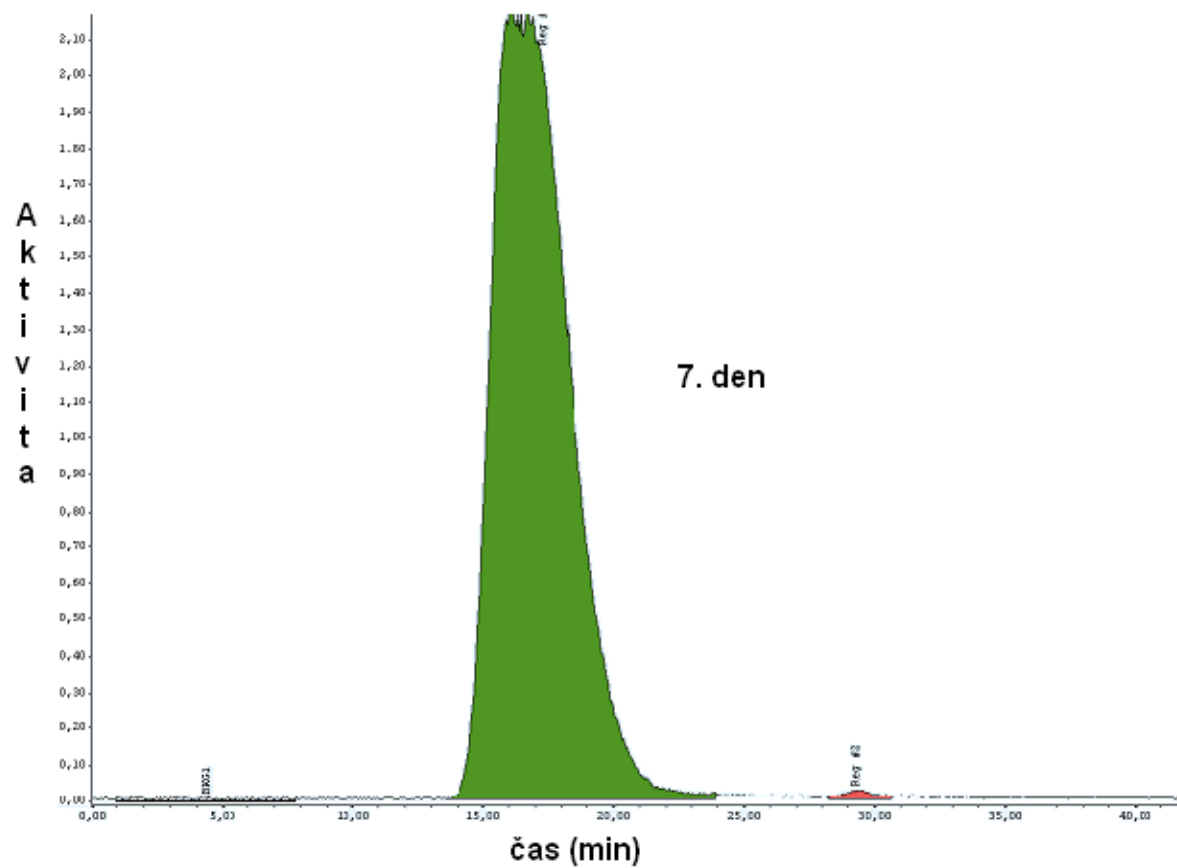


Graf. č. 5: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 48 hodin od přípravy a přečištění



