

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

Katedra farmakologie a toxikologie

Oddělení radiofarmak



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Lenka Smolová

**Studium plazmatické vazebnosti nově vyvíjených
radiofarmak z hlediska mezidruhového srovnání**

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

Studium plazmatické vazebnosti nově vyvíjených radiofarmak z hlediska mezidruhového srovnání

Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem vazebnosti vybraných radiofarmak na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání. Ke stanovení vazebnosti byla použita metoda rovnovážné dialýzy při 37 °C a experimenty byly provedeny s lidskou, hovězí, králičí a potkaní plazmou.

Vazebnostní studie byly provedeny u tří nových radioaktivně značených komplexů a u klinicky rutinně používaného ^{99m}Tc -DTPA. Vazebnost byla stanovena u komplexu nového bifunkčního chelátu ^{90}Y -DTPA-oxn a u dvou potenciálních radiofarmak ze skupiny radioaktivně značených receptorově specifických peptidů, a to ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1. Získané výsledky byly zhodnoceny z hlediska mezidruhového srovnání a porovnány s hodnotami získanými pro klinicky používaný komplex ^{99m}Tc -DTPA. U naměřených dat bylo provedeno statistické zpracování dat. Výsledky tohoto zpracování ukázaly, že statisticky významně se liší hodnoty naměřené pro komplex ^{99m}Tc -DTPA mezi lidskou a hovězí plasmou a také mezi lidskou a králičí plasmou na hladině významnosti alfa 0,05.

Výsledky všech provedených experimentů ukázaly, že plazmatická vazebnost je nízká a nebude tedy faktorem, který by výrazně ovlivnil farmakokinetiku studovaných látek.

Study of interspecies differences in plasma protein binding of new radiopharmaceuticals

Abstract

This paper engages in a study on the plasma protein binding of chosen radiopharmaceuticals from the perspective of interspecies comparison. An equilibrium dialysis at 37°C was employed for the plasma protein binding determination and experiments were implemented on human, bovine, rabbit and rat plasma.

Studies on the plasma protein binding were carried out with three new radiolabelled chelates and clinically routinely used bifunctional chelate DTPA radiolabelled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc -DTPA). Binding was determined for the newly bifunctional chelate ^{90}Y -DTPA-oxn and for the two potencial peptide based radiopharmaceuticals: ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1. The results received were evaluated in light of interspecies comparison and compared with the results of the plasma protein binding of a clinically routinely used ^{99m}Tc -DTPA. Measuring data were analyzed using statistic data processing. The results of this analysis showed that statistically significant difference is for the complex ^{99m}Tc -DTPA between human and bovine and also between human and rabbit plasma at the level of significance alfa 0,05.

The results of all experiments carried out showed that the plasma protein binding is very low and therefore it is not a factor that would significantly influence the pharmacokinetics of material studied.

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

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

I. ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
Úvod	10
Cíl práce	11
II. TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Nukleární medicína	13
1.1 Radiofarmaka	14
1.1.1 Kontrola radiofarmak	14
1.2 Receptorově specifická radiofarmaka	15
1.2.1 Bifunkční cheláty	16
1.2.2 Radionuklidy	18
1.2.3 Zdroje radionuklidů	18
1.2.4 Technecium	19
1.2.5 Ytrium, Lutecium	20
2. Farmakokinetika	22
2.1 Absorpce	22
2.2 Distribuce	23
2.3 Eliminace	23
2.4 Vazba léčiv na plazmatické bílkoviny	25
2.4.1 Lidský serový albumin	27
2.4.2 Kyselý α 1-glykoprotein (oromukosoid)	27
2.5 Stanovení vazebnosti	28
2.5.1 Rovnovážná dialýza	28
2.5.2 Mikrodialýza	30
2.5.3 Gelová filtrace	30
2.5.4 Vysokoučinná frontální analýza (HPFA)	31
2.5.5 Ultrafiltrace	31

3. Radioaktivně značené peptidy.....	33
3.1 Vývoj radioaktivně značených peptidů	35
3.2 Radioaktivní značení peptidů	36
3.3 Receptory vyskytující se na nádorech.....	37
3.4 Somatostatin	37
3.4.1 Analoga somatostatinu.....	39
3.4.2 Neuroendokrinní nádory	41
3.4.3 [⁹⁰ Y-DOTA0,Tyr3] oktretid a [¹⁷⁷ Lu-DOTA0,Tyr3] oktretát	41
3.5 Gastrin.....	42
3.6 Vazoaktivní intestinální peptid (VIP).....	44
3.7 Bombesin	44
III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
1. Použité materiály, přístroje a pomůcky.....	47
1.1 Testované látky	47
1.2 Biologický materiál	48
1.3 Látky pro stanovení radiochemické čistoty	48
1.4 Přístroje na měření aktivity	49
1.5 Další pomocné látky	49
2. Metodika.....	50
2.1 Stanovení radiochemické čistoty	50
2.2 Stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny	50
2.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu ^{99m} Tc.....	51
2.4 Výpočty.....	53
2.4.1 Výpočet radiochemické čistoty ^{99m} Tc-DTPA.....	53
2.4.2 Výpočet vazebnostních parametrů	53
2.4.3 Statistické zpracování výsledků.....	54
3. Výsledky	56

3.1 Experiment s ^{99m}Tc -DTPA	56
3.2 Experiment s ^{90}Y -DTPA-oxn.....	62
3.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu ^{99m}Tc	68
3.4 Experiment s ^{177}Lu -DOTA-TATE	71
3.5 Experiment s ^{177}Lu -DOTA-MG-1	77
IV. DISKUZE	83
V. ZÁVĚR.....	87
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89

I. ÚVOD A CÍL PRÁCE

ÚVOD

Farmakokinetika se zabývá osudem léčiva v organismu a ovlivňuje ji řada faktorů. Jedním z těchto faktorů je vazba léčiv na plazmatické bílkoviny. Po absorpci léčiva do krevního oběhu dochází k jeho interakci s plazmatickými bílkovinami. Každé léčivo má specifický poměr mezi frakcí volnou a vázanou. Vazebnost se často stanovuje na principu ustanovení rovnováhy mezi frakcí volnou a vázanou – je to metoda stanovení nepřímá. Stanovení vazebnosti je součástí každého farmakokinetického výzkumu nových léčiv. [12,13]

CÍL PRÁCE

1. Zpracovat přehled literárních údajů o důležitosti vazebnosti léčiv na plazmatické bílkoviny a zhodnotit význam této vazebnosti pro farmakokinetiku léčiv.
2. Vhodným radionuklidem radioaktivně označit komplexan DTPA-oxn, u vzniklého komplexu stanovit radiochemickou čistotu a určit vazebnost na plazmatické bílkoviny.
3. Stanovit vazebnost dvou potenciálních radiofarmak ^{177}Lu -DOTA-TATE (derivát somatostatinu) a ^{177}Lu -DOTA-MG-1 (derivát gastrinu).
4. Získané výsledky porovnat s hodnotami stanovenými pro klinicky používané radiofarmakum $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA.
5. Výsledky zhodnotit z hlediska mezidruhového srovnání u čtyř živočišných druhů a z hlediska významu plazmatické vazebnosti na farmakokinetiku studovaných látek.
6. U naměřených výsledků provést statistické zpracování dat, určit zda se získané výsledky statisticky významně liší na stanovené hladině významnosti.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. NUKLEÁRNÍ MEDICÍNA

Je jedním z lékařských oborů, zabývá se aplikací radiofarmak pro diagnostické i terapeutické účely. Radiofarmakum je jakýkoliv léčivý přípravek, který, je-li připraven k použití, obsahuje jeden nebo více radionuklidů (radioaktivních izotopů) včleněných pro lékařské účely. [Český lékopis 2005]

Diagnostické metody se rozdělují na vyšetření in vivo a in vitro. Při vyšetření in vivo se radiofarmaka aplikují do těla pacienta v podobě otevřených zářičů (roztok nebo plyn) a jedná se o radiofarmaka, která při své přeměně emitují gama záření. Gama záření je velmi pronikavé, pouze částečně se absorbuje v těle a lze ho registrovat pomocí přístrojů se scintilačními detektory. Neinvazivním způsobem se tak studují různé fyziologické a biochemické procesy v těle, je možné lokalizovat a diferencovat patologické změny. Výsledkem scintigrafického vyšetření je obraz – prostorová distribuce radiofarmaka v těle.

Vyšetření in vitro využívají radioaktivních látek ke stanovení koncentrace např. hormonů nebo protilátek v krvi. Pacient vůbec nepřichází do kontaktu s radioaktivní látkou, pracuje se pouze se vzorkem krve.

Pro diagnostiku jsou důležité gama zářiče. Požadavky na diagnosticky používané radionuklidy jsou emítace čistého gama záření v rozmezí 100 – 300 keV, fyzikální poločas přeměny přiměřený době potřebné pro vyšetření, produktem radioaktivní přeměny by měl být stabilní nuklid nebo nuklid s tak dlouhým poločasem přeměny, že se chová prakticky jako stabilní nuklid.

Terapeutické metody naopak využívají beta zářiče, které mají dosah ve tkáni jen několik mm, to znamená, že téměř veškerá energie záření se absorbuje v cílovém ložisku. Požadavky na terapeuticky používané radionuklidy je emítace β - záření, perspektivní mohou být i některé α zářiče, poločas přeměny nesmí být ani příliš krátký, ani příliš dlouhý, aby se aplikace nemusela znovu opakovat.

Radiofarmaka se vyrábějí hromadně, ale také individuálně, a to v případech, kdy obsahují radionuklid s krátkým poločasem přeměny. Radiofarmaka se mohou vyskytovat v několika lékových formách – jako přípravky parenterální, perorální, inhalační a topické. [1,2,3]

1.1 RADIOFARMAKA

Jsou to léčivé přípravky obsahující chemické nebo biologicky aktivní látky, jejichž účinnou složkou je radionuklid, který je zdrojem ionizujícího záření. Přítomnost radionuklidu odlišuje radiofarmaka od jiných léčivých přípravků. Záměrně včleněný radionuklid je charakteristický svým poločasem přeměny, druhem a energií záření.

Úkolem terapeutických radiofarmak je doručení terapeutické dávky ionizujícího záření do oblasti onemocnění. Hlavními překážkami jsou použitelnost terapeutických izotopů a technika jejich specifické lokalizace v nemocné tkáni. Existují tři různé cesty, pomocí nichž lze terapeutickou dávku doručit do místa určení: externím ozářením, implantátem nebo systémovým podáním. Ideální by bylo, pokud by radiofarmakum doručilo do místa nádoru vhodnou cytotoxickou radiační dávku pro buňky nádoru a zároveň se co nejdříve vyloučilo z krve a zdravých orgánů, aby zdravá tkáň byla co nejméně poškozována. Distribuce terapeutických radiofarmak není homogenní, je to hlavně výsledek neschopnosti radioaktivně značených molekul rovnoměrně penetrovat do nádorové tkáně. [4,5]

1.1.1 KONTROLA RADIOFARMAK

Každý léčivý přípravek musí splňovat určité požadavky na kvalitu a ani radiofarmakum není výjimkou. Vzhledem k obsahu radionuklidu se vedle standardních zkoušek vyžadují zkoušky, které ověřují radionuklidovou a radiochemickou čistotu.

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

Radiochemická čistota je poměr radioaktivity daného radionuklidu přítomného v radiofarmaku v určité chemické formě a celkové radioaktivity tohoto radionuklidu, vyjádřený v procentech (Český lékopis 2005). [1,2]

Pro účely kontroly se často využívají analytické separační metody, nejčastěji se jedná o chromatografické metody. Základem chromatografických metod je rozdělení stanovovaných látek mezi dvě fáze: mezi fází stacionární (nepohyblivou)

a fází mobilní (pohyblivou). V průběhu stanovení dochází k ustanovení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. K separaci jednotlivých látek dochází na základě jejich rozdílné afinity k těmto fázím. Při kontrole radiofarmak se často využívá chromatografie na rychle se vyvíjejících tenkých vrstvách, chromatogram se vyvine během několika minut. [6]

Radiofarmaka radioaktivně značená ^{99m}Tc využívají dvě vyvíjející soustavy, a sice soustavu organickou (aceton, etanol, methylketon) a soustavu vodnou. Při vyvíjení chromatogramu dochází k oddělování jednotlivých forem technecia. V organickém prostředí se odděluje ^{99m}Tc ve formě technecistanu (ten je unášen mobilní fází k čelu chromatogramu) od komplexů ^{99m}Tc , které zůstávají na startu, stejně jako redukované hydrolyzované technecium. Ve vodné fázi se komplex ^{99m}Tc a technecistan (putují k čelu) oddělují od redukovaného hydrolyzovaného technecia (zůstává na startu). Po vysušení chromatogramů se detekuje rozložení aktivity pomocí vhodných přístrojů. [1]

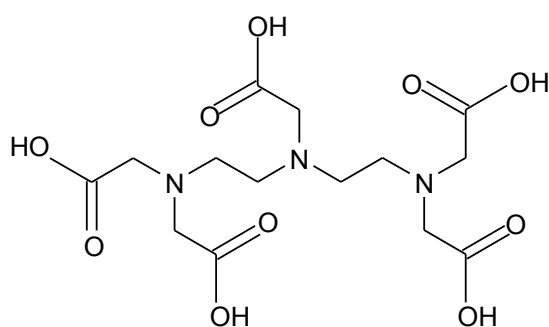
1.2 RECEPTOROVĚ SPECIFICKÁ RADIOFARMAKA

Receptorově specifická radiofarmaka jsou biomolekuly, které mohou zprostředkovat interakci mezi radioaktivním ligandem a receptorem. Tato radiofarmaka jsou založená na interakci mezi receptorem v postižené tkáni a radioaktivně značeným ligandem. Obecně se dá struktura receptorově specifického radiofarmaka rozdělit na čtyři části: cílovou biomolekulu, farmakokinetiku modifikující článek, bifunkční chelát a radionuklid. Cílová biomolekula slouží jako nosič pro doručení specifického radionuklidu do nemocné tkáně, která obsahuje značnou koncentraci cílového receptoru. Radioaktivně značený ligand se váže na receptor s vysokou afinitou a specifitou, výsledkem je selektivní vycytávání radiofarmaka. Radionuklid je zdrojem radiace a jeho výběr závisí na způsobu využití radiofarmaka. Bifunkční chelát je nutný pro radioaktivní značení biomolekuly kovovým radionuklidem. [7,8]

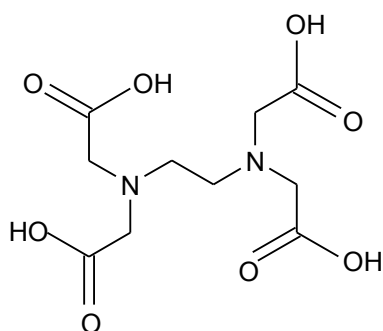
1.2.1 BIFUNKČNÍ CHELÁTY

Jako bifunkční se označují takové cheláty, které poskytují dvě vazebná místa. Jedno vazebné místo je vždy určeno pro radionuklid, u peptidově specifických radiofarmak je druhé vazebné místo vyhrazeno pro peptid. Přítomnost chelátu také většinou zvyšuje stabilitu komplexu, což je důležité, neboť pouze dostatečně stabilní komplex lze prakticky využít. U málo stabilního komplexu může dojít ke ztrátě nebo disociaci radionuklidu a to má za následek toxicitu, pokud se radiofarmakum používá k terapii, nebo vede ke špatné zobrazovací kvalitě v případě využití radiofarmaka pro diagnózu.

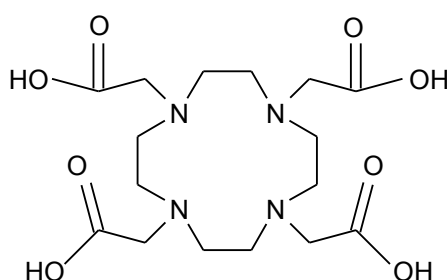
Radionuklidy se svými vlastnosti velmi liší, a proto neexistuje žádný bifunkční chelát vhodný pro všechny radionuklidy. Bifunkčních chelátů existuje celá řada, odlišují se svými vlastnostmi a vhodností použití pro jednotlivé radionuklidy. Mezi bifunkční cheláty patří ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina (DOTA). Tyto sloučeniny mají koordinační číslo 6-8. DOTA patří mezi makrocyclické cheláty a má 12členný kruh, dále existují cheláty s kruhem ještě větším, např. TETA s 14členným kruhem, která tvoří stabilní komplexy s radionuklidy mědi, PEPA s 15členným kruhem a HEHA s 18členným kruhem.



Obr. 1 DTPA - diethylentriaminpentaoctová kyselina



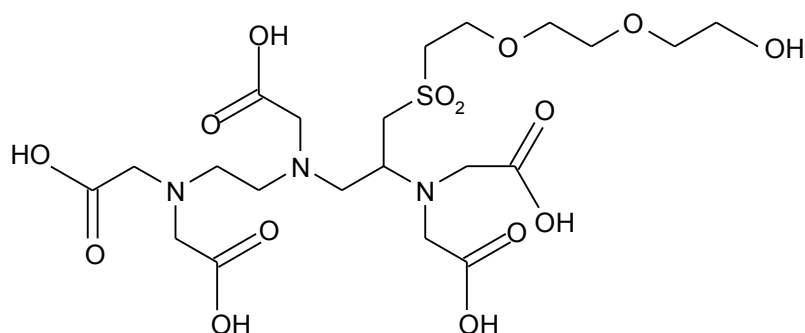
Obr. 2 EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina



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

Nové cheláty se dále vyvíjejí, většinou je jejich struktura odvozena od chelátů již známých, dochází k různým obměnám v postranním řetězci. [9]

V této rigorózní práci byl studován nový bifunkční chelát DTPA-oxn, byla stanovena jeho plazmatická vazebnost na bílkoviny krevní plazmy u čtyřech živočišných druhů (viz Experimentální část).



Obr. 4 DTPA-oxn

1.2.2 RADIONUKLIDY

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

Pro diagnostické účely jsou vhodné gama zářiče nebo pozitronové zářiče. Ideální jsou radionuklidy získané z generátoru, kde se dá jednoduše oddělit dceřiný radionuklid od mateřského radionuklidu pomocí výměnné chromatografie. Jsou to např. ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{111}In , $^{61,64}\text{Cu}$.

Pro terapii jsou vhodné jiné radionuklidy – při výběru je potřeba zvážit několik faktorů: absorpci a retenci v nádorové tkáni, clearanci, poločas, aktivitu, dostupnost, kvalitu a ekonomicky výhodnou možnost produkce ve velkém měřítku. Jsou to např. ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{186}Re . [7]

V poslední době se pro receptorově specifická radiofarmaka obsahující analoga somatostatinu nejvíce používají radionuklidy ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu . Tyto radionuklidy mají různé vlastnosti, kterými ovlivňují výsledek terapie, např. tím, že vyzařují různě velké částice o různé energii a rozdílně penetrují do tkání. ^{90}Y mnohem více penetruje do tkání, a proto se hodí pro větší nádory. Penetrace ^{177}Lu do tkání je mnohem menší, a proto se více hodí pro menší nádory. [11]

1.2.3 ZDROJE RADIONUKLIDŮ

Radionuklidy jsou pro účely nukleární medicíny uměle připravovány v jaderném reaktoru a cyklotronu. Jedná se o primární zdroje. Důležitý je také sekundární zdroj radionuklidů, představovaný radionuklidovými generátory.

V jaderném reaktoru se vyrábějí: ^{99}Mo , ^{131}I , ^{51}Cr , ^{32}P . Tyto radionuklidy se získávají ozařováním terčového materiálu v reaktoru nebo se izolují ze štěpných produktů (^{99}Mo , ^{131}I). Tato produkce je poměrně levná, protože v reaktoru lze ozařovat velké množství materiálů.

Výroba radiofarmak v urychlovačích částic (cyklotronech) probíhá tak, že se ozařuje vhodný terčový materiál protony, deuterony nebo jinými částicemi a vznikají např. ^{201}Tl , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{18}F , ^{11}C . Cyklotron urychluje částice v elektrickém poli, které dosahují až takové energie, že jsou schopny po dopadu na terčový

materiál vyvolat jadernou reakci. Při porovnání s výrobou v reaktoru je výroba v cyklotronu nákladnější.

Také je možné využít tzv. lékařské cyklotrony, kde se vyrábějí radionuklidy s velmi krátkým poločasem. Jedná se o pozitronové zářiče ^{11}C s poločasem přeměny 20 min., ^{13}N s poločasem přeměny 2 min. a ^{18}F s poločasem přeměny 110 min. Tyto cyklotrony se využívají přímo na pracovištích nukleární medicíny.

