

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Studium biologického chování derivátů kyseliny  
hyaluronové**

Hradec Králové

2010

Mgr. Evžen Svanovský

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc. za cenné rady, připomínky a pomoc při vedení po celou dobu mého doktorandského studia.

Děkuji také RNDr. Vladimíru Velebnému za podporu a inspiraci při výzkumu a Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. jejíž dlouholeté zkušenosti v oblasti radiofarmacie mi velmi pomohly pro pochopení a získání základních vědomostí a praktických dovedností v této oblasti.

Velký dík patří také pracovníkům oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi vytvořili výborné podmínky pro vypracování této práce a pracovníkům společnosti CPN spol. s r.o. bez jejichž pomoci by tato práce nebyla uskutečněna.

Tato práce vznikla za podpory společnosti Contipro C a.s. a Specifického vysokoškolského výzkumu SVV-2010-261-003.

## **Prohlášení:**

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

Evžen Svanovský

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	5
<b>2. Teoretická část</b> .....	7
<b>2.1 Biodistribuce léčiv</b> .....	8
<b>2.2 Glykosaminoglykany</b> .....	9
2.2.1 <i>Heparan sulfát</i> .....	11
2.2.2 <i>Dermatan sulfát</i> .....	11
2.2.3 <i>Chondroitin sulfát</i> .....	12
2.2.4 <i>Keratan sulfát</i> .....	12
<b>2.3 Hyaluronová kyselina</b> .....	13
2.3.1 <i>Fyziologické funkce</i> .....	14
2.3.2 <i>Receptory</i> .....	16
2.3.3 <i>Absorpce</i> .....	18
2.3.3.1 <i>Topická aplikace</i> .....	18
2.3.3.2 <i>Subkutánní aplikace</i> .....	19
2.3.3.3 <i>Intraperitoneální aplikace</i> .....	19
2.3.3.4 <i>Perorální podání</i> .....	19
2.3.4 <i>Distribuce</i> .....	20
2.3.5 <i>Biotransformace</i> .....	20
2.3.6 <i>Eliminace</i> .....	23
2.3.7 <i>Farmakokinetické parametry</i> .....	23
2.3.8 <i>Funkce HA při patologických dějích</i> .....	24
2.3.9 <i>Výzkum a využití</i> .....	25
2.3.9.1 <i>Funkce při nádorovém bujení</i> .....	26
2.3.9.2 <i>Využití v technologii léčiv</i> .....	28
2.3.9.3 <i>Využití v kosmetice a estetické chirurgii</i> .....	28
2.3.9.4 <i>Využití v terapii osteoartritidy</i> .....	28
2.3.9.5 <i>Využití ve wound-healingu</i> .....	30

2.4	Metodické přístupy pro studium biodistribuce a farmakokinetiky HA .....	30
3.	Přístrojové vybavení.....	34
4.	Experimentální část.....	36
4.1	Chemikálie a materiál.....	37
4.2	Metody .....	38
4.2.1	Biodistribuční studie .....	38
4.2.2	Eliminační studie .....	38
4.2.3	Farmakokinetické studie .....	38
4.2.4	Perfuze jater.....	39
4.2.5	HPLC analýza.....	39
4.3	Značení DTPA-HA izotopem $^{111}\text{In}$ .....	39
4.4	Stabilita komplexu $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA .....	44
5.	Výsledky .....	50
5.1	Biodistribuce $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA .....	51
5.2	Eliminace $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA .....	58
5.3	Farmakokinetika $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA .....	62
5.4	Perfuze jater $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA .....	64
6.	Diskuze.....	68
7.	Závěr .....	73
8.	Souhrn.....	75
9.	Summary .....	78
10.	Přílohy .....	81
10.1	Seznam publikací .....	82
10.2	Publikace.....	83
11.	Použité zkratky.....	105
12.	Seznam použité literatury .....	107

# **1. ÚVOD**

Hyaluronová kyselina (HA) je přirozeně se vyskytující a v živých organismech všudypřítomný nesulfonovaný glykosaminoglykan. Je to lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek tvořených kyselinou glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Struktura HA byla poprvé definována roku 1934 laboratoří Karla Meyerse při výzkumu vnitřní tekutiny sklivce. Samotnou strukturu lineárního glykosaminoglykanu s charakteristicky se opakujícími disacharidovými jednotkami (viz níže) popsali roku 1954 Weissman s Meyerem. <sup>1)</sup>

V živých organismech je HA přirozenou součástí extracelulární matrix, váže na sebe velká množství vody, vyplňuje prostor, je součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Ve velké míře se vyskytuje v očním sklivci, synoviální tekutině a kůži. Na buněčné úrovni brání prostupu virů a bakterií přes pericelulární matrix k buňce, moduluje zánět, zháší volné kyslíkové radikály, ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk, má významnou regulační a strukturální funkci při hojení ran, v synoviální tekutině díky svým viskoelastickým vlastnostem tlumí nárazy.

Některé její vlastnosti byly využívány medicínou již v šedesátých letech minulého století při hojení popálenin a kožních vředů. Od této doby se spektrum indikací HA výrazně rozšířilo a zahrnuje: oční chirurgii – ochrana před poškozením oka během zákroku nebo náhrada sklivce, wound-healing – pro tzv. vlhké hojení ran, estetickou chirurgii – výplň vrásek, revmatologii – intraartikulární a periartikulární injekce, aj.

Současný výzkum se zaměřuje především na schopnost HA ovlivňovat migraci a proliferaci buněk, receptory pro HA a jejich signální cesty a možnosti jejich ovlivnění. Základní motivací tohoto výzkumu je využití HA pro terapii nádorových onemocnění, kde by HA mohla sloužit jako nosič cytotoxického léčiva nebo ve formě fragmentů na jeho povrchu směřovat léčivo ke svému cíli.

Cílem této práce bylo vytvoření reprodukovatelného postupu značení HA izotopem <sup>111</sup>In a u takto vytvořené molekuly popsat biodistribuci po intravenózním podání a stanovit základní farmakokinetické parametry. Výsledky této práce mají přinést nové informace o biologickém chování HA a určit další možné cesty v jejím výzkumu směřujícím k praktickému využití.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Biodistribuce léčiv

Studium biodistribuce, tedy schopnosti léčiv nebo látek se distribuovat v živém organismu do jednotlivých orgánů a tkání, je jedním ze základních předpokladů pro určení místa působení látek v organismu. Její studium vychází z předpokladu, že existuje vztah mezi farmakodynamickým působením léčiva a jeho koncentrací v místě, kterého je schopno dosáhnout, nebo ke kterému je transportováno<sup>2)</sup>.

Místo účinku léčiva v organismu je tedy ve výsledku ovlivněno primárně místem jeho absorpce (přestup přes biologické membrány – typ membrány v místě podání), vlastnostmi léčiva (velikost molekuly, fyzikálně-chemické vlastnosti, lipo/hydrofilita, pH léčiva), faktory ovlivňujícími jeho transport krevním řečištěm (vazba na plazmatické bílkoviny) a vlastnostmi prostředí v místě jeho finálního vychytávání (prokrvení, permeabilita kapilár, přítomnost transportních mechanismů aj.)<sup>3)</sup>.

Celkový obraz o biodistribuci podaného léčiva můžeme získat buď přímo, měřením jeho koncentrací v orgánech a tkáních, pokud nám takové měření vlastnosti léčiva umožňují, nebo nepřímo, měřením koncentrací látek nebo intenzity záření, které je se sledovanou látkou biologickým systémem nesené. Pro nepřímé sledování se používají nejčastěji radioaktivní zářiče nebo látky vydávající fluorescenční záření. Tohoto postupu se využívá zejména u látek, které jsou přirozenou součástí organismu, do kterého jsou aplikovány. V našem případě je tomu tak u HA.

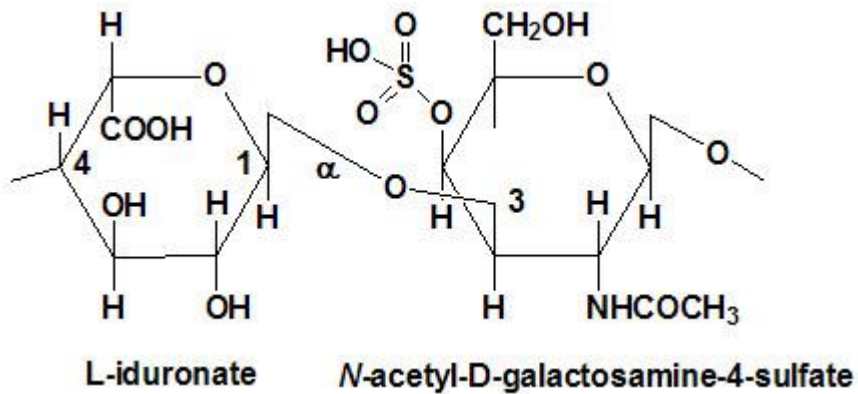


## 2.2 Glykosaminoglykany

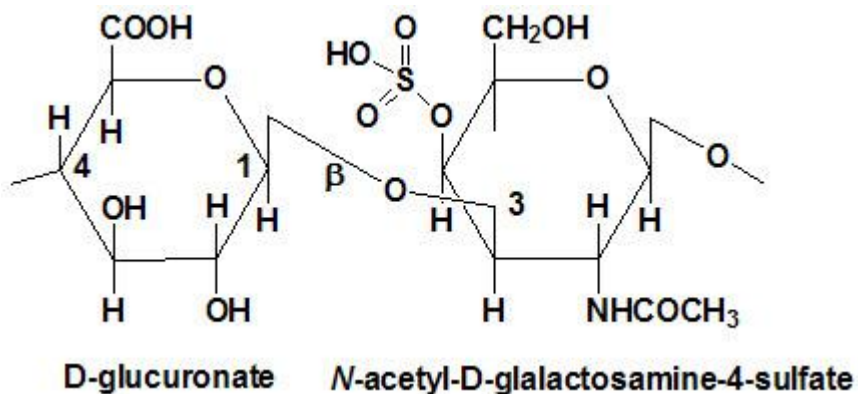
HA patří mezi glykosaminoglykany (GAG). Jsou to v živých organismech přirozeně se vyskytující lineární heteropolysacharidy s typicky se opakujícími disacharidovými jednotkami. Jeden monosacharid je vždy aminocukr D-glukosamin nebo D-galaktosamin a druhý je zbytek kyseliny D-glukuronové nebo iduronové. Obecně se rozdělují do čtyř skupin (1) hyaluronan, (2) chondroitin sulfát a dermatan sulfát, (3) keratan sulfát a (4) heparan sulfát a heparin.<sup>4)</sup>

Obrázek č.1: Strukturální vzorce glykosaminoglykanů<sup>5)</sup>

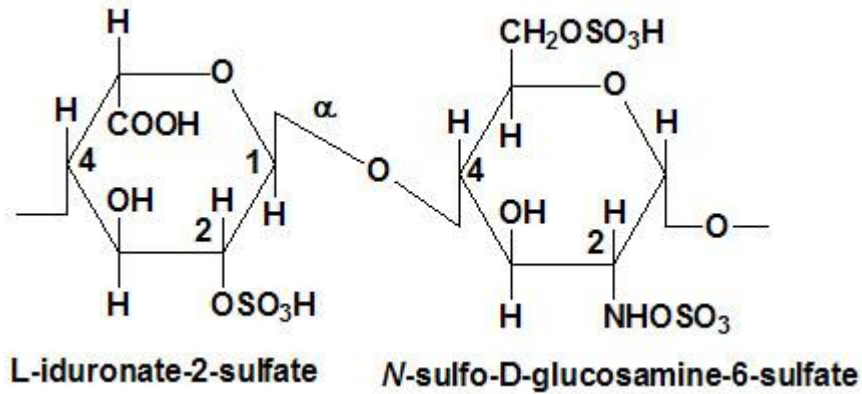
Dermatan sulfát:



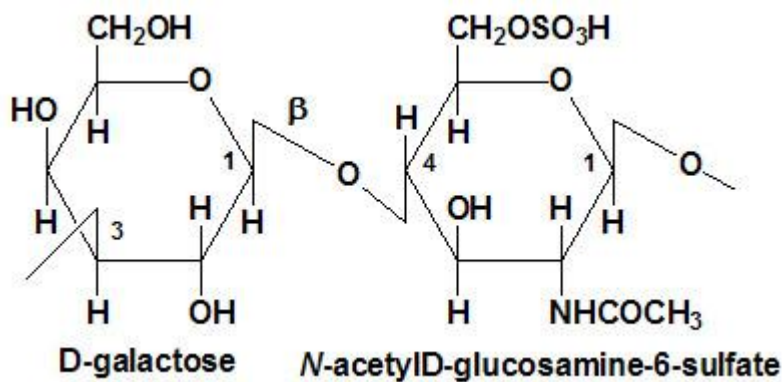
Chondroitin sulfát:



Heparin a heparan sulfát:

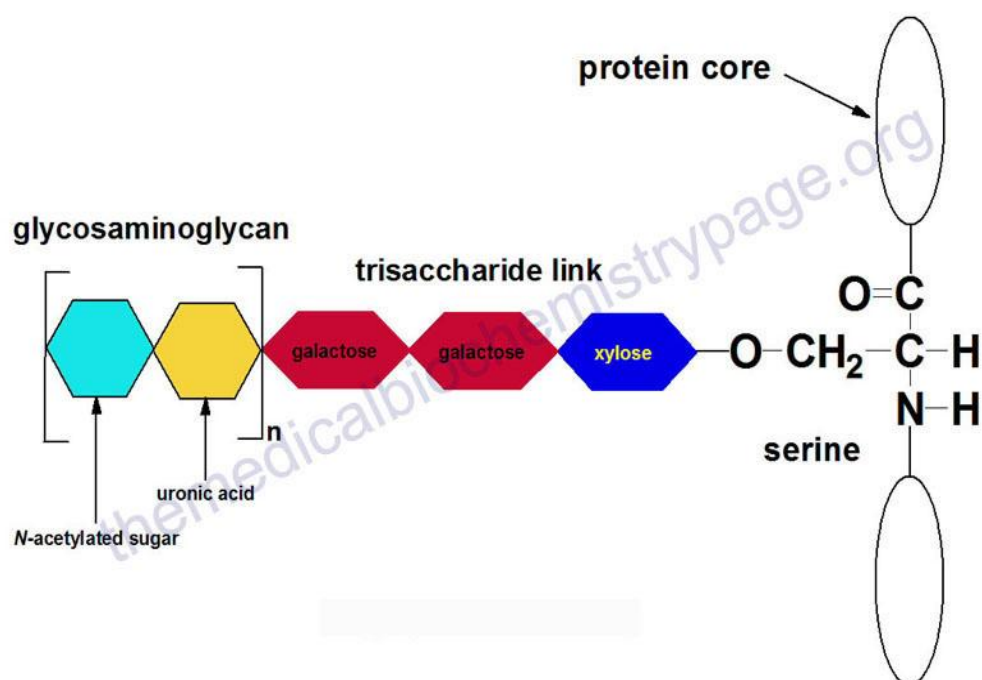


Keratan sulfát:



GAG jsou vysoce negativně nabitě molekuly lišící se od sebe navzájem řadou vlastností: přítomným aminocukrem, uronovou kyselinou, vazbou těchto dvou složek, délkou řetězce, přítomností nebo nepřítomností sulfátu, vlastností osových proteinů, na které jsou vázány a konečně také zastoupením v jednotlivých tkáních a funkcí. Vazbou na osový protein vytvářejí GAG proteoglykany nebo též proteoglykany. Jsou součástí celé řady tkání, kde plní důležité fyziologické funkce jako komponenty extracelulární matrix nebo na buněčné úrovni jako intracelulární komponenty a vázané na povrch buněčných membrán. Regulují celou řadu procesů jako buněčná proliferace, diferenciace a buněčné interakce. Jsou syntetizovány v Golgiho aparátu pomocí vysoce specifických glykosid transferáz. Jejich degradace se potom odehrává v lysozomech, kde jsou štěpeny lysozomálními enzymy. <sup>6)7)</sup>

Obrázek č.2: Schéma glykoproteinu <sup>5)</sup>



### 2.2.1 Heparan sulfát

Heparan sulfát a heparin jsou v současnosti nejprozkoumanějšími a v praxi nejvyužívanějšími proteoglykany. Heparin má ze všech biologických molekul největší negativní náboj. Je produkován žírnými buňkami a bazofily.

Ačkoli je jeho praktické využití v medicíně jako antikoagulans, jeho pravá funkce v organismu není zcela objasněna. Předpokládá se, že jeho původní funkce je obrana organismu před virulentními organismy a cizími látkami v místě poranění tkáně. Interaguje s molekulami buněčných membrán, jako jsou růstové faktory, virové proteiny, enzymy, adhezivní proteiny a integriny. Toto je podloženo i faktem, že heparin/heparan sulfát může být nalezen i u bezobratlých se zcela jinou koagulační kaskádou. <sup>7) 8) 9)</sup>

### 2.2.2 Dermatan sulfát

Dermatan sulfát označovaný též jako chondroitin sulfát B je hojně zastoupen v kůži, cévách, srdečních chlopních, vazech, plicích a rohovce. Strukturou se velmi podobá jak chondroitin sulfátu tak heparan sulfátu. Jeho zvýšená přítomnost byla

doložena u kardiovaskulárních onemocnění, tumorogenezi, infekcích, hojení ran. Společně s heparan sulfátem modifikují biologickou odpověď, regulují enzymovou aktivitu, slouží jako signální molekuly nebo jako cílová struktura virů, bakterií a parazitů při invazi do organismu.<sup>10)</sup>

### 2.2.3 *Chondroitin sulfát*

Chondroitin sulfát podobně jako heparin a heparan sulfát již také našel svoje uplatnění v současné medicíně, i když v tomto případě zatím jen v podobě potravinových doplňků, které snižují celkové množství konzumovaných NSA při osteoartritidě.<sup>11)</sup>

Tělu vlastní chondroitin sulfát je součástí extracelulární matrix, kde vazbou na příslušné proteiny vytváří skupinu proteoglykanů tzv. lektikanů, zodpovědných za strukturální integritu tkání a správnou funkci kloubních chrupavek.

Ačkoliv není chondroitin sulfát tak dobře prozkoumaný jako heparan sulfát, předpokládá se, že má také významné regulační schopnosti na buněčné úrovni.<sup>4)12)13)</sup>

Jako jeden z mála GAG může být absorbován po p.o. podání.<sup>14)</sup>

### 2.2.4 *Keratan sulfát*

Keratan sulfát je jediný z GAG, v jehož řetězci se nevyskytují zbytky kyseliny uronové.<sup>4)</sup> Stejně jako dermatan sulfát není dosud terapeuticky využíván. Poprvé byl izolován z rohovky Meyerem, který zároveň klasifikoval jeho dvě formy KS I a KS II. Ty se liší svými vlastnostmi a tím i místem jejich přítomnosti.

KS I je přítomen především v rohovce, kde společně s dermatan sulfátem, díky své schopnosti pojmout velké množství vody, udržuje průhlednost rohovky.

KS II se dá označit jako „skeletální“ typ. Podle výskytu se dá ještě rozdělit na „kloubní“ KS-IIA a „mimo-kloubní“ KS-IIB. V kloubu je součástí proteoglykanu aggrecanu, který udržuje schopnost chrupavky absorbovat náraz. Díky jeho

koncentraci v séru a v moči se dá poznat míra poškození chrupavky u onemocnění kloubů. <sup>7)</sup>

Biologické funkce keratan sulfátu spočívají především v hydrataci tkání a stejně jako u ostatních výše jmenovaných GAG se na buněčné úrovni i tento podílí na signálních procesech vedoucích k regulaci buněčné motility, adheze aj. <sup>15)</sup>

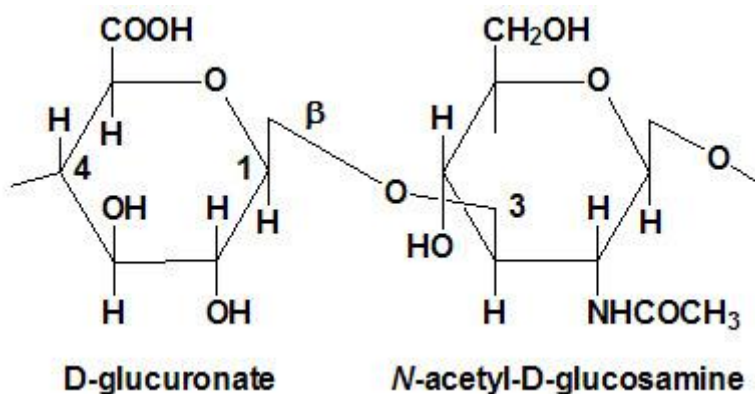
Tabulka č.1: Stručný přehled funkcí GAG <sup>7)</sup>

Glykosaminoglykan	Biologická funkce	Možné medicínské využití
HA	Součást ECM, sklivce a synoviální tekutiny	Urychlení hojení ran
		Léčba rakoviny a cévních chorob
		Léčba artritidy
CS	Součást mnoha tkání, zejména chrupavky	Inhibice angiogeneze při nádorovém bujení
		Léčba osteoartritidy
DS	Součást mnoha tkání	Inhibice angiogeneze při nádorovém bujení
		Antikoagulans
Heparin/HS	Všudypřítomný na povrchu buněk a v ECM	Inhibice růstu nádorů
		Antikoagulans
		Inhibice bakteriálních a virových infekcí

### 2.3 Hyaluronová kyselina

HA se od ostatních GAG liší především tím, že není sulfatována a neváže se na specifické proteiny, tedy nevytváří proteoglykany. Je složena z jednotek disacharidů tvořených kys. glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Ve volném prostoru vytváří sférickou konformaci, ve které zaujímá přibližně 0,1% objemu a zbytek tvoří imobilizovaná voda. Její molekulová hmotnost se liší podle typu tkáně, ve které se nachází od desítek kilodaltonů až po několik megadaltonů. Zaujímá tedy velký prostorový objem a je schopna pojmout velké množství vody. <sup>16)</sup>

Obrázek č.3: Strukturální vzorec hyaluronové kyseliny<sup>5)</sup>



### 2.3.1 Fyziologické funkce

Tato látka je v živých organismech všudypřítomná. Je běžně syntetizována řadou buněk a je přirozenou součástí tělesných tekutin a tkání. Syntéza HA probíhá za pomoci hyaluronan syntázy (HAS). HAS patří mezi „s membránou asociované“ glykosiltransferázy.<sup>17)</sup> Syntéza samotné HA probíhá intracelulárně střídavým transferem uridin-difosfo-HA (UDP-HA) k substrátu uridin-difosfo-N-acetylglukosamin (UDP-GlcNac) a uridin-difosfo-glukuronové kyselině (UDP-GlcA) při odštěpení UDP molekuly. Takto syntetizovaná HA zůstává přichycena na plazmatické membráně a uvolněna může být buď jako intaktní molekula nebo jako fragment po enzymatickém nebo radikálovém štěpení.<sup>18)19)</sup>