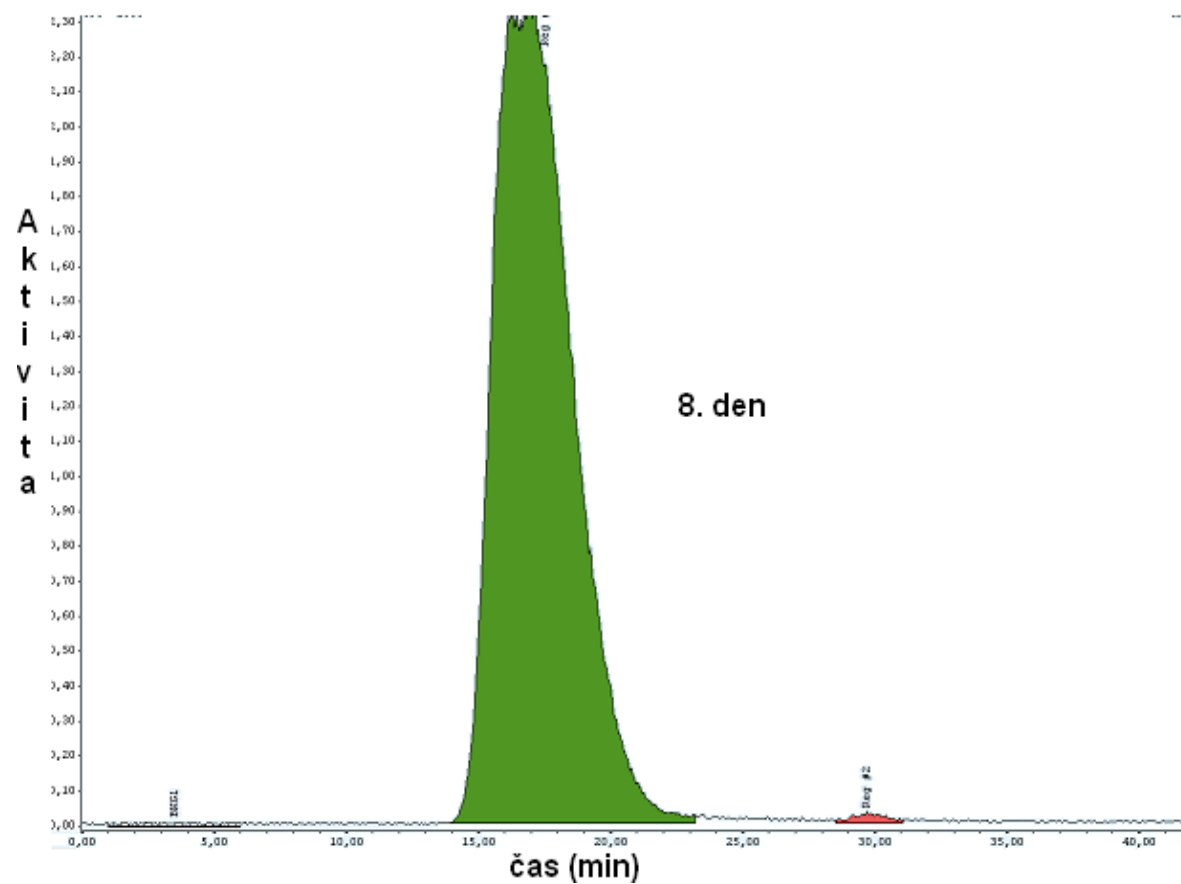
Graf. č. 6: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 72 hodin od přípravy a přečištění