Na pracovištích nukleární medicíny se také používají radionuklidové generátory (např. $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{81}\text{Rb}/^{81\text{m}}\text{Kr}$, $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$). Základem je dvojice radioaktivních prvků – mateřský a dceřiný radionuklid. Mateřský radionuklid se přeměnou β^- nebo elektronovým záchytem mění na dceřiný radionuklid. Mateřský a dceřiný prvek se liší svými chemickými vlastnostmi, proto je lze od sebe oddělit a tento systém tak může sloužit k opakovanému získávání dceřiného radionuklidu. Velký význam generátorů spočívá v tom, že je lze snadno transportovat a že se může dceřiný radionuklid využívat i ve velké vzdálenosti od primárních zdrojů radionuklidů. Radionuklidový generátor $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ je tvořen kolonkou ze skla, která obsahuje oxid hlinitý s adsorbovaným molybdenanem amonným. Při přeměně ^{99}Mo vzniká $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který se ve formě technecistanu $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ z kolonky odloučí promytím generátoru sterilním fyziologickým roztokem (tomuto promytí se říká eluce). Použitelnost generátoru závisí na výchozí aktivitě, většinou je to přibližně 14 dní. [1,3]

1.2.4 TECHNECIUM

Vlastnosti technecia splňují požadavky kladené na radionuklid pro diagnostické radiofarmakum. Technecium má energii záření 140 keV a poločas přeměny 6 hodin. Získává se z $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátoru, tento generátor je možné využívat na pracovištích nukleární medicíny, poločas přeměny Mo je 67 hodin. Tímto způsobem se dá získat velmi jednoduše $^{99\text{m}}\text{Tc}$ s krátkým poločasem přeměny. Technecium je součástí sedmé vedlejší skupiny, jeho oxidační stav může být od -1 až +7; technecium jako součást radiofarmak se nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu +5, +4, +3, +1. Z generátoru se technecium získává jako $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$

v oxidačním stavu +7, jednoduchým zredukováním lze dosáhnout oxidačního stavu +5. [10]

Poločas přeměny ^{99m}Tc je velmi krátký, a proto se radiofarmaka obsahující tento radionuklid často připravují z průmyslově vyrobeného kitu. Kit je sterilní, nepyrogeenní a neradioaktivní směs, připravená lyofylizací ve skleněných lahvičkách. Kit se skládá z biomolekuly (zajišťující doručení radionuklidu na požadované místo v organismu), chelatační látky a redukčního činidla, pokud je to nezbytně nutné. Kit může obsahovat i další látky, např. antioxidanty, solubilizační látky, které zlepšují stabilitu ^{99m}Tc značených radiofarmak. Všechny složky kitu jsou rozpuštěny v pufru, který se používá pro kontrolu pH při procesu radioaktivního značení.

Je známo velké množství technik, pomocí nichž lze radioaktivně označit ^{99m}Tc . Výběr metody závisí na použité biomolekule. Tyto metody můžeme rozdělit do třech skupin: přímé značení, nejprve vznik komplexu radionuklidu s chelatační látkou a potom dochází ke značení a nepřímé značení. [7]

1.2.5 YTRIUM, LUTECIUM

V generátoru je také produkován radionuklid ^{90}Y , jedná se o $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ generátor. ^{90}Y se využívá pro terapii, protože vyzařuje vysoce energetické beta záření. Jeho poločas je 64 hodin. Během této doby stihne dosáhnout svého cíle v organismu a je to dostatečně dlouhá doba na to, aby se radiofarmakum mohlo vyrobit, transportovat a doručit pro klinické využití. ^{90}Y je velmi vhodným radionuklidem pro receptorově specifická radiofarmaka určená pro terapeutické účely.

Radionuklid ^{177}Lu je také vhodný pro terapeutické účely – vyzařuje záření beta a gama. Jeho poločas přeměny je 144 hodin, což je 6,75 dnů. Tento radionuklid se přepravuje v jaderném reaktoru. Výhodná metoda přípravy ^{177}Lu spočívá v ozáření ^{176}Lu v reaktoru. ^{177}Lu připravené touto metodou má dobrou aktivitu a nízkou cenu.

Jako lanthanoidy se označuje skupina 14 prvků, mezi než patří lutecium. Velmi podobné této skupině prvků je yttrium, má podobný náboj, iontový průměr a koordinační chemii. Yttrium se často pokládá za „pseudo-lanthanoid“.

Dobrý bifunkční chelát vhodný pro lanthanoidy a ^{90}Y musí splňovat několik podmínek. Musí tvořit komplex s vysokou termodynamickou stabilitou a kinetickou netečností. Kinetická netečnost určuje velikost disociace radionuklidu z komplexu s chelátem, např. komplexy s makrocyclickým chelátem jsou mnohem více kineticky stabilní oproti komplexům s DTPA. Bifunkční cheláty vhodné pro ionty Y a lanthanoidů jsou ty, které mají aspoň osm donorových atomů. Pro terapeutická radiofarmaka radioaktivně značená ^{90}Y a ^{177}Lu jsou DOTA a její deriváty velmi vhodné. Radionuklid a makrocyclický chelát tvoří komplexy velmi stabilní a s vysokou kinetickou stabilitou. Nevýhodou je, že kinetika radioaktivního značení komplexu DOTA a biomolekuly je pomalá a závislá na okolních podmínkách, jako je koncentrace DOTA-biomolekula, pH, teplota reakce, doba zahřívání a další. Při pokojové teplotě probíhá značení velmi pomalu a pokud má být radioaktivní značení úspěšné, je potřeba zahřát na vyšší teplotu ($> 50\text{ }^\circ\text{C}$).

Biomolekulu lze na bifunkční chelát připojit několika způsoby, které jsou popsány na příkladu s DOTA. Jeden z postupů spočívá v připojení biomolekuly přes jeden z uhlíkových atomů makrocyccklu. Druhý způsob znamená připojení biomolekuly na jedno ze čtyř chelatačních ramen, tvořených kyselinou octovou. Při třetím způsobu připojení se biomolekula konjuguje opět s jedním ze čtyř acetylů za vzniku této vazby CO-NH. [7]

2. FARMAKOKINETIKA

Farmakokinetika je podoborem farmakologie, zabývající se osudem léčiva v organismu. To znamená, že zkoumá změny koncentrace léčiva v měnícím se čase v různých kompartmentech organismu. Koncentrace účinné látky je důležitá a významná, protože na koncentraci látky v místě účinku závisí intenzita účinku. Koncentrace látky je často jediným rozhodujícím faktorem, zda se projeví žádaný účinek nebo toxické účinky dané látky. Koncentraci např. v místě účinku většinou nelze určit, velmi často však odpovídá koncentraci v krevní plazmě. Zpravidla se tedy měří koncentrace v krevní plazmě, její změny jsou určovány absorpcí, distribucí a eliminací, kterou můžeme rozdělit na chemickou přeměnu (biotransformaci) a vyloučení látky z organismu.

Během těchto pochodů se léčiva setkávají s buněčnými bariérami. Na úrovni absorpce se jedná o bariéru ve střevech, v dýchacích cestách, v kůži a v ústní sliznici – jsou to vnější bariéry organismu. Další bariéry, které ovlivňují distribuci, jsou tvořeny např. buňkami endotelu kapilár a buňkami ledvinného tubulu a dalšími. Pro farmakokinetiku je podstatné, aby aplikované látky dokázaly tyto bariéry překonat a dostat se na místo účinku. Společným prvkem těchto bariér jsou molekuly fosfolipidů, uspořádané ve dvojvrstvě. [12,13]

Vzhledem k tomu, že se většina radiofarmak aplikuje intravenózně, role absorpce v těchto případech není významná, důležitou roli tedy bude mít distribuce a eliminace. [3]

2.1 ABSORPCE

Aby léčivo mohlo působit, musí dosáhnout svého místa účinku, ve většině případů to tedy znamená, že musí proniknout do organismu, musí se absorbovat. Pouze výjimečně se totiž místo účinku léčiva nachází na povrchu těla, kde je přímo dostupné. Absorpce je přestup léčiva z místa podání do krevního řečiště. V případě aplikace přímo do krevního řečiště tento pochod odpadá.

Rychlost absorpce léčiva závisí na několika faktorech, mezi něž patří místo aplikace, léková forma přípravku a fyzikálně chemické vlastnosti léčiva. Absorpci ulehčují tyto faktory: nízká molekulární hmotnost, nepřítomnost elektrického náboje molekuly, dobrá rozpustnost látky v tucích, silné prokrvení, dobré předpoklady pro permeabilitu. [12,13]

2.2 DISTRIBUCE

Distribuce je dalším pochodem, který navazuje na předchozí absorpci. Léčivo dosáhlo krevního řečiště a teď probíhá jeho distribuce do tkání a orgánů. K rozpuštění látky může dojít v těchto prostorech: krevní plazma, intersticiální tekutina a intracelulární prostor. Dále se mohou léčiva navázat na tyto struktury: na plazmatické proteiny nebo na erythrocyty v krvi, na receptory ve tkáních, na fosfolipidovou dvojvrstvu membrán a na další. Většina léčiv se v organismu rozděluje nerovnoměrně, rovnoměrnému rozdělení brání bariéry a plazmatické struktury.

Distribuce léčiv je ovlivněna mnoha faktory, např. fyzikálně chemickými vlastnostmi léčiva, krevním průtokem, objemem krve. Velmi důležitým faktorem je vazebnost léčiv na plazmatické proteiny, protože pouze volná, nevázaná část léčiva se může dostat k místu účinku. Vazebnost je rozhodující také pro eliminaci, protože opět pouze volná, nevázaná část léčiva se může vyloučit z organismu. [12,13]

2.3 ELIMINACE

Pod tímto pojmem jsou shrnuty pochody, které vedou k odstranění léčiva z organismu. Eliminaci lze rozdělit do dvou dějů: biotransformace a vylučování. Rychlost eliminace je závislá na obou těchto pochodech. Výkonnost eliminačních orgánů se hodnotí pomocí farmakokinetického parametru clearance. Clearance je objem plazmy, který se za jednotku času očistil od účinné látky.

Při biotransformaci dochází ve většině případů ke snížení účinnosti a ke zvýšení rozpustnosti ve vodě, což je důležité pro usnadnění vylučování. Biotransformace probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku se mění struktura léčiva, např. oxidací, redukcí, hydrolýzou. Ve druhém kroku dochází ke konjugaci např. s kyselinou glukuronovou nebo sírovou.

Vylučování neboli exkrece vede k odstranění látek z organismu. Hlavními exkretními orgány jsou ledviny, dále také játra a plíce. Několik mechanismů se uplatňuje při vylučování látek ledvinami: glomerulární filtrace a aktivní tubulární sekrece. Kromě vylučování látek se zde též uplatňují mechanismy zpětné tubulární reabsorpce a pasivní zpětné difuze.

Struktura stěny cév v oblasti glomerulárních kapilár v ledvinách dovolí projít pouze molekulám do určité velikosti. Léčiva navázaná na bílkovinné proteiny přes tuto bariéru nemohou projít. Vyloučena mohou být pouze léčiva volná. [12,13]

V minulých letech se rozšířily znalosti o tubulární reabsorpci proteinů a peptidů na molekulární úroveň. Vzniklo rovněž několik racionálních postupů k redukci renální radioaktivity peptidů.

Syntetická analoga somatostatinu, jako je $^{111}\text{In-DTPA-Phe}^1\text{-oktreotid}$ a $^{90}\text{Y-DOTA-Tyr}^3\text{-oktreotid}$, se rychle filtrují přes glomerulus a výsledkem je rychlé odstranění z krevního oběhu. Po glomerulární filtraci dochází ke zpětné tubulární reabsorpci. Podle studií, které byly provedeny, lze po aplikaci peptidových radiofarmak lokalizovat radioaktivitu v ledvinách. Existují dvě strategie redukující renální radioaktivitu radiofarmak. Jednou z nich je inhibice tubulární reabsorpce, druhou je modulace metabolismu vsunutím spojovacího článku schopného metabolismu.

Jedním z mechanismů, který inhibuje tubulární reabsorpci, je její kompetitivní zablokování. Kompetitivní blokování spočívá v tom, že spolu s radiofarmakem se aplikuje látka, jež obsadí transportní mechanismy v ledvinných tubulech. Tyto transportní mechanismy mají pouze omezenou kapacitu a přednostně transportují tuto látku. K tomuto účelu se dá využít např. aminokyselina lysin. Lysin byl zkoumán v několika studiích, které měly slibné výsledky. Aminokyseliny je třeba

aplikovat v hyperosmolárním roztoku, což vede k několika nežádoucím účinkům, jako je např. hyperkalémie a zvracení.

Po redukci pozitivního náboje radioaktivně značených peptidů dochází ke snížení radioaktivity v ledvinách, protože klesá tubulární reabsorpce. Náboj u $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1$ -okterotidu lze změnit substitucí fenylalaninu (D-Phe) na jeho N-konci. Při substituci D-Phe L-asparágovou kyselinou vzniká $^{111}\text{In-DTPA-L-Asp}^1$ -okterotid, který má negativní náboj a nejmenší radioaktivitu v ledvinách. Při substituci D-Phe L-lysinem vzniká $^{111}\text{In-DTPA-L-Lys}^1$ -okterotid, který má pozitivní náboj a největší radioaktivitu v ledvinách. Při substituci D-Phe L-methioninem a L-fenylalaninem vzniká $^{111}\text{In-DTPA-L-Met}^1$ -okterotid a $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1$ -okterotid, jež mají neutrální náboj.

Do druhé skupiny strategií, které redukují renální radioaktivitu, patří modulace metabolismu. Ta spočívá v tom, že se do molekuly léčiva vsune článek, který je organismem metabolizován, čímž mění metabolismus aplikovaného léčiva. Cílem je vždy chránit ledviny, poskytovat ochranu tomuto důležitému orgánu, který bývá vystaven radioaktivitě a často prolongovaně, poněvadž zde dochází k hromadění radiofarmaka. [14]

2.4 VAZBA LÉČIV NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Na plazmatické bílkoviny se vážou téměř všechna léčiva vyskytující se v krevní plazmě. V krevní plazmě se vyskytuje několik typů proteinů, na něž se mohou léčiva vázat. Je to např. albumin, glykoproteiny a lipoproteiny. Další plazmatické bílkoviny (např. transferin, globulin vážící tyroxin) jsou důležité pro vazbu zcela specifických látek. Velikost vazby léčiva je závislá na jeho koncentraci a na afinitě k proteinům. Koncentrace plazmatických bílkovin je 66 – 85 g/l plazmy, z toho je 55 – 64 % albuminu. Plazmatické bílkoviny mají v organismu celou řadu úkolů, podílejí se na humorální imunitě, udržují onkotický tlak, transportují látky nerozpustné ve vodě, chrání některé látky před odbouráním a vylučováním. [13,15]

Vazba léčiva na plazmatické proteiny vzniká rychle a je reverzibilní, s každou změnou koncentrace volného léčiva dochází ke změně koncentrace vázaného léčiva. Podle všeobecně uznávané koncepce představuje vázané léčivo jakýsi typ skladiště, z něhož se léčivo postupně uvolňuje. Pouze volné léčivo může přestupovat z krevního oběhu na místo účinku a je k dispozici pro eliminaci, takže postupným přechodem léčiva z plazmy dochází k disociaci vazby mezi léčivem a plazmatickým proteinem, aby byla stále zachována rovnováha mezi volnou a vázanou koncentrací léčiva. Předpokládá se, že procento volné části léčiva není závislé na celkové koncentraci léčiva. Nicméně výsledky studií zabývajících se vazbou propofolu na plazmatické bílkoviny ukazují, že se volná frakce propofolu zvětšuje při klesající celkové koncentraci látky v roztoku albuminu. Při dalším výzkumu bylo objeveno, že důvodem tohoto neobvyklého chování je hydrofóbnost. Okolo plazmatických proteinů se vyskytuje hydratační obal, který tvoří bariéru pro hydrofobní molekuly a brání jejich přístupu k vazebnému místu na albuminu. Toto se netýká pouze propofolu, ale celé řady dalších látek. [16,17]

Krevní plazma obsahuje velké množství proteinů, které jsou schopné vazby, přesto je jejich kapacita omezena. Léčiva o vazebná místa na proteinech soutěží a také se s těchto vazeb navzájem vytěsňují, vazba je saturabilní povahy. Z důvodu tohoto soutěžení může dojít ke zvýšení koncentrace vytěsněného léčiva, čímž dochází ke zvýšení jeho účinnosti a také k rychlejšímu vylučování. [13] Pouze vysoká vazebnost dosahující hodnot nad 90 % má významný a podstatný vliv. Nebo se dá říci, že volná frakce nedosahující ani 10 % má významný a podstatný vliv. [18]

Vazbu léčiv na plazmatické bílkoviny ovlivňuje množství faktorů, jako jsou stavy nemoci, hlavně onemocnění jater, ledvin, štítné žlázy; dále také těhotenství, se změnou vazebnosti je třeba počítat u skupiny pediatrických a geriatrických pacientů. U těchto specifických případů je důležité stanovit koncentraci volné frakce léčiva, aby mohl být stanoven individuální dávkovací režim. [19]

2.4.1 LIDSKÝ SÉROVÝ ALBUMIN

Je to peptid tvořený jedním řetězcem, skládající se z 585 aminokyselin. Je složený z několika shodných, opakujících se domén, které se dále dělí na subdomény. Lidský sérový albumin se vyznačuje jedinečnou schopností vázat, kovalentně i reversibilně, velké množství látek, a to jak endogenních, tak exogenních. Reversibilně interaguje s širokým spektrem terapeutických látek. Na albuminu se vyskytuje několik míst, kde dochází k interakci mezi albuminem a jeho ligandem. Některá z těchto míst byla přesně popsána a byla určena jejich přesná poloha. [20,21,22]

Na koncentraci albuminu je závislá farmakokinetika léčiv, která se velmi silně vážou na albumin. Snížená koncentrace albuminu se vyskytuje při poruchách jater, u nefrotického syndromu nebo u špatného zdravotního stavu. Při nižší koncentraci albuminu dochází k zvyšování volné frakce a tím také ke změně farmakokinetiky. [22]

Místa s velkou afinitou pro vazbu jsou na albuminu omezena, vazba jednoho léčiva může ovlivnit současnou vazbu léčiva jiného. Hlavně je to významné pro léčiva, která soutěží o stejné vazebné místo. Informace o takovémto typu vlivu jsou důležité, protože změna vazebnosti má své následky ve změně farmakokinetiky. Je tedy užitečné pokusit se určit, na které místo se konkrétní léčivo bude vázat, aby se mohlo předejít případným interakcím. Nedá se tím však vždy všechno vyřešit, protože vazba léčiva může být ovlivněna i tím, že se jiný ligand naváže na plně jinou stranu albuminu a svou vazbou změní strukturu proteinu, čímž ovlivní jeho schopnost vazby. [20,21]

2.4.2 KYSELÝ α_1 -GLYKOPROTEIN (OROSOMUKOID)

Tento glykoprotein se skládá z 41 % sacharidů a 59 % proteinů, je negativně nabitý a mezi jeho funkce patří schopnost vázat léčiva (hlavně steroidy). Řadíme ho mezi transportní proteiny a uplatňuje se rovněž při patologických procesech. Působí jako projektivní faktor při infekci a proti toxinům, stimuluje některé buňky imunitního systému.

I na tomto proteinu se vyskytuje několik vazebných míst, na která se mohou vázat léčiva. Vznik této vazby je ovlivněn mnohými okolnostmi, jako je např. koncentrace ligandu a kyselého α_1 -glykoproteinu, pH, přítomnost dalšího ligandu soutěžícího o vazebné místo. Vliv má také věk, pohlaví, těhotenství, hormony, nemoci. [23]

2.5 STANOVENÍ VAZEBNOSTI

Vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny má významný vliv na jejich farmakokinetiku i farmakodynamiku. U léčiv se většinou uvádí jejich celková koncentrace, ale informace o koncentraci volné frakce léčiva mohou vést k lepšímu určení terapeutické odpovědi – hlavně u léčiv, jejichž vazebnost je vysoká. Aktivní je pouze volná frakce léčiva, určení volné frakce je základem terapeutického monitorování léčiv.

Existuje velké množství metod, které jsou určeny pro stanovení plazmatické vazebnosti léčiva. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody. Mezi často používané patří: mikrodialýza, rovnovážná dialýza a ultrafiltrace. Výběr metody pro určitý typ stanovení záleží na cíli práce a na chemických vlastnostech stanovované látky.

2.5.1 ROVNOVÁŽNÁ DIALÝZA

Tato metoda patří k často využívaným metodám. Mezi její výhody patří: kontrola teploty během stanovení, široká použitelnost a dostupnost dialyzačního aparátu (dialyzační aparát je popsán v experimentální části), možnost stanovení více vzorků najednou a použitelnost pro malé i velké objemy vzorků. Rovnovážná dialýza využívá semipermeabilní membránu, která propouští pouze molekuly do určité velikosti podle typu membrány. Běžně se využívají umělé membrány. Při srovnání umělých membrán s membránami biologickými výsledky ukazují, že obě tyto membrány jsou srovnatelně přesné. Výhoda biologických membrán tkví v tom, že k ustanovení rovnováhy je potřeba mnohem kratší čas a díky tomu jsou více spolehlivé. [19,24,25] Na jedné straně membrány se nachází plazma na druhé

straně membrány pufr. Stanovovaná látka může přecházet z jedné strany membrány na druhou (ale pouze nevázaná část látky) až do ustanovení rovnováhy, kdy se koncentrace se obou stranách membrány rovnají. Doba nutná pro ustanovení rovnováhy je pro každou látku jiná. Teplota během stanovení je obvykle 37 °C. Koncentrace léčiva po ustanovení rovnováhy v pufru je koncentrace nevázaného léčiva C_U . Koncentrace léčiva po ustanovení rovnováhy v plazmě je celková koncentrace léčiva C_T . Koncentraci navázaného léčiva C_B je možno vypočítat jako rozdíl mezi C_T a C_U .

$$C_B = C_T - C_U$$

Frakci nevázaného F_U a vázaného F_B léčiva lze vypočítat podle následujících rovnic:

$$F_B = C_B / C_T$$

$$F_U = C_U / C_T$$

K nevýhodám této metody patří: potřebný čas k ustanovení rovnováhy, degradace nestabilních proteinů, možnost vazby stanovované látky na dialyzační blok nebo na membránu. Negativní dopad na měření může také mít přestup tekutin do plazmy, je způsoben osmotickým tlakem proteinů a výsledkem je zředění plazmy. [19,24]

Donnanův efekt je dalším faktorem způsobujícím nepřesnost. Ustanovení rovnováhy je tímto efektem ovlivněno, pokud je přítomen koloidní elektrolyt. Koloidní kationt nebo aniont nemůže přes membránu prostupovat, ale přítomnost tohoto náboje na jedné straně membrány může ovlivnit pohyb malých nabitých iontů, což vede k tomu, že koncentrace malých nabitých iontů není stejná na obou stranách membrány. Některé výsledky v experimentální části uvádějí hodnoty volné frakce více než sto procent – tohoto výsledku lze dosáhnout právě v důsledku tohoto efektu. [19,26,27]

Metoda rovnovážné dialýzy se stále vyvíjí. Nově bylo představeno zařízení pro rychlou rovnovážnou dialýzu (Pierce Biotechnology), jehož výhodou je redukce doby potřebné pro ustanovení rovnováhy a lepší výkonnost. [28]

2.5.2 MIKRODIALÝZA

Mikrodialýza je technikou, jež umožňuje měření koncentrace léčiva. Základní rozdíl mezi běžným měřením koncentrace léčiva a mikrodialýzou spočívá v tom, že mikrodialýza změří koncentraci volné frakce léčiva, zatímco běžné měření určí celkovou koncentraci léčiva. Mikrodialýza se stala velmi rozšířenou a široce akceptovanou metodou. Umožňuje měření endogenních i exogenních látek v extracelulární tekutině obklopující mikrodialyzační sondu. Jako jediná dovoluje stanovení in vivo v plazmě, ve tkáních a dalších tělních tekutinách.