Plazmatické hladiny dosahují 300 ng/ml.<sup>20)</sup> Celkové množství v lidském organismu je odhadováno na 15g,<sup>21)</sup> s největšími depozity v synoviální tekutině, sklivci, kůži a v místech její degradace - játrech a slinivce.<sup>22)23)24)</sup>

Za fyziologických podmínek tvoří vysoce hydratovaný obal kolem mnoha buněčných typů,<sup>22)</sup> vytváří odpor vodě, podílí se na udržení osmotického tlaku a vytváří jakési molekulové síto pro propuštění molekul o různé molekulové hmotnosti.<sup>16)</sup>

Reguluje funkce granulocytů, ovlivňuje oxidyvativní poškození tkání, je endogenním stimulatorem produkce řady cytokinů, reguluje rychlost produkce

endoteliálních buněk a fibroblastů. <sup>25)</sup> Indukuje angiogenezu v pokožce <sup>26)</sup> a v neposlední řadě podporuje buněčnou proliferaci, migraci a tumorigenicitu. <sup>27)28)29)</sup>

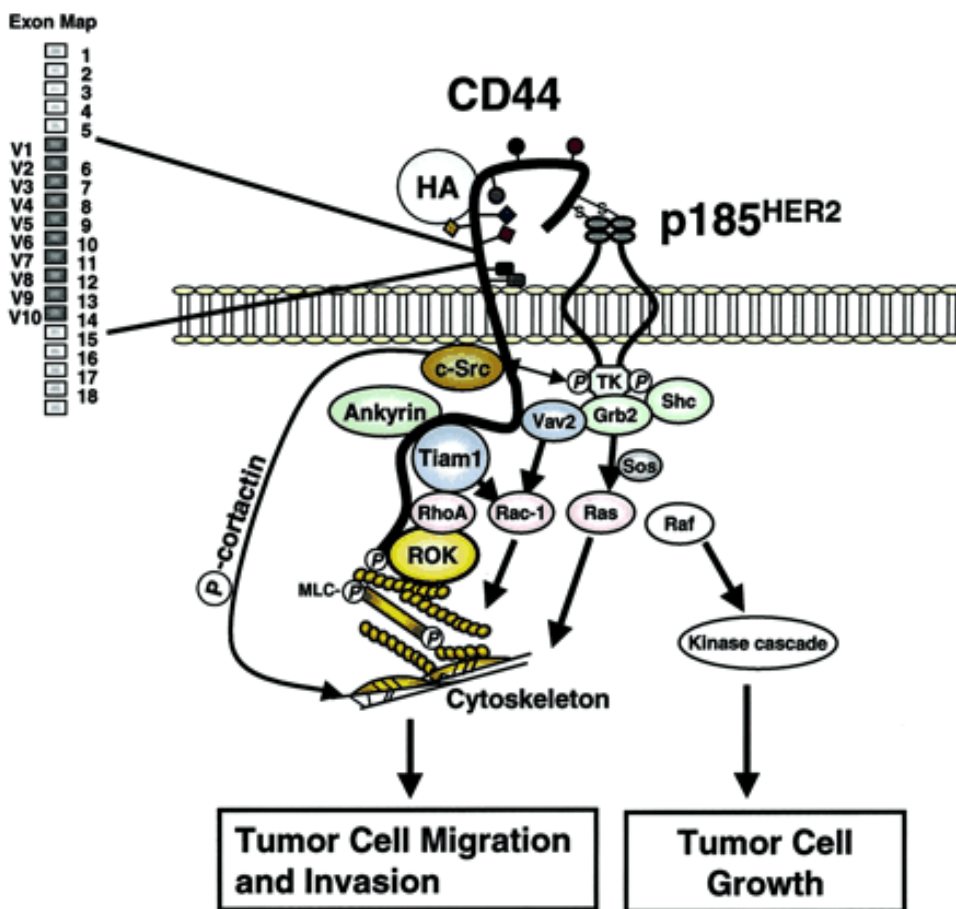
Na orgánové úrovni zvlhčuje stratum corneum a udržuje jeho flexibilitu. <sup>30)</sup> Jako součást sklivce udržuje nitrooční tlak a tvar oka. Je také významnou součástí synoviální tekutiny <sup>31)</sup> čímž udržuje správnou lubrikaci chrupavky a tím správnou funkci kloubu. <sup>23)</sup>

Fyziologické funkce HA na buněčné úrovni, jako ovlivnění buněčné adheze, proliferace, migrace a angiogeneze a formování extracelulární matrix, jsou závislé na vazbě na specifické receptory. Afinita HA k těmto receptorům roste s narůstající molekulovou hmotností. Vyšší molekulová hmotnost zvyšuje nabídku charakteristických sekvencí sacharidů, nutných k navázání HA a zároveň stéricky inhibuje možnost vazby menších molekul.

### 2.3.2 Receptory

Obecně nazýváme receptory pro HA HYABP (hyaluronan binding proteins). Hlavní z těchto receptorů jsou transmembránové proteiny CD44 a RHAMM. Jejich funkce je spojena s tyrosin kinázovou aktivitou jak je vidět na obrázcích č. 4 a 5. <sup>32)33)34)35)</sup>

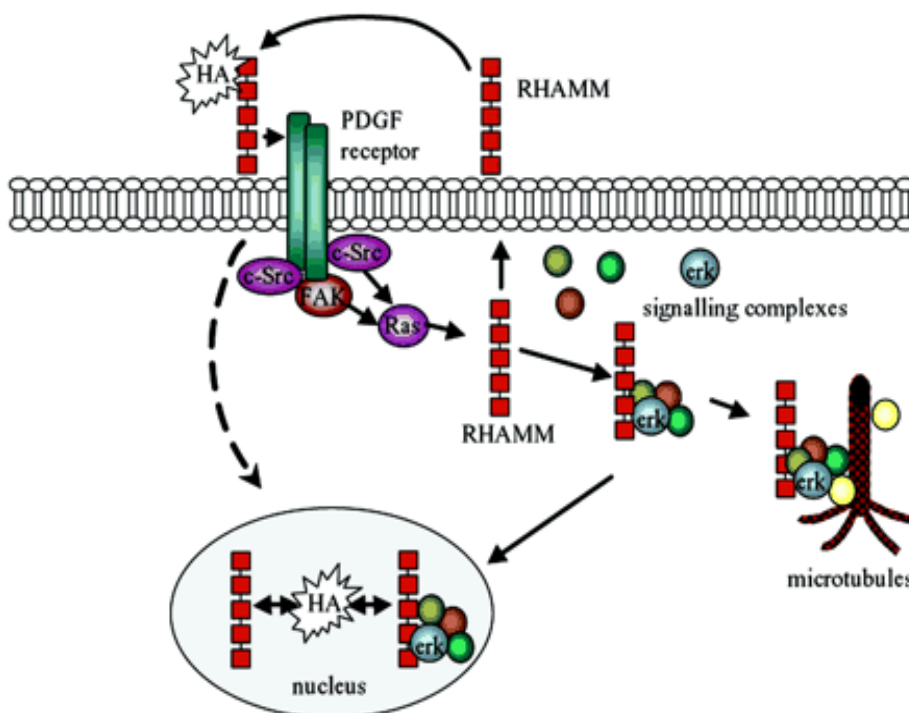
Obrázek č.4: Model HA-dependentní, CD44 specifické signální cesty



CD44-HA interakce podporují tyrosin-kinázovou aktivitu HER2 a nerekceptorové kinázy Src. Src fosforyluje kortaktin, který jej přitahuje k buněčné membráně. CD44-HA interakce také aktivují RHOA a Rac1 a CD44 se váže k Tiam1 a Vav2. HA podporuje spojení CD44 s proteiny cytoskeletu jako ankyrin nebo ERM proteiny. Aktivace těchto cest společně vede k nádorovému chování jako migrace a invazivita. Interakce HA-CD44 vedou k řadě signálních cest a s receptorem spřaženým fosforylacím. To vše vede k nádorovému chování buněk jako migrace, proliferace, růst a invazivita. <sup>32)</sup>



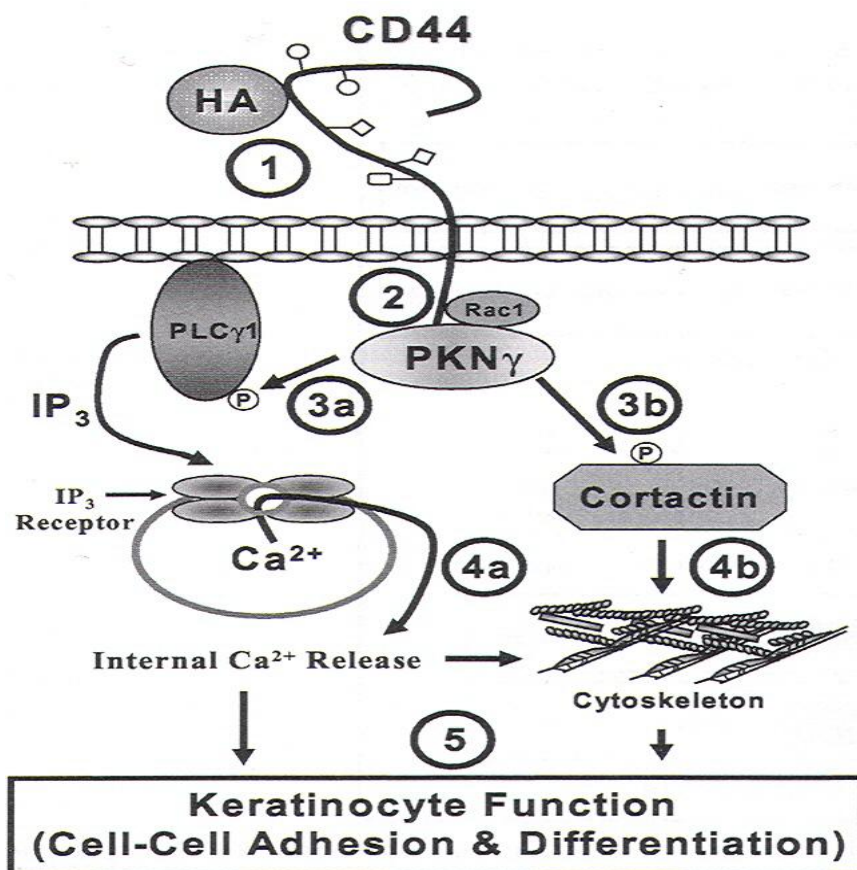
Obrázek č.5: Model HA-dependentní, RHAMM signální cesty.



*RHAMM je pohyblivý hyaladherin, který se objevuje na mnoha buněčných kompartmentech, a který může být i transportován do extracelulárního prostředí, kde se váže na povrch buňky. Povrchové interakce RHAMM-HA regulují přenos signálů přes Ras a Src. Dále RHAMM reguluje schopnost PDGF aktivovat Erk kinasu (klíčové pro buněčnou motilitu). Intracelulární RHAMM kóduje umístění některých kinás a rozpoznávacích míst. RHAMM je spojena též s cytoskeletem.<sup>32)</sup>*

Podle dalších poznatků interaguje HA-CD44 s Rac-1 dependentní proteinkinázou N- $\gamma$  a jsou fyzicky spojeny in vivo. Rac1 aktivovaná PKN $\gamma$  zvyšuje threoninovou fosforylaci fosofolipázy C. Ta štěpí fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát na inositoltrifosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol. Zvýšená koncentrace IP<sub>3</sub> vede k uvolnění intracelulárního Ca<sup>2+</sup>. Diacylglycerol aktivuje proteinkinázu C. Dále HA-CD44 aktivovaný Rac1-PKN $\gamma$  fosforyluje cytoskeletární protein cortactin. Tento mechanismus vede ke zvýšení cell to cell adheze. (Obrázek č.6).<sup>36)</sup>

Obrázek č.6: Interakce HA-CD44 s Rac-1 dependentní protein-kinázou N-γ



### 2.3.3 Absorpce

HA nese na každém disacharidu jednu karboxylovou skupinu, která je při fyziologickém pH plně disociována. To z ní vytváří silně polární a hydrofilní látku, jejíž pasivní přestup přes biologické bariéry by měl být téměř nemožný.<sup>16)37)</sup>

V dosavadní literatuře nebyl zveřejněn žádný důkaz pro specifický transportní mechanismus, který by umožňoval jakýkoli aktivní druh transportu této molekuly přes biologické bariéry. I přesto se zdá, že HA je schopna přes tyto bariéry pronikat. V této kapitole jsou popsány výsledky absorpce z různých míst aplikace s pravděpodobnými mechanismy průniku HA přes biologické membrány.

#### 2.3.3.1 Topická aplikace

Při topické aplikaci by měl být průnik HA přes silně lipofilní stratum corneum nemožný. V hydratovaném stavu se však uvnitř molekuly HA tvoří několik

vodíkových můstků, které mohou stočit molekulu do stavu, ve kterém je exponováno 8 -CH vazeb a ta se tak přiblíží amfifilní povaze a je schopna proniknout i do hlubších vrstev pokožky. <sup>38)</sup>

V samotné pokožce je potom HA transportována extracelulárními prostory zejména difúzí, zpožděnou díky možnému uvíznutí velkých molekul ve fibrózní tkáni, nebo naopak difúzí, která je facilitována redukcí velikosti molekuly. <sup>39)</sup>

Další studie dokonce uvažuje o absorpci pokožkou zprostředkovanou aktivním transportem přes buňky. Studie uvažuje, že tímto způsobem proniká HA přes pokožku až do krevního oběhu, kde se objevuje asi po 30 minutách od aplikace. <sup>38)</sup> Konkrétní mechanismy nebo transportní systémy, které by toto umožňovaly, zde nejsou uvedeny a jde spíše o hypotetickou možnost.

#### *2.3.3.2 Subkutánní aplikace*

Subkutánně podaná HA, značená <sup>125</sup>I-TC, do zadní nohy králíka se nejprve koncentruje v pokožce v místě vpichu. Menší koncentrace se objevují zejména v játrech a lymfatické uzlině na straně vpichu. Po 48h se poměr mění, koncentrace v pokožce se snižuje a koncentrace v játrech mírně stoupá. Po celou dobu je HA degradována na nízkomolekulární fragmenty. <sup>40)</sup>

#### *2.3.3.3 Intraperitoneální aplikace*

Intraperitoneální podání HA vede k jejímu rychlému vstřebání z dutiny břišní a po osmi hodinách od začátku experimentu se její hladiny v krvi zvyšují až na čtyřnásobek své původní hodnoty. <sup>41)</sup>

#### *2.3.3.4 Perorální podání*

Mechanismus absorpce HA po perorálním podání není dosud příliš znám. Jak již bylo zmíněno, neexistuje v dostupné literatuře spolehlivý důkaz o absorpci HA ze střevního lumen. Dvě práce používající značenou <sup>99m</sup>Tc-HA na potkaních přesto popisují její absorpci ze střevního lumen, na základě aktivity měřené v krvi, svalech,

slinných žlázách, kostech, ramenních kloubech a páteři. <sup>42)43)</sup> Tyto práce připouští možnost sledování pouhých frakcí <sup>99m</sup>Tc-HA nebo volného <sup>99m</sup>Tc.

#### 2.3.4 *Distribuce*

Po intravenózním podání je distribuce HA výrazně ovlivněna její celkovou plazmatickou koncentrací a celkovým průtokem krve játry. Důsledkem toho je i ovlivnění dalších farmakokinetických parametrů jako clearance a plazmatický poločas. <sup>44)</sup>

Obecně jsou plazmatické koncentrace HA nízké a doposud nebyl objeven transportní protein pro HA. I.v. podaná HA má relativně krátký plazmatický poločas, od 2,5 - 9 min u člověka a králíka, až po 20 min u myši. <sup>45)46)47)</sup>

Nejvyšší koncentrace v krvi lze naměřit během první hodiny od podání. HA je poté z plazmy vychytávána do ostatních tkání prvky RES s částečnou redistribucí do lymfatického systému. 4h od podání je nejvyšší koncentrace v játrech, slezině, kostní dřeni a lymfatických uzlinách v periferních oblastech. V malých koncentracích může být exogenně podaná HA nalezena také v ledvinách, plicích, nadledvinách nebo kosterním svalstvu. <sup>40)41)42)43)45)48)</sup>

Rychlé vychytávání a redistribuce jsou odpovědné i za vysoký distribuční objem (viz 2.3.7). <sup>47)49)50)</sup>

#### 2.3.5 *Biotransformace*

Biotransformace HA probíhá různými způsoby a na různých místech. Nejčastějším místem biodegradace HA jsou již zmiňovaná játra a to zejména při parenterálních způsobech podání. Topické podání naopak vykazuje degradaci již v pokožce. <sup>39)</sup>

HA je ze systému vychytávána především neparenchymatickou frakcí jaterních buněk, kde je degradována na nízkomolekulární produkty. <sup>51)</sup>

Vychytávání se děje pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. O následném osudu komplexu HA-receptor po endocytóze existují čtyři hypotézy. 1) receptor se může recyklovat zpět na buněčnou membránu, zatímco ligand je degradován nitrobuněčně, 2) receptor i ligand mohou být oba recyklovány, 3) receptor i ligand mohou být oba degradovány a 4) receptor s ligandem mohou být transportovány přes polární buňku a nakonec uvolněny do extracelulárního prostoru.

Díky experimentům s digitoninem, schopným permeovat do nitra buňky a uvolnit ze svých receptorů nitrobuněčnou HA a <sup>125</sup>I značenou HA, se potvrdilo, že HA je kumulována nitrobuněčně a po endocytóze je ze svého receptoru uvolněna. Následně je degradována a receptor je recyklován zpět na povrch buňky. O stejný mechanismus soutěží také chondroitin a heparin. <sup>52)</sup>

Vychytávání a degradace HA je umožněno schopností buněk vázat HA pomocí receptorů několika typů. <sup>53)</sup> Jsou to transmembránové receptory (CD44, RHAMM) a některé další (HABP, LYVE, LAIYLIN, ICAM, VCAM).

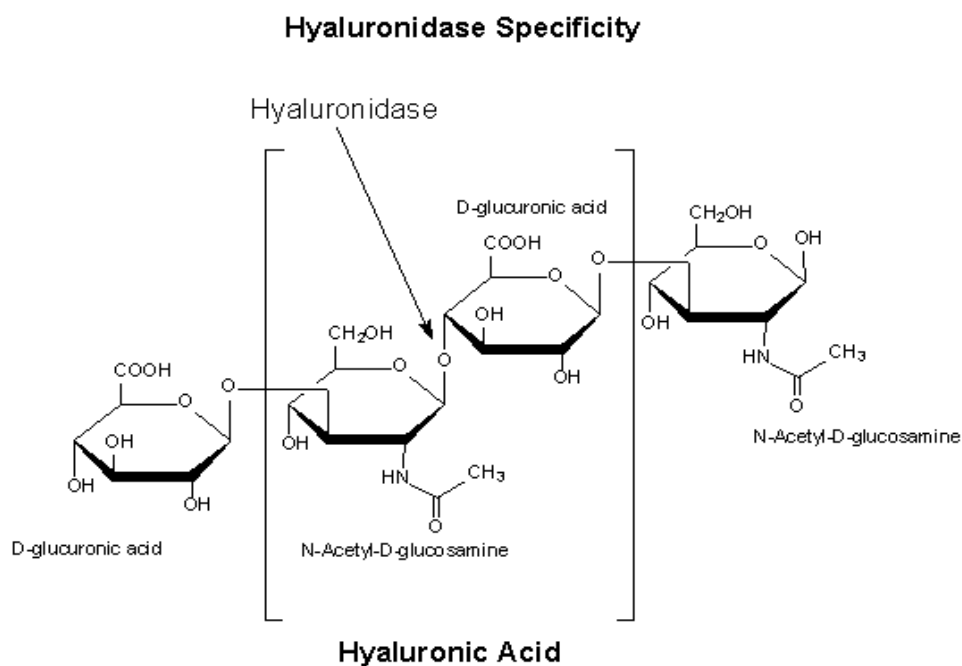
Hlavním receptorem pro uptake HA je opět CD44. Exprese tohoto receptoru, a tím i zvýšený uptake HA z oběhu, může být regulována cytokiny jako je IL-1 <sup>53)</sup>

Katabolismus HA zahrnuje degradaci polysacharidového řetězce na monomery, které jsou využívány jinými tkáněmi. <sup>20)</sup>

Katabolický proces začíná vazbou extracelulárních molekul k povrchu buňky kombinovaným způsobem a jejich následným rozkladem pomocí enzymů hyaluronidáz (viz. Obrázek č.7).

V lidském organismu rozeznáváme tři typy těchto enzymů. Pro degradaci HA jsou nejdůležitější Hyal 1 a Hyal 2. Hyal 2 štěpí velké makromolekuly na povrchu buňky na menší produkty o velikosti 20 kDa. Následně jsou tyto oligosacharidy transportovány do buňky v lysozomům podobných organelách, kde jsou dále štěpeny Hyal 1 na di- až tetrasacharidy. V posledním kroku jsou di- a tetrasacharidy přeměněny β-glykosidasou, β-glukuronidasou, β-N-acetylglukosaminidasou na monosacharidy. <sup>54)55)</sup>

Obrázek č.7: Místo působení hyaluronidázy<sup>56)</sup>



Degradace HA probíhá kromě jater také v epidermis a lymfatickém systému.

V epidermis je obrat HA taktéž rychlý. Keratinocyty v monokultuře si ponechávají část HA jako součást buněčné vrstvy, část na povrchu plazmatické membrány a část v intracelulárním kompartmentu.<sup>57)</sup>

Je pravděpodobné, že první zkracování řetězce HA se děje extracelulárně neenzymatickými postupy, jako je degradace kyslíkovými radikály anebo mechanickými silami.<sup>39)</sup>

V synoviální tekutině je obrat HA závislý na velikosti molekuly. Zatímco velké molekuly setrvávají v synoviální štěrbině, malé molekuly jsou odsouvány a degradovány.<sup>18)</sup>

V lymfatickém systému probíhá degradace řetězců HA v lymfatických uzlinách. Při tomto ději jsou rychleji štěpeny molekuly s vyšší molekulovou hmotností než ty s menší.<sup>58)</sup>

Degradační produkty tvořené po úplné degradaci se při analýze chovají jako laktáty a acetáty. Můžeme tedy říci, že metabolismus HA je v souladu s metabolismem acetylových skupin přes acetyl-CoA.<sup>46)51)</sup>

### 2.3.6 *Eliminace*

Exkrece HA je převážně extrarenální<sup>59)</sup> a je limitována molekulovou hmotností molekuly. [<sup>3</sup>H]HA nalezená v moči má molekulovou hmotnost kolem 25000. Toto se zdá být horním limitem pro renální exkreci. Ta může být mimo limitující  $M_r$  ovlivněna také velkým hydrodynamickým objemem HA.<sup>46)</sup>

### 2.3.7 *Farmakokinetické parametry*

Farmakokinetické parametry HA jsou v současné době prostudovány jen omezeně. HA nenese na povrchu žádné antigenní struktury a její slabá odolnost vůči fyzikálním vlivům (vysoké nebo nízké pH, vysoká teplota) klade značně náročné podmínky pro její sledování v organismu.