Stabilita a čistota komplexu ^{125}I -Tm-HA



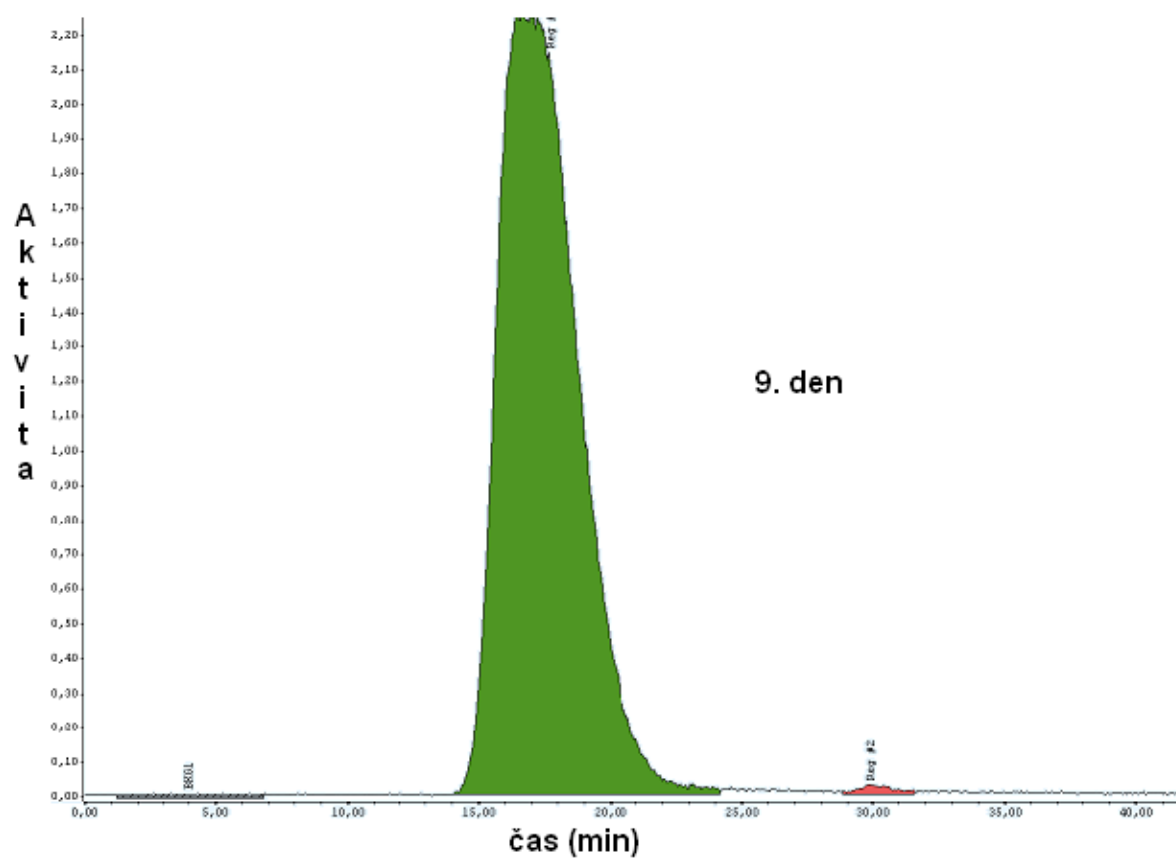
Graf. č. 7: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 144 hodin od přípravy a přečištění