Dialyzační sonda obsahuje dialyzační membránu, která pokrývá špičku sondy. Tato sonda se implantuje do krevní cévy, tkáně či orgánu. Sonda je konstantním tokem perfundována odpovídajícím roztokem, např. krví či tkáňovým roztokem, malé molekuly difundují podle koncentračního gradientu směrem do sondy nebo pryč od sondy. Po potřebnou dobu se shromažďuje dialyzát, z něhož se určí koncentrace navázaného léčiva C_U . Pomocí této metody lze změřit pouze koncentraci nevázané části léčiva.

Velikou výhodou této metody je možnost využití in vivo. Používá se tedy k určení průniku léčiva do specifických orgánů, tkání a tělních tekutin. Nevýhodou je nutnost vložení sondy do cévy, tkáně či jiné tělní tekutiny. Objem získaného vzorku je poněkud malý, proto je potřeba použít k vyhodnocení velmi citlivé analytické metody. [19,24,29]

2.5.3 GELOVÁ FILTRACE

Gelová filtrace je metodou chromatografickou, která využívá chromatografickou kolonu. Základem ustanovení rovnováhy u této metody je rozdílná afinita stanovované látky ke dvěma nemísitelným fázím.

Před vlastním stanovením je potřeba vzorek upravit, je nutné saturovat vazebná místa bílkovin ligandem. Po této úpravě se vzorek nanese na kolonu a je eluován roztokem ligandu. Roztok ligandu se musí použít z toho důvodu, aby nedocházelo k disociaci komplexu bílkovina-léčivo.

Mezi nevýhody této metody patří její složitost a časová náročnost. Výhodou je možnost stanovení vazebnosti léčiv, jejichž vazebnost je velká, a to v malém objemu vzorku. [19,24,30]

2.5.4 VYSOKOÚČINNÁ FRONTÁLNÍ ANALÝZA (HPFA)

Jedná se o metodu chromatografickou, vyvinutou na základě gelové filtrace, která je vhodná pro stanovení volné koncentrace léčiva. Velkou výhodou je možnost přímé aplikace vzorku na kolonu, nástřik vzorku na kolonu může být dokonce plně automatizován. U této metody nedochází k absorpci léčiva na membránu ani k Donnanovu efektu. Současně je možné stanovit volnou i vázanou frakci léčiva. Při použití chirálních kolon, lze stanovit koncentraci volné frakce jednotlivých enantiomerů.

Vzorek se dá aplikovat bez předchozí úpravy v případě použití vhodných stacionárních fází, jako jsou reverzní fáze. Na kolonu se přímo nanese roztok bílkovin s navázaným léčivem. Nejprve po aplikaci vzorku dochází k uvolnění léčiva z vazby na bílkoviny v důsledku zředění vzorku mobilní fází. Volné léčivo proniká do mikropórů stacionární fáze a zde je zadržováno. Dalším nanášením vzorku na kolonu se zvyšuje objem vzorku a uvolňování léčiva z vazby je potlačeno. K ustanovení rovnováhy dochází v horní části kolony. Rovnováha je mezi koncentrací léčiva v mikropórech stacionární fáze a volnou koncentrací léčiva v mobilní fázi v intersticiu (mimo póry). Koncentrace bílkovin je stejná jako koncentrace bílkovin v prvním roztoku, to znamená, že volná koncentrace léčiva je také stejná. Po ukončení nanášení vzorku dochází k eluování nenavázaného léčiva mobilní fází. [19,24,30,31]

2.5.5 ULTRAFILTRACE

Ultrafiltrace je metoda jednoduchá, rychlá a účinná. Tato metoda nevyužívá nefyziologický pufr, který je třeba použít např. u rovnovážné dialýzy, což je určitě výhodou. K nevýhodám patří např. vazba léčiva na membránu a růst koncentrace

bílkovin během stanovení, čímž dochází k ovlivňování rovnováhy, a proto je vhodné čas ultrafiltrace co nejvíce zkrátit.

U této metody se plazma obsahující léčivo umístí do filtrační jednotky. Tato jednotka má filtr, který propouští pouze molekuly s nízkou molekulovou hmotností. Provedení ultrafiltrace může být dvojitý: pomocí centrifugace (negativní tlak) nebo přetlaku (pozitivní tlak). Během procesu filtrování se ultrafiltrát objevuje ve spodní části ultrafiltrační jednotky, ultrafiltrát obsahuje nevázané léčivo C_U . [19,24,30]

3. RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ PEPTIDY

Peptidy jsou malé molekuly o nízké molekulové hmotnosti, obvykle menší než 10 000 kDa a s méně než 100 aminokyselin. Peptidy používané v nukleární medicíně se obvykle skládají z malého množství aminokyselin (většinou do 30), takto malé peptidy nemají jasně definovanou terciární strukturu. V porovnání s většími peptidy či protilátkami se dají relativně jednoduše připravit. Díky nejasně definované a často chybějící terciární struktuře je jednodušší je radioaktivně označit, lépe si zachovávají svoji celistvost a jsou méně citlivé na chemické podmínky reakce radioaktivního značení. Pro radioaktivní značení těchto peptidů se používají různé radionuklidy. Nejvíce využívány jsou ^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In . Při radioaktivním značení se také často využívá bifunkční chelát jako spojovací článek mezi peptidem a radionuklidem.

Farmakokinetika peptidů je obvykle velmi rychlá, rychle se distribují do tkání, rychle přecházejí z cirkulace do eliminačních orgánů. Jejich hydrofilita zvyšuje renální clearance, zatímco více lipofilní peptidy se převážně vylučují hepatobiliární exkrecí. Rychlý metabolismus a vylučování radioaktivně značených peptidů snižuje potenciální hromadění radiofarmaka v cílové tkáni.

Jedním z problémů aplikace proteinů je často jejich krátký biologický poločas v důsledku rychlého rozštěpení proteolytickými enzymy. Toto proteolytické štěpení může být inhibováno molekulární modifikací, jako je například substituce D aminokyselin za L aminokyseliny, začlenění aminoalkoholů nebo neobvyklých aminokyselin či přidání postranního řetězce.

Po objevení peptidových receptorů a možnosti syntézy biologicky aktivních peptidů bylo zjištěno, že tyto molekuly mohou poskytnout nový úspěch v radiofarmaceutickém výzkumu. U mnoha případů nádorových onemocnění dochází ke zmnožení receptorů, a proto jsou tyto receptory atraktivním cílem při zobrazování nádorů. [32,33,34]

Receptory vyskytující se na určitém typu nádorové tkáni specificky vážou určitý typ peptidu. Po radioaktivním označení peptidu je možné tento peptid využít pro neinvazivní identifikaci, lokalizaci a terapii nádorů. Jsou to receptorově specifická

radiofarmaka, jejichž využití je založeno na tom, že receptor nádorové tkáně je schopen specificky vycytávat radioaktivitu aplikovaného radiofarmaka. [33,35]

Malé peptidy si získaly velkou pozornost jako biologický prostředek k doručení radioaktivity k nádorovým buňkám. Nádorové buňky mají na svém povrchu receptory, které jsou specifické pro každý typ nádoru a selektivně vážou specifický peptid. Tato interakce receptoru s peptidem umožňuje doručení radioaktivity k cílové tkáni. Pozornost si peptidy získaly také díky mnohým výhodám, jež mají v porovnání s proteiny a protilátkami. Mezi výhody peptidů patří: malá velikost, snadná příprava, jednoduché radioaktivní značení, tolerance podmínek nutných při radioaktivním značení, schopnost připojit se na bifunkční chelát, modifikovatelnost jejich cesty exkrece, rychlá clearance z krve a necílových tkání, vysoká penetrace do nádorové tkáně, nízká toxicita, nízká imunogenita a vysoká afinita a specifita k receptorům. [36]

Nejčastěji se používají analoga fyziologického somatostatinu. Použití analog somatostatinu je možné označit za úspěšné, ale pouze omezená skupina typu nádorů má na svém povrchu somatostatinové receptory. Dále se využívají nebo studují další typy peptidů, kterými jsou např. vazoaktivní intestinální peptid (VIP), bombesin, cholecystokinin, gastrin a mnoho dalších.

Stále je zde snaha o zlepšení již známých peptidů a vývoj nových analog peptidů, aby se zvětšil počet nádorů, jež mohou být diagnostikovány a léčeny pomocí peptidů. S tímto vývojem nových peptidů, které se s vysokou afinitou vážou na receptory nádorové tkáně, se výrazně zvyšují dostupné prostředky radionuklidové terapie nádorů. Radionuklidová terapie používající radioaktivně značené peptidy je proto velice slibným prostředkem pro léčbu nádorů, zvláště při použití v kombinaci s jiným způsobem terapie nebo při použití kombinace různých peptidů a různých radionuklidů. [33,35]

3.1 VÝVOJ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ

Objevení skutečnosti, že na některých typech nádorů se ve zvýšeném počtu vyskytují určité typy receptorů pro peptidy, poskytuje základ pro výzkum nových nádorově specifických radiofarmak. Přirozené peptidy se vyznačují vysokou afinitou k receptorům. Pro radioaktivně značené peptidy je důležité, aby měly aspoň stejnou nebo dokonce vyšší afinitu než přirozené peptidy. Peptid, který se má využít jako radiofarmakum, by měl být takový, aby bylo možné ho radioaktivně označit a aby byl stabilní při fyziologických podmínkách. Nový peptid by se také měl vyznačovat tím, že bude ve velké míře vychytáván nádorem a nebude zadržován zdravou tkání. Hlavní kroky zahrnuté do vývoje radioaktivně značených peptidů pro klinické využití jsou nastíněny v následujícím schématu. [37]

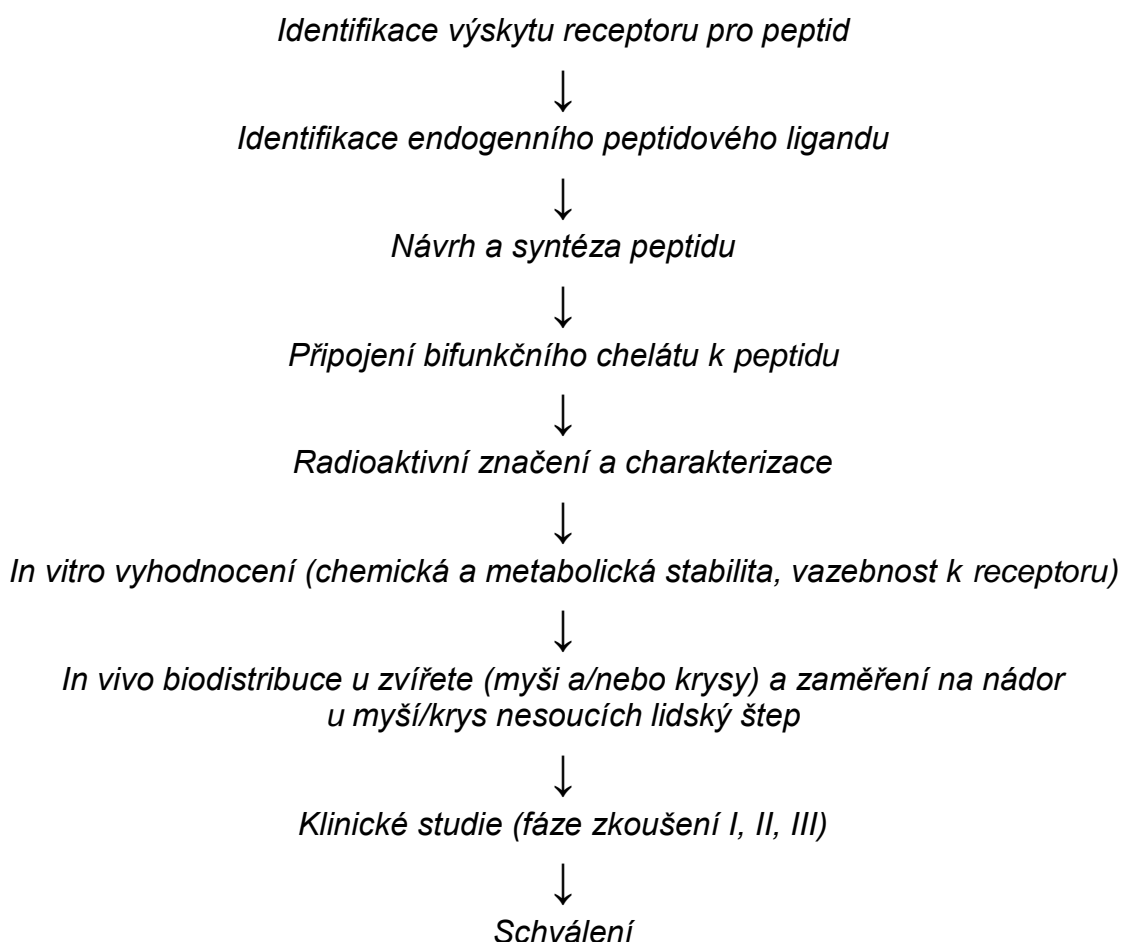


Schéma 1 Hlavní kroky při vývoji nových, na peptidech založených radiofarmak

3.2 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ PEPTIDŮ

Peptidy mohou být radioaktivně označeny několika radionuklidy. Pro každý z těchto vhodných a k tomuto účelu použitelných radionuklidů byla vyvinuta technika pro radioaktivní značení. Výběr radionuklidu závisí na mnoha faktorech, některé se využívají častěji než jiné, ale všechny mají své výhody i nevýhody. Velmi často využívaným radionuklidem je ^{99m}Tc . Jednotlivé metody značení tedy popíši při použití tohoto konkrétního radionuklidu.

Existuje velké množství technik značení ^{99m}Tc . Výběr metody závisí na biomolekule a na záměru studie, záměrem studie může být důkaz koncepce nebo vývoj výrobku. Tyto metody můžeme rozdělit do třech hlavních skupin: přímé značení, nepřímé značení a metoda předznačení, kdy nejprve dochází ke vzniku komplexu radionuklidu s chelatační látkou.

První skupina používá postup přímého značení. Obvykle se využívají redukční látky, jež redukují disulfidické můstky na volné thioly. Volné thioly mohou silně vázat Tc. Tento postup je jednoduše proveditelný, ale použitelný pouze u molekul obsahujících disulfidické můstky. Při přímém značení často vznikají komplexy, které mají nízkou in vivo stabilitu.

Druhou skupinu technik značení reprezentuje postup, který se někdy označuje jako nepřímé značení. Spočívá v tom, že nejdříve dochází k vytvoření komplexu mezi biomolekulou a chelatační látkou a teprve potom se může značení dokončit přímou redukcí $^{99m}\text{TcO}_4^-$ v přítomnosti komplexu biomolekuly a chelatační látky.

Třetí skupinu technik značení představuje postup, při němž nejdříve vzniká komplex radionuklidu s chelatační látkou. Teprve potom dochází ke spojení tohoto komplexu s biomolekulou v odděleném kroku. Tento postup má lépe definovanou chemii (jako je oxidační stav Tc, počet vazeb Tc) a biomolekula není vystavena podmínkám chelatace, které jsou někdy velmi drsné.

Navázání bifunkčního chelátu na peptid může ovlivnit farmakokinetiku tohoto peptidu. Při radioaktivním značení je důležité, aby zůstala zachována afinita peptidu k receptoru. Ke značení tedy musí dojít na takovém místě peptidu, které je

dostatečně vzdáleno od oblasti, jež se váže na receptor. Výběru bifunčního chelátu je tedy třeba věnovat velkou pozornost. [36,38]

3.3 RECEPTORY VYSKUTUJÍCÍ SE NA NÁDORECH

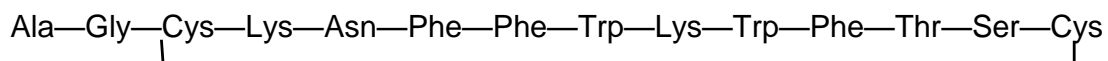
Tyto receptory hrají důležitou roli ve vývoji rakoviny a v růstu nádorů a byly jedny z prvních cílů při nádorově specifické terapii. Znalost výskytu receptorů je klíčem k terapii zacílené na nádorovou tkáň.

Společná všem receptorům je interakce mezi ligandem a receptorem, výsledkem této interakce je biochemická nebo fyziologická reakce. Interakce receptoru s ligandem může aktivovat nebo inhibovat jednotlivé procesy skrze různé mechanismy. Ligandy, které způsobí fyziologickou změnu vazbou na receptor, jsou obvykle nazývány jako agonisté. Ligandy, které se vážou na receptor a blokují navázání agonisty na receptor, ale neaktivují žádnou změnu, jsou označovány jako antagonisté. Antagonisté jsou často léčiva, která působí jako receptorově specifické ligandy.

Interakce ligandu s receptorem je bimolekulární chemická reakce. Koncentrace receptoru je obvykle velmi nízká. Receptorově specifické ligandy se vážou na receptor s vysokou afinitou a často mají velmi nízkou rychlost disociace. Kombinace nízké receptorové koncentrace a vysoké afinity ligandu k receptoru vede k nízké celkové kapacitě vazebnosti receptorů. Tato vlastnost je prospěšná pro terapii, kde je cílem nasytit receptory antagonistou a zabránit aktivaci receptorů agonistou. [39]

3.4 SOMATOSTATIN

Somatostatin je malý cyklický hormon, který se v lidském těle vyskytuje ve dvou formách, jednou je somatostatin-14, obsahující 14 aminokyselin, a druhou je somatostatin-28, obsahující 28 aminokyselin.



Obr.5 Somatostatin-14

Vyvolává různorodé biologické účinky skrze interakce se specifickými somatostatinovými receptory (sst_s) v cílových tkáních. Somatostatin inhibuje různé fyziologické funkce v gastrointestinálním traktu, jako je gastrointestinální motilita, produkce žaludečních kyselin, sekrece enzymů ze slinivky a sekrece žluče. Inhibuje sekreci hormonů vylučovaných pankreatem a střevy, jako je insulin, glukagon, sekretin. Dále asi kontroluje proliferaci buněk v normální a nádorové tkáni.

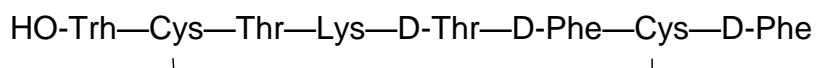
Somatostatinové receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Takovýto receptor se typicky skládá z jednoduchého peptidového řetězce, který několikrát opakovaně prostupuje buněčnou membránou – těchto transmembránových domén je většinou sedm. Extracelulární doména obsahuje vazebné místo pro ligand. Na intracelulární doméně dochází k interakci se sekundárním poslem. V současné době je známo pět různých typů sst_s, podtyp: sst₁, sst₂, sst₃, sst₄, sst₅. Sst_s jsou kódovány pěti různými geny, každý z nich má zřetelnou lokalizaci na daném chromozómu. Přestože jednotlivé podtypy sst_s jsou ze 40 až 60 % homogenní, každý podtyp zprostředkovává odlišné biologické reakce na somatostatin.

Nádory vznikající z cílových tkání pro somatostatin často na svém povrchu mají somatostatinové receptory. Na většině nádorů obsahujících somatostatinové receptory můžeme současně nalézt několik typů těchto receptorů. Existuje zde však významná variabilita mezi jednotlivými typy nádorů i mezi jednotlivými nádory stejného typu v tom, který subtyp receptoru se na nich vyskytuje nejčastěji. Na nádorech pankreatu a trávicího systému se převážně vyskytuje sst₂, a to u 80 % těchto nádorů. [40,41, 44]

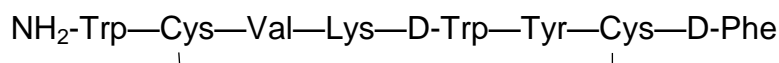
3.4.1 ANALOGA SOMATOSTATINU

Praktickému využití somatostatinu brání jeho příliš krátký biologický poločas. Po intravenózním podání je jeho biologický poločas v cirkulaci méně než 3 minuty. Proto byla vyvinuta analoga somatostatinu, která mají odlišnou sekvenci aminokyselin, čímž se jejich biologický poločas prodlouží. Prvním byl oktreotid s biologickým poločasem po podkožním podání 2 hodiny. Na rozdíl od fyziologického somatostatinu, který se stejnou afinitou váže na všechny typy svých receptorů, oktreotid se s vysokou afinitou váže pouze na sst₂ a sst₅. [40]

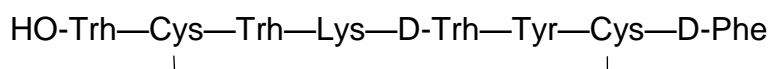
Podobnou afinitu k jednotlivým somatostatinovým receptorům mají i další analoga somatostatinu, jimiž jsou lantreotid, vapreotid, oktreotát. S velkou afinitou se vážou na sst₂, s mnohem menší afinitou se vážou na sst₃ a sst₅, vůbec se neváží k sst₁ a sst₄. [43]



Obr. 6 Oktreotid



Obr. 7 Valpreotid



Obr. 8 Oktreotát

Tyto peptidy mohou být radioaktivně značeny několika radionuklidy. Kvůli lepší stabilitě radioaktivně značených peptidů se také využívají bifunkční cheláty, jež zvyšují jejich stabilitu. Z radionuklidů se uplatňuje ¹¹¹In, které se používalo jako první. Makrocyclické cheláty umožňují použití ⁹⁰Y a ¹⁷⁷Lu, peptid značený pomocí

^{90}Y je vhodnější pro větší nádory, naopak peptid značený ^{177}Lu poskytuje lepší výsledky u menších nádorů. Velice efektivní také může být aplikace obou dvou.