Na základě informací z literatury se pro kinetiku HA jeví kompatibilní jednokompartmentový nelineární model Michaelise-Mentenové. Dvoukompartmentový model svou charakteristikou a vlastnostmi neodpovídá chování HA a je proto nekompatibilní.

Při zkouškách na člověku byla vypočítána  $K_m$  v hodnotách  $340 \pm 130 \mu\text{g l}^{-1}$ . Maximální rychlost reakce  $V_{\text{max}}$   $267 \pm 81 \mu\text{g min}^{-1}$  a průměrný distribuční objem  $5,44 \pm 0,94 \text{l}$ .

Eliminace HA byla popsána jako reakce prvního řádu podle rovnice:

$$v = k \times n$$

Kde  $v$  ( $\mu\text{g min}^{-1}$ ) je rychlost eliminace a  $n$  je množství látky (HA). Nebo vyjádřeno kinetikou Michaelis-Mentenové:

$$v = V_{max} / (1 + K_m/c)$$

kde  $V_{max}$  je maximální rychlost eliminace,  $K_m$  je Michaelisova konstanta a  $c$  je koncentrace HA v séru. <sup>60)</sup>

Plazmatický poločas se u člověka pohybuje od 3,5 do 6,0 min. <sup>46)</sup>

### 2.3.8 *Funkce HA při patologických dějích*

Mimo fyziologické funkce zmíněné v úvodu této kapitoly, je HA přítomna také řady patologických dějů, jejichž průběh lze odhalit na základě změn její koncentrace v krvi, nebo na základě přítomnosti jejích fragmentů a degradačních produktů.

Mezi tyto patologické děje patří především revmatoidní artritida, fibróza a jiná onemocnění jater a některé další zánětlivé procesy v lidském organismu.

HA obsažená v synoviální tekutině je schopna inhibovat migraci, chemotaxi, fagocytózu a adheenci leukocytů. Může také ovlivnit produkci řady mediátorů zánětlivých procesů obsažených v synoviální tekutině. Stejně jako má součást HA, kys. D-glukuronová, schopnost působit jako scavenger.

Strukturní změny HA, týkající se například délky jejího řetězce, mohou mít výrazný význam na funkce synoviální tekutiny, jako jsou absorpce nárazu, rozptýlení energie při traumatu a konzervace a lubrikace chrupavky. Při patologických stavech nastává změna ve složení a velikosti molekuly HA. <sup>61)</sup>

Při revmatoidní artritidě jsou v krvi pacienta nacházeny antigenní komplexy vznikající vazbou malých molekul HA na protilátky typu IgG. Tyto malé molekuly vznikají díky degradaci velkých molekul volnými radikály produkovanými neutrofilními granulocyty a monocyty, které revmatický kloub infiltrují. Vysokomolekulární HA nutná pro lubrikaci kloubní chrupavky je produkována jen zdravými buňkami, zatímco kloubní tkáň infiltrovaná monocyty a neutrofilny produkuje pouze molekuly o malé molekulové hmotnosti. Degradace HA pak vede k



masivnímu uvolnění volných radikálů. Vychytávače radikálů (scavengery) chrání HA před degradací v synoviální tekutině a zlepšují tak stav revmatického kloubu.<sup>18)</sup>

HA je mimo osteoartritidy také markerem poškození jater (cirhóza, fibróza včetně dalších poškození způsobených virovým onemocněním nebo působením xenogenních látek) a biliární atrezie. Indikace je možná díky tomu, že za normálních podmínek je 90% HA degradováno jaterními endoteliálními buňkami. Při jejich poškození se toto procento snižuje a dojde ke zvýšení plazmatické koncentrace HA. Na základě statistik je potvrzeno, že plazmatické koncentrace HA korelují s plazmatickými koncentracemi bilirubinu. Plazmatická koncentrace HA v těchto případech vypovídá pouze o stavu jaterní fibrózy a nikoli o stavu jaterních funkcí.<sup>62)</sup>

Mimo svoji roli při patologii revmatoidní artritidy a poškození jater, má HA velký vliv také při kancerogenním procesu. Interakcí se specifickým CD44 receptorem indukuje HA buněčnou motilitu, facilitovanou invazi rakovinných buněk a indukuje angiogenezi.<sup>63)</sup>

### 2.3.9 Výzkum a využití

I přes výše zmíněné vlastnosti a funkce je hyaluronová kyselina mnohdy považována pouze za molekulu extracelulární matrix.

Znalosti získané minulým i současným výzkumem ukazují na přesný opak. Je to molekula velkého významu nutná pro správnou funkci lidského organismu.

Zmíněná všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran, tumorogenezi a dalších, ukazuje na celou řadu možností využití této molekuly.

Zároveň celá řada otázek nebyla doposud zodpovězena - mechanismu účinku na buněčné úrovni, přesné mechanismy a role HA při hojení ran a v neposlední řadě také její výrazný vliv na tumorogenezi a metastatickou aktivitu nádorových buněk.

Právě výzkumu vlivu HA na tumorogenezi a možnostem jejího využití při targetingu cytostatik je v posledních letech věnována největší pozornost. Poznatky výzkumu z této oblasti, společně s indikacemi, ve kterých se molekula HA již uplatňuje - revmatologie, wound-healing, oftalmologie, diabetologie, farmaceutická technologie a další, jsou uvedeny níže v této kapitole.

#### *2.3.9.1 Funkce při nádorovém bujení*

Bylo prokázáno, že řada nádorových buněk obsahuje a produkuje zvýšená množství HA. Její účinek je při nádorovém bujení zprostředkováván přes charakteristické receptory, jejichž koncentrace je v nádorových buňkách taktéž zvýšena.<sup>64)</sup>

Na základě těchto poznatků je vyvíjena snaha o vytvoření vhodných konjugátů či preparátů, využívající nejen přímo vlastností a funkcí HA při rakovinném procesu, ale také nepřímo jejího potenciálu celkově snižovat nežádoucí účinky cytostatických léčiv, směřováním a specifickou vazbou na nádorové buňky.

Zvýšená množství HA při nádorových onemocněních jsou vysvětlována jednak zachováním schopnosti nádorových buněk, které ve svém původu byly výraznými producenty HA, syntetizovat HA, například buňky nádoru prsu, nádorové buňky synoviomu, chondrosarkomu, osteosarkomu aj.,<sup>65)</sup> a dále signálním mechanismem – interakcemi nádorových buněk s okolními buňkami, zejména potom s buňkami stromatickými, jako jsou fibroblasty nebo buňkami hladkých svalů, které následně začnou produkovat zvýšená množství HA.<sup>66)</sup>

Společným jmenovatelem obou je zvýšená exprese genu pro HAS u nádorových buněk přímo produkujících HA a aktivace HAS u buněk, které HA produkují na základě signálu. Syntéza HA a tím i HAS významně koreluje s buněčným cyklem s nejvyšší aktivitou v M-fázi.<sup>67)</sup>

Produkce HAS je pro buňku důležitá, protože buňka s odstraněným genem pro HAS není schopna přežít.<sup>68)</sup>

Konečným důsledkem, ke kterému vysoké hladiny HA/HAS vedou je zvýšená neovaskularizace nádoru a vyšší metastatická aktivita. <sup>69)70)71)</sup>

Metastatická aktivita je na HA závislá především ve smyslu, čím více HA tím snáze buňka migruje. Tedy buňky produkující nadměrná množství HA se snáze odpoutávají od primárního nádoru a vytváří vzdálené emboly, následně vedoucí k formování metastáz. <sup>72)73)</sup> Ačkoli je migrace buněk závislá spíše na koncentraci HA než na počtu exprimovaných receptorů, je také závislá na vazbě HA na receptor RHAMM a její adheze v místě tvorby metastázy je zprostředkována receptorem CD44. <sup>74)75)</sup>

Právě zvýšené hladiny HA vedou k úvahám o možném diagnostickém využití této znalosti, například biochemickým měřením látek rozpuštěných v moči namísto standardně prováděných invazivních metod.

Metoda pro stanovení HA v moči se dá prokazatelně použít například u rakoviny močového měchýře, kde je její koncentrace 4-9x vyšší. <sup>76)77)</sup>

Kombinace výskytu HA v přítomnosti nádorů a její povaha co by fyziologicky produkované látky (není antigenní), dělá z HA vhodného kandidáta pro nosič cytotoxické látky. <sup>78)</sup>

Především jde o její vlastnost specificky se vázat a být vychytávána receptory CD44 hojně se vyskytujícími právě na povrchu nádorových buněk. <sup>79)</sup>

Hlavní dva směry využívající této vlastnosti je tvorba konjugátů s kyselinou butyrovou, paclitaxelem, doxorubicinem, taxolem, mitomycinem C, fluoruracilem nebo lipozomů inkorporující tyto látky. <sup>80-87)</sup>

Tyto nové konjugáty se zdají být dobrou, i když možná díky své dosud neznámé toxicitě a tudíž i nutným toxikologickým zkouškám, ne příliš lukrativní formou pro transport cytostatické látky. Naproti tomu lipozomy, nesoucí na svém povrchu fragmenty nebo celé molekuly HA, plněné cytostatickými léčivy jsou z pohledu toxicity lepší volbou. Nejen díky tomu, že lipozomy bez HA jsou již běžně

v terapii používanou lékovou formou, ale hlavně díky tomu, že by umožnily internalizaci většího počtu různých cytostatik.

Obě tyto formy, ať už se jedná o konjugáty nebo lipozomy, umožní díky svému „cílenému“ účinku podání vyšších dávek cytostatika bez ohrožení pacienta. Cílená distribuce by také do veliké míry snížila četnost a intenzitu nežádoucích účinků, které jsou v současné době limitujícím faktorem v terapii rakoviny.

#### *2.3.9.2 Využití v technologii léčiv*

Jednou z nejdůležitějších snah o využití HA je vytvoření derivátu pro tvorbu mikrokapslí ke zvýšení biologické dostupnosti některých léčiv. Vlastnosti těchto derivátů HA vylepšují její biokompatibilitu. Lipofilní vlastnosti usnadňují průnik biologickými membránami a zvyšují schopnost její biodegradace.<sup>88)</sup>

#### *2.3.9.3 Využití v kosmetice a estetické chirurgii*

Výhodné je použití HA v kosmetice a estetické chirurgii. Jako fyziologická komponenta tkání nemá velké nežádoucí účinky a shoda v chemickém složení HA produkované streptokoky s lidskou umožňuje její aplikaci bez předchozího testování bezpečnosti na zvířatech. HA je v této oblasti využívána zejména pro vyhlazování vrásek a zvěšování rtů. Předností je téměř 100% eliminace možnosti udělat viditelnou chybu. Chybné vytvarování díky HA se dá velmi snadno vyřešit aplikací Hyal do stejného místa.<sup>89)</sup> Má také své výhody pro pacienty odmítající chirurgický zákrok. HA se aplikuje jako dermální injekce jen s použitím anestetického gelu aplikovaného před zákrokem.<sup>90)</sup>

#### *2.3.9.4 Využití v terapii osteoartritidy*

Důležitou indikací pro použití HA je osteoartritida. Při osteoartritidě dochází ke snižování molekulové hmotnosti řetězců HA v synoviální tekutině, spojené s jejím ředěním pronikající plazmou a snižováním reologických vlastností přítomnými proteiny. Tato teorie vedla k viskosuplementaci HA přímo v kloubu, kdy je

„nefunkční“ synoviální tekutina nahrazena vysoce čištěnou HA o vysoké molekulové hmotnosti.<sup>91)</sup>

V této indikaci se používají především intraartikulární injekce. Vzhledem k tomu, že distribuce HA do kloubu po intravenózním nebo perorálním podání není dostatečně potvrzena, má intraartikulární aplikace své opodstatnění. V současnosti je porovnáván přínos léčby intraartikulární injekcí HA s léčbou kortikosteroidy nebo NSA.<sup>92)</sup> Intraartikulárně podávané injekce HA používané při klinickém výzkumu terapie osteoartritidy se často liší v molekulové hmotnosti. Rozdíl v účinku HA o nízké a vysoké molekulové hmotnosti je zřejmý. Zdá se, že druhá jmenovaná HA je efektivnější při redukování projevů zánětu kloubu a při obnově viskozity synoviální tekutiny. Ne všechny studie však naznačují totéž a je těžké mezi nimi porovnávat. Mnoho lékařů hodnotí lépe HA o vysoké Mr, jako lépe snižující bolestivost osteoartritického kloubu. Přesný mechanismus účinku HA obou Mr v kloubní štěrbině není bohužel dosud objasněn. Je však známo, že zde snižuje celkovou produkci NO a PGE2. Proto je HA využitelná nejen jako viskoelastický činitel, ale také jako biologicky aktivní látka pro terapii osteoartritidy.<sup>93)</sup>

Odpověď postiženého kloubu na terapii HA je přitom obdobný jako odpověď na terapii kortikosteroidy. Nevýhodou HA stále zůstává způsob aplikace pro účinnou léčbu. Intraartikulární injekce je velice bolestivá a není přijatelným řešením pro všechny pacienty.<sup>92)</sup>

Nyní je pro americký trh schváleno pět přípravků s HA, které jsou doporučeny k léčbě osteoartritidy ve chvíli, kdy pacient dostatečně neodpovídá na léčbu NSA. Přitom látky obsahující HA jsou bezpečnější a zároveň efektivní volbou pro úlevu bolesti oproti NSA i steroidům.

Vhodnost použití HA pro terapii osteoartritidy, prokazuje celá řada klinických hodnocení, zabývajících se bezpečností, účinností a porovnávající účinnost terapie HA s účinností terapie NSA nebo kortikosteroidů. Výsledkem těchto klinických hodnocení je zjištění, že HA nejen že je stejně účinná v terapii jako NSA, ale že může být i účinnější. Zejména dobrých výsledků bylo dosaženo při kombinaci obou

metod léčby. Některé studie dokonce ukazují, že včasné zahájení léčby HA může výrazně oddálit totální kloubní náhradu.<sup>94)</sup>

#### 2.3.9.5 Využití ve wound-healingu

Role HA v hojení ran je v současné době již dobře známa a byla prokázána klinickou studií provedenou v České republice prof. Sobotkou s přípravkem Hyiodine.<sup>95)</sup>

HA má při hojení ran různého původu řadu účinků a to při všech fázích hojení rány. Zánětu, formaci granulační tkáně a reepitelizaci.

Při zánětlivé fázi je produkce HA obvyčejně zvýšena a bylo prokázáno, že exogenně podaná HA zvyšuje produkci některých cytokinů podporujících migraci prozánětlivě působících buněk do místa zánětu.

Při tvorbě granulační tkáně HA uplatňuje svoji schopnost vytvářet matrix nutnou pro migraci a zachytávání buněk v místě defektu. Mimo vliv na migraci při tvorbě granulační tkáně, podporuje její tvorbu také zvýšenou angiogenezou. Reepitelizace probíhá taktéž za přítomnosti HA a je podporována její schopností tvorby nutného extracelulárního matrix. K celkovému zacelení defektu také přispívají schopnosti HA jako vychytávače volných radikálů.<sup>96)</sup>

## 2.4 Metodické přístupy pro studium biodistribuce a farmakokinetiky HA

Práce provedená na oddělení radiofarmak měla za cíl stanovit základní farmakokinetiku hyaluronové kyseliny a získání výsledků biodistribuce po i.v. podání pro porovnání v dalším výzkumu této molekuly, jehož základní motivací je možnost terapeutického využití HA.

Vzhledem k povaze molekuly a možnostem jejího sledování v organismu, známých z dostupné literatury, byl pro tuto práci zvolen postup radioaktivního značení. Tento postup umožňuje velmi citlivé a přesné určení množství radioaktivity v jednotlivých tkáních,

orgánech a určení distribučních cest látky v organismu. Zároveň je však nutné při interpretaci výsledků zohlednit fakt, že nikdy nesledujeme látku jako takovou, ale pouze její radioaktivní „stopu“.

Při experimentu tohoto typu a tedy i pro dosažení výše zmíněných výsledků, při použití radioaktivně značené molekuly, je bezpodmínečně nutné vytvoření reprodukovatelného postupu pro tvorbu stabilního komplexu sledované molekuly, v našem případě HA, s radioligandem.

### *Možnosti značení HA*

Vhodný radioligand pro sledování farmakokinetických parametrů HA byl vybrán na základě studia postupů značení této molekuly popsanych a známých z literatury pro izotopy  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  a  $^{111}\text{In}$ .

Obecně lze říci, že popsané postupy využívají běžné způsoby přípravy radioaktivně značených organických sloučenin, jak pro biodistribuční studie tak klinické aplikace aj. Konkrétně klasickou chemickou syntézu, výměnnou reakci a biochemickou syntézu. Všechny uvedené metody byly zváženy pro své výhody i nevýhody a dostupnost jejich využití při našem experimentu. <sup>97)98)99)</sup>

Při značení HA izotopy  $^{14}\text{C}$  a  $^3\text{H}$  (v obou případech se jedná o beta zářiče, s poločasem rozpadu pro uhlík 5715 let a pro vodík 12,4 roku) se využívá biochemické syntézy, tedy postupu, při kterém je radionuklid obsažen v kultivačním médiu a živým mikroorganismem je zabudován do produkovaných metabolitů. Požadovaný metabolit je poté chemicky separován. V tomto případě je radioaktivní molekula glukózy metabolizována na HA.

V případě izotopu  $^3\text{H}$  se jedná o přidání glukózy s  $^3\text{H}$  N - acetylovými skupinami ke kultuře hovězích nebo lidských synoviocytů, které následně při svém růstu produkují značenou HA. Pro zvýšení produkce se v některých případech přidává ke kultuře také cholerový enterotoxin. Izotop v takto značené HA je potom součástí karboxylových skupin molekuly. <sup>34)49)51)99)</sup>

$^{14}\text{C}$  značená HA se získává obdobným způsobem. Zdrojem  $^{14}\text{C}$  je D-[ $^{14}\text{C}$  (U)] glukóza přidávaná jako zdroj uhlíku ke kulturám synoviocytů, laktobacilů nebo streptokoků produkujících HA. Takto vytvořená HA obsahuje izotop přímo v řetězci.<sup>20)31)48)</sup>

Tyto molekuly jsou totožné s fyziologickou HA a nenesou žádné další struktury na svém povrchu.

Nevýhodou tohoto postupu je poměrně velká náročnost přípravy radioaktivní HA a relativně nevýhodný poměr mezi náklady a výtěžkem reakce oproti postupům využívajícím izotopy jako jsou  $^{125}\text{I}$  a  $^{111}\text{In}$ . Další nevýhodou je dlouhý poločas rozpadu těchto izotopů a tím pádem i složitější dekontaminace metabolitů a případného odpadu.

U izotopů  $^{125}\text{I}$  a  $^{111}\text{In}$  se jedná o chemickou syntézu, izotop je do cílové molekuly vázán pomocí chelátu nebo ligandu vázaného na cílové molekule.  $^{125}\text{I}$  se váže přes tyramin, u  $^{111}\text{In}$  je to molekula DTPA (diethylentriaminopentaocetová kyselina).<sup>60)101)102)103)</sup> Příprava takto značené HA je výrazně jednodušší oproti izotopům  $^{12}\text{C}$  a  $^3\text{H}$ . Má výrazně nižší produkci radioaktivního odpadu, který má zároveň kratší poločas rozpadu.

Nevýhodou použití chemické syntézy pro sledování biologicky aktivních látek je změna struktury a tedy i možnost ovlivnění vazby na cílové receptory, transportní mechanismy a přestup přes biologické membrány.

Z tohoto důvodu je nutné před přistoupením k samotným experimentům porovnat podobnost takto značených molekul s molekulami původními in vitro.

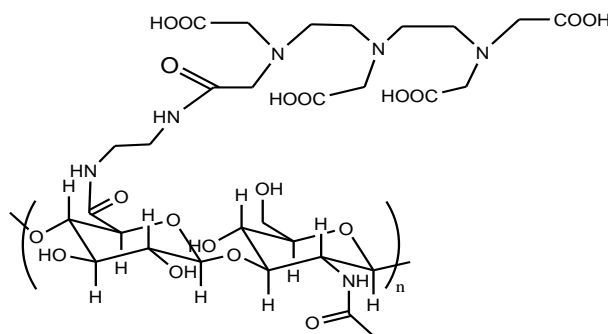
Na základě výše zmíněných informací a znalostí získaných z literatury byl pro značení HA v našich podmínkách využit izotop  $^{111}\text{In}$  (jedná se o typ zářiče gama, s poločasem rozpadu 2,8 dne) jehož reakce s HA je jednoduchá a snadno proveditelná. Konkrétně se jedná o vytvoření stabilního komplexu  $^{111}\text{In}$  – DTPA, který je vázán na povrchu molekuly. Poločas rozpadu izotopu, asi 2,8 dne, umožňuje jak sledování krátkých, tak dlouhých intervalů, stejně jako snadné odmoření odpadu.



Při této variantě je nutné porovnávání DTPA-HA s fyziologickou HA. Bereme zde v úvahu zejména zvýšení negativního náboje molekuly díky COO- skupinám chelátu a možné ovlivnění štěpitelnosti molekuly přirozenými enzymy.

DTPA (diethylentriaminopentaoctová kyselina) je chelatační látka vytvářející silné kovalentní vazby s trojmocnými kovy jako je Indium. Komplex DTPA-HA byl připraven Ing. Petrou Mlčochovou ve společnosti CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč na základě dříve popsané metody Thierryho a Winnika<sup>101</sup>). DTPA bylo podle literatury vázáno amidickou vazbou na karboxylový zbytek glukuronové kyseliny.

Obrázek č.8: Strukturální vzorec DTPA-HA



Tímto způsobem bylo připraveno 16 derivátů o různých molekulových hmotnostech.

### **3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ**

## Přístrojové vybavení:

HPLC Shimadzu – LC 10AD izokratická pumpa s termostatem kolon CTO-10A  
(Shimadzu corporation)

Radiometrický detektor Raytest Gabi Star (Straubenhardt)

Magnetická míchačka (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatic gammacounter 1480 Wizard™ 3" (Wallac, Finsko)

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Chemikálie a materiál

Sephadex G50 Medium (Sigma-Aldrich)

$^{111}\text{In-InCl}_3$  (Amersham Health Pty Ltd)

Tween 20 (Biesterfeld Silicom, s.r.o. Praha)

Azid sodný (Sigma-Aldrich)

Dextran Blue (Sigma-Aldrich)

Hyaluronidase, Type I-S: from Bovine Testes, 608units/mg solid (Sigma-Aldrich)

Fosfátový pufr pH 7,5 - dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich)

Fyzilogický roztok 0,9% NaCl - chlorid sodný (Lachema)

Acetátový pufr pH 5,5 - octan sodný (Merck)

HA-DTPA (CPN spol. s r. o.)