Stabilita a čistota komplexu ^{125}I -Tm-HA

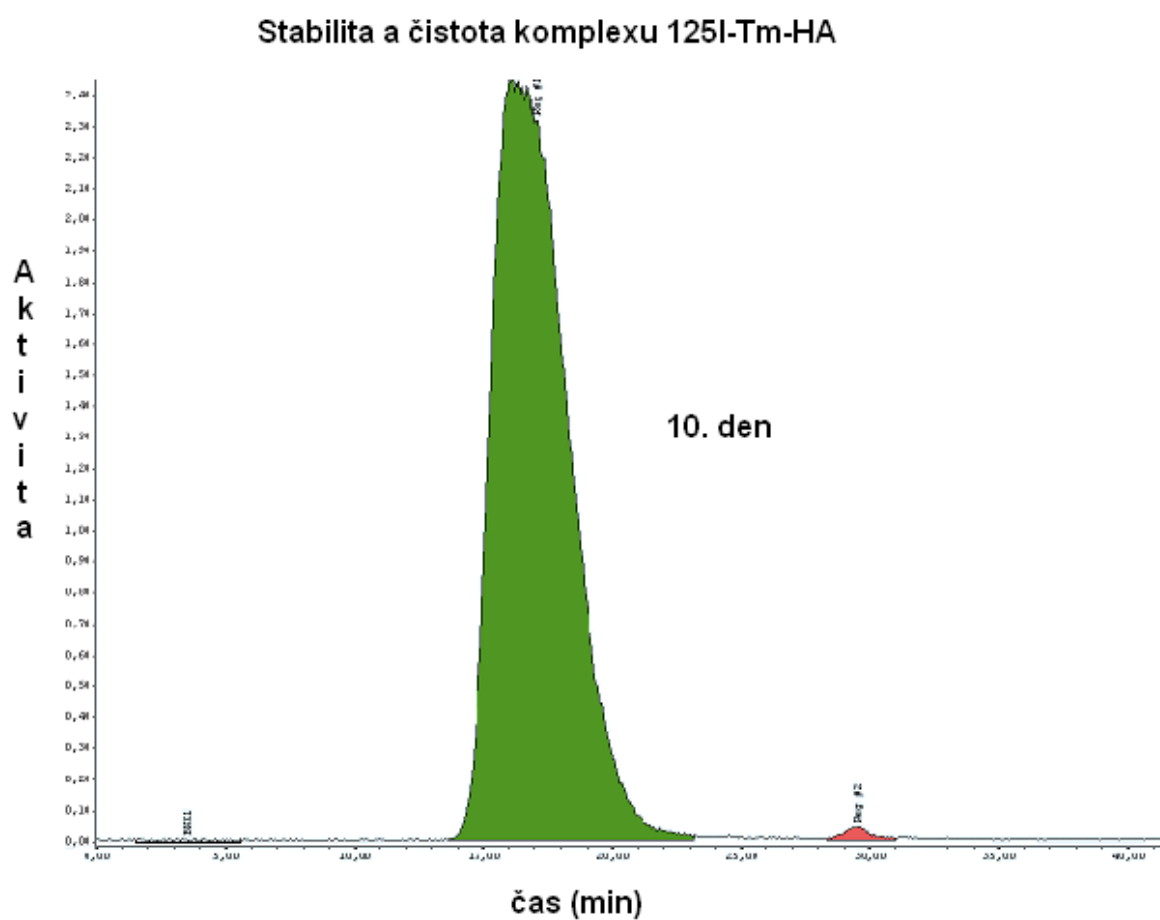


Graf. č. 8: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 168 hodin od přípravy a přečištění

Stabilita a čistota komplexu ^{125}I -Tm-HA



Graf. č. 9: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 192 hodin od přípravy a přečištění



Graf. č. 10: Záznam HPLC analýzy ^{125}I – Tm - HA 216 hodin od přípravy a přečištění

5. Diskuse

1. Přímé značení hyaluronové kyseliny různými radionuklidy není možné, neboť sama kyselina hyaluronová neobsahuje pro radioaktivní značení vhodné funkční skupiny. Proto se vlastní hyaluronová kyselina různým způsobem modifikuje, například vazbou chelatonů, které umožňují vazbu kovových radionuklidů, případně vazbou funkčních skupin schopných radiohalogenace.

V naší práci jsme získali od kooperujícího pracoviště tyraminem modifikovanou hyaluronovou kyselinu o molekulové hmotnosti 200 kDa. Benzenové jádro tyraminu představuje strukturu s vysokou elektronovou hustotou, na kterou se snadno váže kladně nabitý elektrofil I^+ , což umožňuje označení modifikované hyaluronové kyseliny pomocí radioizotopů jódu. Výhoda této metody je především v její jednoduchosti, efektivnosti, v nízké ceně radionuklidu ^{125}I , kdy ani likvidace radioaktivního odpadu není náročná. Dostatečně dlouhý poločas radionuklidu jódu (60 dní) nám umožní provádět experimenty, jak v krátkých časových intervalech, tak i v relativně dlouhém časovém období.

Pro jodaci tyraminem modifikované hyaluronové kyseliny byl jako oxidační činidlo zvolen nejdříve levný a snadno dostupný chloramin - T. Toto činidlo, které je obsaženo ve fázi značené látky, však hyaluronovou kyselinu štěpilo, jak ukazuje široký pík vysokomolekulární formy při chromatografii na Sephadexu – graf č. 1. Metoda přímé oxidační jodace pomocí oxidačního činidla chloraminu - T se ukázala jako málo šetrná.

2. Proto byla pro označení aduktu Tm - HA zvolena metoda jodace pomocí jodogenu. Tato látka je pro oxidační jodaci jemných biogenních struktur mnohem vhodnější. Není přítomna přímo ve fázi se značenou látkou, a i když vlastní jodace probíhá v delším čase, ukazuje se, že značený produkt neobsahuje rozštěpené struktury makromolekuly.
3. Radiochemická čistota a zároveň stabilita komplexu $^{125}I - Tm - HA$ byly prověřeny použitím separační analytické metody – HPLC. Bylo prokázáno, že stabilita komplexu je relativně velmi dobrá, složení struktury se s časem nemění (nevznikají nízkomolekulární fragmenty).
4. Důležitý bude, ale stupeň modifikace hyaluronové kyseliny tyraminem, kdy navázání příliš velkého množství tyraminových skupin může podstatně změnit fyzikálně - chemické, a tím i biologické chování značené molekuly.

5. Skleněná kolonka naplněná Sephadexem G - 50 s mobilní fází 0,15 M octanem amonným nám umožnila oddělení radioaktivně značené hyaluronové kyseliny (vysokomolekulární látka) od chemicky agresivního reakčního prostředí při jodaci (které představuje nízkomolekulární reakční zplodiny a nenávanou radioaktivitu). Bohužel, ale nedošlo k úplnému oddělení volného jodidu, který zůstává částečně nespecificky vázán ve struktuře HA. K tomuto účelu se ukázala vhodná separace radiojodidu na sraženině chloridu stříbrného.