U většiny pacientů s karcinoidním a gastroenteropankreatickým nádorem léčba oktreotidem způsobila rychle zlepšení klinických symptomů, jako je průjem, dehydratace, hypokalémie, hypoglykemický záchvat, nekrotické léze na kůži. Na druhou stranu u většiny pacientů došlo k desenzibilizaci inhibice hormonální sekrece během týdnů až měsíců. Potenciální mechanismus zodpovědný za desenzibilizaci a za značnou různorodost v délce trvání odpovědi na terapii oktreotidem není přesně znám. Mohlo by se například jednat o změnu v počtu receptorů, a to snížení jejich počtu („down-regulation“), může to být následek vzrůstu klonů buněk negativních na somatostatinové receptory a další.

Mechanismy, které určují množství radioaktivně značeného analoga somatostatinu zachyceného nádorem, zahrnují: stabilitu radiofarmaka, hustotu exprese sst receptorů na nádoru, typ sst receptorů, afinitu radiofarmaka k receptorům, množství aplikovaného peptidu. [40,42]

Léčba s radioaktivně značenými analogy somatostatinu je velmi slibným novým nástrojem u pacientů s neoperovatelnými nádory nebo s metastázami u neuroendokrinních nádorů. Výsledky získané s [^{90}Y -DOTA⁰,Tyr³] oktreotidem a [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³] oktreotátem jsou velmi povzbudivé. [45] Cílem terapie je eliminace nádorových buněk, limitujícím faktorem dávkování radiofarmak jsou kostní dřeň a ledviny. Významné zadržování radioaktivních látek v ledvinách může např. snížit citlivost detekční metody pro zobrazení menších nádorů nebo tím ledviny poškodit. [46] Podle jedné studie provedené s DOTA oktreotidem i oktreotátem, radioaktivně označenými ^{111}In , se ^{111}In -DOTA-oktreotát více kumuluje v ledvinách v porovnání s ^{111}In -DOTA-okterotátem. [47]

Údaje týkající se antiproliferativních vlastností analog somatostatinu a jejich role v terapii neuroendokrinních nádorů jsou velmi různorodé, a proto jsou těžko analyzovatelné. Tako skutečnost se dále komplikuje různorodostí nádorů, použitím různých typů analog v různém dávkování. Přesto jsou analoga somatostatinu velmi užitečným a slibným typem terapie. [48]

3.4.2 NEUROENDOKRINNÍ NÁDORY

Neuroendokrinní nádory (NET) obsahují heterogenní skupinu nádorů difuzního endokrinního systému. Tento systém obsahuje endokrinní žlázy, jako je hypofýza, příštítná tělíska, dřeň nadledvin, štítnou žlázu, pankreas a buňky rozptýlené mezi buňkami trávicího traktu a respiračního traktu. Rozlišujeme dvě hlavní skupiny neuroendokrinních nádorů: gastroenteropankreatické nádory a karcinoidní nádory. Neuroendokrinní nádory mohou mít agresivní chování a být velice maligními, ale velká většina těchto nádorů je benigní nebo aspoň pomalu rostoucí s mnoha odlišnými rysy. Protože somatostatinové receptory se hlavně vyskytují na těchto nádorech, představují tyto nádory hlavní skupinu pro terapii pomocí peptidů. [46,42]

Léčebné postupy pro tyto typy nádorů jsou velmi podobné díky jejich často podobnému chování, charakteristickým, dobře rozlišeným histologickým rysům a schopnosti vylučovat neuropeptidy, jež mají za následek charakteristické klinické syndromy. Léčebných postupů je celá řada – od různých chirurgických řešení až po využití receptorově specifické radioterapie. [49]

3.4.3 [⁹⁰Y-DOTA⁰,Tyr³] OKTRETID A [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰,Tyr³] OKTRETÁT

Radioaktivně značené peptidy emitující β záření mají větší terapeutický potenciál, protože částice, které emitují, mají dostatečnou energii způsobit poškození buněk bez moc hluboké penetrace do okolní tkáně. Vysoko energetické β částice připojené na somatostatinová analoga mohou potenciálně doručit letální dávku radiace k nádoru pozitivnímu na somatostatinové receptory s minimálním poškozením zdravé tkáně.

DTPA-oktreotid není vhodný pro radioaktivní značení pomocí ⁹⁰Y, což je energeticky čistý β zářič. Pro ⁹⁰Y je vhodnější DOTA, výsledné komplexy mají mnohem větší stabilitu.

Počáteční biodistribuční studie ukazují, že vysoká dávka je absorbována slezinou, ledvinami a nádorem. Aplikace ⁹⁰Y-DOTATOC má pouze malé riziko, že způsobí

myelotoxicitu, ale s potenciálem, že vysoké radiační dávky budou vystaveny ledviny a slezina. Ledviny byly označeny za dávku limitující tkáň.

Díky vlastnostem ^{90}Y mají radiofarmaka značená tímto izotopem lepší výsledky u větších nádorů, Radiofarmaka značená ^{177}Lu jsou vhodnější pro menší nádory, protože nepoškodí tolik okolní tkáň nádoru. Další způsob terapie je použití radiofarmaka s ^{177}Lu i s ^{90}Y .

^{177}Lu -DOTA⁻oktreotát má větší afinitu k sst_2 než ^{90}Y -DOTA-oktreotid, což znamená větší dávku radiace pro nádor. Ledvinami jsou oba tyto peptidy absorbovány podobně, takže ^{177}Lu -DOTA⁻oktreotát má výhodu v tom, že se k nádoru dostane vyšší dávka, ale dávka pro ledviny je stejná. [46]

Peptidy konjugované s DOTA, jako je DOTA-oktreotit a DOTA-oktreotát, mohou být radioaktivně označeny těmito radionuklidy ^{177}Lu , ^{90}Y a ^{111}In . Aby se mohly tyto značené peptidy úspěšně použít, musí zůstat zachována jejich specifická aktivita. Tato aktivita je ovlivněna několika biologickými faktory. Například množství aplikovaného radioligandu je omezeno afinitou a množstvím receptorů. Podáním větší dávky, než je dávka optimální, dochází ke kompetici mezi radioaktivně nenaznačeným ligandem a radioaktivně označeným ligandem na receptoru, čímž se snižuje jeho vychytávání i dávka radioaktivity pro cílovou tkáň. Reakční kinetika těchto třech radionuklidů (^{177}Lu , ^{90}Y , ^{111}In) optimálně probíhá při pH 4 – 4,5. [50]

3.5 GASTRIN

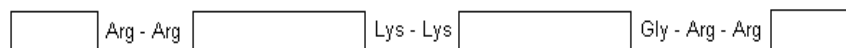
Jako mnoho jiných peptidů, také gastrin vzniká z prekurzorů, počáteční produkt translace genu pro gastrin je velká molekula preprogastrinu (101 aminokyselin). Z této molekuly vzniká zkrácením o signální peptid progastrin (80 aminokyselin). Po dalším zkrácení řetězce vzniká gastrin prodloužený o glycin a v posledním kroku vzniká amidovaný gastrin. [51]

Gastrin byl původně identifikován jako stimulant sekrece žaludeční kyseliny. Produkují ho hlavně G buňky žaludeční dutiny a horní část tenkého střeva.

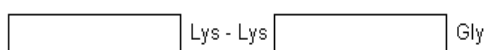
PREPROGASTRIN



PROGASTRIN



GASTRIN (34) - proudloužený o glycin



GASTRIN (17)



Obr. 9 Vznik gastrinu

Gastrinu se velmi podobá cholecystokinin (CCK), který je syntetizován v duodenu a je odpovědný za sekreci pankreasu. Oba dva tyto peptidy mají shodný C konec. Působení cholecystokininu je zprostředkováno dvěma receptory, a sice CCK-A a CCK-B. CCK-A má nízkou afinitu ke gastrinu, naopak CCK-B má vysokou afinitu ke gastrinu. Tyto dva typy receptorů jsou spojené s G-proteinem. Gastrin vykazuje malou aktivitu k receptorům, které se nacházejí na močovém měchýři, na hladké svalovině žaludku a na slinivce břišní. Naopak má gastrin vysokou afinitu na gastrinové receptory, které se nacházejí na žaludeční mucosa, na mozku a na endokrinní části slinivky břišní. Gastrinové receptory se také ve velkém množství nacházejí na některých typech nádorů. Vzhledem k výskytu těchto receptorů na nádorech se zdá, že jsou slibným cílem pro diagnózu a terapeutickou aplikaci radioaktivně značených analogů gastrinu. [36,51,52,53]

Gastrin hraje vícefunkční roli v podporování karcinogenního procesu. U mnoha nádorů se vyskytuje gen pro gastrin, různými mechanismy je regulován jeho abnormální výskyt. Podle toho, kde k tomuto výskytu dojde, typu tkáně a velikosti výskytu dochází k odlišným procesům s prekurzorem gastrinu a vznikají různě biologicky aktivní peptidy, formy gastrinu. Reagují přes cholecystokininové receptory a ovlivňují expresi dalších genů, působících např. na přežívání buněk, nebo angiogenesi. [51,53,55]

Minigastrin byl popsán jako velmi vhodný pro in vivo zaměřování výskytu CCK-B receptoru díky své vysoké afinitě k tomuto receptoru. Přítomnost sekvence těchto aminokyselin (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) na C-konci peptidu je rozhodující pro afinitu peptidu k receptoru.



Obr. 10 Minigastrin (MG-1)

Kvůli lepší stabilitě radioaktivně značeného minigastrinu se využívají bifunkční cheláty, jako je např. DTPA nebo DOTA. DOTA je cyklickým chelátem a oproti acyklické DTPA tvoří stabilnější komplexy s minigastrinem. [36,52,54]

3.6 VAZOAKTIVNÍ INTESTINÁLNÍ PEPTID (VIP)

VIP je peptid, který se skládá z 28 aminokyselin. Původně byl objeven v duodenu prasat a má široké spektrum biologických účinků. VIP je potenciální vasodilatátor a stimulant sekrece různých hormonů. Navíc je též důležitým imunomodulátorem a podporuje růst a proliferaci normálních i maligních buněk. Byly charakterizovány dva receptory s podobnou afinitou pro VIP. Tyto receptory se vyskytují na různých nádorových buňkách. Klinické studie s VIP radioaktivně značeným ¹²³I ukázaly jeho slibné použití při zobrazování nádorů. K tomuto účelu je také možné radioaktivně označit tento peptid pomocí ^{99m}Tc. Nicméně až další klinické studie ukážou užitečnost tohoto peptidu při zobrazování nádorů. [36]

3.7 BOMBESIN

Bombesin byl poprvé izolován s kůže žáby. Jedná se o neuropeptid, který se skládá ze 14 aminokyselin a má vysokou afinitu k receptoru pro gastrin uvolňující peptid. Bombesin a gastrin uvolňující peptid, který se skládá z 28 aminokyselin,

mají podobné biologické vlastnosti a téměř shodnou sekvenci aminokyselin na C-konci. Celkem byli identifikovány čtyři typy receptorů pro tyto peptidy. Tyto receptory se také vyskytují na různých typech nádorů, a proto lze radioaktivně značený bombesin využít pro jejich lokalizaci. V poslední době bylo k tomuto účelu vyvinuto několik analogů bombesinu. Pro vazbu na receptor a biologickou aktivitu je důležité zachování sekvence aminokyselin na C-konci peptidu. Ke značení může být použito více typů radionuklidů. [36]

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. POUŽITÉ MATERIÁLY, PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1.1 Testované látky

- Komplex ^{99m}Tc -DTPA

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

- Komplex ^{90}Y -DTPA-oxn

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

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

- Komplex ^{177}Lu -DOTA-TATE

Pro přípravu komplexu byl použit $^{177}\text{LuCl}_3$ rozpuštěný v 40 mM HCl, 50 – 100 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4 M acetátového pufru o pH 5 a k 10 μl DOTA-Tyr³-oktreotátu v roztoku 0,1 % kyseliny trifluoroctové. Tento komplex byl připraven Doc. Ing. Alicí Lázníčkovou, CSc., z katedry biofyziky a fyzikální chemie.

Před provedením vazebnostního experimentu bylo 100 μl komplexu ^{177}Lu -DOTA-TATE zředěno 10 ml fosfátového pufru o pH 7,41.

- Komplex ^{177}Lu -DOTA-MG-1

Minigastrin je peptid o molekulové hmotnosti 1403,5, který se skládá z těchto aminokyselin: D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂.

Pro přípravu komplexu bylo použito 200 μl 0,4 M acetátového pufru o pH 5, 10 μl vodného roztoku DOTA-MG a 50 – 100 μl roztoku izotopu $^{177}\text{LuCl}_3$ v 40 mM HCl. Tento komplex byl připraven Doc. Ing. Alicí Lázníčkovou, CSc., z katedry biofyziky a fyzikální chemie.

Před vlastním prováděním experimentu byl komplex zředěn 10 ml fosfátového pufru o pH 7, 41.

1.2 Biologický materiál

Při experimentech byla použita plazma čtyř živočišných druhů:

- Lidská plazma – odebraná zdravému dárci, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Hovězí plazma – heparinizovaná krev, dodaná společností LabMediaServis, s. r. o., centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Králičí plazma – heparinizovaná krev, odebraná králíkovi plemene Český albín, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.
- Potkání plazma – heparinizovaná krev, odebraná potkanovi kmene Wistar, centrifugací došlo k oddělení plazmy a ta byla použita pro experimenty.

1.3 Látky pro stanovení radiochemické čistoty

- Pro stanovení radiochemické čistoty $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA byly potřebné dvě chromatografické soustavy – jedna s ethanolem a druhá s 0,9% roztokem NaCl.

- Pro stanovení radiochemické čistoty ^{90}Y -DTPA-oxn byl použit jako chromatografická soustava acetátový pufr o pH 6,5, připravený z jednoho dílu 10% octanu amonného a jednoho dílu metanolu.
- Radiochemická čistota ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1 byla stanovena pomocí tenkovrstvé chromatografie.
- Chromatografický papír ITLC SG (Silica Gel Impregnated Glass Fibre Sheets), Gelman Sciences Inc.
- Radiochromatograf Automatic TLC – Linear Analyzer, BERTHOLD.

1.4 Přístroje na měření aktivity

Aktivita radioaktivně značených vzorků byl stanovena pomocí gamaspektrometru 1480 WIZARD od firmy WALLAC.

Pro stanovení plazmatické vazebnosti metodou rovnovážné dialýzy jsem použila dialyzační blok.

1.5 Další pomocné látky

Pufr o pH 7,41, připravený ze dvou dílů roztoku KH_2PO_4 (0,9075 g/100 ml) a z osmi dílů Na_2HPO_4 (2,39 g/100 ml) – použit pro rovnovážnou dialýzu.

2. METODIKA

2.1 Stanovení radiochemické čistoty

Radiochemická čistota studovaných látek byla ověřena metodou tenkovrstvé chromatografie (TLC) s pomocí chromatografického papíru ITLC SG.

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

Vzorek komplexu ^{90}Y -DTPA-oxn jsem automatickou pipetou v množství 10 μl naněla na start, nechala vysušit a potom vyvinout v pufru o pH 6,5. Po vysušení jsem chromatogram vyhodnotila na přístroji Automatic TLC – Linear Analyzer.

Radiochemická čistota komplexů ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1 byla ověřena pomocí tenkovrstvé chromatografie. Stejně jako přípravu těchto komplexů i ověření jejich čistoty provedla Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc., z katedry biofyziky a fyzikální chemie.

2.2 Stanovení vazebnosti na plazmatické bílkoviny

Metodou rovnovážné analýzy jsem stanovila plazmatickou vazebnost. Při této metodě se používá dialyzační blok, který se skládá ze dvou kotoučů z umělé hmoty. Každý z těchto kotoučů má osm dialyzačních komůrek a kotouče do sebe zapadají. Mezi tyto dva kotouče se vloží vhodná semipermeabilní membrána (celofán), kotouče se k sobě přišroubují k tomuto účelu vhodnými šrouby a takto připravený blok se naplní vzorky. Objem 0,45 ml plazmy byl vždy dialyzován proti stejnému objemu fosfátového pufru o pH 7,41 přes semipermeabilní celofánovou membránu. Vždy čtyři komůrky jsem naplnila jedním druhem plazmy. Stanovení

se provádí ve vytemperovaném termostatu při teplotě 37 °C a během celého stanovení dialyzační blok rotuje. V průběhu stanovení dochází k ustanovení rovnováhy mezi obsahy jednotlivých komůrek. Podle velikosti molekuly se liší doba potřebná k ustanovení rovnováhy.

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

U experimentů s komplexy ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1 byl postup také vždy stejný. K plazmám jednotlivých živočišných druhů jsem již nic dalšího nepřidávala a rovnou použila k experimentům. Ke každému komplexu jsem přidala 10 ml fosfátového pufru a pak naplnila dialyzační blok. Po 16 hodinách u komplexu ^{177}Lu -DOTA-TATE a po 6 hodinách u komplexu ^{177}Lu -DOTA-MG-1 jsem odpipetovala vzorky. Z každé dialyzační komůrky jsem získala dva vzorky po 100 μl . Vzorky jsem odpipetovala do připravených a označených měřicích lahvíček a změřila jsem aktivitu na automatickém gama counteru WALLAC. U každého živočišného druhu jsem stanovila 8 vzorků.

2.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu ^{99m}Tc

Klinicky rutinně používaný komplex ^{99m}Tc -DTPA je radioaktivně označen ^{99m}Tc , proto byl původní záměr této práce radioaktivně označit DTPA-oxn právě techneciem. Provedla jsem čtyři pokusy o naznačení DTPA-oxn ^{99m}Tc . V každém z těchto pokusů jsem použila různá množství pufru, ligandu, izotopu a redukčního činidla. Redukční činidlo bylo připraveno různými způsoby.

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

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

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

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

Požadované radiochemické čistoty nebylo dosaženo ani v jednom případě. Radiochemická čistota byla stanovena ve dvou radiochemických soustavách: ethanol a 0,9% roztok NaCl. Hodnoty radiochemické čistoty se pohybovaly od 48 % do 68 %. Tento komplex se nemohl použít pro vazebnostní experimenty.

2.4 Výpočty

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

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

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

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

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

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

Ve 2. chromatografické soustavě (ethanol) je množství volného TcO_4^- dáno vztahem:

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

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

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

2.4.2 Výpočet vazebnostních parametrů podle práce Wright a kol. [19]

C_U – aktivita v pufru resp. koncentrace volného léčiva

C_T – aktivita v plazmě resp. celková koncentrace léčiva

C_B – koncentrace vázaného léčiva

$$C_B = C_T - C_U$$

F_B – frakce vázaného léčiva

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

F_U – frakce volného léčiva

$$F_U = C_U / C_T$$

2.4.3 Statistické zpracování výsledků

- **Směrodatná odchylka**

Průměrné výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. V grafech zobrazujících mezidruhové srovnání plazmatické vazebnosti (5,11,17, 23) je směrodatná odchylka zobrazená také graficky.

- **Statistická významnost**

K posouzení vzájemných vztahů a statisticky významných rozdílů naměřených souborů dat jsem použila metodu testování statistických hypotéz. Vzhledem k tomu, že se jedná o nezávislá měření a posuzujeme vždy data ze dvou měření, je nejvhodnější metodou dvouvýběrový t-test (Studentův t-test) rovnosti středních hodnot dvou nezávislých souborů. Tento dvouvýběrový t-test má dvě varianty: pro shodný a rozdílný rozptyl. V našem případě použijeme t-test pro rozdílný rozptyl podle [56] a [57].

Dvouvýběrový t-test rovnosti středních hodnot dvou základních souborů pro $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ (pro rozdílnost rozptylů) umožňuje testování hypotézy H_0 proti alternativní H_1 : $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ Nulová hypotéza H_0 říká, že střední hodnoty jsou stejné.

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$ Alternativní hypotéza H_1 říká, že střední hodnoty jsou rozdílné.

Naměřené hodnoty jsou výběry $\{x_i\}$ a $\{y_i\}$ a testovací kritérium má tvar:

$$R = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{S_{12}} \quad (1)$$

$$S_{12} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}} \quad (2)$$

$$W: |R| > \frac{\frac{S_1^2}{n_1} t_\alpha(n_1 - 1) + \frac{S_2^2}{n_2} t_\alpha(n_2 - 1)}{S_{12}^2} \rightarrow \text{zamítáme } H_0 \quad (3)$$

$t_\alpha(n_1-1)$, $t_\alpha(n_2-1)$ – kritické hodnoty Studentova t-rozdělení s (n_1-1) , resp. (n_2-1) stupni volnosti získané s tabulek. [57]

Rovnice (3) je ekvivalentní rovnici (5). Numerický výpočet zde nahradíme přímým srovnáním s koeficientem nalezeným v tabulce pro kritické hodnoty Studentova rozdělení.