Kolona PL aquagel-OH 60 (Agilent technologies)

Kolona HEMA-BIO 1000 (Tessek)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Biodistribuční studie

Biodistribuční a eliminační studie byly prováděny pracovníky oddělení radiofarmak na potkaních samcích kmene Wistar, jejichž hmotnost se pohybovala v rozmezí 190 - 240g.

Pro studium biodistribuce bylo použito celkem 16 potkanů pro každou látku. Ti byli před aplikací drženi bez přístupu k potravě. V každém časovém intervalu pro odběr orgánů a tkání byl použit soubor čtyř zvířat. V čase  $T = 0$  byl zvířatům za etherové anestézie aplikován do véna saféna vzorek  $^{111}\text{In-DTPA-HA}$  o celkovém objemu 0,2ml. Ve stanovených intervalech 5 min, 1 h, 24 h, 72 h, byla zvířata usmrcena desanquinací a následnou dekapitací. Určené orgány a tkáně byly zváženy a podrobeny analýze pro zhodnocení celkového obsahu radioaktivity. Ze získaných hodnot bylo vypočítáno procento radioaktivity z podané dávky v jednotlivých orgánech a tkáních (%D), a také procento radioaktivity z podané dávky vztažené na hmotnost orgánu (%D/g).

### 4.2.2 Eliminační studie

Pro účely eliminačních studií byli potkani po aplikaci radioaktivně značené látky umístěni do metabolických klecí s neomezeným přístupem k potravě a ve vybraných časových intervalech 24h, 48h a 72h byly sbírány vzorky moči a stolice. Ze získaných hodnot radioaktivity bylo pro každý časový interval vypočítáno procento vyloučené radioaktivity z podané dávky oběma exkrečními cestami. V moči bylo HPLC analýzou určeno zastoupení HMw a LMw složky radioaktivity.

### 4.2.3 Farmakokinetické studie

Ve farmakokinetické studii byly vzorky  $^{111}\text{In-DTPA-HA}$  aplikovány podle postupu biodistribučních studií. Následně po uspání pentobarbitalovou anestézií byly odebrány vzorky krve o objemu 0,2ml z karotidy do „heparinizovaných“ zkumavek v časových intervalech 1, 2, 5, 15, 30, 60, 90, 120 min a podrobeny měření na obsah radioaktivity.

Hodnoty radioaktivity v odebraných vzorcích byly hodnoceny nelineární regresivní analýzou, Gauss-Newtonovou metodou. Plazmatické koncentrace byly vyjádřeny biexponenciální rovnicí:

$$C = C_1 e^{-\alpha t} + C_2 e^{-\beta t}$$

kde  $C$  je plazmatická koncentrace radioaktivity,  $t$  je čas,  $\alpha, \beta$  jsou parametry charakterizující distribuční a eliminační fázi.

Výpočet farmakokinetických parametrů a křivek byl proveden programem SAAM II.

#### 4.2.4 Perfuze jater

Pro perfuzi jater byla použita perfuze in situ. Po pentobarbitalové anestézii (45 mg/kg i.p.) byl potkan fixován na temperovanou podložku, následně byl kanylován žlučovod a portální žíla. Jako perfuzní tekutina byl použit Krebs-Hanseleitův roztok s glukózou, pH 7,4. Po kanylaci byl průtok perfusátu vyrovnán na 25ml/min a vzorek  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA byl přidán do rezervoáru s perfuzní tekutinou. Vzorky perfusátu na vstupu a výstupu z jater byly odebírány v 10min intervalech uprostřed 10min intervalů odběru žluči. Experiment trval 90min.

#### 4.2.5 HPLC analýza

HPLC analýza vzorků byla provedena za použití HPLC Shimadzu – LC 10AD izokratické pumpy s termostatem kolon CTO-10A, na kolonách: PL aquagel OH60 kombinovaná s Hema-bio 100, Mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH 7,5, 0,05%  $\text{NaN}_3$ , detekce: radiometr Raytest Gabi Star.

### 4.3 Značení DTPA-HA izotopem $^{111}\text{In}$

Pro značení DTPA-HA byly použity deriváty připravené pracovníky společnosti CPN spol. s r.o. Dolní Dobrouč. Byly připraveny úpravou metody publikované Thierrym a Winnikem<sup>101)</sup>. Na rozdíl od literatury byl v případě těchto derivátů použit coby aktivátor EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) pro vazbu ADH (dihydrazid kyseliny adipové) k molekule DTPA a po aktivaci HA CNBr, bylo k takto aktivované molekule HA přidáno ADH-DTPA a byl vytvořen komplex DTPA-HA.

Celkově bylo tímto způsobem připraveno 16 derivátů DTPA-HA o různé molekulové hmotnosti.

Tabulka č.2: Molekulové hmotnosti jednotlivých derivátů DTPA-HA

Vzorek	Mr
DTPA-HA	20015
DTPA-HA 2	356100
DTPA-HA 3	111500
DTPA-HA 4	823250
DTPA-HA 5	340250
DTPA-HA 6	343700
DTPA-HA 7	242400
DTPA-HA 8	227500
DTPA-HA 9	403700
DTPA-HA 10	409000
DTPA-HA 11	253350
DTPA-HA 12	99995
DTPA-HA 13	192650
DTPA-HA 14	564450
DTPA-HA 15	1193000
DTPA-HA 16	10610

12 derivátů bylo značeno izotopem  $^{111}\text{In}$  podle následující metody:

0,4% roztok DTPA-HA byl připraven rozpuštěním 0,024g substance DTPA-HA ve 4ml vody nebo 0,05% roztoku azidu sodného. 0,5ml tohoto roztoku bylo nanášeno na předem připravenou kolónu -30 x 1cm, pevná fáze: Sephadex G50 medium, mobilní fáze: voda.

Byl určen volný objem kolóny nanášením 0,5ml Dextranu blue na kolónu a jímáné frakce byly měřeny spektrofotometricky pro určení absorbance v jednotlivých frakcích. A dále ověřen nanášením 0,5ml roztoku DTPA-HA na kolónu. Jednotlivé frakce byly analyzovány na HPLC s výstupem na refraktometr pro určení nejvyšší koncentrace DTPA-HA v jednotlivých frakcích.



Na základě určení volného objemu kolóny byly po odkapání 9ml mobilní fáze od nanesení vzorku, najímány do čisté nádoby 2ml frakce přečištěné DTPA-HA.

V čisté nádobce bylo smícháno 0,25ml 0,4M acetátového pufru pH 5,5, připraveného rozpuštěním 1,64g CH<sub>3</sub>COONa v 50ml vody a dotitrováním 0,4M CH<sub>3</sub>COOH na pH 5,5, s 0,25ml roztoku přečištěné DTPA-HA. K takto připravené směsi bylo přidáno požadované množství izotopu <sup>111</sup>In (<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> 15-30μl pro biologické pokusy) a směs míchána na magnetické míchačce 0,5h při pokojové teplotě. <sup>104)</sup>

0,5ml této směsi bylo naneseno na předem připravenou kolónu -30 x 1cm, pevná fáze: Sephadex G50 medium, mobilní fáze: voda.

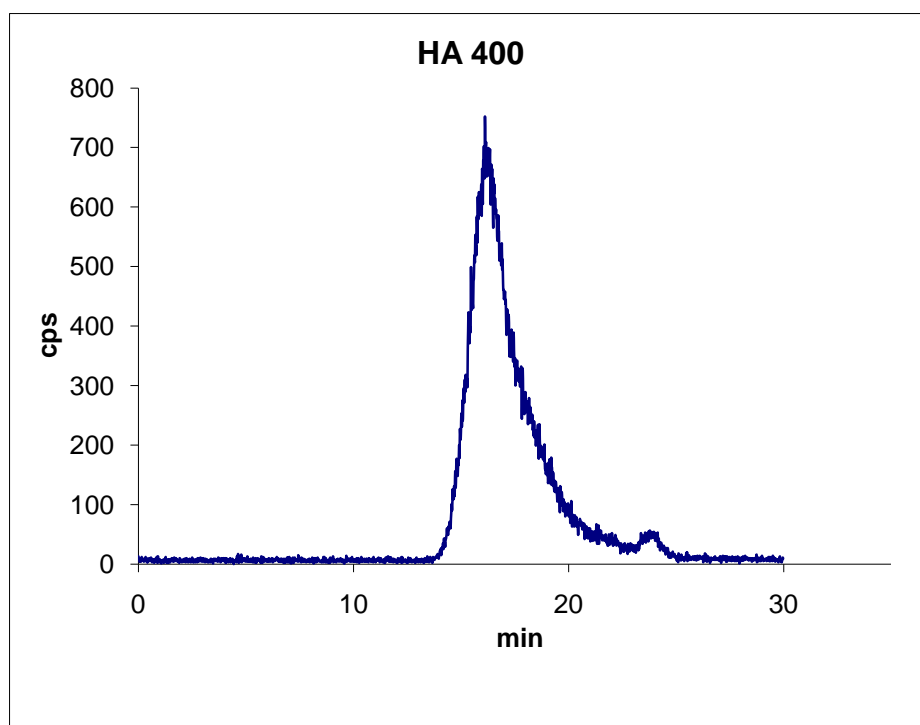
Po odkapání 4,6ml mobilní fáze od nanesení vzorku, byly jímány do čistých nádobek frakce á 0,92 ml až do frakce č.25. Frakce byly podrobeny analýze na gamma automatu 1480 Wizard 3“ (Wallac) nebo bylo 100μl roztoku <sup>111</sup>In-DTPA-HA podrobeno analýze na HPLC LKB-HPLC Pump 2248 (Pharmacia), později také na HPLC Schimadzu – LC 10AD izokratické pumpě s termostatem kolon CTO-10A a radiometrickým detektorem Raytest Gabi Star.

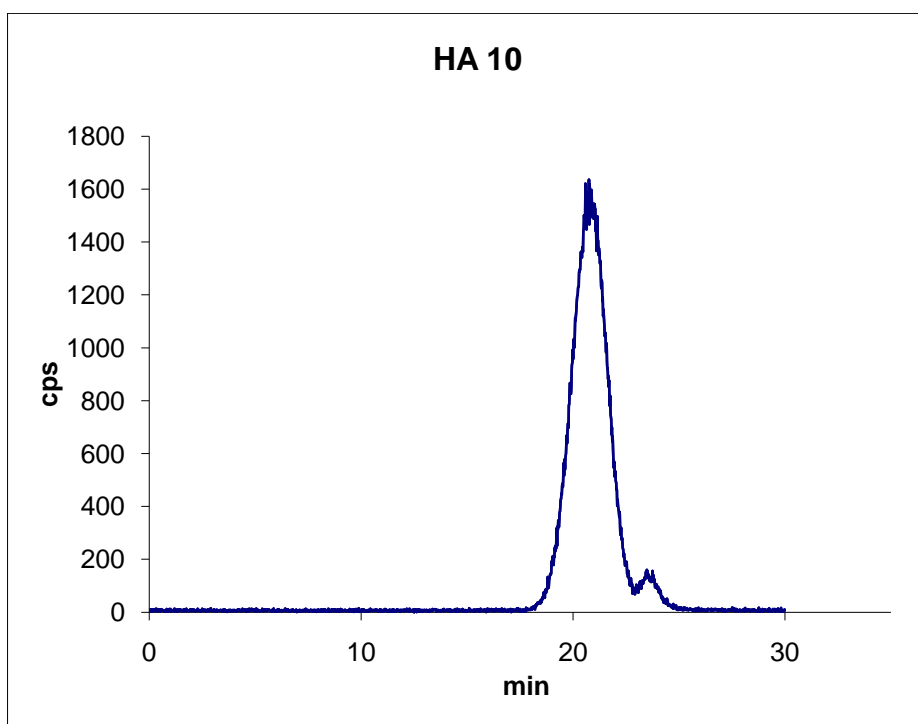
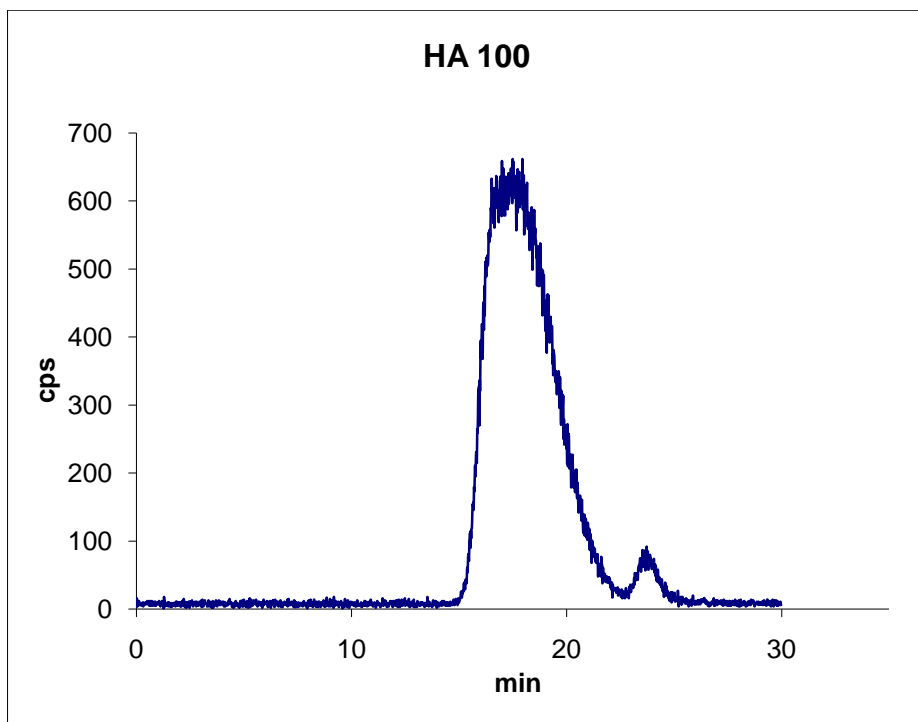
Mobilní fáze 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,05% NaN<sub>3</sub>, pH 7,5. Kolóny: PL aquagel – OH 60 8μm; HEMA – BIO 1000 10μm. Detektory: refraktometr RID – 10A (Schimadzu); Radiometr (Raytest Gabi Star)

Z výše uvedených molekul byly nejprve značeny DTPA-HA 2, 3, 4. I přesto, že tyto molekuly vykazovaly po značení izotopem <sup>111</sup>In 82 - 97% aktivity ve vysokomolekulární frakci v porovnání s frakcí nízkomolekulární, celkové množství aktivity vázané v molekule bylo jen 5% proti aktivitě dodané do reakce. Orientační pokusy na zvířatech navíc ukázaly, že vazba nebyla dostatečná a izotop <sup>111</sup>In byl vázán ve vysokomolekulární složce je slabými vazbami. Dále byly značeny molekuly DTPA-HA 6, 7, 8, které vykazovaly po značení izotopem <sup>111</sup>In 27 - 50% aktivity ve vysokomolekulární frakci. Z nich byla <sup>111</sup>In-DTPA-HA 6 podrobena biologickým pokusům. Výsledky sice prokázaly vazbu <sup>111</sup>In ve vysokomolekulární frakci, ale tyto výsledky se nepodařilo zopakovat.

Reprodukovatelných výsledků značení bylo dosaženo až s molekulami DTPA-HA 9, 10, 11, 12, 13. Pro vzájemný poměr izotopu vázaného/volného byl nejvýhodnějším z těchto molekul pro další pokusy DTPA-HA 9, DTPA-HA 12 a byla připravena i nízkomolekulární DTPA-HA 16. Dále v textu jsou použité značené molekuly pro vyšší přehlednost označovány molekulovou hmotností  $^{111}\text{In}$ -DTPA –HA 9 jako HA400,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 12 jako HA 100 a  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 16 jako HA 10 (viz. tabulka č.2)

Grafy č.1-3: HPLC analýza molekul DTPA-HA 400, 100, 10 značených  $^{111}\text{InCl}_3$ :





Z HPLC analýzy vybraných molekul (Graf č.1-3) je zřetelný peak pro vysokomolekulární frakci z čehož vyplývá dostatečná vazba radioligandu na molekulu HA. Stabilita takto získaných molekul a procentuální poměr zastoupení vysokomolekulární a nízkomolekulární frakce po 24h je uveden v tabulce stabilit níže.

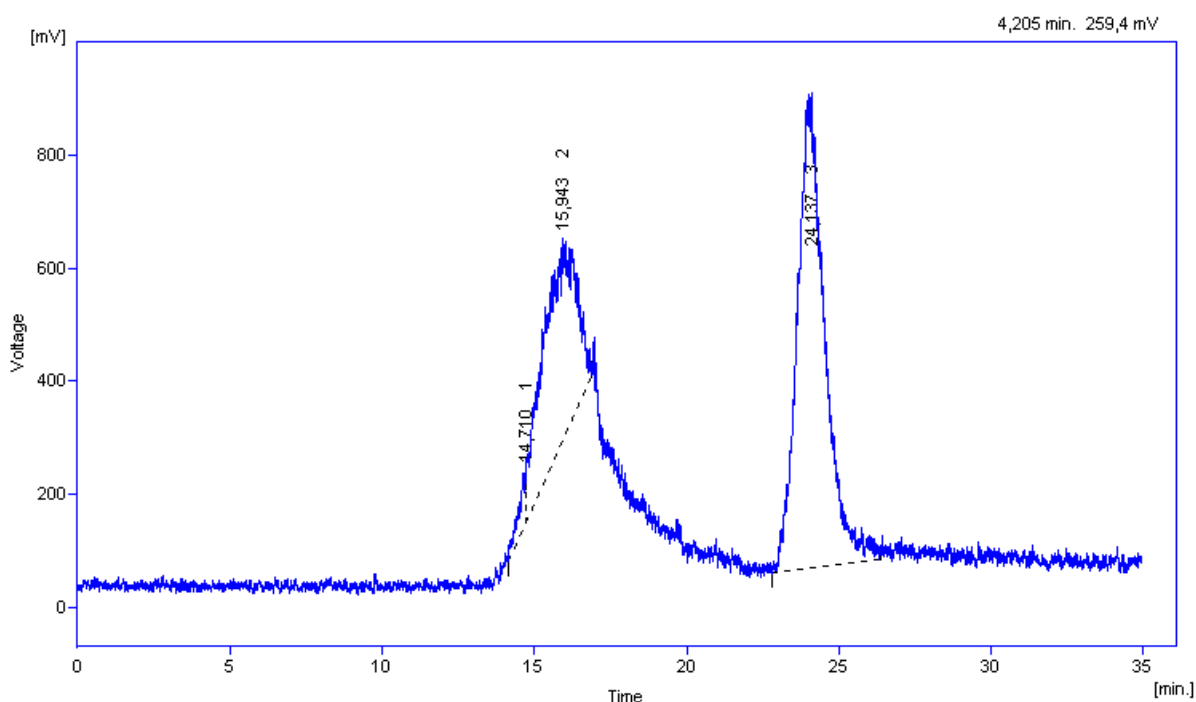
Určení stupně substituce bylo opět provedeno popsanou metodou. <sup>101)</sup> Stupeň substituce (DS) byl stanoven pro DTPA-HA 10kDa na 5,5%, DTPA-HA 100kDa 4,5% a DTPA-HA 400kDa 7,6%.

Po vytvoření molekuly <sup>111</sup>In-DTPA-HA byla určena její stabilita v pufru, plazmě a štěpitelnost hyaluronidázami.

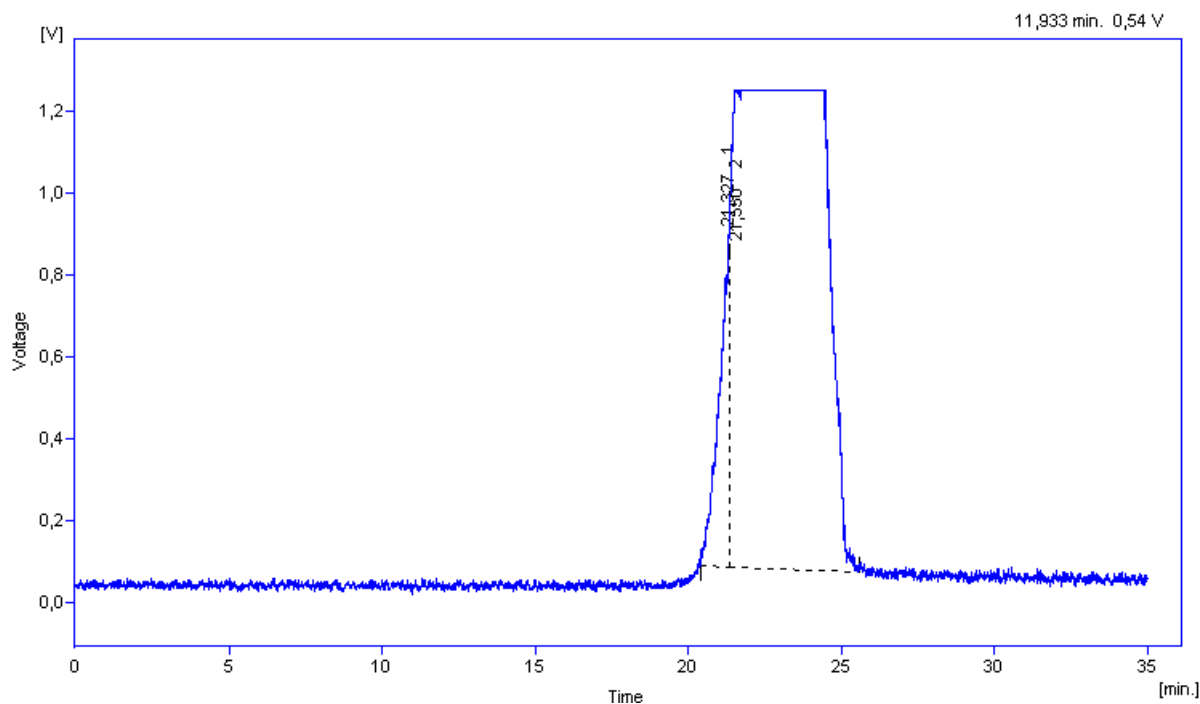
#### 4.4 Stabilita komplexu <sup>111</sup>In-DTPA-HA

Pro ověření vazby <sup>111</sup>In na DTPA-HA a štěpitelnosti glykosidických vazeb v <sup>111</sup>In-DTPA-HA tedy určení podobnosti chování molekuly v organismu s chováním nativní molekuly, byl proveden pokus se štěpením bovinní testikulární hyaluronidázou na molekule 400kDa. 100μl reakčního roztoku <sup>111</sup>In-DTPA-HA bylo nastříknuto na HPLC s radiometrickou detekcí elučního času – Graf č.4. Ke zbylé části reakčního roztoku byla přidána bovinní testikulární hyaluronidáza a celá směs inkubována při teplotě 36,5°C po dobu 0,5h. Po této době bylo opět 100μl této směsi nastříknuto na HPLC pro radiometrické stanovení elučních časů Graf č.5.