6. Stabilita výše zmíněné radioaktivně označené struktury byla prokázána i dalšími experimenty prováděnými jinými pracovníky katedry. Šlo o stanovení stability ¹²⁵I – TM - HA v modelovém prostředí žaludeční šťávy a v potkaní plasmě. Látka se v těchto prostředích v podstatě neštěpila (plasma), případně štěpila velmi pomalu (prostředí žaludku). Tento závěr je důležitý pro posuzování biologického chování jodované hyaluronové kyseliny po perorálním podání.

6. Závěr

1. Byla prostudována literatura týkající se metod jodace.
2. Byla připravena radioaktivně značená hyaluronová kyselina modifikovaná tyraminem oxidativní jodací a nalezena metoda jejího přečištění pomocí gelové permeační chromatografie na Sephadexu G - 50 a filtrace přes sraženinu chloridu stříbrného.
3. Byla ověřena čistota tohoto radioaktivně značeného produktu pomocí gelové permeační chromatografie na HPLC zařízení Shimadzu.
4. Stejným způsobem byla dále ověřena kinetická stabilita radioaktivně značené modifikované hyaluronové kyseliny.

7. Souhrn

Studium radioaktivního značení hyaluronové kyseliny oxidativní jodací

Diplomová práce

Eliška Dvořáčková

2009

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

V rámci této práce byla prostudována literatura, týkající se vlastností a využití kyseliny hyaluronové a metod radioaktivního značení sloučenin se zaměřením na jodaci. V experimentální části práce byly vyzkoušeny dvě metody oxidativní jodace hyaluronové kyseliny modifikované tyraminem s nejnižším stupněm modifikace (HA – Tm – 1). První použitá chloraminová metoda se ukázala jako nevhodná, díky přítomnosti oxidačního činidla ve fázi s hyaluronovou kyselinou došlo k částečnému štěpení řetězce značené látky. Další metoda jodace s použitím jodogenu, je reakcí heterogenní, kdy je oxidační činidlo přítomno jako ve vodě nerozpustný odparek na stěnách reakční nádoby. Tento způsob značení byl proto k hyaluronové kyselině mnohem šetrnější. Zastavení reakce bylo provedeno nanesením reakční soustavy na kolonu se Sephadexem G – 50, kde došlo k oddělení označené sloučeniny od agresivního reakčního prostředí. Ukázalo se, že tento způsob přečištění značeného produktu neodstraní z roztoku zbytky radioaktivního jodidu, proto bylo provedeno promytí značené hyaluronové kyseliny přes filtr se sraženinou chloridu stříbrného. Pro stanovení radiochemické čistoty a stability značeného produktu byla použita gelová permeační chromatografie na automatickém HPLC zařízení Shimadzu. Výsledky studia stability v prostředí acetátového pufru neutrálního pH při teplotě 4 °C ukazují, že označená struktura je relativně stabilní. Takto značený produkt by mohl sloužit ke studiu metabolismu kyseliny hyaluronové po perorálním podání, případně posloužit k identifikaci hyaluronan vazebných proteinů, které hrají v organismu důležitou roli při patologických dějích.

8. Abstract

Study of radiolabelling of hyaluronic acid by oxidative iodination

Diploma paper

Eliška Dvořáčková

2009

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

In the frame of this work the literature describing characteristics and possible applications of hyaluronic acid and methods of radiolabelling of compounds with a view to the radioiodination was read up. In experimental part of the task two methods of oxidative iodination of hyaluronic acid modified by tyramine with the lowest degree of modification (HA – TM – 1) was examined. Chloramine method, used as first one, turned out ineligible as due to presence of oxidative agent in the phase with hyaluronic acid a partial degradation of the sequence occurred. Another method of iodination with the use of iodogen is heterogenous reaction, oxidative agent is present as an insoluble deposit on the walls of the reaction vial. This method of radiolabelling was more moderate to hyaluronic acid. The reaction was interrupted by applying the reaction system on the column with Sephadex G – 50 wherby the labelled compound was separated from the aggressive reactive environment. It turned out that this way of refinement of the labelled product does not eliminate the rests of the radioactive iodide. Therefore the labelled hyaluronic acid was washed through a filter with silver chloride coagulation. For assessment of radiochemical cleanness and stableness of the labelled product a gel permeation chromatography an automatic Shimadzu HPLC unit was used. The results of the stableness study in environment of a pH neutral acetate buffer at 4 °C show that the labelled structure is relatively stable. Such a labelled product could enable examination of metabolism of hyaluronic acid oral use. Additionally it could be used for identification of hyaluronan binding proteins that are of an important role by pathological processes in organism.