Ekvivalentní stupeň volnosti ν se vypočítá podle vztahu:

$$\nu = \frac{\frac{S_x^2}{n_1} + \frac{S_y^2}{n_2}}{\frac{S_x^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{S_y^4}{n_2^2(n_2-1)}} \quad (4)$$

$$|R| > t_{1-\alpha/2}(\nu) \rightarrow \text{zamítáme } H_0 \quad [56] \quad (5)$$

Předpokladem tohoto testu je nezávislost obou testovaných souborů dat a normální rozdělení dat. První předpoklad je splněn, neboť se jedná o nezávislá měření. U druhého pouze předpokládáme, že naměřené hodnoty jsou náhodným výběrem z rozsáhlejšího souboru naměřených dat s normálním rozdělením. Zajímá nás pravdivost tvrzení, že střední hodnoty dvou porovnávaných měření jsou na hladině významnosti 5% stejné, nebo jinak, že nejsou statisticky významně rozdílné. Pro tento účel vyslovíme základní hypotézu o rovnosti středních hodnot, kterou t-testem buď zamítneme nebo nezamítneme.

Je nutno podotknout, že 4 měření, navíc v mnoha případech s významným rozptylem, je pro spolehlivé ověření základní hypotézy málo. Z tohoto důvodu mohou být některé výsledky nepřesné.

K vyhodnocení výsledku testu zda jeho hodnota leží v kritickém oboru jsem použila dva postupy. Jeden numerický podle [57], a druhý s použitím tabulky pro kritické hodnoty Studentova rozdělení podle [56]. Ve všech případech jsem jako srovnávací hodnoty brala hodnoty naměřené pro lidskou plazmu a postupně je porovnávala s výsledky pro další tři plazmy. Výsledky obou metod se shodují a výsledky statisticky významně rozdílné jsou vyznačeny v grafu 5. Výpočty podle obou uvedených metod jsou v tabulkách 6, 12, 18, 24.

3. VÝSLEDKY

3.1 Experiment s ^{99m}Tc -DTPA

- Stanovení radiochemické čistoty

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

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

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

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

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

Radiochemická čistota připraveného komplexu je 99,51%.

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

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

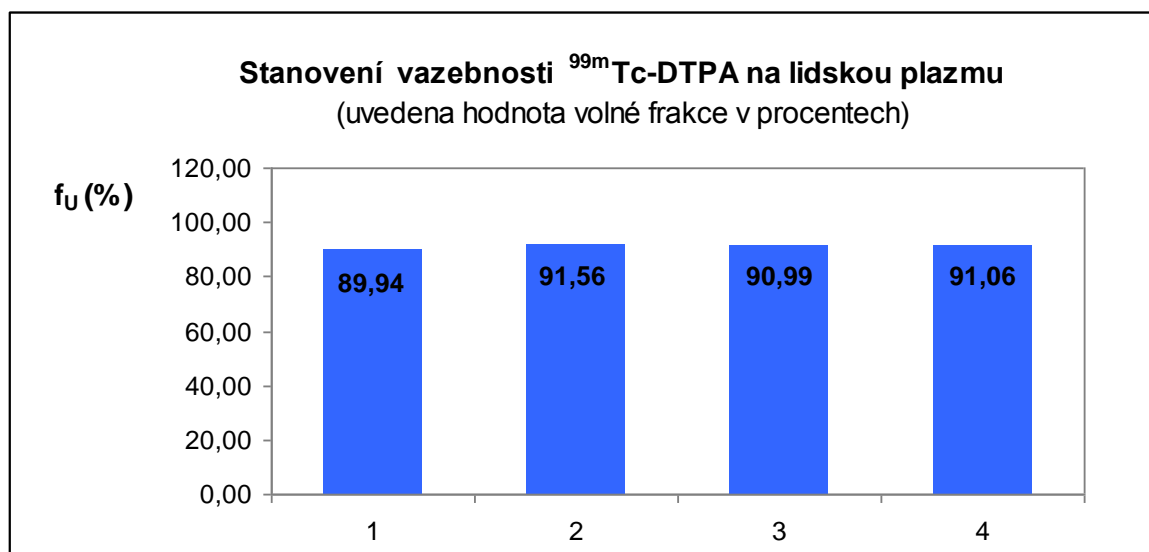
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

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

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

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	278362,8	254807,0		
1A	290680,2	257015,5		
Průměr	284521,5	255911,3	89,94	10,06
2	260206,3	246186,5		
2A	277441,2	246094,5		
Průměr	268823,8	246140,5	91,56	8,44
3	259421,2	240065,6		
3A	270799,8	242378,3		
Průměr	265110,5	241222,0	90,99	9,01
4	259906,4	242302,1		
4A	274167,6	244026,9		
Průměr	267037,0	243164,5	91,06	8,94
Průměr			90,89 ± 0,68	

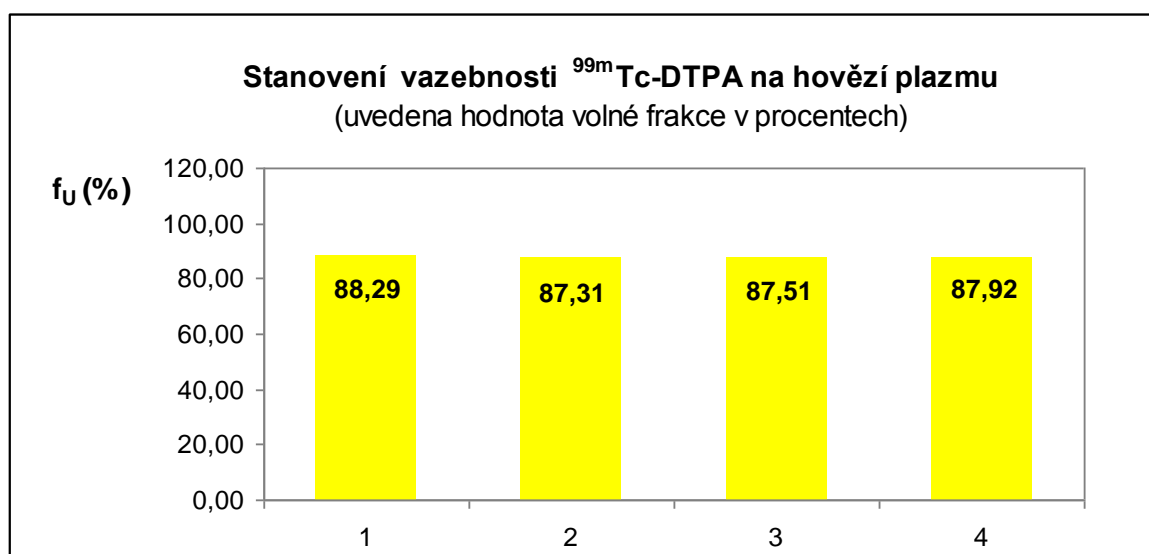
**Graf 1 Výsledky stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -DTPA na lidskou plazmu
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



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

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	304720,2	270817,7		
1A	311245,5	272997,5		
Průměr	307982,9	271907,6	88,29	11,71
2	270071,1	241463,4		
2A	286169,3	244212,3		
Průměr	278120,2	242837,9	87,31	12,69
3	263729,3	235865,3		
3A	277704,2	237916,9		
Průměr	270716,8	236891,1	87,51	12,49
4	254796,2	229360,7		
4A	270047,7	232065,2		
Průměr	262422,0	230713,0	87,92	12,08
Průměr			87,76 ± 0,43	

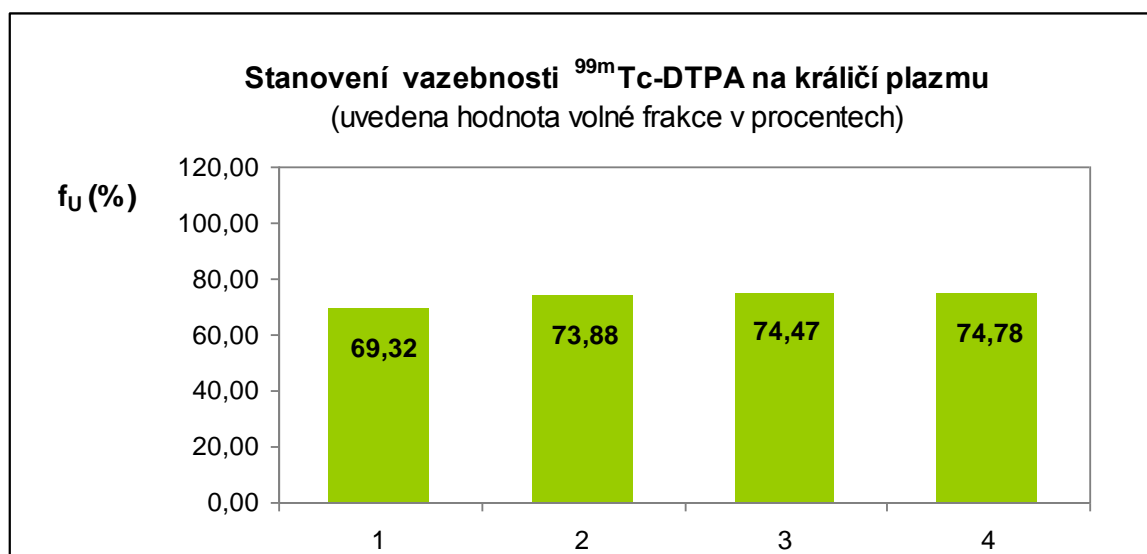
**Graf 2 Výsledky stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -DTPA na hovězí plazmu
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



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

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	47777,7	33829,4		
1A	50289,2	34149,1		
Průměr	49033,5	33989,3	69,32	30,68
2	202332,3	153330,9		
2A	214011,3	154245,9		
Průměr	208171,8	153788,4	73,88	26,12
3	370615,6	282281,6		
3A	397119,3	289418,5		
Průměr	383867,5	285850,1	74,47	25,53
4	365233,1	278739,6		
4A	390750,4	286555,0		
Průměr	377991,8	282647,3	74,78	25,22
Průměr			73,11 ± 2,55	

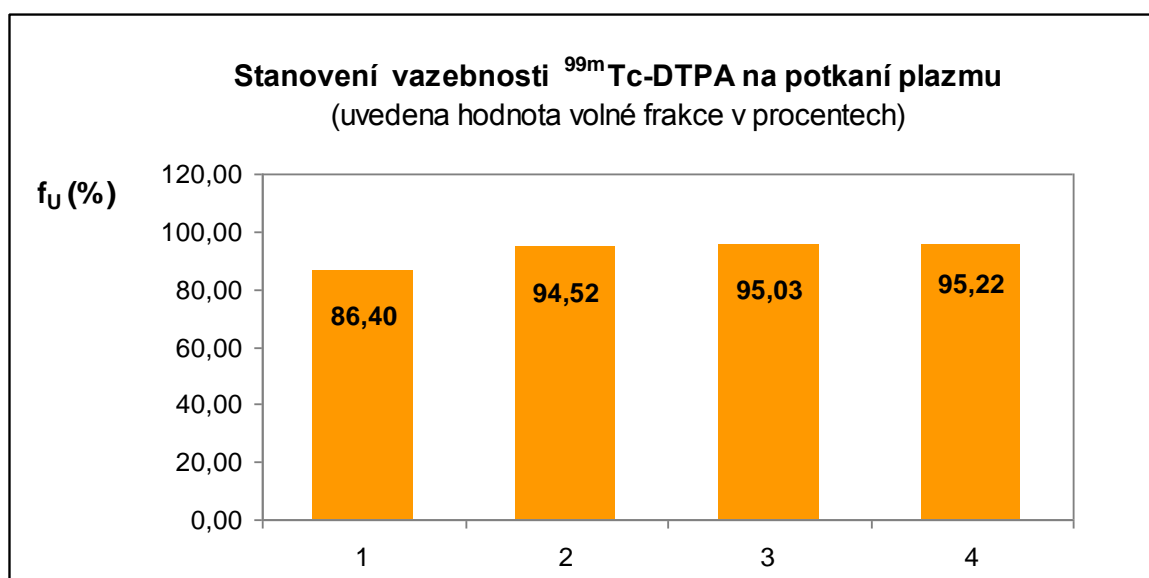
Graf 3 Výsledky stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -DTPA na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



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

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	259441,7	222500,7		
1A	258390,6	224897,3		
Průměr	258916,2	223699,0	86,40	13,60
2	248737,3	239169,3		
2A	260778,7	242449,3		
Průměr	254758,0	240809,3	94,52	5,48
3	252887,8	246390,4		
3A	270824,5	251311,6		
Průměr	261856,2	248851,0	95,03	4,97
4	254048,7	247007,5		
4A	271660,8	253596,5		
Průměr	262854,8	250302,0	95,22	4,78
Průměr			92,80 ± 4,27	

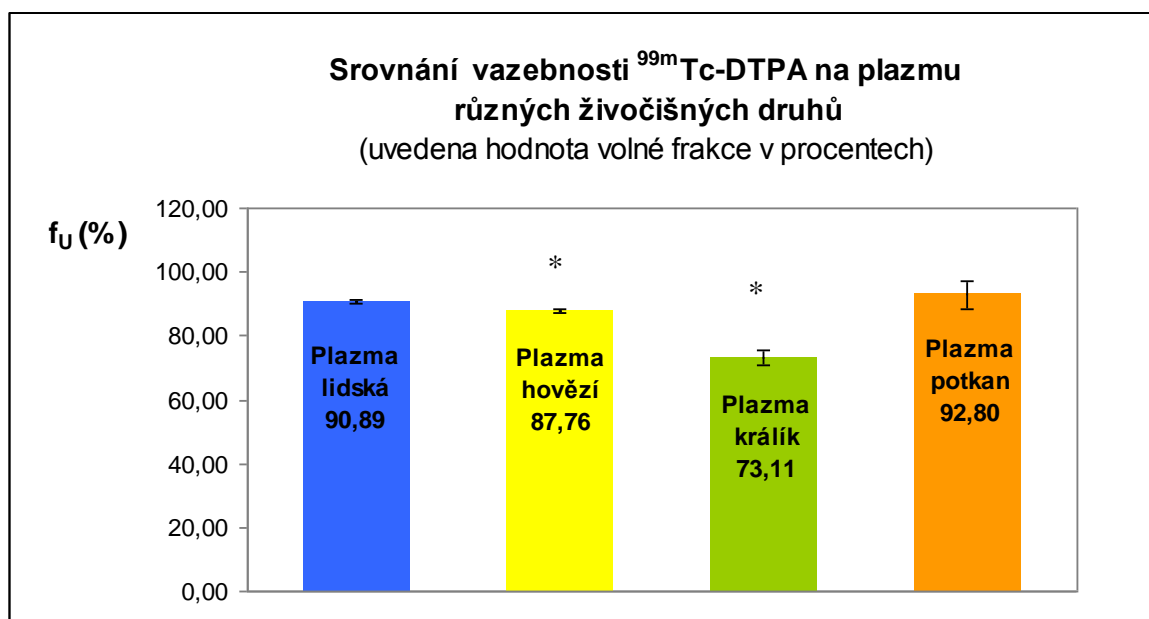
Graf 4 Výsledky stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -DTPA na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



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

Srovnání vazebnosti ^{99m}Tc -DTPA na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
f_U (%)	90,89 ± 0,68	87,76 ± 0,43	73,11 ± 2,55	92,80 ± 4,27

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



* statisticky významně rozdílné v porovnání s lidskou plazmou na hladině významnosti $\alpha - 0,05$

Tabulka 6 Ověření statistické hypotézy o rovnosti středních hodnot pro ^{99m}Tc -DTPA s použitím vzorců (1) až (5)

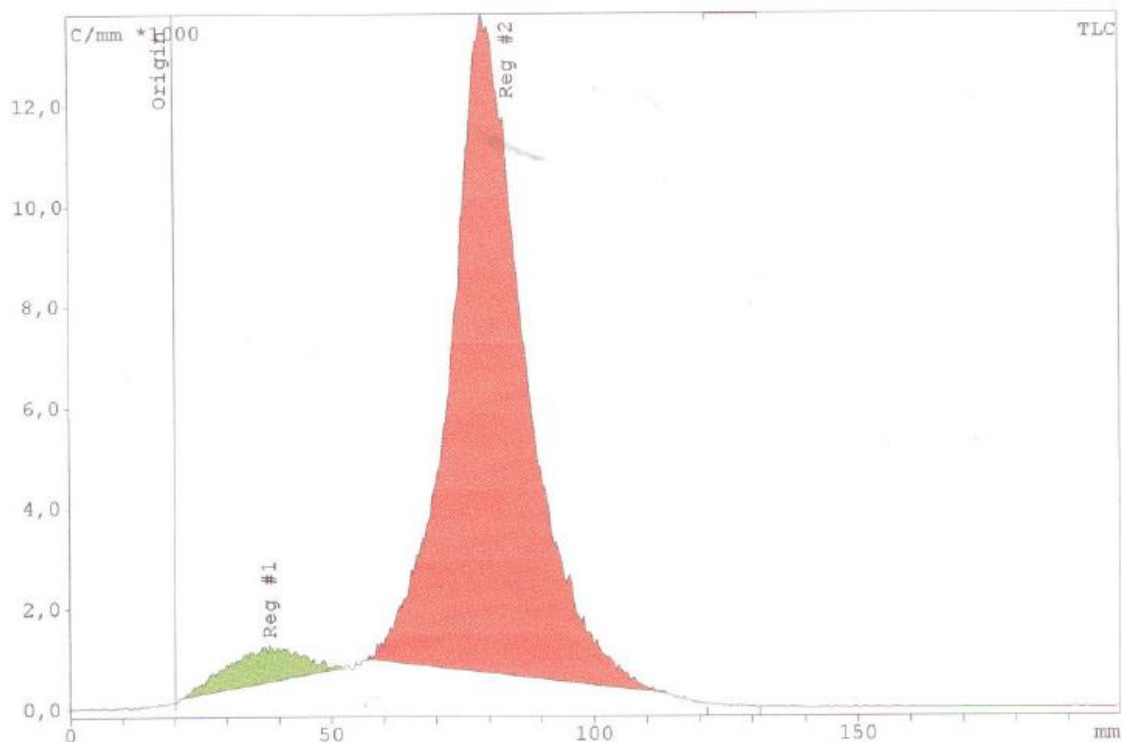
	Plazma lidská X Plazma hovězí	Plazma lidská X Plazma králík	Plazma lidská X Plazma potkan
R (1)	7,49	13,44	0,88
W (3)	1,29	4,21	6,88
$t_{1-\alpha/2}(v)$	2	2	2
Závěr dle (3)	R>W	R>W	R<W
Závěr dle (5)	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$
	Zamítám H_0	Zamítám H_0	Nezamítám H_0

3.2 Experiment s ^{90}Y -DTPA-oxn

- Stanovení radiochemické čistoty

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

Čistota komplexu je 94, 97%.



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

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

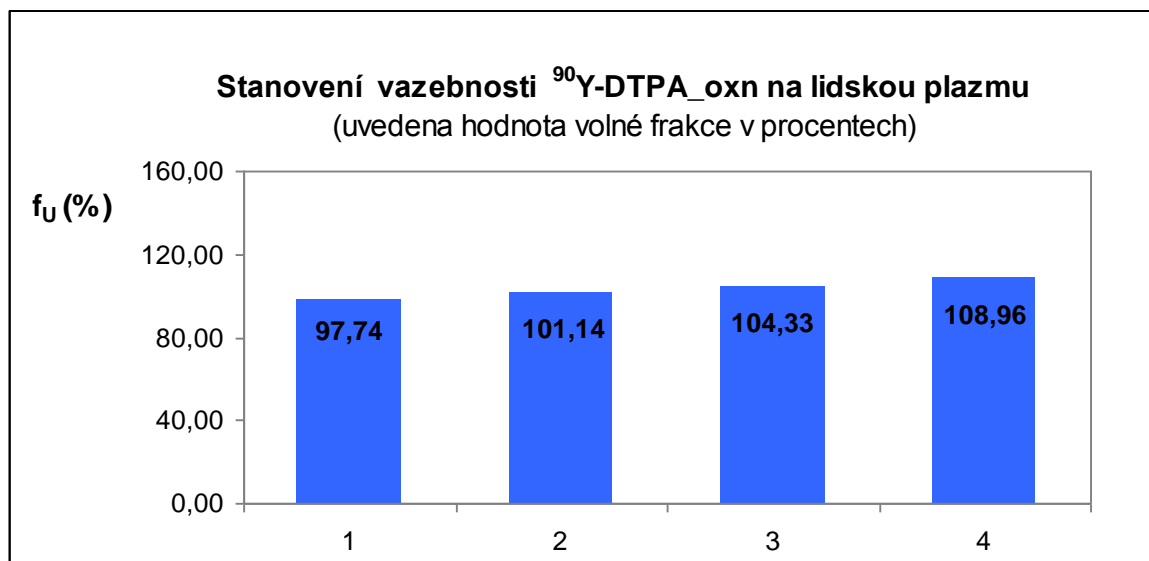
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

Výsledky pro jednotlivé živočišné druhy jsou uvedeny v tabulkách 7 – 10 a na grafech 6 – 9, souhrnně pak v tabulce 11 a na grafu 10.