Graf č.4: Reprezentativní HPLC analýza reakčního roztoku <sup>111</sup>In-DTPA-HA po dokončení reakce (bez přečištění)



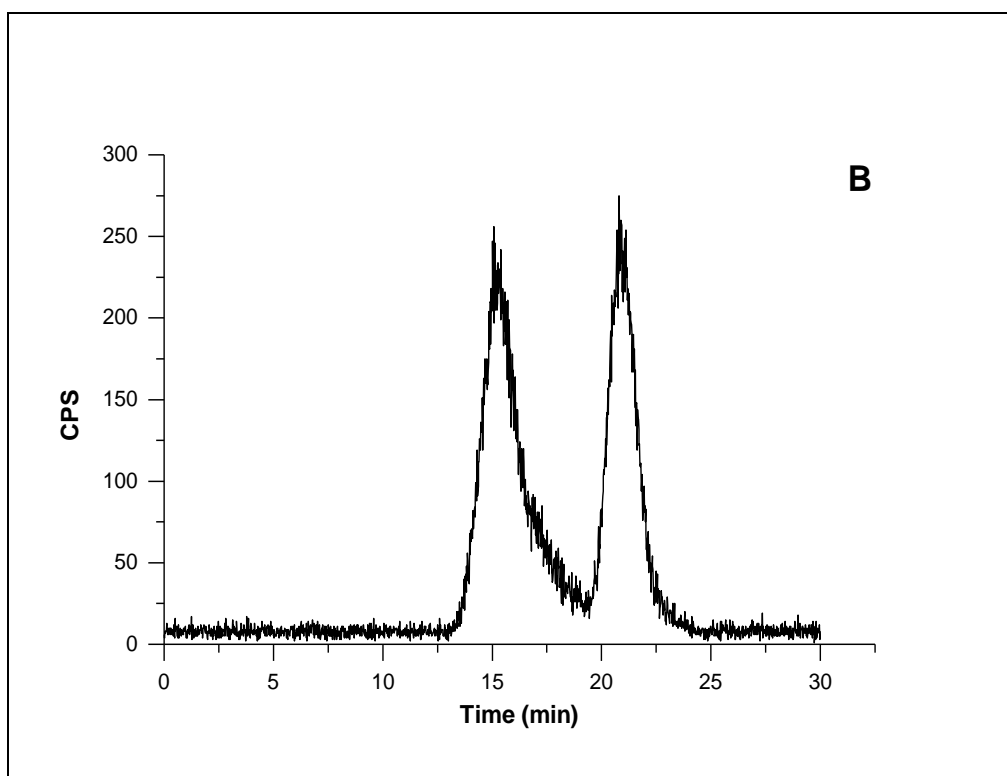
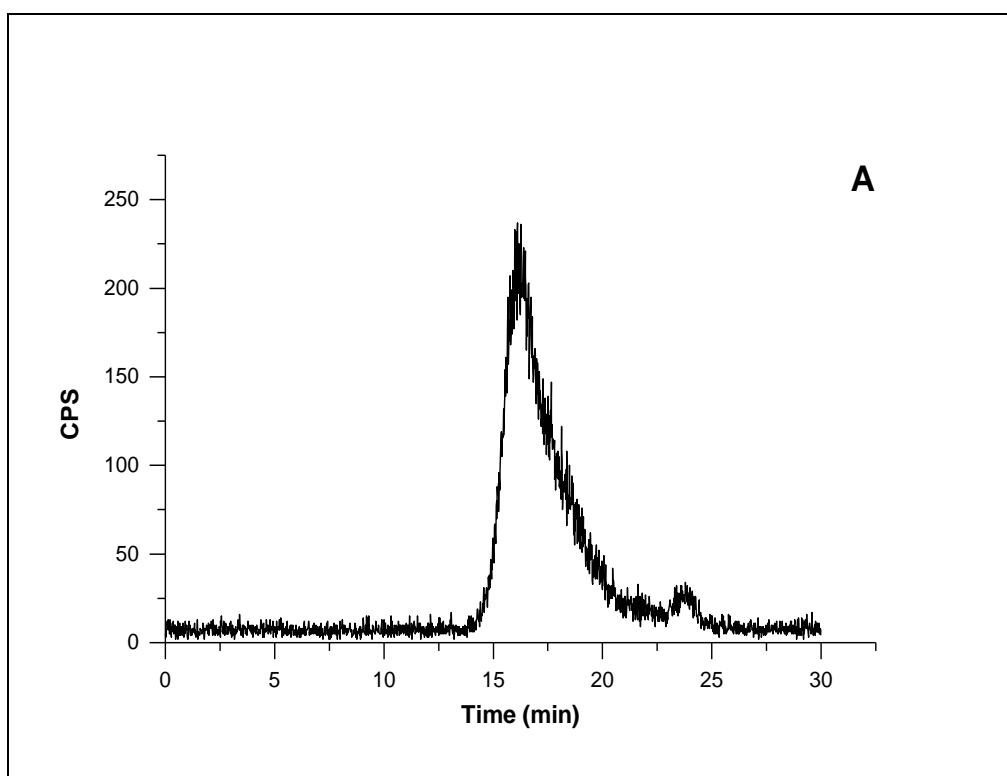
Graf č.5: Reprezentativní HPLC analýza reakčního roztoku  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (bez přečištění) po inkubaci 30min s bovinní testikulární hyaluronidázou.



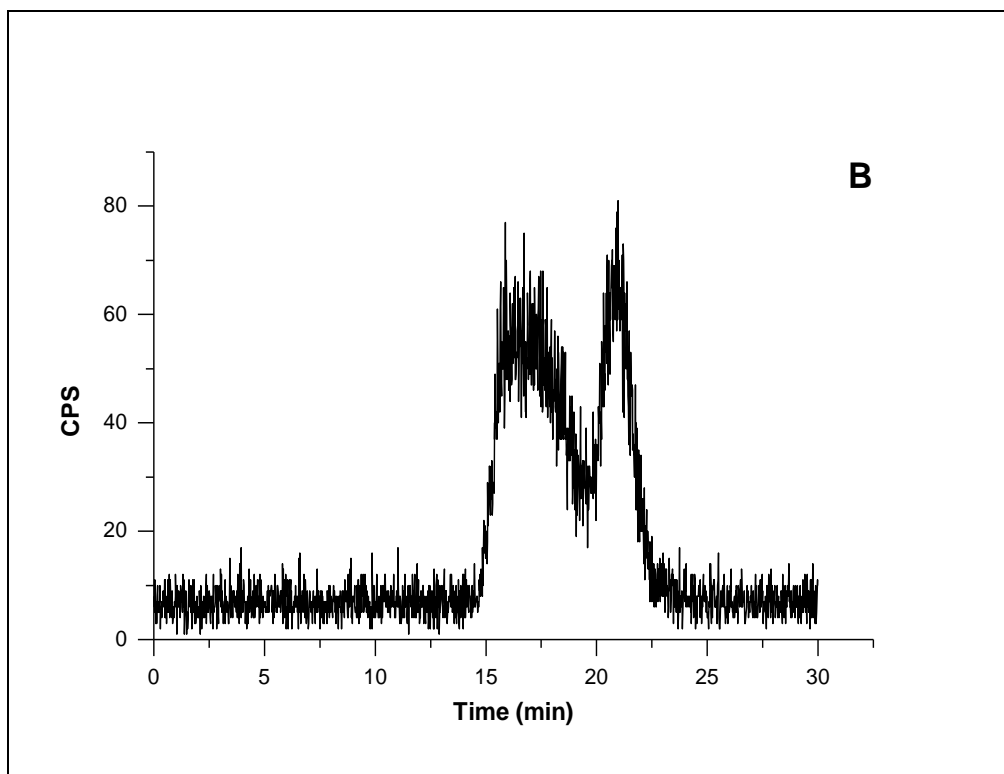
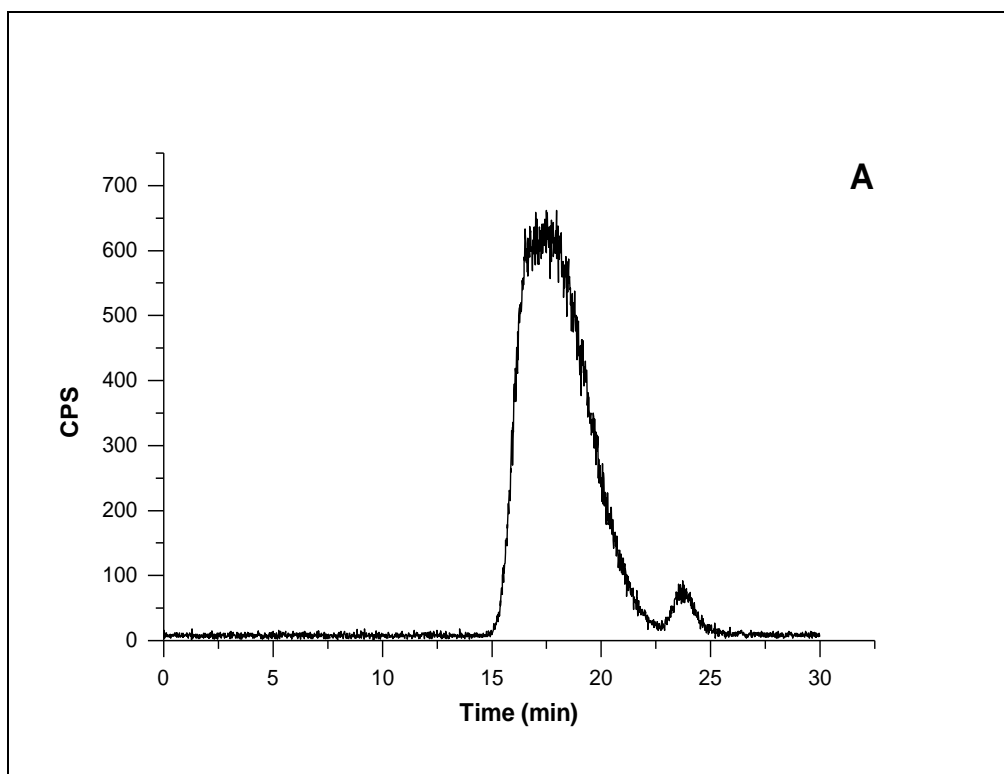
$^{111}\text{In}$ -DTPA-HA byla v in vitro podmínkách kvantitativně štěpena na nízkomolekulární produkty. V tomto směru lze tedy předpokládat stejné chování molekuly v podmínkách in vivo. Degradace  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA tímto ukazuje na fakt, že v průběhu biodistribučního experimentu nebudou sledovány pouze celé nezměněné molekuly, ale zároveň produkty její degradace.

Dále byla stanovena stabilita všech tří připravených vzorků in vitro. Byla porovnána stabilita standardů připravených podle výše uvedené metody a směsi těchto standardů s 0,2ml plazmy v poměru 1:1, vše při teplotě 37°C. Interval byl stanoven na 24h. Po tomto čase byly vzorky analyzovány a celkový podíl nízkomolekulární frakce byl stanoven HPLC s radiometrickou detekcí – Graf č.6-8, tabulka č.3.

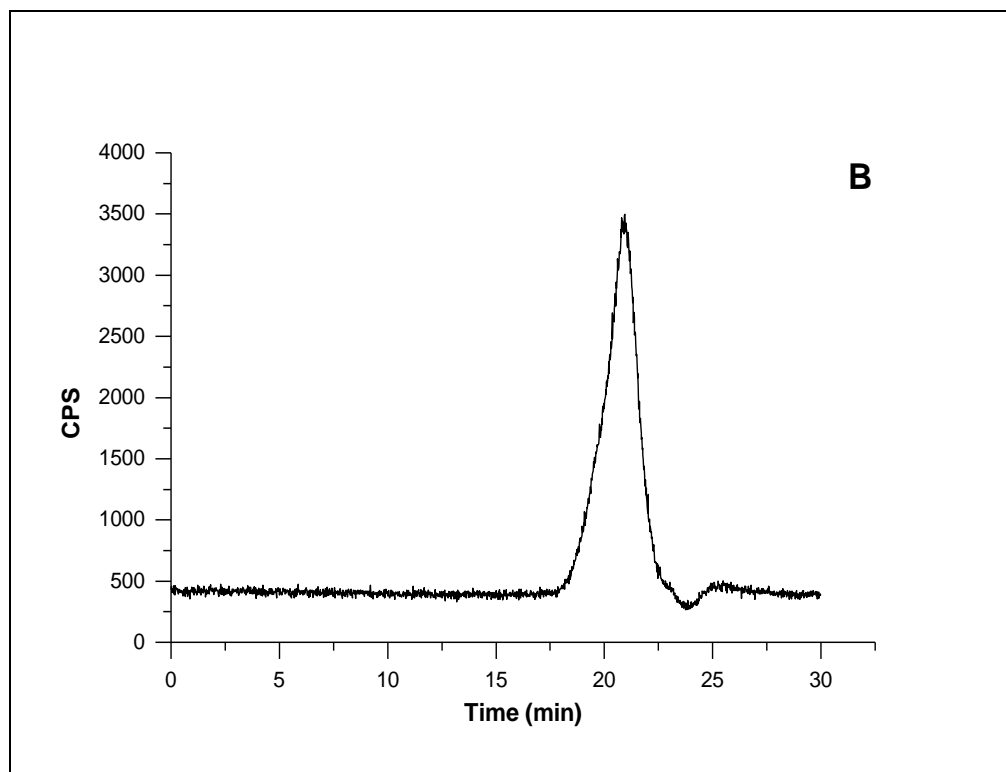
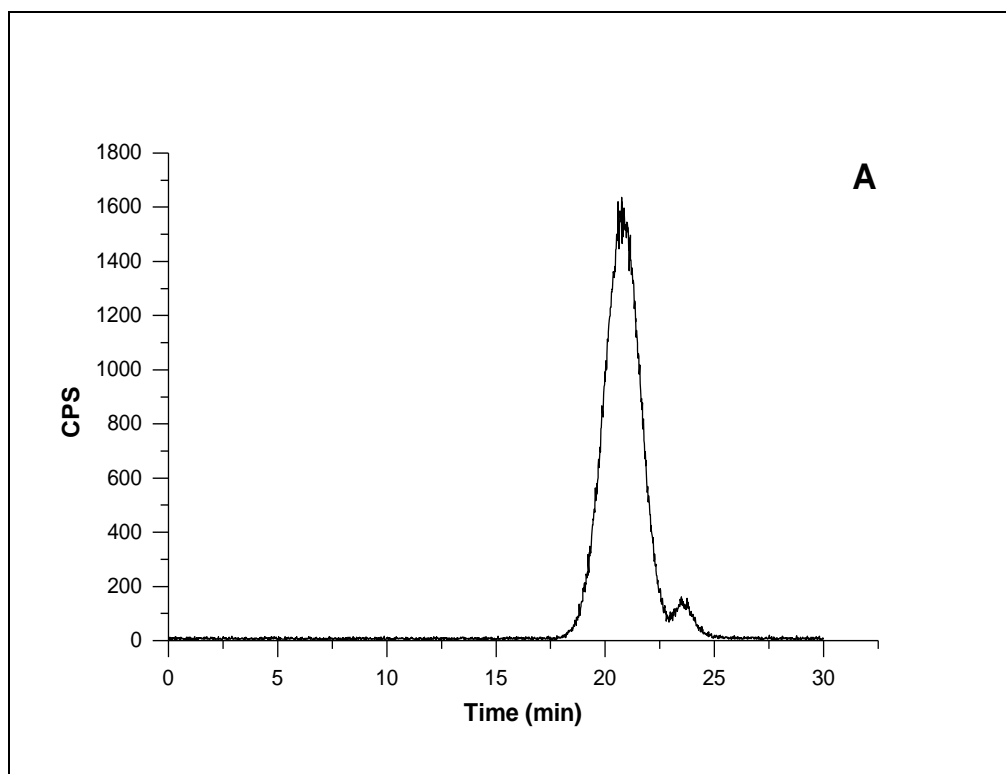
Graf č.6: Zkoušky stability - HPLC analýza HA 400 inkubovaného 24h při teplotě 37°C - standard (A), směs standardu s potkaní plazmou (B).



Graf č.7: Zkoušky stability - HPLC analýza HA 100 inkubovaného 24h při teplotě 37°C - standard (A), směs standardu s potkaní plazmou (B).



Graf č.8: Zkoušky stability - HPLC analýza HA 10 inkubovaného 24h při teplotě 37°C - standard (A), směs standardu s potkaní plazmou (B).





Tabulka č.3: Zkoušky stability - Procentuální zastoupení vysoko a nízkomolekulárních frakcí derivátů <sup>111</sup>In-DTPA-HA ve standardu (acetátový pufr pH 5,5) a ve směsi standardu s potkaní plazmou 1:1 po inkubaci 24h při 37°C

Vzorek	HMw frakce <sup>a</sup> [%]	LMw frakce <sup>a</sup> [%]	HMw frakce <sup>b</sup> [%]	LMw frakce <sup>b</sup> [%]
HA 400	98	2	56	44
HA 100	97,5	2,5	51	49
HA 10	98	2	-	-

<sup>a</sup> Procentuální zastoupení HMw/LMw frakcí <sup>111</sup>In-DTPA-HA po 24h ve standardu -acetátový pufr pH 5,5. (AUC)

<sup>b</sup> Procentuální zastoupení HMw/LMw frakcí <sup>111</sup>In-DTPA-HA po 24h ve směsi standardu s potkaní plazmou 1:1 (AUC)

Výsledky stabilit ukazují na relativní stabilitu molekul. Méně než 3% se po 24h v prostředí acetátového pufru pH 5,5 objevila v nízkomolekulární podobě. Na druhou stranu jejich stabilita v plazmě v podmínkách in vitro je omezená. Více než 40% se po 24h objevuje ve formě molekul s nízkou molekulovou hmotností.

Tyto nízkomolekulární frakce vznikající v plazmě jsou pravděpodobně výsledkem enzymatického i neenzymatického štěpení molekuly. Je doloženo, že i plazma obsahuje nízké koncentrace hyaluronidáz a jiných hyaluronan lyáz, které přispívají k degradaci <sup>111</sup>In-DTPA-HA. <sup>105)106)107)</sup> Za částečnou degradaci mohou být zodpovědné také volné kyslíkové radikály.

39)

## **5. VÝSLEDKY**

## 5.1 Biodistribuce <sup>111</sup>In-DTPA-HA

Množství radioaktivity změřené pro jednotlivé vzorky HA 10, HA 200, HA 400 v orgánech a tkáních je uvedeno v tabulkách č.4-6. Pro přehlednější vyjádření množství aktivity v průběhu experimentu v jednotlivých orgánech byly vytvořeny grafy č.9-14. Vzhledem k výraznému vychytávání radioaktivity játry bylo grafické znázornění průběhu radioaktivity v tomto orgánu zobrazeno odděleně.

Tabulka č.4: Množství HA 400 změřené v jednotlivých orgánech potkanů - % dávky v celém orgánu a % dávky na 1 gram tkáně (průměr ± SD čtyř zvířat)

<b>HA 400</b>				
	<b>5 min</b>	<b>1 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Procento dávky v celém orgánu</b>				
Játra	75.892 ± 3.527	79.866 ± 2.197	73.484 ± 3.434	66.528 ± 2.154
Nadledviny	0.006 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.009 ± 0.006
Ledviny	1.063 ± 0.265	0.170 ± 0.002	0.318 ± 0.052	1.027 ± 0.060
Plíce	0.414 ± 0.153	0.070 ± 0.008	0.037 ± 0.007	0.050 ± 0.012
Srdce	0.044 ± 0.011	0.026 ± 0.011	0.011 ± 0.002	0.039 ± 0.007
Slezina	0.312 ± 0.086	0.320 ± 0.069	0.414 ± 0.071	0.427 ± 0.014
Žaludek	0.063 ± 0.026	0.109 ± 0.134	0.020 ± 0.005	0.079 ± 0.004
Střeva	0.302 ± 0.084	0.132 ± 0.026	0.206 ± 0.088	0.349 ± 0.050
Tračník	0.404 ± 0.362	0.307 ± 0.293	1.539 ± 1.010	1.125 ± 0.315
Varlata	0.018 ± 0.003	0.027 ± 0.007	0.030 ± 0.002	0.097 ± 0.019
Štítná žláza	0.010 ± 0.007	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.017 ± 0.016
Mozek	0.012 ± 0.003	0.005 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.011 ± 0.006
<b>Procento dávky na 1 gram tkáně</b>				
Krev	0.211 ± 0.022	0.067 ± 0.005	0.012 ± 0.001	0.025 ± 0.004
Plazma	0.412 ± 0.045	0.125 ± 0.003	0.028 ± 0.004	0.024 ± 0.012
Slinivka	0.047 ± 0.011	0.018 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.063 ± 0.029
Játra	9.173 ± 0.620	11.074 ± 1.432	10.610 ± 1.567	10.259 ± 0.660
Nadledviny	0.088 ± 0.024	0.019 ± 0.020	0.038 ± 0.006	0.136 ± 0.080
Ledviny	0.535 ± 0.162	0.087 ± 0.007	0.173 ± 0.019	0.598 ± 0.014
Kůže	0.011 ± 0.004	0.008 ± 0.001	0.012 ± 0.005	0.032 ± 0.010
Sval	0.005 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.024 ± 0.005
Tuk	0.015 ± 0.006	0.010 ± 0.007	0.018 ± 0.008	0.081 ± 0.034
Stehenní kost	0.108 ± 0.014	0.087 ± 0.027	0.110 ± 0.011	0.159 ± 0.015