9. Zkratky

HA	hyaluronová kyselina
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HA - Tm	hyaluronová kyselina modifikovaná tyraminem
Tm	tyramin
HA – TM-1	hyaluronová kyselina modifikovaná tyraminem do nejnižšího stupně
PTFE	polytetrafluorethylen
GPC	gelová permeační chromatografie

10. Použitá literatura

- 1. Hyaluronic acid, From Wikipedia, the free encyclopedia**
<http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronic-acid>
- 2. Alberts B, Bray D, Johnson A**
Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky
1. vydání, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998, Kapitola 9 Tkáně, s 604
- 3. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UB**
Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover
J Internal Med, 242: 27 - 33 (1997)
- 4. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley O**
Základy histologie
7.vydání, H & H, 1992, 472 s, Kapitola 7 Chrupavka, s 124 - 133
- 5. Co je to hyaluronová kyselina**
www.symbinatur.cz
- 6. Kopřiva F**
Adhezivní molekula CD44 a zánět, www.tigis.cz, 13. 2. 2006
- 7. Zesíťená hyaluronová kyselina**
<http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronic-acid>
- 8. Velebný V**
Užití kyseliny hyaluronové jako nutričního doplňku
www.chondroline.cz, 6. 2. 2006
- 9. Nimrod A, Ezra E, Ezov N, Nachum G and Parisada B**

Absorption, distribution of high molecular weight hyaluronic acid
Collect Czech. Chem. Commun. 57, 2151 - 2156 (1992)

10. Yamada A, Traboulsi A, Dittert LW, Hussian AA.

Chloramin - T in radiolabeling techniques.III. Radioiodation of biomolecules containing thioether groups.

Anal Biochem 277(2), 232 – 235 (2000)

11. Lázníček M, Komárek P

Základy radiofarmacie, 1.vydání, Praha – Karolinum, 1998,
kapitola 2: Příprava radiofarmak, s 27 - 65

12. Hrabálek A

Laboratorní cvičení z organické chemie, 1.vydání, Praha – Karolinum 2002, kapitoly
2 a 5, Substituce s 3 - 22, 43 - 53

13. Coenen HH, Moerlein SM, Stöckling G

No – carrier - added radiohalogenation methods with heavy halogens.

Radiochim Acta 34: 47 - 68 (1983)

14. Coenen HH, Mertens J, Maziere B

Compendium on radioiodination reactions and radioiodinated Radiopharmaceuticals.

Springer, Dordrecht, Holandsko, 2006

15. Coenen HH, Petzold, Stöckling G

Recent studies of radiobromination and iodination (nca) with chloramine - T in aqueous and organic solvents.

J Lab Comp Radiopharm 1982: 19: 1580 – 1581

16. Kabalka GW, Varma RS.

The synthesis of radiolabelled compounds via organometallic intermediates.

Tetrahedron 45: 6601 - 6621 (1989)

17. Kabalka GW, Goodman MM.

Synthesis of radiopharmaceuticals via organoboranes.

In: Emram AM, ed. New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance and regulatory control.

New York: Plenum Press, S 289 - S 301 (1991)

18. Wilbur DS

Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labelling methods and reagents for conjugate labelling.

Bioconjug Chem: 3, 435 - 470 (1992)

19. Dahl LB, Laurent FC a Smedsrod B

Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioaktivita: Coupling of ¹²⁵I – tyramine – cellobiose to amino groups after partial N – deacetylation

Analytical Biochemistry 175, 397 - 407 (1998)

20. Gustafson S, Bjorkman T and Westlin JE

Labelling of high molecular weight hyaluronan with ¹²⁵I - tyrosine: studies in vitro and in vivo in the rat

Glycoconjug. Journal, 11, 608 - 613 (1994)

**21. Modifikovaná kyselina hyaluronová tyraminem dle návodu Contipro, s.r.o.,
Dolní Dobrouč, ČR**