Tabulka 7 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufro	f_U (%)	f_B (%)
1	25 451,7	25 189,4		
1A	25 622,6	24 728,2		
Průměr	25 537,2	24 958,8	97,74	2,26
2	24 793,6	26 542,8		
2A	25 439,5	24 261,5		
Průměr	25 116,6	25 402,2	101,14	-1,14
3	24 455,0	26 898,1		
3A	25 338,1	25 049,9		
Průměr	24 896,6	25 974,0	104,33	-4,33
4	23 877,9	26 165,6		
4A	25 295,7	27 412,3		
Průměr	24 586,8	26 789,0	108,96	-8,96
Průměr			103,04 ± 4,78	

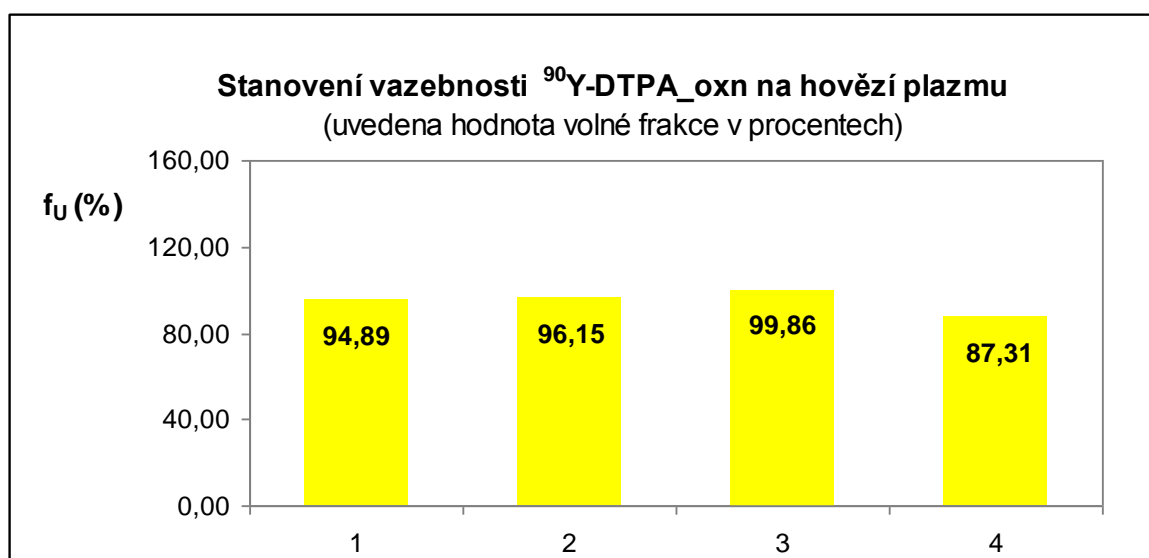
Graf 6 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



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

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	7 133,2	6 805,6		
1A	7 103,1	6 703,4		
Průměr	7 118,2	6 754,5	94,89	5,1
2	19 912,8	20 361,7		
2A	22 197,0	20 125,0		
Průměr	21 054,9	20 243,4	96,15	3,9
3	31 298,4	31 919,1		
3A	32 574,8	31 862,8		
Průměr	31 936,6	31 891,0	99,86	0,1
4	29 741,3	26 399,9		
4A	30 766,5	26 431,9		
Průměr	30 253,9	26 415,9	87,31	12,7
Průměr			94,55 ± 5,27	

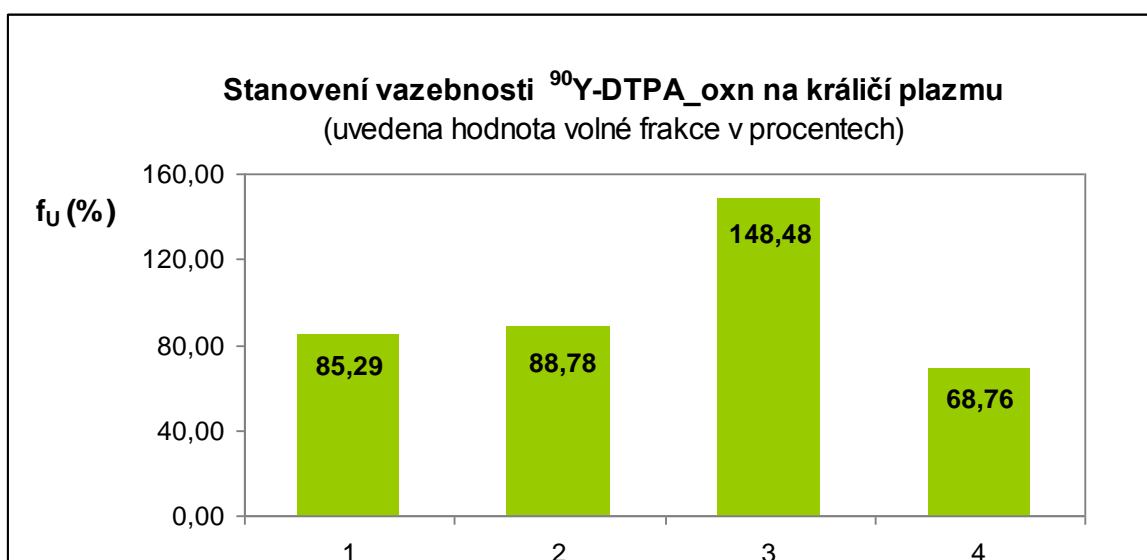
**Graf 7 Výsledky stanovení vazebnosti $^{90}\text{Y-DTPA}_{\text{oxn}}$ na hovězí plazmu
metodou rovnovážné analýzy při 37 °C**



Tabulka 9 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	13 639,9	12 853,7		
1A	14 759,4	11 368,2		
Průměr	14 199,7	12 111,0	85,29	14,7
2	17 696,7	17 737,5		
2A	21 166,0	16 765,7		
Průměr	19 431,4	17 251,6	88,78	11,2
3	10 100,2	15 658,4		
3A	10 739,7	15 285,3		
Průměr	10 420,0	15 471,9	148,48	-48,5
4	17 207,5	13 411,2		
4A	19 041,2	11 514,5		
Průměr	18 124,4	12 462,9	68,76	31,2
Průměr			97,83 ± 34,88	

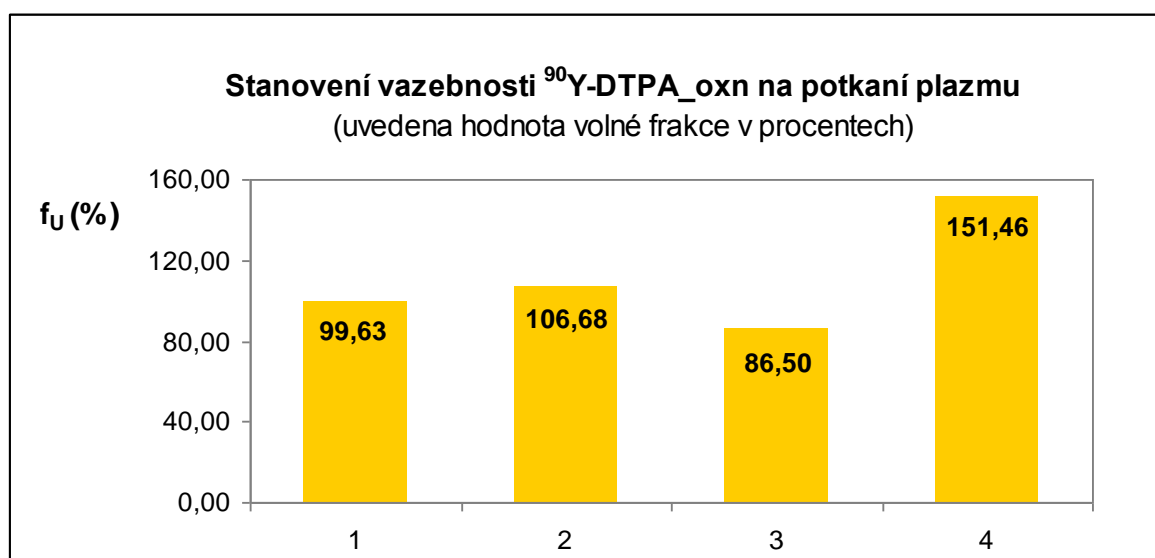
Graf 8 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 10 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	14 390,4	14 456,2		
1A	15 186,9	15 012,1		
Průměr	14 788,7	14 734,2	99,63	0,37
2	13 763,2	15 920,5		
2A	15 179,0	14 953,9		
Průměr	14 471,1	15 437,2	106,68	-6,68
3	19 757,4	18 021,6		
3A	20 608,2	16 894,0		
Průměr	20 182,8	17 457,8	86,50	13,50
4	10 849,1	15 998,6		
4A	11 404,4	17 706,4		
Průměr	11 126,8	16 852,5	151,46	-51,46
Průměr			111,07 ± 28,70	

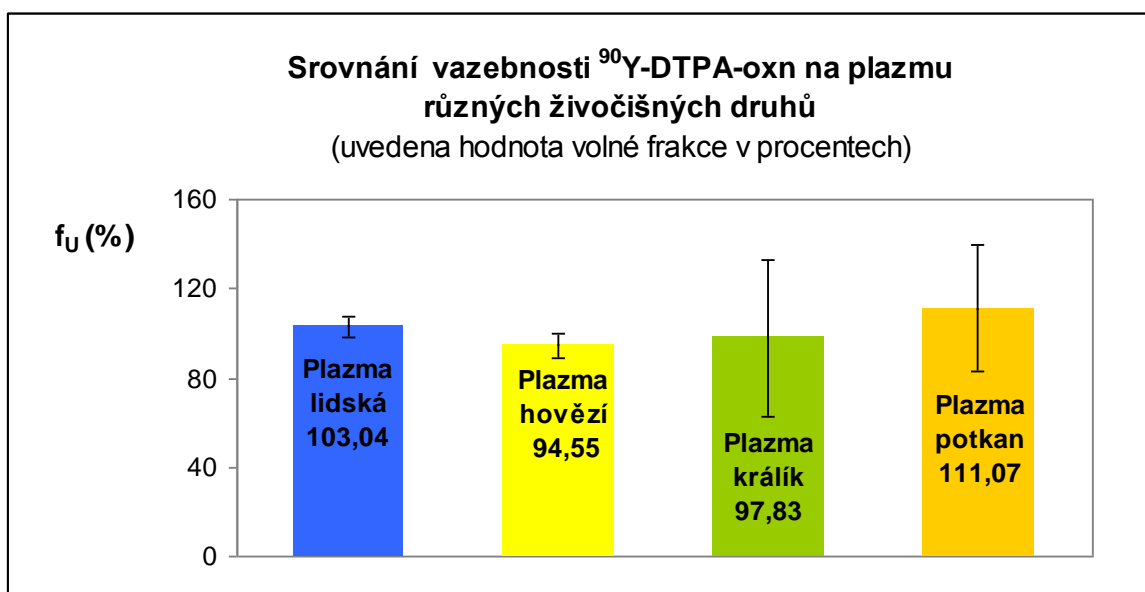
Graf 9 Výsledky stanovení vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 11 Srovnání vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na plazmu čtyř živočišných druhů - stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Srovnání vazebnosti ^{90}Y -DTPA-oxn na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
f_U (%)	103,04 ± 4,78	94,55 ± 5,27	97,83 ± 34,88	111,07 ± 28,20

Graf 10 Srovnání vazebnosti ^{90}Y -DTPA_oxn na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 12 Ověření statistické hypotézy o rovnosti středních hodnot pro ^{90}Y -DTPA_oxn s použitím vzorců (1) až (5)

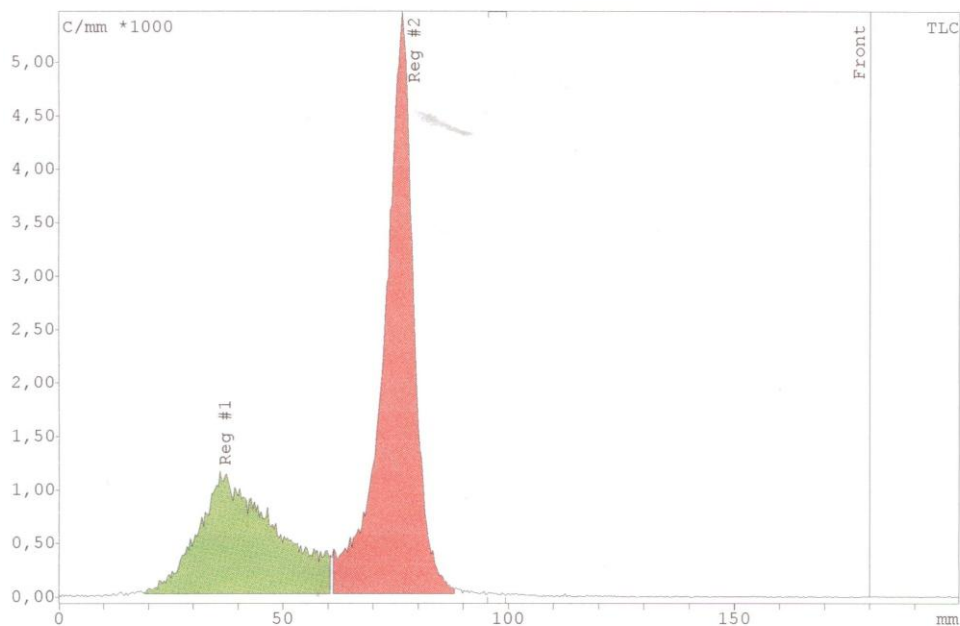
	Plazma lidská X Plazma hovězí	Plazma lidská X Plazma králík	Plazma lidská X Plazma potkan
R (1)	2,39	0,30	0,56
W (3)	11,31	55,98	45,47
$t_{1-\alpha/2}(v)$	12,71	12,71	12,71
Závěr dle (3)	R<W	R<W	R<W
Závěr dle (5)	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$	R>$t_{1-\alpha/2}(v)$
	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0

3.3 Pokus o naznačení DTPA-oxn pomocí izotopu ^{99m}Tc

3.3.1 Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -DTPA-oxn

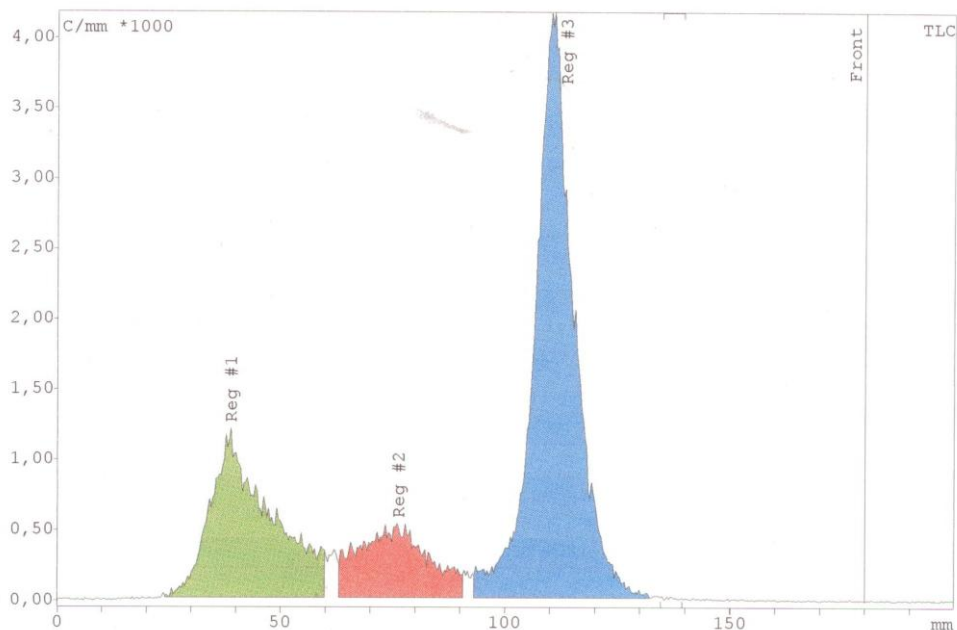
Tenkovrstvá chromatografie ^{99m}Tc -DTPA-oxn (rozložení aktivity na chromatogramu), mobilní fáze: etanol.

Čistota komplexu je 64,82%.



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

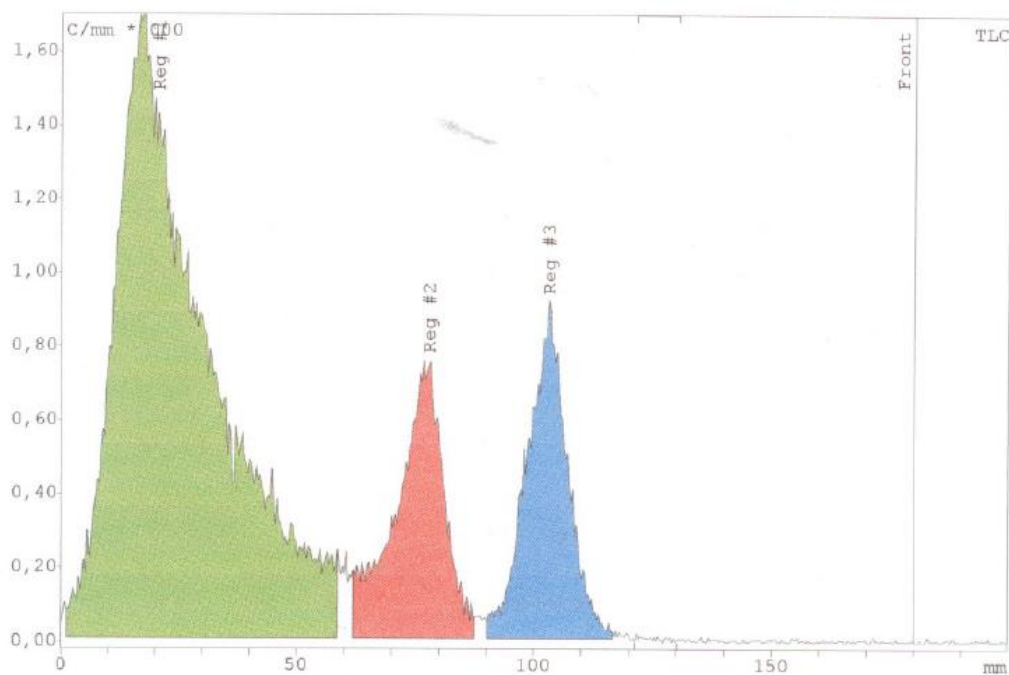
Čistota komplexu je 60,69%



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

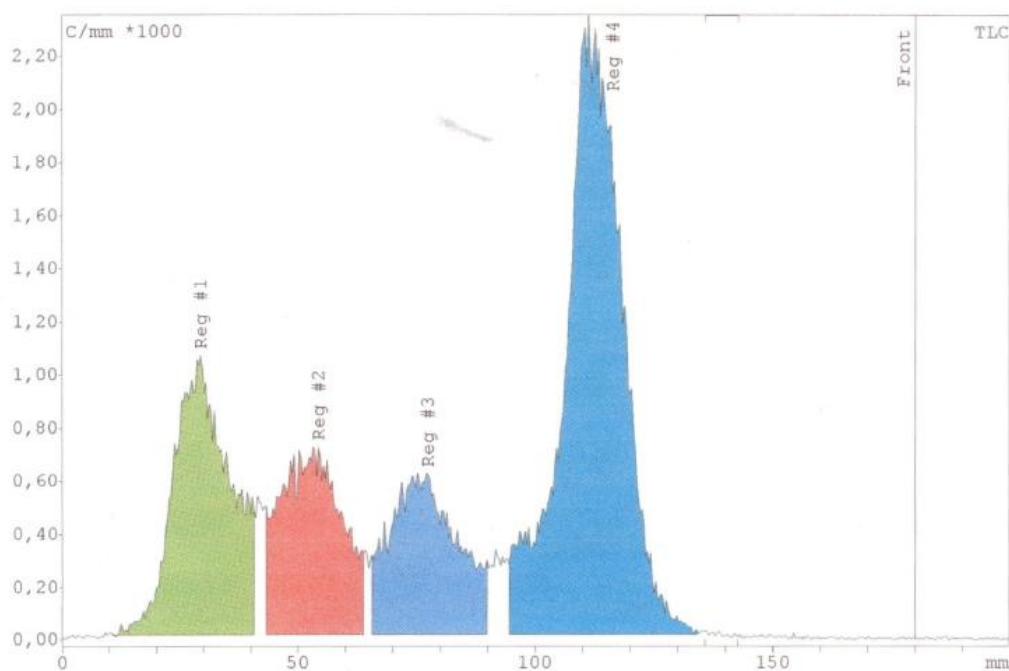
Tenkovrstvá chromatografie $^{99m}\text{Tc-DTPA-oxn}$ (rozložení aktivity na chromatogramu), mobilní fáze: etanol

Čistota komplexu je 68,61%.



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

Čistota komplexu je 48,12%.



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

3.4 Experiment s ^{177}Lu -DOTA-TATE

- **Stanovení vazebnosti komplexu ^{177}Lu -DOTA-TATE na bílkoviny krevní plazmy**

Metoda stanovení: rovnovážná dialýza při 37 °C po dobu 16 hodin.

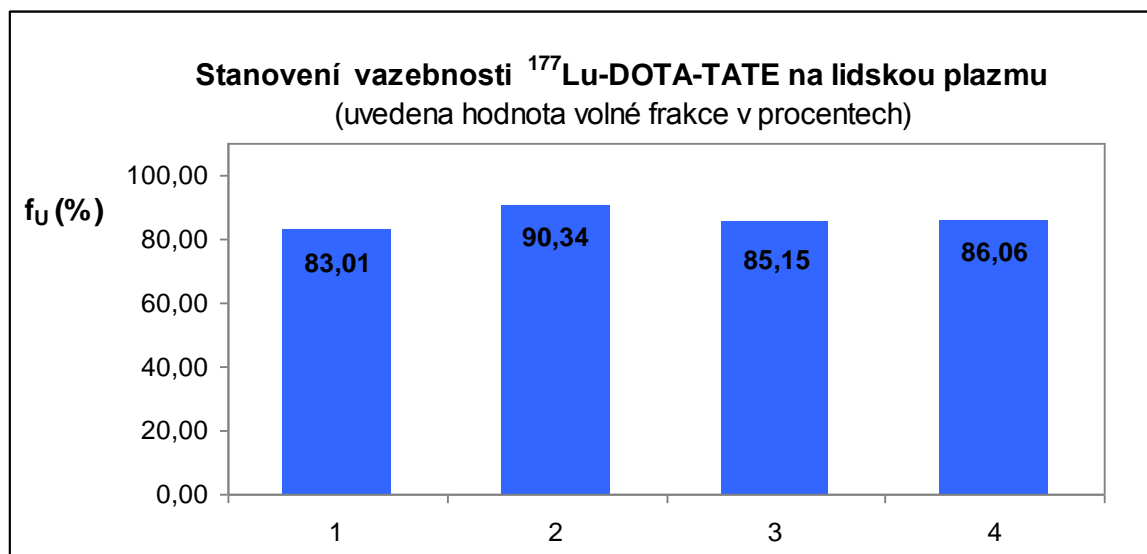
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

Výsledky pro jednotlivé živočišné druhy jsou uvedeny v tabulkách 13 - 16 a na grafech 11 - 14, souhrnně pak v tabulce 17 a na grafu 15.