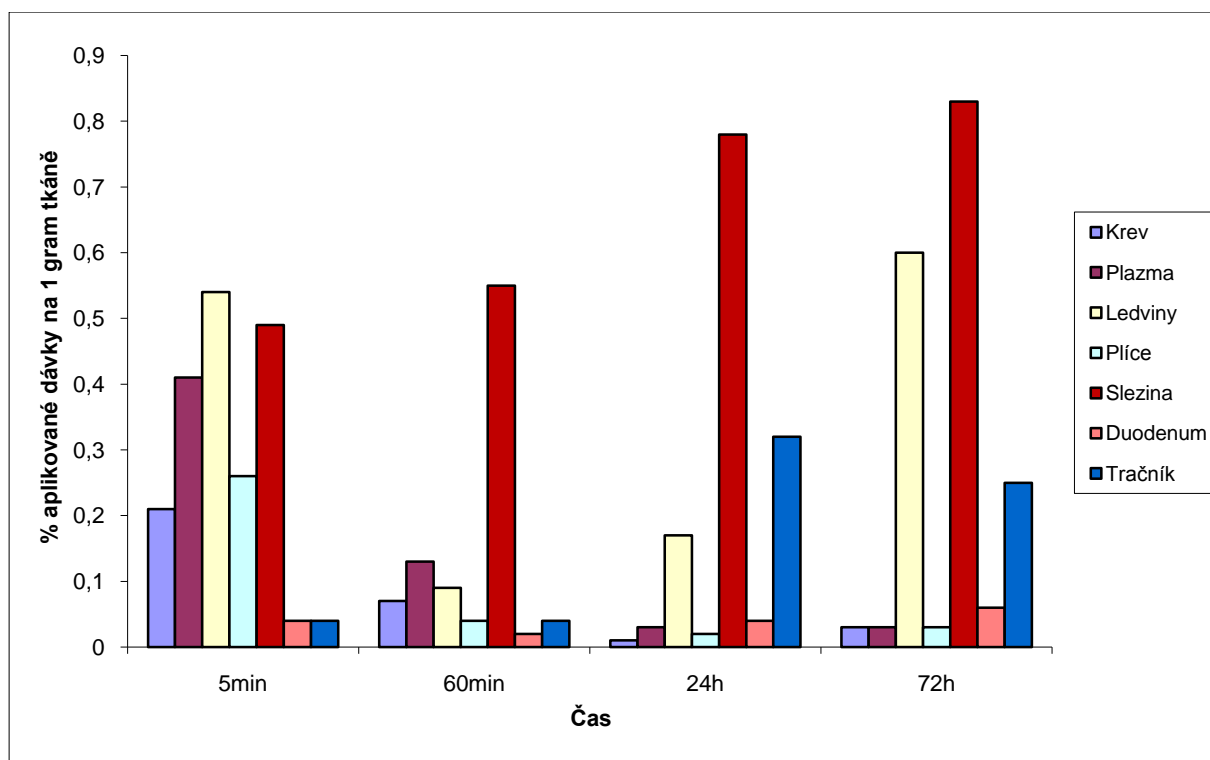
Tabulka č.5: Množství HA 100 změřené v jednotlivých orgánech potkanů - % dávky v celém orgánu a % dávky na 1 gram tkáně (průměr ± SD čtyř zvířat)

	HA 100			
	5 min	1 h	24 h	72 h
<b>Procento dávky v celém orgánu</b>				
Játra	49.279 ± 2.992	54.074 ± 2.171	56.107 ± 0.595	50.092 ± 1.572
Nadledviny	0.011 ± 0.003	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001
Ledviny	2.563 ± 0.440	0.285 ± 0.090	0.501 ± 0.046	0.817 ± 0.053
Plíce	0.579 ± 0.208	0.172 ± 0.050	0.054 ± 0.011	0.055 ± 0.005
Srdce	0.158 ± 0.030	0.042 ± 0.009	0.020 ± 0.003	0.021 ± 0.002
Slezina	0.576 ± 0.086	0.898 ± 0.121	0.730 ± 0.174	0.650 ± 0.181
Žaludek	0.160 ± 0.046	0.108 ± 0.044	0.073 ± 0.055	0.051 ± 0.020
Střeva	0.823 ± 0.122	0.399 ± 0.075	0.318 ± 0.035	0.197 ± 0.016
Tračník	0.209 ± 0.028	0.111 ± 0.023	0.573 ± 0.138	0.722 ± 0.502
Varlata	0.066 ± 0.009	0.062 ± 0.023	0.061 ± 0.020	0.070 ± 0.005
Štítná žláza	0.019 ± 0.010	0.009 ± 0.004	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.000
Mozek	0.060 ± 0.010	0.012 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
<b>Procento dávky na 1 gram tkáně</b>				
Krev	0.967 ± 0.182	0.167 ± 0.036	0.026 ± 0.005	0.013 ± 0.002
Plazma	1.880 ± 0.385	0.313 ± 0.065	0.048 ± 0.012	0.017 ± 0.001
Slinivka	0.150 ± 0.036	0.040 ± 0.015	0.027 ± 0.007	0.035 ± 0.009
Játra	5.875 ± 0.290	6.834 ± 1.356	6.528 ± 0.386	6.291 ± 0.652
Nadledviny	0.152 ± 0.019	0.053 ± 0.006	0.042 ± 0.007	0.063 ± 0.016
Ledviny	1.334 ± 0.174	0.154 ± 0.056	0.240 ± 0.020	0.400 ± 0.022
Kůže	0.025 ± 0.004	0.018 ± 0.005	0.017 ± 0.002	0.022 ± 0.004
Sval	0.016 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Tuk	0.034 ± 0.008	0.027 ± 0.009	0.022 ± 0.010	0.050 ± 0.047
Stehenní kost	0.236 ± 0.048	0.220 ± 0.067	0.167 ± 0.029	0.196 ± 0.061

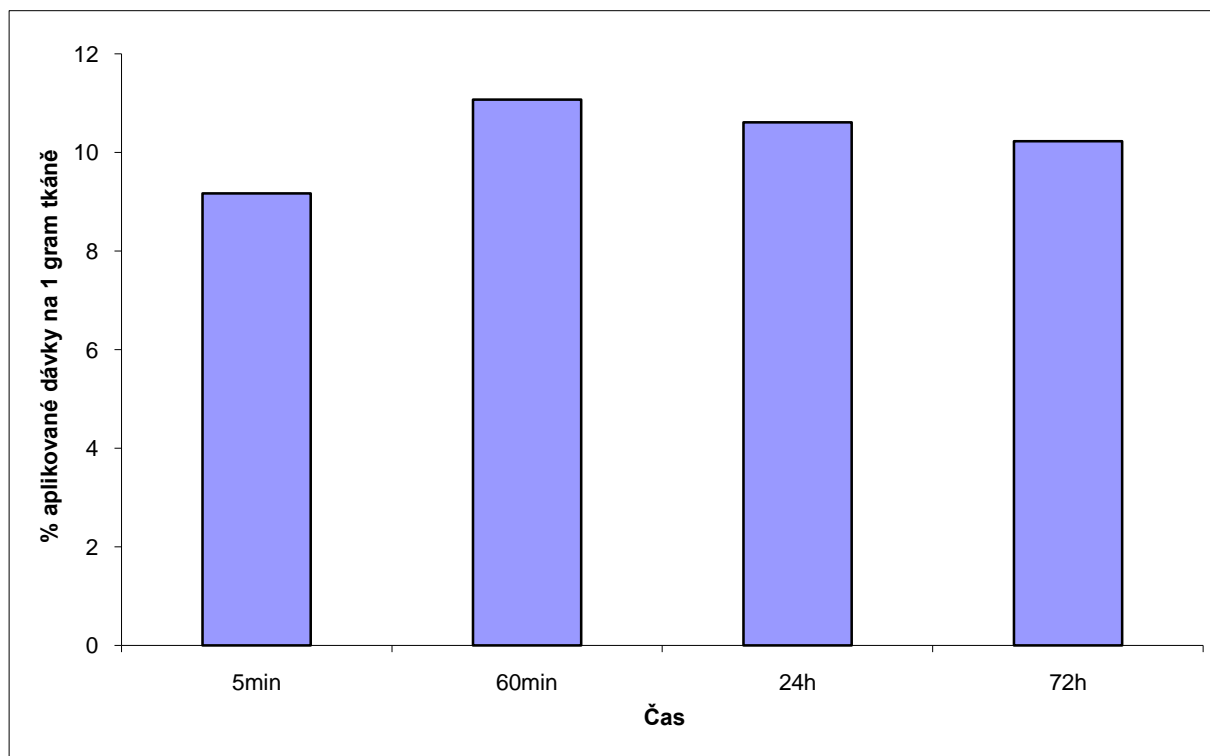
Tabulka č.6: Množství HA 10 změřené v jednotlivých orgánech potkanů - % dávky v celém orgánu a % dávky na 1 gram tkáně (průměr ± SD čtyř zvířat)

	HA 10			
	5 min	1 h	24 h	72 h
<b>Procento dávky v celém orgánu</b>				
Játra	54.132 ± 8.273	58.966 ± 6.038	56.047 ± 15.718	45.426 ± 9.113
Nadledviny	0.020 ± 0.016	0.004 ± 0.003	0.009 ± 0.011	0.003 ± 0.001
Ledviny	8.409 ± 6.597	0.658 ± 0.274	1.020 ± 0.653	0.536 ± 0.081
Plíce	0.515 ± 0.169	0.385 ± 0.224	0.153 ± 0.135	0.043 ± 0.011
Srdce	0.180 ± 0.042	0.125 ± 0.072	0.041 ± 0.033	0.012 ± 0.005
Slezina	1.055 ± 0.313	1.197 ± 0.174	1.340 ± 0.265	1.007 ± 0.147
Žaludek	0.684 ± 0.841	0.158 ± 0.079	0.127 ± 0.106	0.052 ± 0.034
Střeva	1.271 ± 0.607	0.581 ± 0.169	0.754 ± 0.431	0.139 ± 0.026
Tračník	0.380 ± 0.192	0.143 ± 0.021	1.017 ± 0.296	0.417 ± 0.199
Varlata	0.106 ± 0.045	0.133 ± 0.068	0.128 ± 0.099	0.042 ± 0.015
Štítná žláza	0.023 ± 0.006	0.039 ± 0.046	0.016 ± 0.016	0.002 ± 0.001
Mozek	0.076 ± 0.030	0.027 ± 0.018	0.024 ± 0.026	0.003 ± 0.001
<b>Procento dávky na 1 gram tkáně</b>				
Krev	0.942 ± 0.182	0.440 ± 0.298	0.071 ± 0.061	0.009 ± 0.003
Plazma	1.680 ± 0.367	0.748 ± 0.474	0.111 ± 0.088	0.012 ± 0.005
Slinivka	0.260 ± 0.118	0.063 ± 0.048	0.078 ± 0.065	0.029 ± 0.016
Játra	7.137 ± 0.953	8.348 ± 1.390	7.286 ± 2.591	6.118 ± 2.350
Nadledviny	0.291 ± 0.245	0.062 ± 0.043	0.159 ± 0.209	0.046 ± 0.024
Ledviny	4.863 ± 4.050	0.362 ± 0.152	0.581 ± 0.384	0.293 ± 0.054
Kůže	0.074 ± 0.020	0.056 ± 0.012	0.049 ± 0.034	0.021 ± 0.007
Sval	0.037 ± 0.009	0.039 ± 0.026	0.025 ± 0.022	0.009 ± 0.002
Tuk	0.159 ± 0.170	0.054 ± 0.013	0.252 ± 0.309	0.029 ± 0.012
Stehenní kost	0.326 ± 0.089	0.277 ± 0.049	0.312 ± 0.115	0.303 ± 0.212

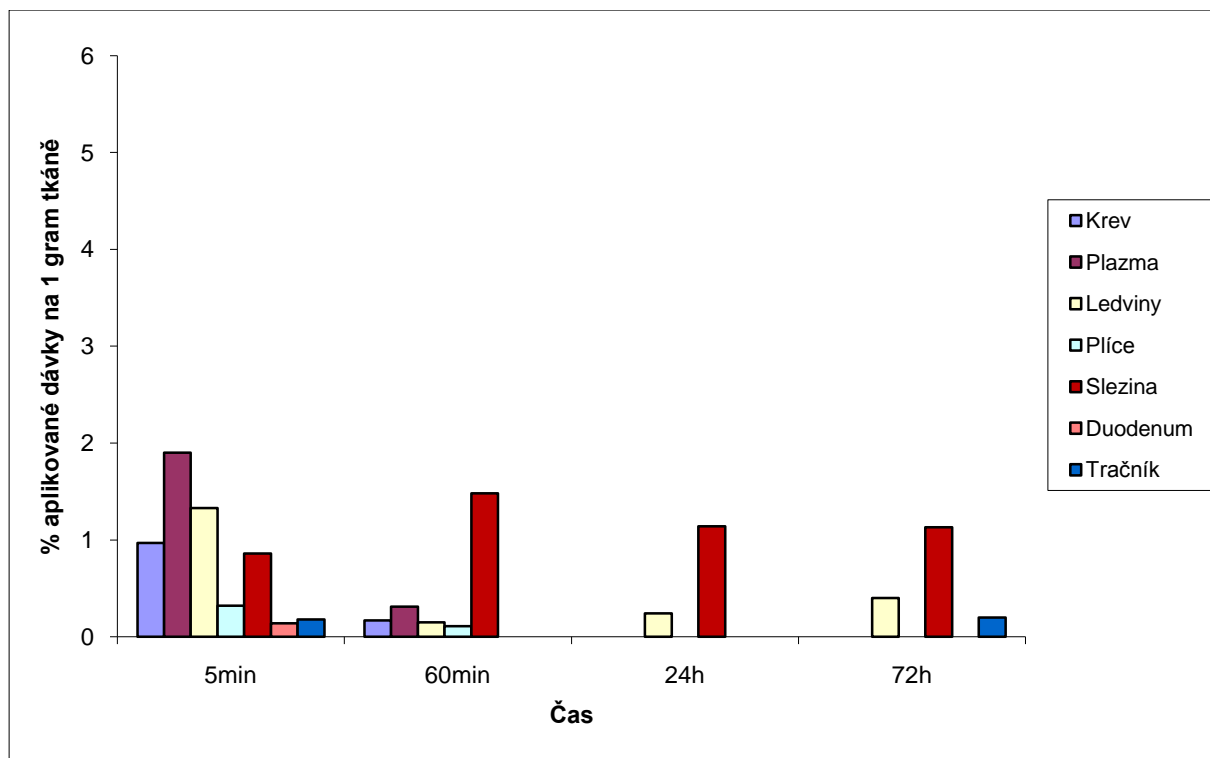
Graf č.9: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 400 v jednotlivých orgánech (% dávky na 1 gram tkáně)



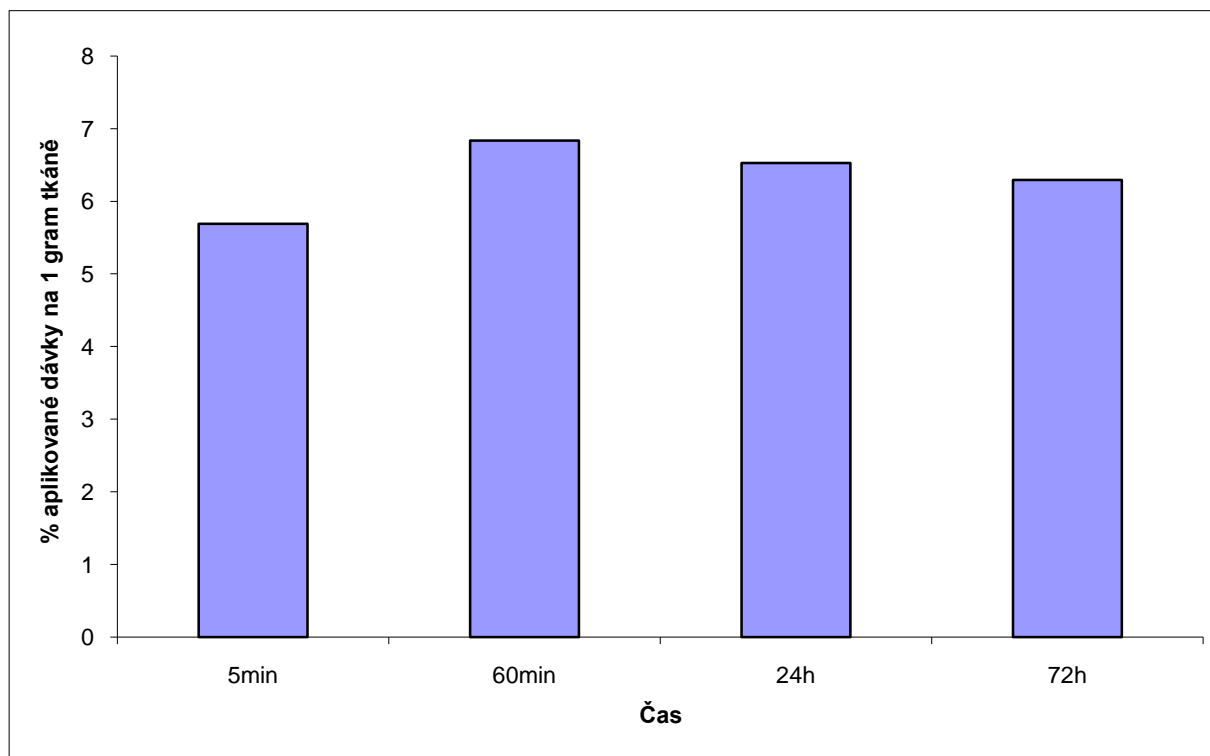
Graf č.10: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 400 v játrech (% dávky na 1 gram tkáně)



Graf č.11: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 100 v jednotlivých orgánech (% dávky na 1 gram tkáně)

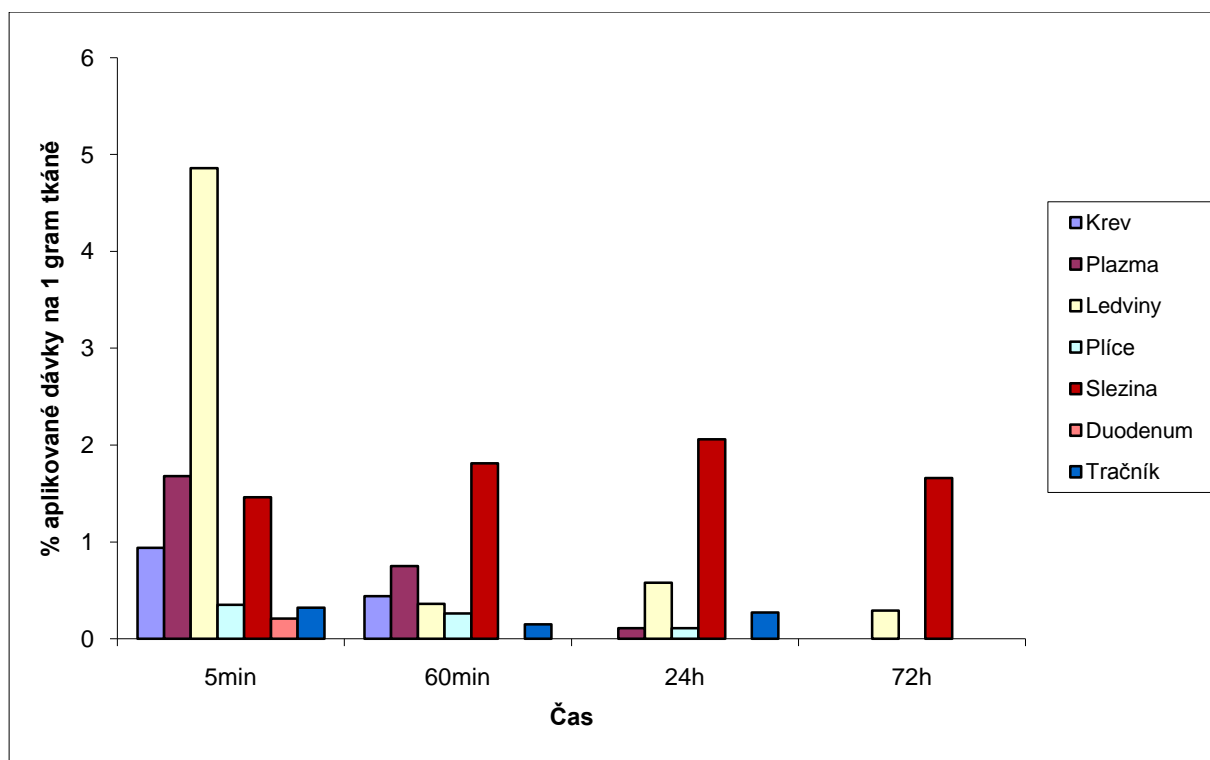


Graf č.12: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 100 v játrech (% dávky na 1 gram tkáně)

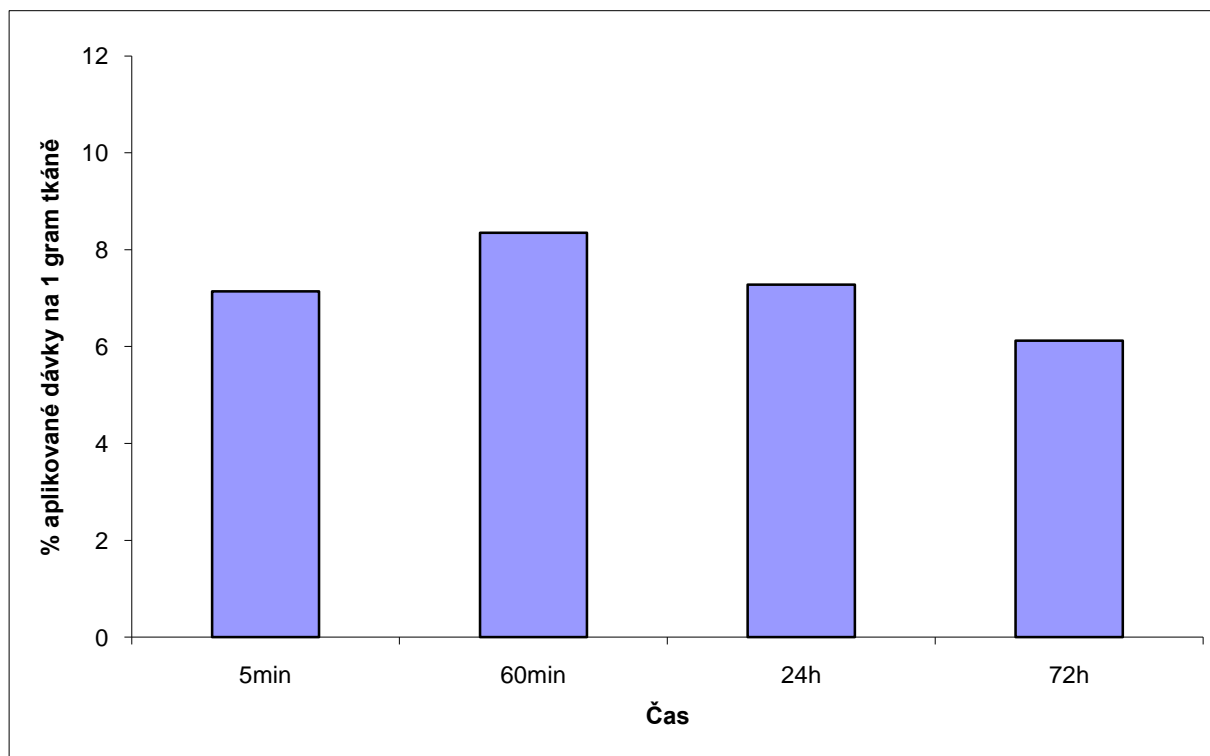




Graf č.13: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 10 v jednotlivých orgánech (% dávky na 1 gram tkáně)