Tabulka 13 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	12788,5	9470,3		
1A	10882,5	10179,9		
Průměr	11835,5	9825,1	83,01	16,99
2	11766,7	12988,0		
2A	13620,9	9947,3		
Průměr	12693,8	11467,7	90,34	9,66
3	11933,1	10132,8		
3A	12734,3	10870,5		
Průměr	12333,7	10501,7	85,15	14,85
4	15109,6	14107,4		
4A	14916,0	11731,7		
Průměr	15012,8	12919,6	86,06	13,94
Průměr			86,14 ± 3,08	

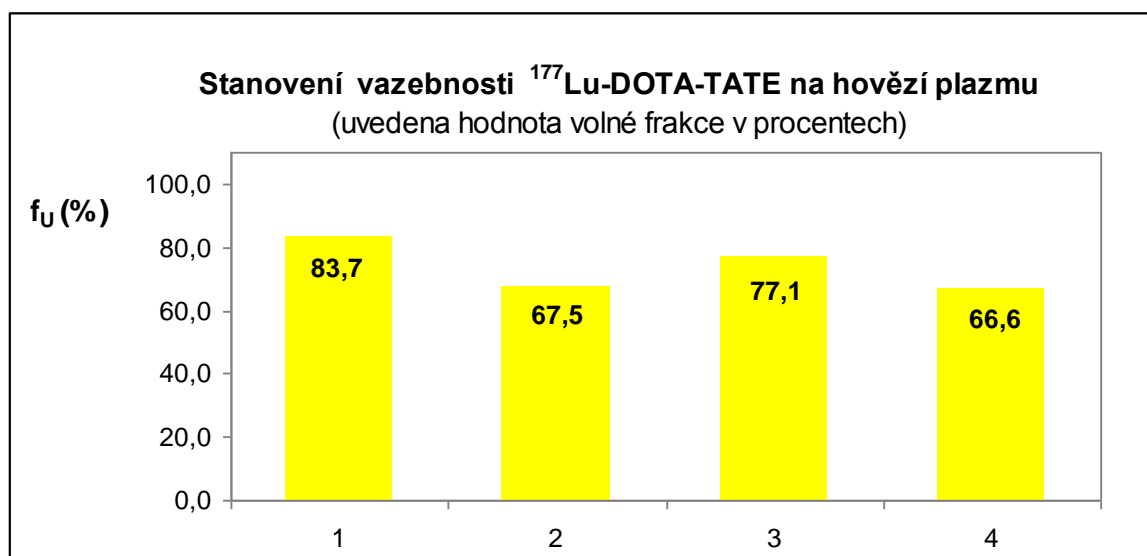
Graf 11 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 14 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	13848,6	11628,4		
1A	13917,8	11604,3		
Průměr	13883,2	11616,4	83,7	16,33
2	12564,9	8302,0		
2A	14797,5	10166,8		
Průměr	13681,2	9234,4	67,5	32,50
3	11200,3	6878,6		
3A	9594,6	9163,6		
Průměr	10397,5	8021,1	77,1	22,86
4	12901,8	8262,9		
4A	11666,4	8102,6		
Průměr	12284,1	8182,8	66,6	33,39
Průměr			73,73 ± 8,17	

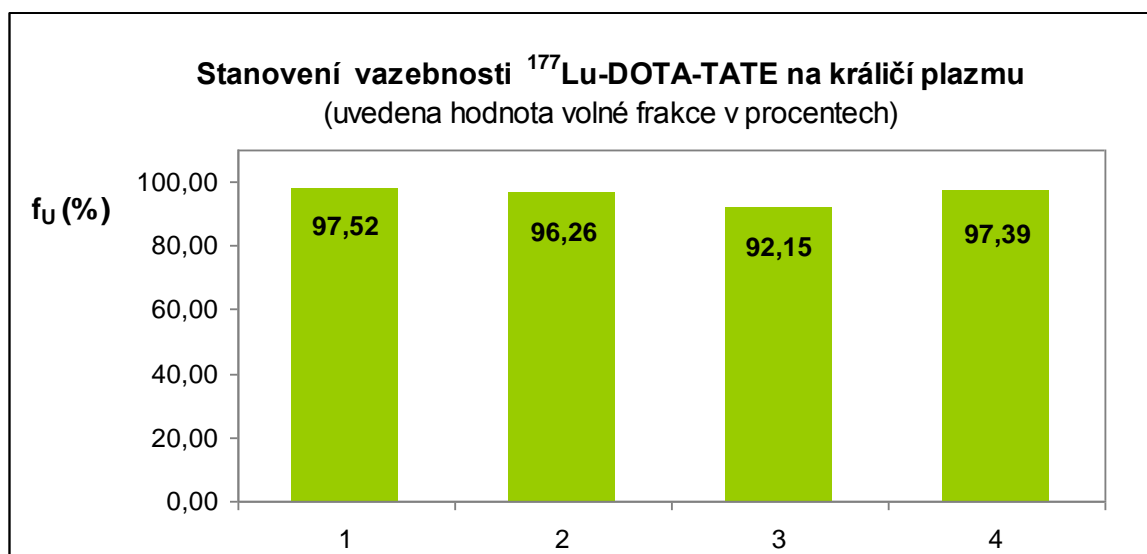
Graf 12 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 15 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	15031,3	15387,5		
1A	15912,3	14788,6		
Průměr	15471,8	15088,1	97,52	2,48
2	15488,9	15100,6		
2A	15617,3	14841,8		
Průměr	15553,1	14971,2	96,26	3,74
3	14811,6	13777,4		
3A	14682,2	13400,2		
Průměr	14746,9	13588,8	92,15	7,85
4	14076,3	13878,7		
4A	14174,6	13634,9		
Průměr	14125,5	13756,8	97,39	2,61
Průměr			95,83 ± 2,52	

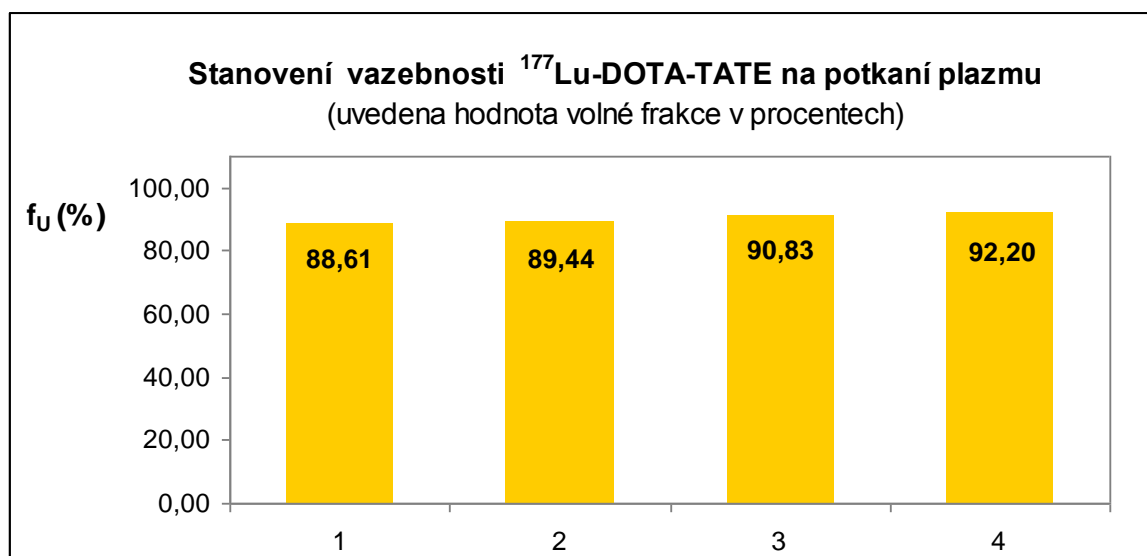
Graf 13 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 16 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	13184,6	12140,7		
1A	14264,9	12181,8		
Průměr	13724,8	12161,3	88,61	11,39
2	13870,6	12653,1		
2A	13985,0	12260,0		
Průměr	13927,8	12456,6	89,44	10,56
3	9583,5	9419,2		
3A	11325,6	9571,5		
Průměr	10454,6	9495,4	90,83	9,17
4	13025,2	13025,2		
4A	15527,0	13300,9		
Průměr	14276,1	13163,1	92,20	7,80
Průměr			90,27 ± 1,58	

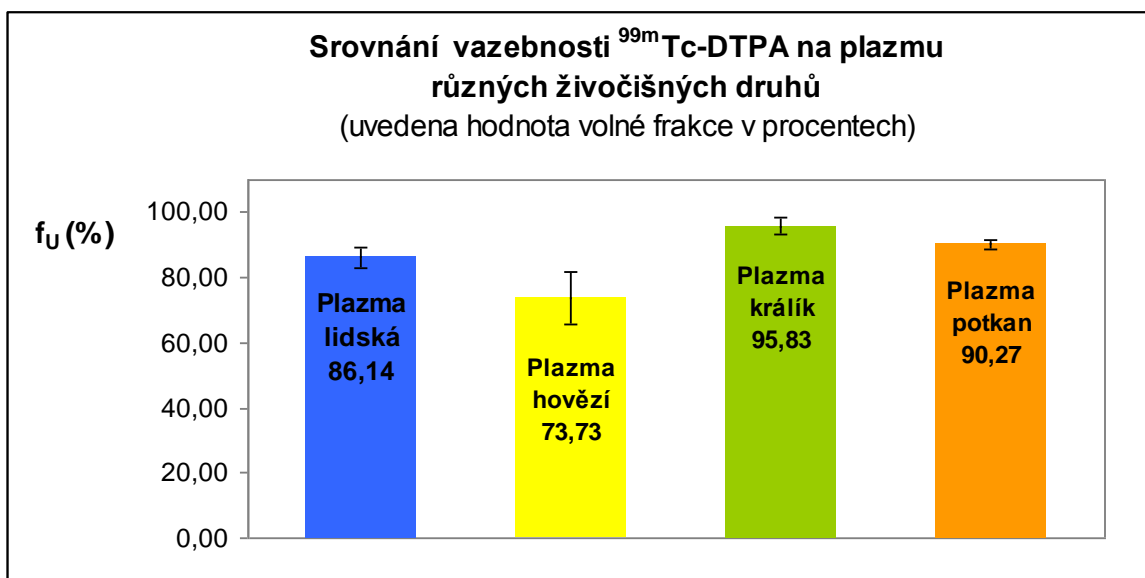
Graf 14 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 17 Srovnání vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na plazmu čtyř živočišných druhů - stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Srovnání vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
f_U (%)	86,14 ± 3,08	73,73 ± 8,17	95,83 ± 2,52	90,27 ± 1,58

Graf 15 Srovnání vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-TATE na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 18 Ověření statistické hypotézy o rovnosti středních hodnot pro ^{177}Lu -DOTA-TATE s použitím vzorců (1) až (5)

	Plazma lidská X Plazma hovězí	Plazma lidská X Plazma králík	Plazma lidská X Plazma potkan
R (1)	2,84	4,87	2,29
W (3)	13,89	6,32	5,73
$t_{1-\alpha/2}(v)$	12,71	12,71	12,71
Závěr dle (3)	R < W	R < W	R < W
Závěr dle (5)	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$
	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0

3.5 Experiment s ^{177}Lu -DOTA-MG-1

- **Stanovení vazebnosti komplexu ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na bílkoviny krevní plazmy**

Metoda stanovení: rovnovážná dialýza při 37 °C po dobu 6 hodin.

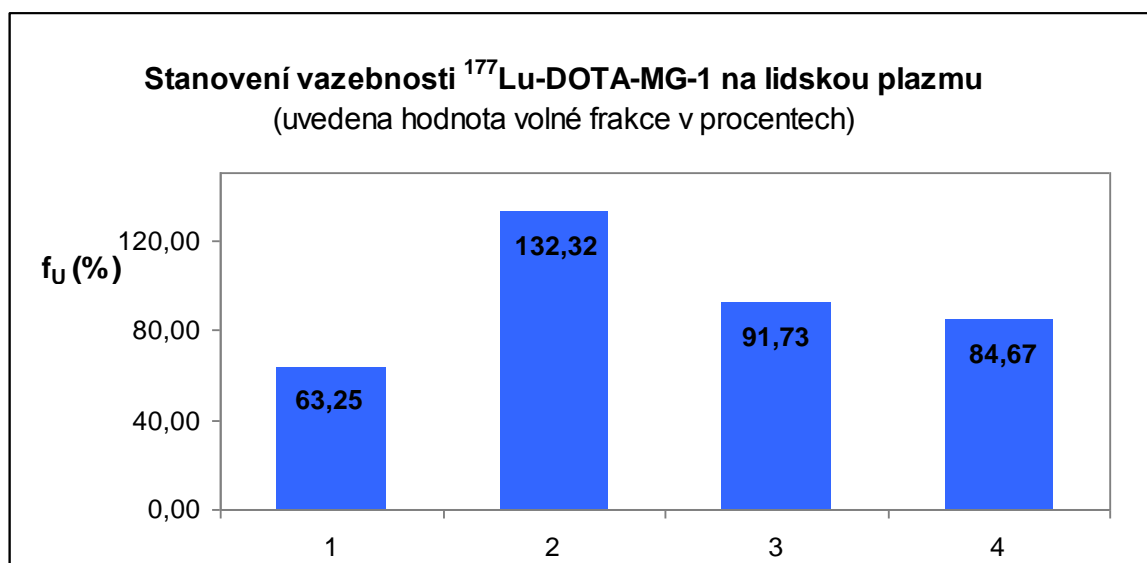
Stanovení provedeno na plazmě čtyř živočišných druhů.

Výsledky pro jednotlivé živočišné druhy jsou uvedeny v tabulkách 19 – 22 a na grafech 16 - 19, souhrnně pak v tabulce 23 a na grafu 20.

Tabulka 19 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma lidská				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	4 069,0	2 569,8		
1A	4 024,9	2 549,8		
Průměr	4 047,0	2 559,8	63,25	36,75
2	2 571,8	3 196,3		
2A	2 496,8	3 510,5		
Průměr	2 534,3	3 353,4	132,32	32,32
3	1 951,7	2 770,0		
3A	3 761,7	2 470,8		
Průměr	2 856,7	2 620,4	91,73	8,27
4	3 800,6	2 931,1		
4A	3 628,6	3 359,4		
Průměr	3 714,6	3 145,3	84,67	15,33
Průměr			92,99 ± 28,88	

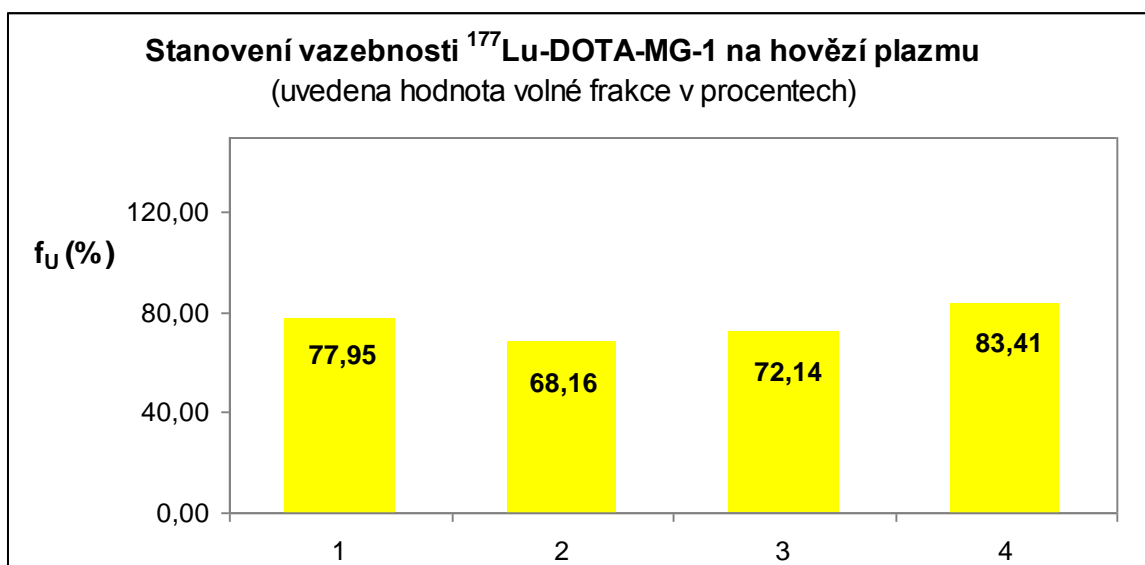
Graf 16 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na lidskou plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 20 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma hovězí				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	4 367,3	3 299,4		
1A	4 329,2	3 479,5		
Průměr	4 348,3	3 389,5	77,95	22,1
2	4 195,1	2 782,0		
2A	4 207,1	2 945,1		
Průměr	4 201,1	2 863,6	68,16	31,8
3	4 208,1	2 985,1		
3A	4 438,3	3 252,3		
Průměr	4 323,2	3 118,7	72,14	27,9
4	3 434,4	2 858,0		
4A	3 706,7	3 098,2		
Průměr	3 570,6	2 978,1	83,41	16,6
Průměr			75,41 ± 6,67	

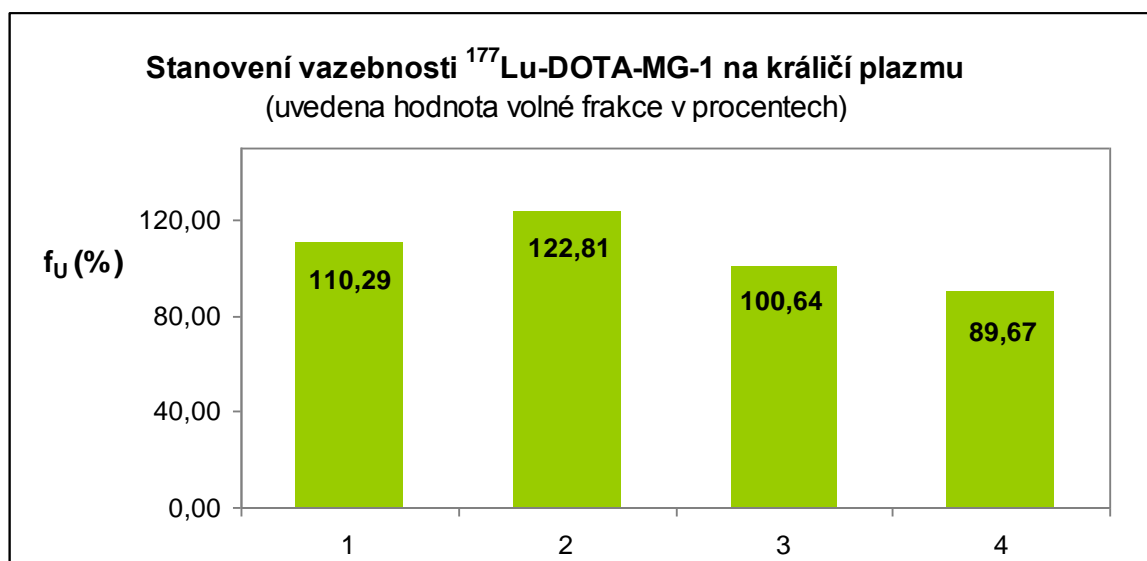
Graf 17 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na hovězí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 21 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma králík				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	2 685,9	2 498,8		
1A	2 467,1	3 184,2		
Průměr	2 576,5	2 841,5	110,29	-10,3
2	2 744,0	3 736,7		
2A	2 344,7	2 512,8		
Průměr	2 544,4	3 124,8	122,81	-22,8
3	3 365,4	3 189,3		
3A	3 213,3	3 431,4		
Průměr	3 289,4	3 310,4	100,64	-0,6
4	3 520,5	2 767,9		
4A	3 137,2	3 202,3		
Průměr	3 328,9	2 985,1	89,67	10,3
Průměr			105,85 ± 14,10	