Graf č.14: Grafické znázornění změny radioaktivity v čase pro HA 10 v játrech (% dávky na 1 gram tkáně)

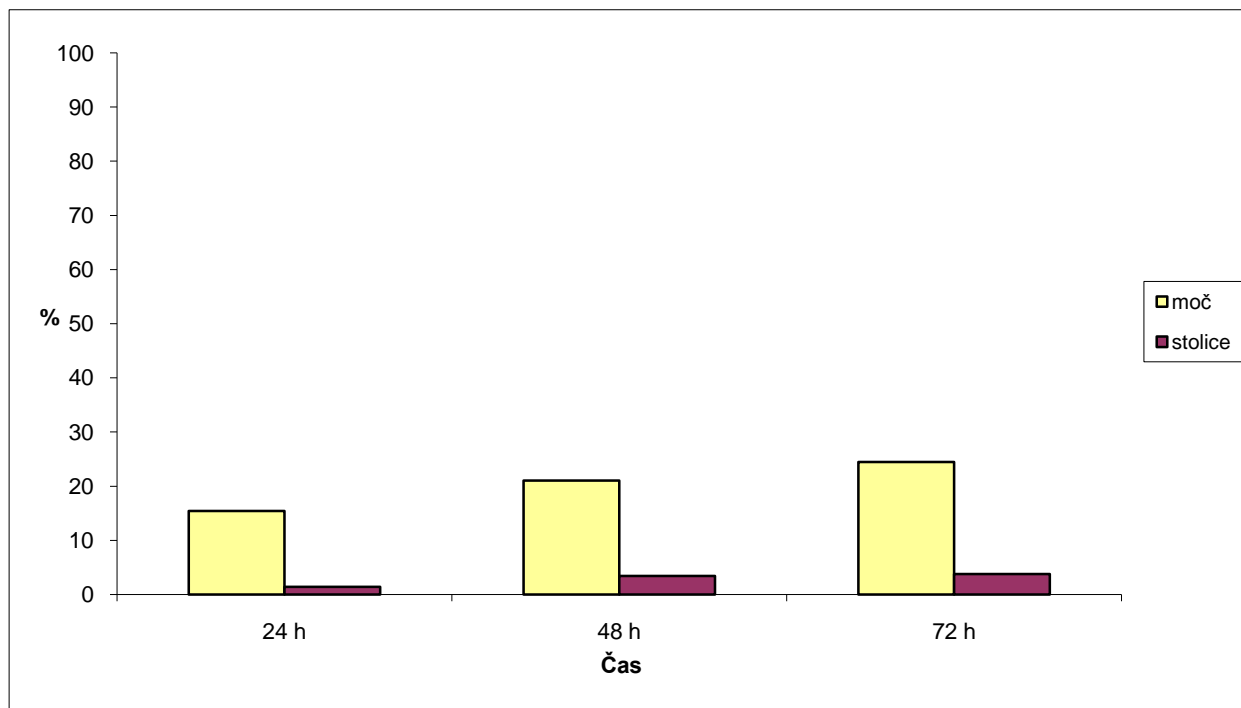


## 5.2 Eliminace $^{111}\text{In-DTPA-HA}$

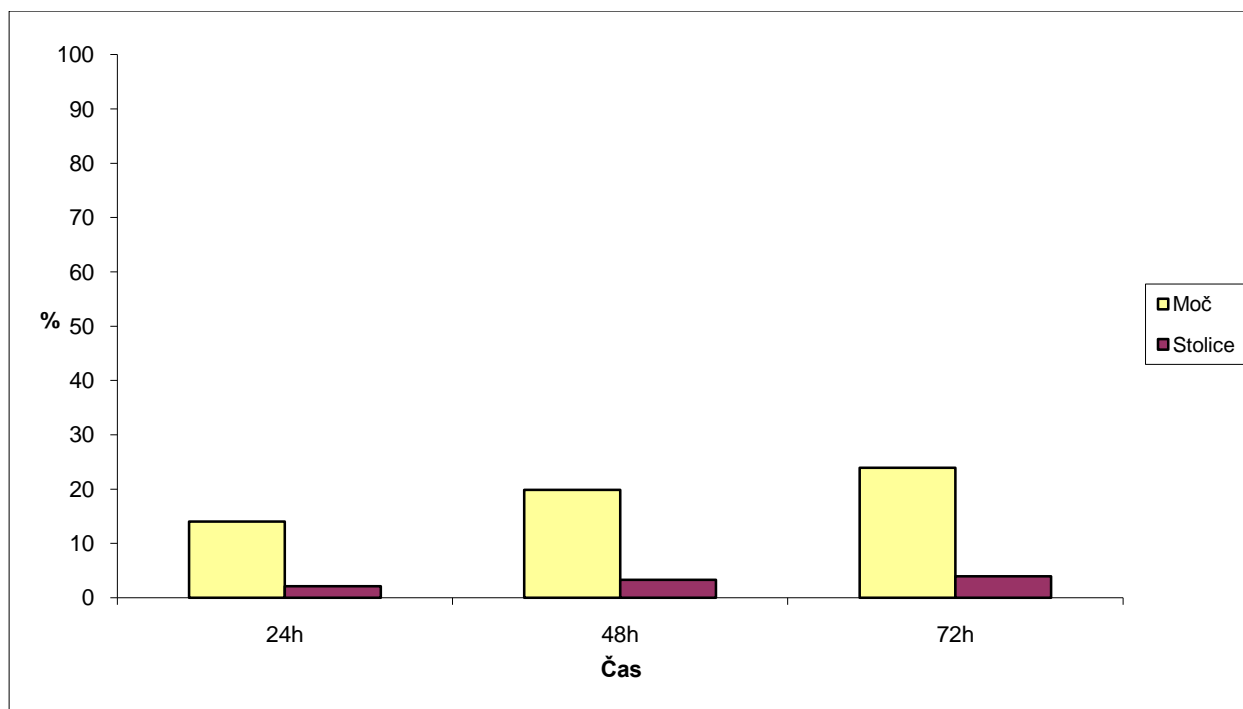
Vzhledem k relativně vysokým hodnotám aktivity v ledvinách 5min po aplikaci látky a pro úplný obraz biodistribuce molekuly, byly provedeny studie eliminace a určení molekulové hmotnosti eliminovaných molekul.

Grafy č.15-17 ukazují kumulativní množství radioaktivity v moči a ve stolici sbírané v průběhu 72h experimentu. Grafy č.18-20 ukazují zastoupení molekulových hmotností v moči.

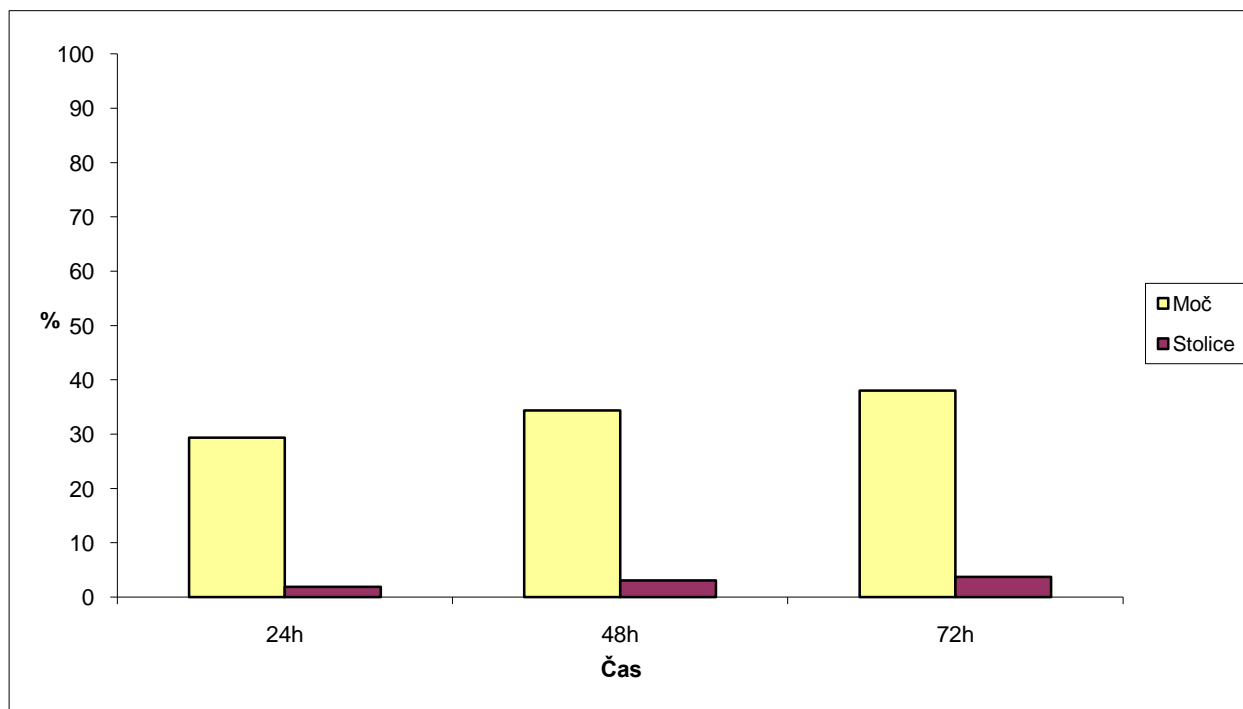
Graf č.15: Kumulativní graf vylučování HA 400 po i.v. podání v průběhu 72h (% aplikované dávky)



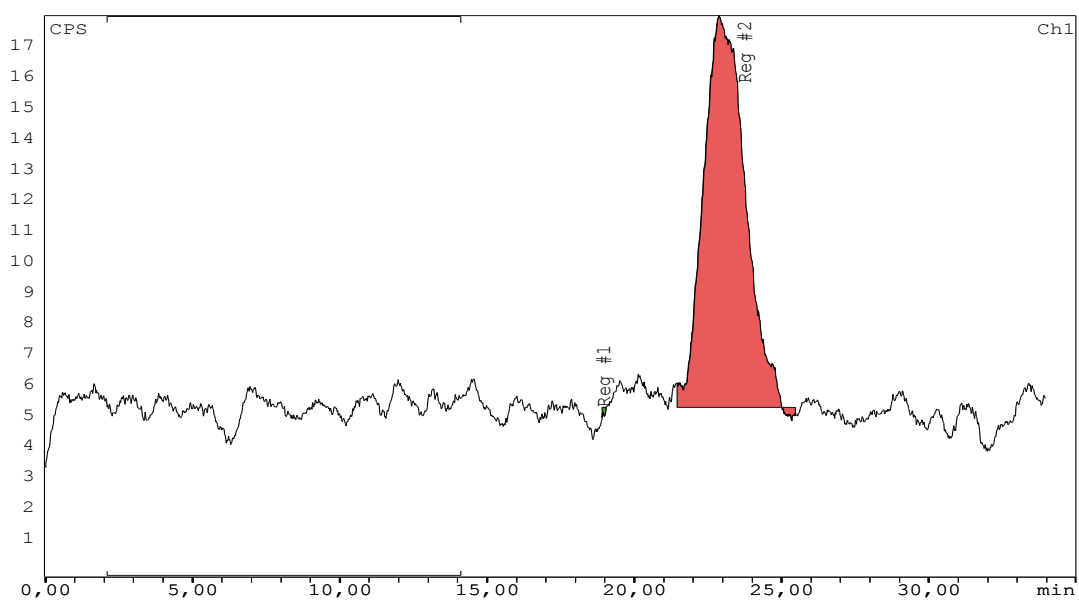
Graf č.16: Kumulativní graf vylučování HA 100 po i.v. podání v průběhu 72h (% aplikované dávky)



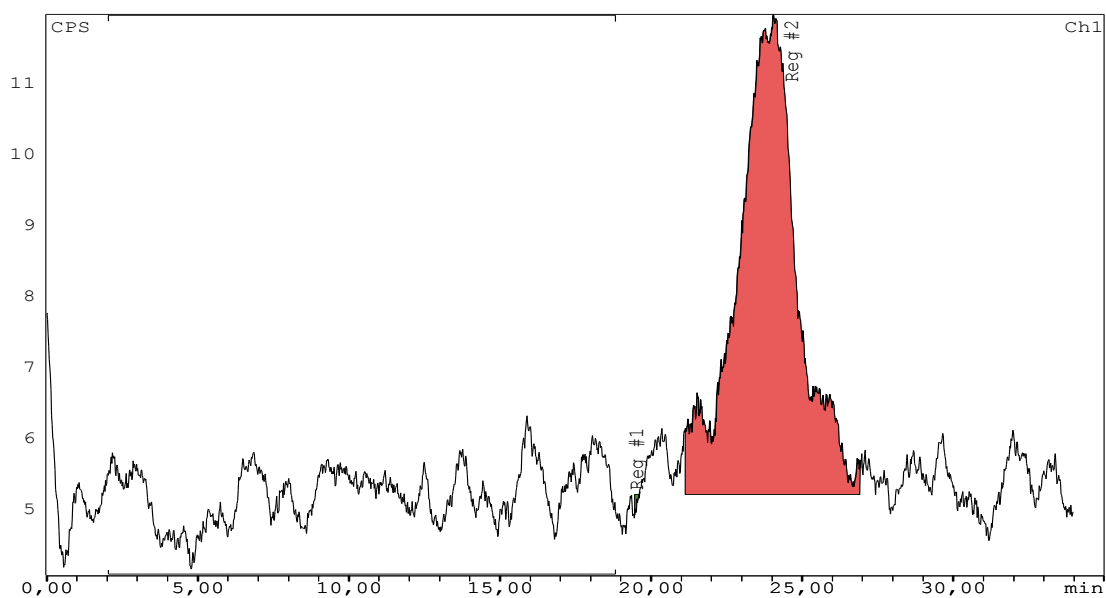
Graf č.17: Kumulativní graf vylučování HA 10 po i.v. podání v průběhu 72h (% aplikované dávky)



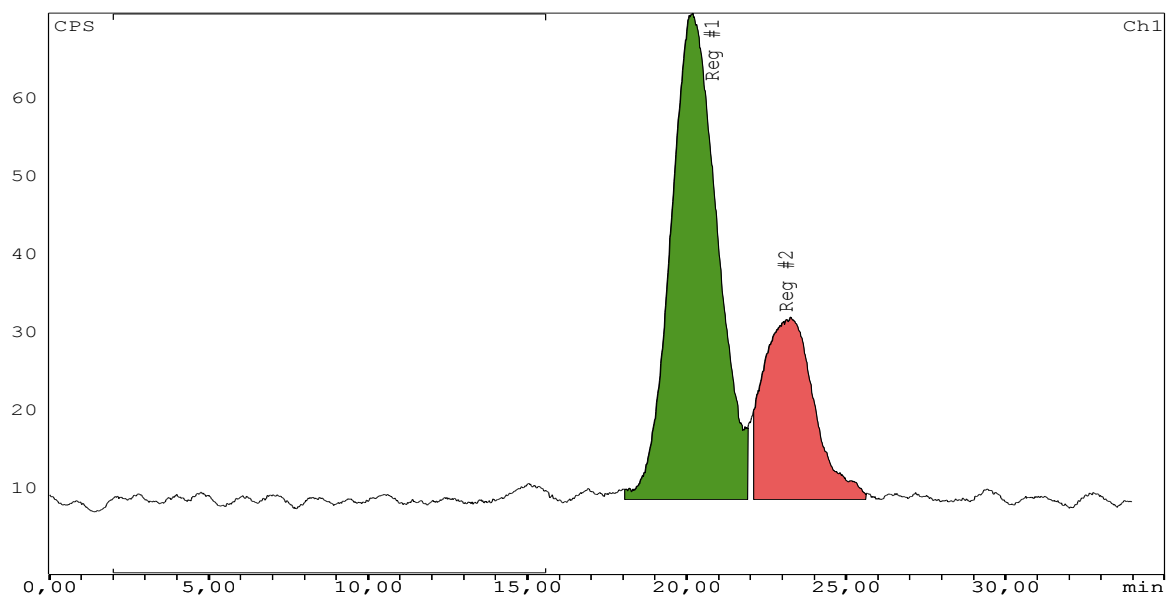
Graf č.18: HPLC analýza molekulové hmotnosti HA 400 v moči



Graf č.19: HPLC analýza molekulové hmotnosti HA 100 v moči



Graf č.20: HPLC analýza molekulové hmotnosti HA 10 v moči



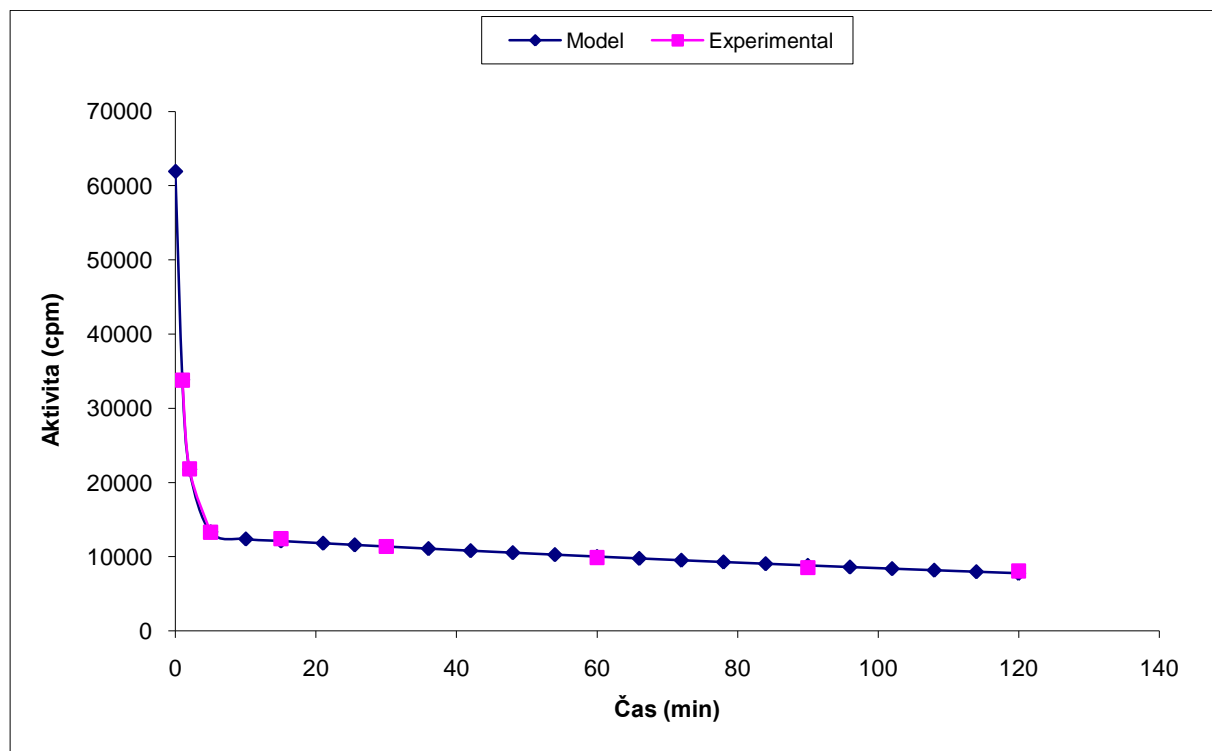
### 5.3 Farmakokinetika <sup>111</sup>In-DTPA-HA

Z výsledků biodistribuce a eliminačních studií byl pro výpočet farmakokinetických parametrů odvozen dvoukompartmentový model.

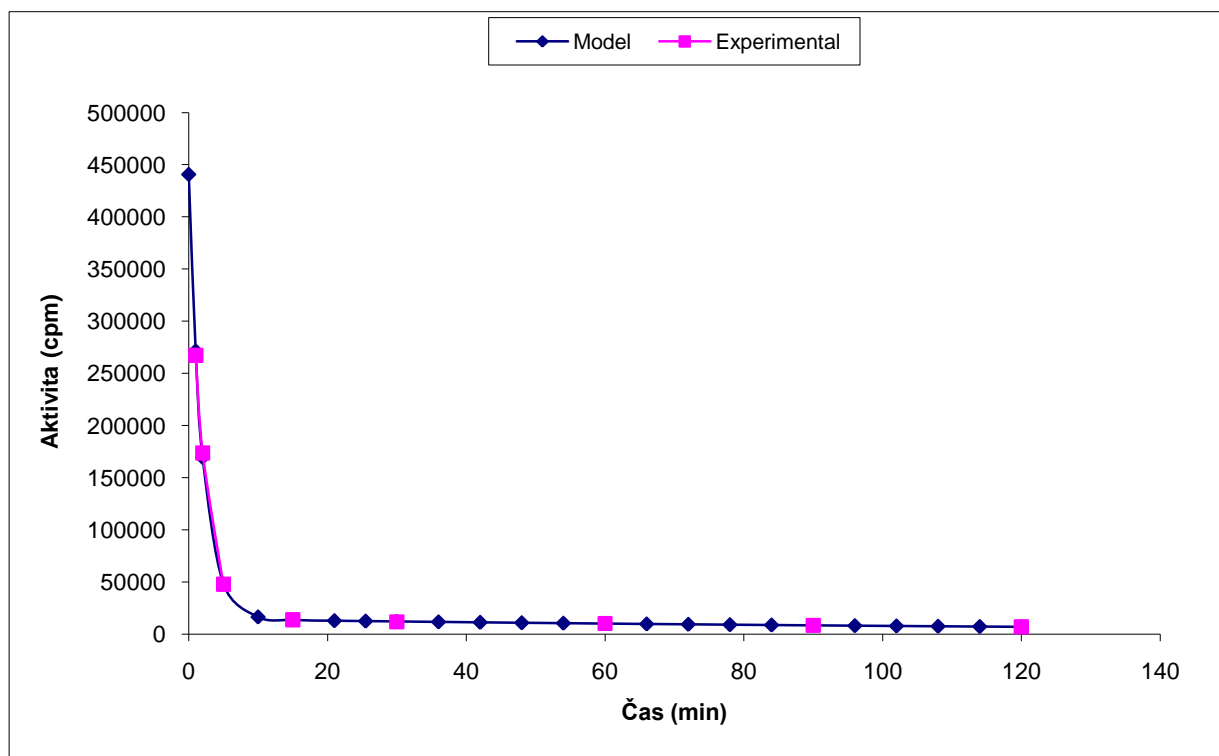
Tabulka č.7: Hlavní farmakokinetické parametry HA 10, 100, 400.