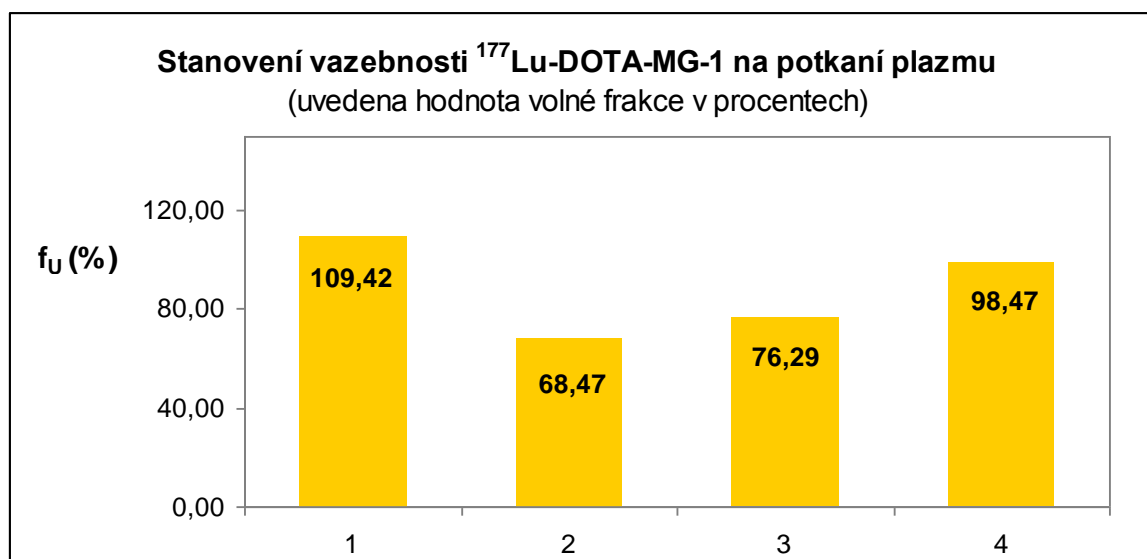
Graf 18 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na králičí plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 22 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Plazma potkan				
Č. vzorku	Aktivita v plazmě	Aktivita v pufru	f_U (%)	f_B (%)
1	2 195,6	2 356,7		
1A	2 263,7	2 522,8		
Průměr	2 229,7	2 439,8	109,42	-9,42
2	3 314,3	2 047,6		
2A	3 293,3	2 476,8		
Průměr	3 303,8	2 262,2	68,47	31,53
3	2 811,0	2 004,5		
3A	2 717,9	2 213,6		
Průměr	2 764,5	2 109,1	76,29	23,71
4	2 708,9	2 432,8		
4A	2 785,0	2 977,1		
Průměr	2 747,0	2 705,0	98,47	1,53
Průměr			88,16 ± 19,03	

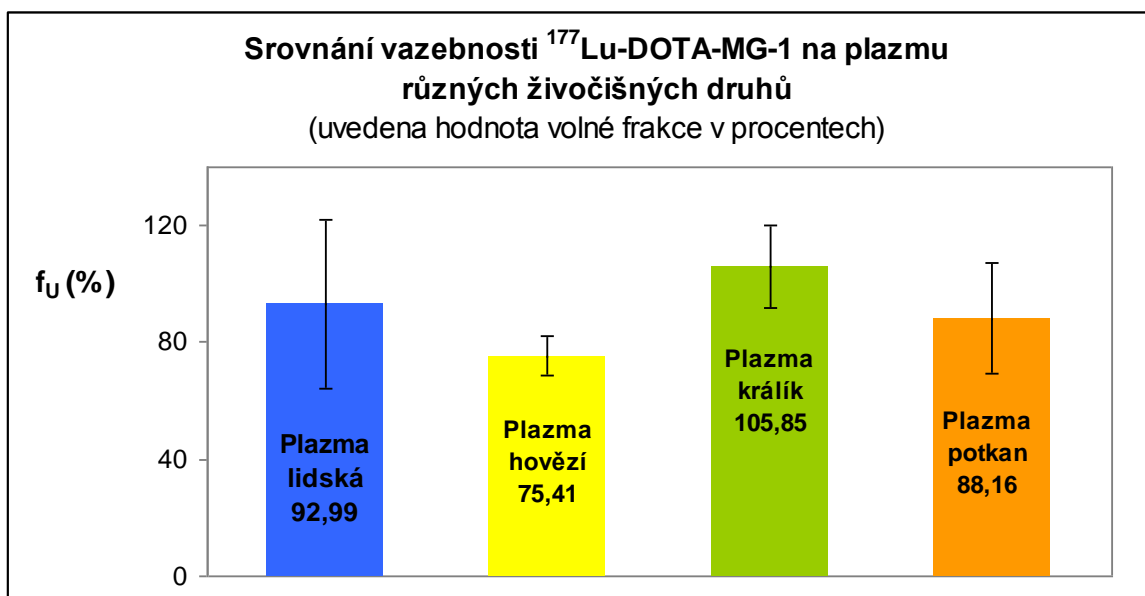
Graf 19 Výsledky stanovení vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na potkaní plazmu metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 23 Srovnání vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na plazmu čtyř živočišných druhů - stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C

Srovnání vazebnosti ^{90}Y -DTPA-oxn na plazmu různých živočišných druhů				
	Plazma lidská	Plazma hovězí	Plazma králík	Plazma potkan
f_U (%)	92,99 ± 28,88	75,41 ± 6,67	105,85 ± 14,10	88,16 ± 19,03

Graf 20 Srovnání vazebnosti ^{177}Lu -DOTA-MG-1 na plazmu čtyř živočišných druhů stanoveno metodou rovnovážné analýzy při 37 °C



Tabulka 24 Ověření statistické hypotézy o rovnosti středních hodnot pro ^{177}Lu -DOTA-MG-1 s použitím vzorců (1) až (5)

	Plazma lidská X Plazma hovězí	Plazma lidská X Plazma králík	Plazma lidská X Plazma potkan
R (1)	1,19	0,80	0,28
W (3)	47,13	51,10	55,00
$t_{1-\alpha/2}(v)$	12,71	12,71	12,71
Závěr dle (3)	R<W	R<W	R<W
Závěr dle (5)	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$	$R > t_{1-\alpha/2}(v)$
	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0	Nezamítám H_0

IV. DISKUZE

DISKUZE

Stanovení farmakokinetiky a jejích parametrů je důležitou součástí předklinického zkoumání nově vyvíjených látek. Důležitým faktorem farmakokinetiky, který byl zkoumán v této práci, je vazebnost léčiv na plazmatické bílkoviny. Vazebnost léčiv ovlivňuje průnik léčiva přes biologické membrány k místu účinku, jeho biotransformaci a eliminaci z organismu, protože pouze volná, nevázaná část léčiva je k dispozici pro tyto děje. Vazebnost je tedy důležitým parametrem farmakokinetiky, který může významně ovlivnit biologické chování léčiv. Cílem této práce bylo stanovit plazmatickou vazebnost pro nově připravený, radioaktivně značený bifunkční chelát DTPA-oxn a pro potenciální radiofarmaka ze skupiny receptorově specifických peptidů ^{177}Lu -DOTA-TATE a ^{177}Lu -DOTA-MG-1 u čtyřech živočišných druhů a výsledky porovnat s běžně používaným radiofarmakem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA.

Hodnoty vazebnosti získané pro komplex $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA jsou relativně nízké. Mezidruhové srovnání vazebností ukazuje, že hodnoty pro lidskou, hovězí a potkaní plazmu jsou velmi podobné (volná frakce komplexu je přibližně 90 %), hodnoty vazebnosti u králičí plazmy jsou poněkud odlišné, volná frakce látky je přibližně 73 %. Vazebnostní experimenty se pro všechny živočišné druhy prováděly současně, hodnoty vazebnosti nemohly být ovlivněny parametry, jako je radiochemická čistota komplexu, doba provádění experimentů, popřípadě i vliv teploty. Poněkud neočekávaný výsledek vazebnosti pro králičí plazmu je možné vysvětlit např. rozdílnou afinitou králičího albuminu k $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA v porovnání s albuminy dalších studovaných druhů. Pouze o tohoto měření jsou statisticky významně rozdílné střední hodnoty mezi lidskou a hovězí plazmou a mezi lidskou a králičí plazmou na hladině významnosti alfa - 0,05.

U všech dalších měření nebyly zjištěny statisticky významné mezidruhově rozdílné hodnoty středních hodnot plazmatické vazebnosti vzhledem k lidské plazmě. Ve všech případech jsem jako srovnávací hodnoty brala hodnoty naměřené pro lidskou plazmu a postupně je porovnávala s výsledky pro další tři plazmy, a to vždy na hladině statistické významnosti alfa - 0,05.

Vzhledem k tomu, že bifunkční chelát DTPA byl radioaktivně označen $^{99\text{m}}\text{Tc}$, bylo původním záměrem označit nový chelát DTPA-oxn stejným radionuklidem. Komplex $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-oxn se však nepodařilo připravit s dostatečnou

radiochemickou čistotou pro provádění biologických experimentů, přítomné radiochemické nečistoty by totiž mohly výrazně ovlivnit dosažené výsledky vazebnosti. Vazebnostní studie se tedy neprováděly s ^{99m}Tc -DTPA-oxn, ale s komplexem DTPA-oxn, značeným ^{90}Y (^{90}Y -DTPA-oxn).

Výsledky vazebnosti chelátu ^{90}Y -DTPA-oxn ukazují, že tento komplex se váže na plazmatické bílkoviny méně než klinicky rutinně využívaný komplex ^{99m}Tc -DTPA. Hodnoty volné frakce jsou nejmenší opět pro králíčí (97,83%) a hovězí plazmu (94,55%). Hodnota volné frakce pro lidskou plazmu je 103,04% a pro potkaní plazmu je 111,07%. Pro králíčí a potkaní plazmu však byly nalezeny vysoké hodnoty směrodatné odchylky, způsobené velkými rozdíly v hodnotách vazebnosti stanovených v jednotlivých experimentech.

Z výsledků vazebnosti na plazmatické bílkoviny, získaných pro komplexy ^{99m}Tc -DTPA a ^{90}Y -DTPA-oxn, lze vyvodit závěr, že vazebnost nebude faktorem, který by výrazně ovlivnil biologické chování těchto komplexů.

Pro potenciální radiofarmakum ^{177}Lu -DOTA-TATE byly stanoveny hodnoty plazmatické vazebnosti, uvedené jako hodnoty volné frakce, které se pohybují v rozmezí přibližně od 73 % do 95 %. Z hlediska mezidruhového srovnání je možné hodnoty získané pro lidskou, králíčí a potkaní plazmu označit za podobné, hodnoty volné frakce jsou přibližně: 86 % pro lidskou plazmu, 95 % pro králíčí plazmu a 90 % pro potkaní plazmu. Nejmenší hodnota volné frakce byla stanovena pro hovězí plazmu, a sice přibližně 73 %, vazebnost je tedy v tomto případě největší. Stejně jako u předchozích experimentů probíhalo stanovení pro všechny živočišné druhy zároveň a faktory uvedené výše nemohly stanovené výsledky ovlivnit.

Plazmatická vazebnost stanovená pro radiofarmakum ^{177}Lu -DOTA-MG-1 se pohybovala v rozmezí přibližně 75 až 105 %, uvedeny jsou hodnoty volné frakce. V tomto experimentu se hodnoty získané pro jednotlivé živočišné druhy poněkud liší a podobné jsou si pouze hodnoty volné frakce pro lidskou a potkaní plazmu. Po seřazení jednotlivých druhů podle velikosti volné frakce docházíme k tomuto pořadí: králíčí plazma (105,85 %), lidská plazma (92,99 %), potkaní plazma (88,16 %) a hovězí plazma (75,85 %). Je třeba také doplnit, že směrodatné odchylky vypočítané pro průměrné výsledky jednotlivých živočišných druhů jsou

poněkud veliké, a to v důsledku rozdílných hodnot vazebnosti pro jednotlivé experimenty.

V. ZÁVĚR

ZÁVĚR

1. Metoda rovnovážné dialýzy při 37 °C byla použita ke studiu vazebnosti vybraných komplexů na plazmatické bílkoviny z hlediska mezidruhového srovnání (lidská, hovězí, králičí a potkaní plazma).
2. Poměrně nízké hodnoty vazebnosti byly naměřeny pro komplex $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, vazebnost na bílkoviny lidské, hovězí a potkaní plazmy je srovnatelná, vazebnost pro králičí plazmu je větší.
3. Komplex $^{99m}\text{Tc-DTPA-oxn}$ se nepodařilo připravit s dostatečnou radiochemickou čistotou, a proto se vazebnostní studie u tohoto komplexu neprováděly.
4. Naměřené výsledky pro komplex $^{90}\text{Y-DTPA-oxn}$ ukázaly, že i v tomto případě je vazebnost nízká a dokonce ještě nižší než u komplexu $^{99m}\text{Tc-DTPA}$. Vazebnost je srovnatelná pro hovězí a potkaní plazmu a pro lidskou a potkaní.
5. U radiofarmaka $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ dosahují naměřené hodnoty od 73 % do 95 %. Podobné hodnoty vazebnosti jsou pro lidskou, králičí a potkaní plazmu. Pro hovězí plazmu je hodnota vazebnosti vyšší.
6. Hodnoty pro $^{177}\text{Lu-DOTA-MG-1}$ se pohybují od 75 % do 105 %. Vazebnost jednotlivých živočišných druhů je rozdílná, podobné jsou si hodnoty pro lidskou a potkaní plazmu. Vazebnost králičí plazmy je vyšší a hovězí plazmy nižší.
7. Vazebnost ani jednoho ze zkoumaných komplexů nebude faktorem, který by výrazně ovlivnil biologické chování.
8. Statisticky významně rozdílné střední hodnoty byly nalezeny pouze u hodnot naměřených pro komplex $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, a to mezi lidskou a hovězí plazmou a mezi lidskou a králičí plazmou.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Lázníček M., Komárek P., Základy radiofarmacie, Karolinum Praha 1998, 27-34 a 64-65
- [2] Český lékopis, Grada Praha 2005
- [3] Mysliveček M., Hušák V., Koranda P., Nukleární medicína – 1. díl, UP Olomouc 2007, 9 a 21-24
- [4] Liu S., Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12),1347-1370
- [5] Kassis Al., Therapeutic radionuclides: Biophysical and radiobiologic principles, *Semin Nucl Med* 2008, 38 (5), 358-66
- [6] Klimeš J. a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum Praha 2006, 26-28
- [7] Liu S., Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12),1347-1370
- [8] Kilbourn M.R., Zalutsky M.R., Research and clinical potential of receptor based radiopharmaceuticals, *J Nucl Med* 1985, 26(6), 655-62
- [9] Brechbiel M.W., Bifunctional chelates for metal nuclides, *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 52 (2) 166-173
- [10] Jurisson S., Cutler C., Smith S.V., Radiometal complexes: characterization and relevant in vitro studies, *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 52 (3) 222-234
- [11] Forrer F., Valkema R., Kwekkeboom D.J., de Jong M., Krenning E.P., Peptide receptor radionuclide therapy, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007, 21(1), 111-29
- [12] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M., Farmakologie a toxikologie, Grada publishing Praha 2004, 35-61
- [13] Lüllman H., Mohr K., Hein L., Barevný atlas farmakologie, Grada publishing Praha 2007, 22-25 30-31

- [14] Akizawa H., Uehara T., Arano Y., Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12), 1319-1328
- [15] Silbernagl S., Despopoulos A., *Atlas fyziologie člověka*, Grada publishing Praha 2004, 88
- [16] Dawidowicz A.L., Kobielski M., Pieniadz J., Anomalous relationship between free drug fraction and its total concentration in drug-protein system I. Investigation of propofol binding in model HSA solution, *Eur J Pharm Sci* 2008, 10 (34) 30-6
- [17] Dawidowicz A.L., Kobielski M., Pieniadz J., Anomalous relationship between free drug fraction and its total concentration in drug-protein system II. Binding of different ligands to plasma proteins, *Eur J Pharm Sci* 2008, 35 (1-2), 136-141
- [18] Gillette J.R., Overview of drug-protein binding , *Ann N Y Acad Sci* 1973, 226, 6-17
- [19] Wright J.D., Boudinot F.D., Ujhelyi M.R., Measurement and analysis of unbound drug concentrations, *Clin Pharmacokinet* 1996, 30 (6) 445-462
- [20] Chuang V.T., Otagiri M., Stereoselective binding of human serum albumin, *Chirality* 2006, 18 (3),159-16
- [21] Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M., Practical aspects of ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumine, *Biol Pharm Bull* 2002, 25 (6), 695-704
- [22] Otagiri M., Molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins, *Drug Metab Pharmacokinet* 2005, 20 (5) 309-23
- [23] Israili Z.H., Dayton P.G., Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs, *Drug Metab Rev* 2001, 33 (2), 161-235
- [24] Pacifini G.M., Viani A., Methods of determining plasma and tissue binding of drugs, *Clin Pharmacokinet* 1992, 23 (6), 449-468
- [25] Hinderling P., Comparative Evaluation of Equilibrium Dialysis Methods Employing Biological and Artificial Membranes for the Determination of Protein Binding of Drugs, *Ther Drug Monit* 1987, 9 (3), 331-336

- [26] Oravcova J., Böhs B., Lindner W., Drug-protein binding studies (New trends in analytical and experimental methodology), *J Chromatogr B* 1996, 667 (1), 1-28
- [27] Chalabala M., *Technologie léků*, Galén Praha 2001, 73
- [28] Waters N.J., Jones R., Williams G., Sohal B., Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding, *J Pharm Sci* 2008, 97 (10), 4586-4595
- [29] Tsai T.H., Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 797 (1-2), 161-173
- [30] Liu Z., Li F., Huang Y., Determination of unbound drug concentration and protein-drug binding fraction in plasma, *Biomed Chromatogr* 1999, 13 (4), 262-266
- [31] Shibukawa A., Kuroda Y., Nakagawa T., High-performance frontal analysis for drug-protein binding study, *J Pharm Biomed Anal* 1999, 18 (6), 1047-55
- [32] Blok D., Feitsma R.I., Vermeij P., Pauwels E.J, Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine, *Eur J Nucl Med* 1999, 26 (11), 1511-1519
- [33] Signore A., Annovazzi A., Chianelli M., Corsetti F., Van de Wiele C., Watherhouse RN, Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy, *Eur J Nucl Med* 2001, 28 (10), 1555-1565
- [34] Wiener R.E., Thakur M.L., Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases, *Appl Radiat Isot* 2002, 57 (5), 749-63
- [35] de Jong M., Kwekkeboom D., Valkema R., Krenning E.P., Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003, 30 (3), 463-469
- [36] Okarvi S.M., Peptide-based radiopharmaceuticals: Future tools for diagnostic imaging of cancer and other diseases, *Med Res Rev* 2004, 24(3), 357-397
- [37] Okarvi S.M., Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxin conjugates: Potential tools against cancer, *Cancer Treat Rev* 2008, 34 (1) 13-26
- [38] Liu S., Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides, *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60 (12), 1347-1370

- [39] Mankoff D.A., Link J.M., Linden H.M., Sundararajan L., Krohn K.A., Tumor receptor imaging, *J Nucl Med* 2008, 49 (6 suppl), 149S-163S
- [40] de Herder W.W., Hofland L.J., van der Lely A.J., Lamberts S.W., Somatostatin receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, *Endocr Relat Cancer* 2003, 10 (4), 451-458
- [41] Breeman W.A., de Jong M., Kwekkeboom D.J., Valkema R., Bakker W.H., Kooij P.P., Visser T.J., Krenning E.P., Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives, *Eur J Nucl Med* 2001, 28 (9), 1421-1429
- [42] Cihlo J., Lazníček M., Radioaktivně značené peptidy v diagnostice a terapii nádorů, *Česká a slovenská farmacie* 2008, 57(2), 70-77
- [43] Reubi J.C., Waser B., Schaer J.C., Laissue J.A., Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands, *Eur J Nucl Med* 2001, 28 (7), 836-846
- [44] de Herder W.W., Lamberts S.W., Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses, *Curr Opin Oncol* 2002, 14 (1) 53-7
- [45] Kwekkeboom D.J., Mueller-Brand J., Paganelli G., Anthony L.B., Pauwels S., Kvols L.K., O'dorisio T.M., Valkema R., Bodei L., Chinol M., Maecke H.R., Krenning E.P., Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs, *J Nucl Med* 2005, 46 [1(suppl)], 62S-66S
- [46] Kaltsas G.A., Papadogias D., Makras P., Grossman A.B., Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues, *Endocr Relat Cancer* 2005, 12 (4) 683-699
- [47] Trejnar F., Nový Z., Petřík M., Lázníčková A., Melicharová L., Vanková M., Lázníček M., In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111, *Ann Nucl Med* 2008, 22 (10), 859-67

- [48] Grozinsky-Glasberg S., Shimon I., Korbonits M., Grossman A.B., Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms, *Endocr Relat Cancer* 2008, 15 (3) 701-20
- [49] Hulke M.H., Gastrointestinal neuroendocrine tumors: a role for targeted therapies, *Endocr Relat Cancer* 2007, 14 (2) 207-219
- [50] Breeman W.A., De Jong M., Visser T.J., Erion J.L., Krenning E.P., Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{177}Lu , ^{90}Y and ^{111}In at high specific activities, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003, 30 (6) 917-920
- [51] Aly A., Shulkes A., Baldwin G.S., Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer, *Biochim Biophys Acta* 2004, 1704 (1) 1-10
- [52] Good S., Walter M.A., Waser B., Wang X., Müller-Brand J., Béhé M.P., Reubi J.C., Maecke H.R., Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing tumours, *Eur J Med Mol Imaging* 2008, 35 (10) 1868-1877
- [53] Grabowska A.M., Watson S.A., Role of gastrin peptides in carcinogenesis, *Cancer Lett* 2007, 257 (1) 1-15
- [54] Mather S.J., McKenzie A.J., Sosabowski J.K., Morris T.M., Ellison D., Watson S.A., Selection of radiolabeled gastrin analogs for peptide receptor-targeted radionuclide therapy, *J Nucl Med* 2007, 48 (4) 615-22
- [55] Ferrand A., Wang T.C., Gastrin and cancer: A review, *Cancer Lett* 2006, 238 (1), 15-29
- [56] Meloun M., Militký J., *Statistické zpracování experimentálních dat*, PLUS spol. s r.o. 1994, 181-198
- [57] Miroslava Dubcová, *Aplikovaná statistika s použitím programu excel* [online], poslední revize 28. června 2007, [cit. 6.12.2009] dostupné z: http://www.vscht.cz/mat/matstat/Apl_stat/BRAND%20NEW%20HOME.htm