	HA 10	HA 100	HA 400
Distribuční objem centrálního kompartmentu (ml)	8,97 ± 0,76	11,04 ± 1,07	14,97 ± 1,87
Distribuční objem v rovnovážném stavu (ml)	103,56 ± 19,37	175,07 ± 24,74	58,21 ± 1,35
Celková plazmatická clearance (ml/min)	1,01 ± 0,23	1,15 ± 0,39	0,25 ± 0,04
Poločas distribuce (min)	1,89 ± 0,08	1,66 ± 0,22	1,22 ± 0,31
Poločas eliminace (min)	102,39 ± 19,16	143,71 ± 20,76	162,27 ± 21,56

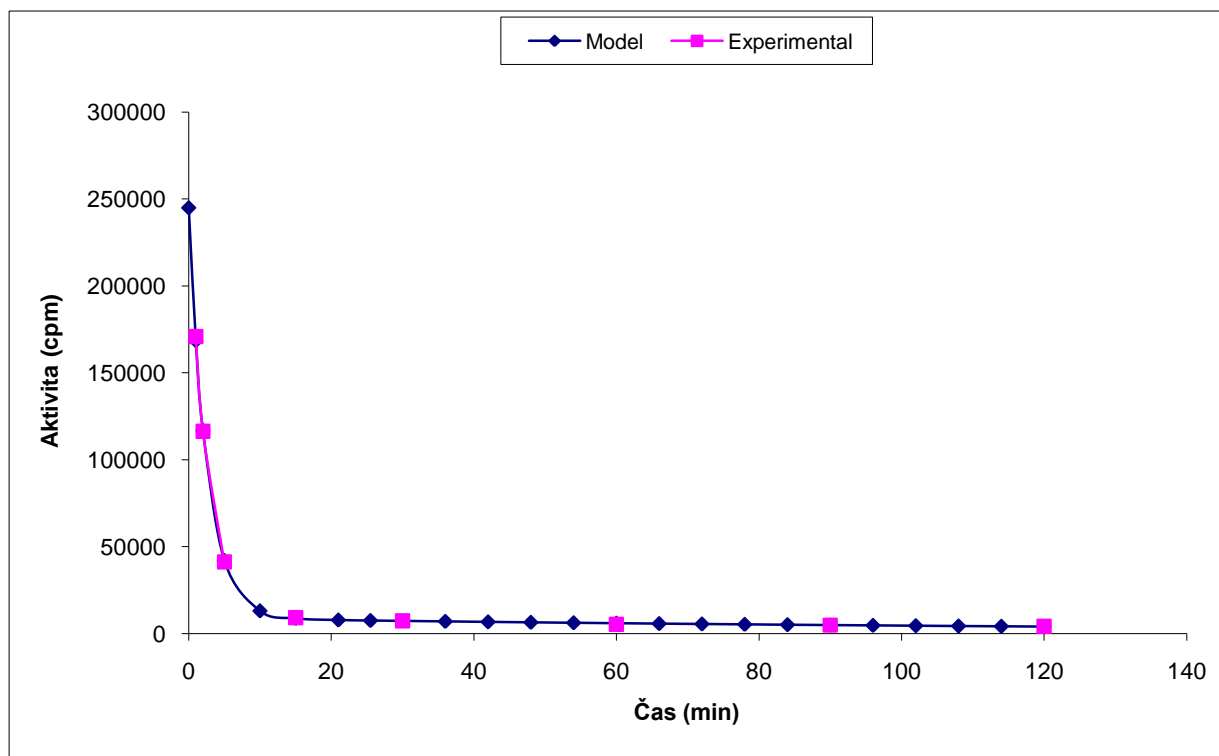
Graf č.21: Závislost změny koncentrace HA 400 v plazmě v čase – experiment a model vypočtený programem SAAM II



Graf č.22: Závislost změny koncentrace HA 100 v plazmě v čase – experiment a model vypočtený programem SAAM II



Graf č.23: Závislost změny koncentrace HA 10 v plazmě v čase – experiment a model vypočtený programem SAAM II

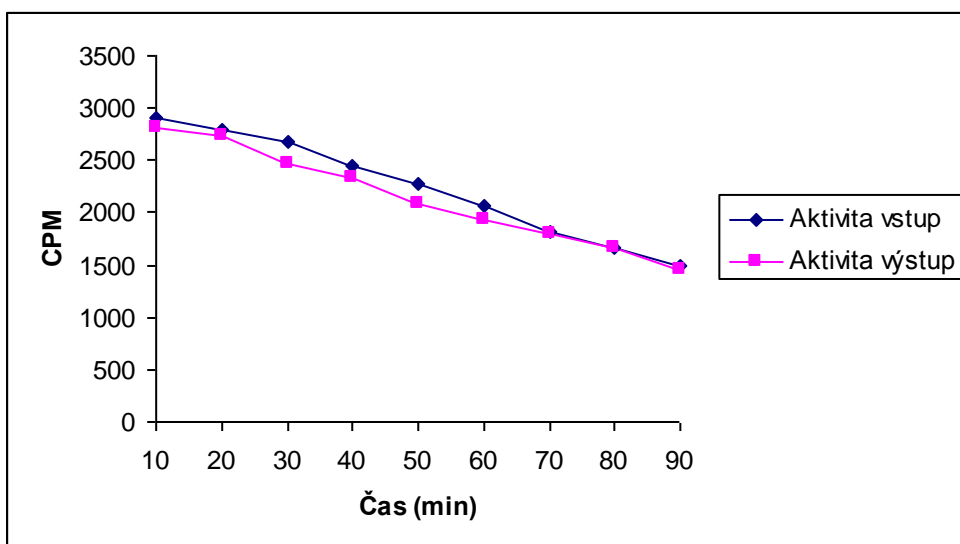


## 5.4 Perfuze jater $^{111}\text{In-DTPA-HA}$

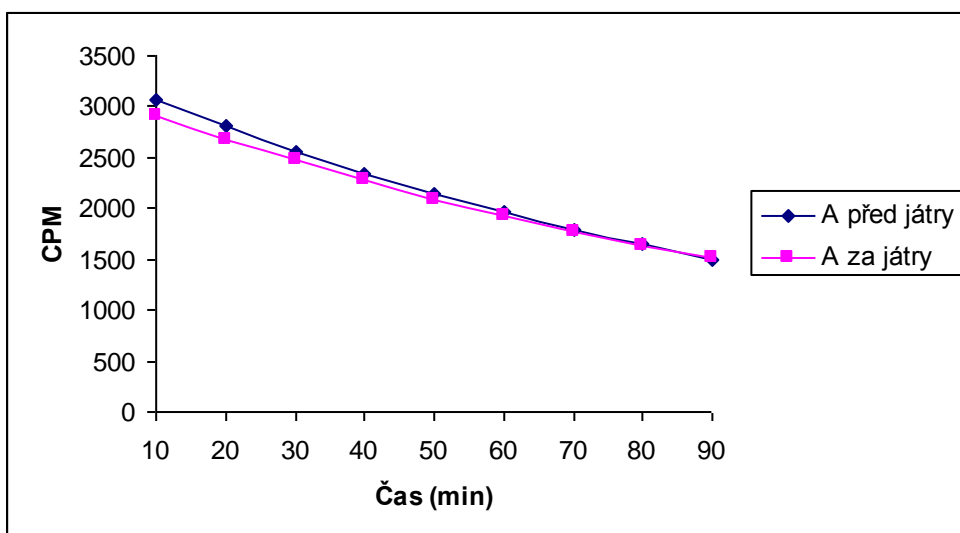
Výsledky perfuze jater u všech tří molekul a jejich analýza programem SAAM II ukazují na kinetiku prvního řádu (Grafy č.24-26). Porovnání parametrů  $\alpha$  spočítaných tímto programem podle rovnice  $C = C_1^{-\alpha t}$  neukazuje žádný statisticky významný rozdíl mezi výsledky získanými z perfuzátu jednotlivých molekul.

Graf č.24: Farmakokinetika perfuze jater - HA 400 – srovnání experimentu a modelu podle programu SAAM II závislosti aktivity v perfuzní tekutině na čase

Experiment



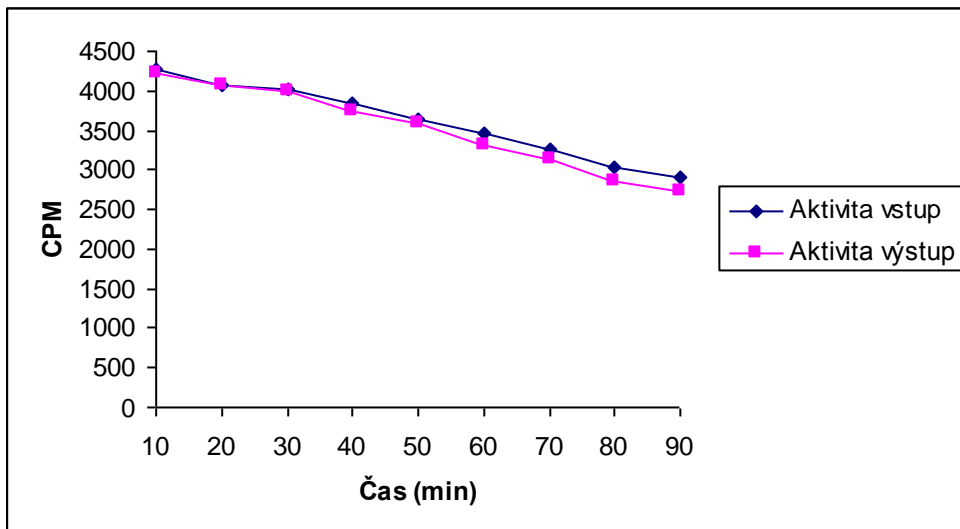
Model



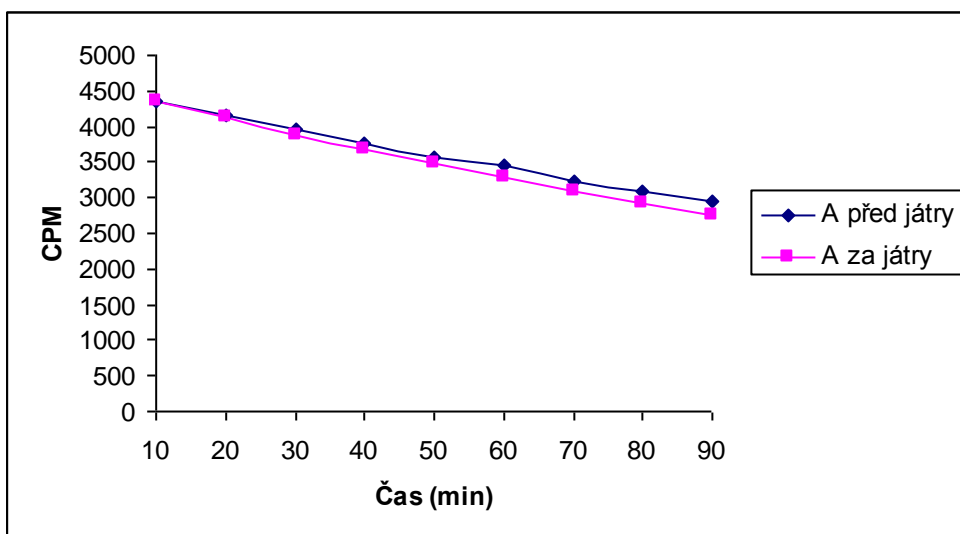


Graf č.25: Farmakokinetika perfuze jater - HA 100 – srovnání experimentu a modelu HA 100 podle programu SAAM II závislosti aktivity v perfuzní tekutině na čase

### Experiment

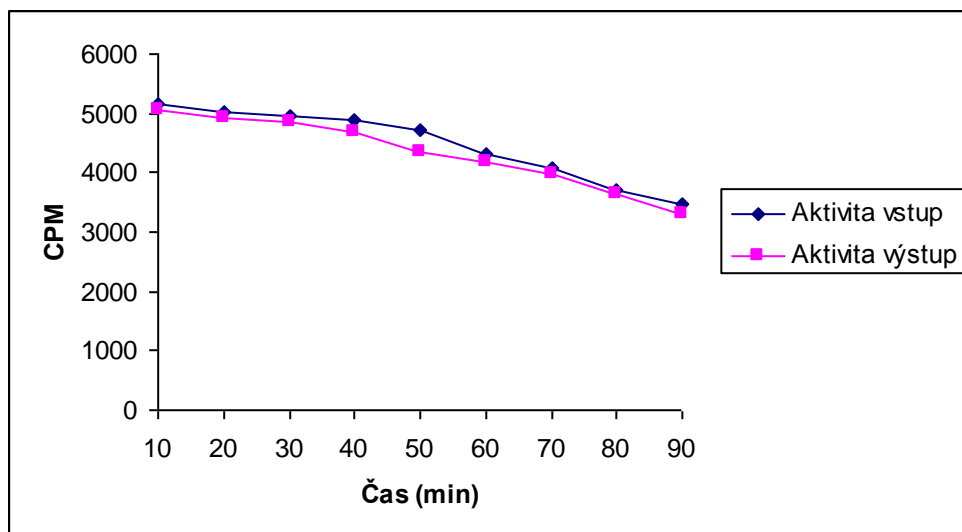


### Model

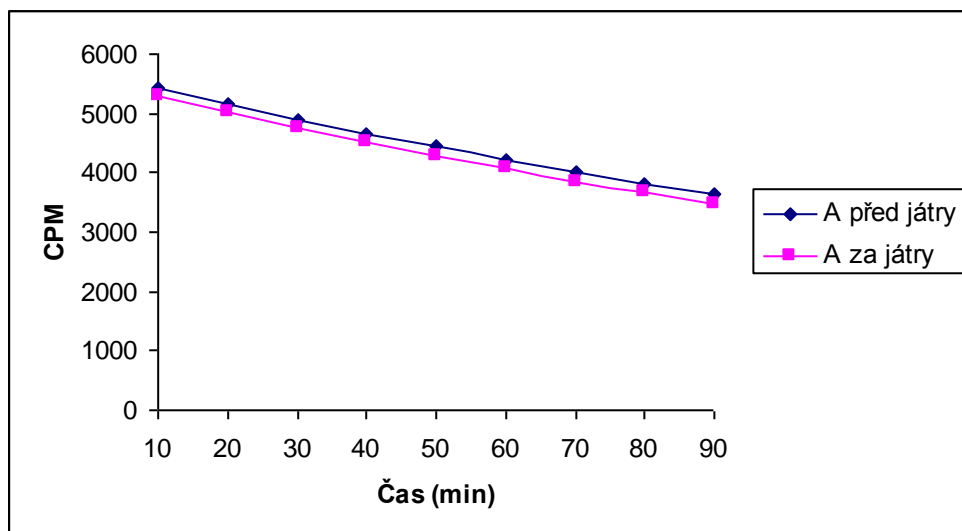


Graf č.26: Farmakokinetika perfuze jater - HA 10 – srovnání experimentu a modelu podle programu SAAM II závislosti aktivity v perfuzní tekutině na čase

### Experiment

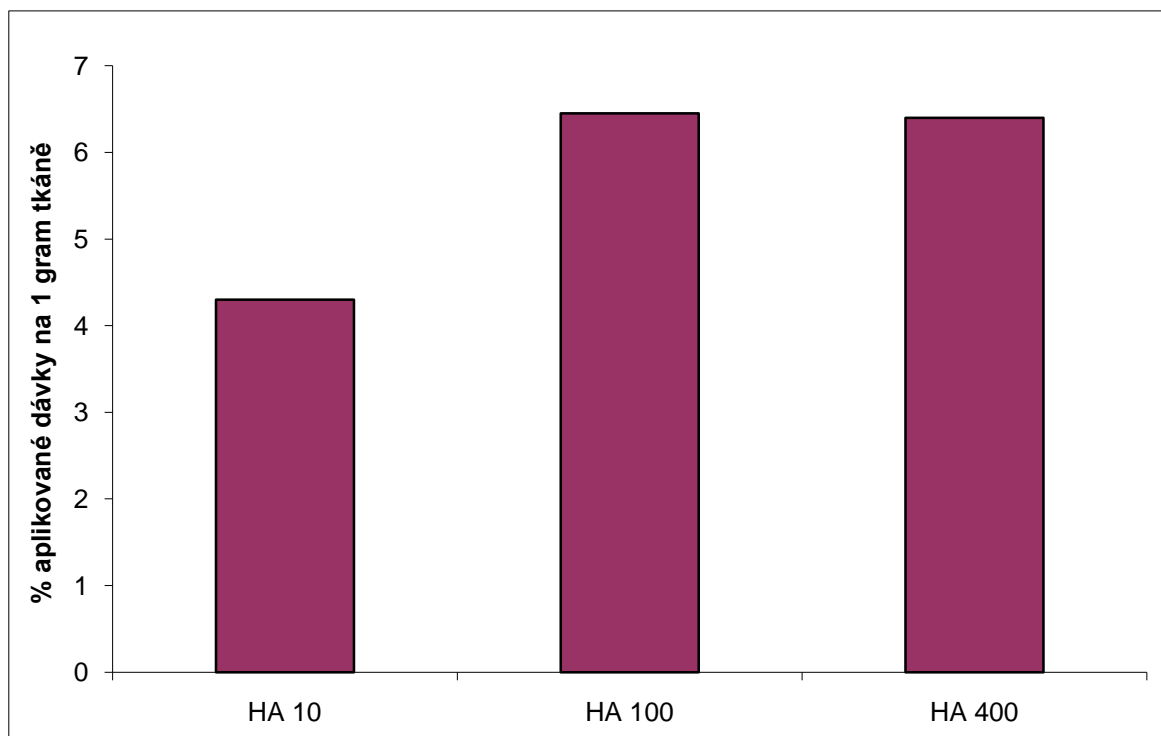


### Model



Celková aktivita perfuzátu v čase 10min od začátku pokusu se u všech tří molekul významně liší od aktivity dodané do systému v čase 0. Celkové množství aktivity absorbované játry po 90 minutách experimentu je zobrazeno v grafu č. 27.

Graf č. 27: Porovnání celkové aktivity experimentálních molekul absorbované játry během 90 minut perfuze jater



Extrakční poměr se od 10min do 90min experimentu u HA400 pohyboval od 0% do 8,5% u HA100 od 0% do 14% a u HA10 od 0% do 11%. Tyto hodnoty jsou však zatíženy velkou statistickou chybou vzhledem k tomu, že chyba měření hodnot srovnávaných v tomto experimentu se v některých případech blíží nebo se rovná samotnému extrakčnímu poměru.

Žlučová clearance aktivity vychytané játry se u všech tří molekul pohybuje od 0 do 0,0005 ml/min.

## **6.DISKUZE**

Biodistribuce všech tří molekulových hmotností  $^{111}\text{In}$ -HA-DTPA může být na základě výsledků charakterizována dvěma cestami. Velmi rychlým vychytáváním aplikovaných molekul z krevního řečiště játry a eliminací malých degradačních produktů, vzniklých pravděpodobným působením hyaluronidáz, hyaluronan lyáz a kyslíkových radikálů, ledvinami.

Více než jedna polovina podané aktivity HA 10 a 100 a více než dvě třetiny aktivity HA 400 byly vychytány játry během prvních pěti minut experimentu. Do jedné hodiny od začátku se aktivita v játrech mírně zvyšovala a v delších časových intervalech byla zaznamenána vysoká retence aktivity v tomto orgánu.

Vychytávání radioaktivity játry může být výsledkem několika mechanismů popsaných McGarym.<sup>52)</sup> Je pravděpodobné, že vysokomolekulární frakce  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA jsou štěpeny uvnitř jaterních endoteliálních buněk hyaluronidázami na menší fragmenty velikosti oligosacharidů. Na základě experimentů z literatury s izotopy  $^3\text{H}$  nebo  $^{14}\text{C}$  víme, že takto značená HA byla štěpena a produkty její degradace byly dále redistribuovány do jiných orgánů a tkání.<sup>20)59)</sup> Tyto výsledky jsou v ostrém kontrastu k výsledkům získaným v průběhu našeho experimentu. Základní příčinou výrazně delší kumulace molekul HA značených  $^{111}\text{In}$ -DTPA v játrech může být právě modifikace řetězce HA. Výsledky naznačují, že tato modifikace ligandem  $^{111}\text{In}$ -DTPA ovlivnila další redistribuci metabolitů. Jak je již zmíněno v úvodu, základní rozdíl mezi HA značenou  $^3\text{H}$  nebo  $^{14}\text{C}$  a  $^{111}\text{In}$ -DTPA je výsledná polarita vzniklé molekuly. Zatímco u prvních dvou izotopů je prakticky nezměněna, vazba  $^{111}\text{In}$ -DTPA polaritu výrazně zvyšuje a může tedy negativně ovlivňovat transport metabolitů vně buňky. Radioaktivně značené fragmenty vzniklé štěpením  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-fragment, případně i odštěpený  $^{111}\text{In}$ -DTPA fragment) jsou natolik polární, že nemohou pronikat přes biologické membrány a proto tyto produkty štěpení zůstávají dlouhodobě kumulovány v místě štěpení (především v játrech). Experimenty, jejichž cílem bylo stanovit molekulovou hmotnost fragmentů  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA v játrech, nebyly úspěšné, protože se nepodařilo za použitých experimentálních podmínek převést významný podíl aktivity homogenátu do vodné fáze. Radioaktivně značené štěpy HA byly totiž silně vázány na konstituční složky jaterní tkáně a použití agresivních postupů pro jejich uvolnění z této vazby by mohlo významně ovlivnit velikost i strukturu produktů metabolismu HA.

## *Eliminační studie*

Z kumulativních výsledků vylučování HA 10, 100, 400 je viditelná převažující renální exkrece všech tří látek. Z porovnání s grafy biodistribuce vyplývá, že největší část eliminace ledvinami proběhla v krátkých časových intervalech tedy do dvou hodin od podání vzorků, kdy ledviny ve srovnání s jinými orgány (kromě jater) vykazují vysoký nárůst radioaktivity. Lze předpokládat, že molekuly, které nebyly vycity játry, byly v krvi degradovány na produkty o nižší molekulové hmotnosti a následně eliminovány renální exkrecí.

Následná analýza (Grafy č.18-20) potvrzuje nízkomolekulární produkty v moči. Jejich původ může být dvojího, v případě HA 10 trojího charakteru. 1. Nízkomolekulární produkty vznikající štěpením původního řetězce, 2. Nečistoty typu  $^{111}\text{In}$  DTPA nebo  $^{111}\text{In}$ , které jsou obsaženy v aplikovaných vzorcích v množství 2 - 4% a za 3. v případě HA 10 se podle elučního času prvního peaku může jednat o původní látku, tedy  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 10kDa.

Podle výsledků eliminace a aktivity ve střevech se vylučování  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA děje i přes GIT ovšem výrazně nižší měrou.

Vylučování HA GIT a renální exkrecí bylo potvrzeno i v jiných publikacích sledujících biodistribuci HA. Celkové množství aktivity vyloučené při našem experimentu je však v porovnání s těmito výsledky vyšší. <sup>59)100)</sup>

## *Farmakokinetika*

Výsledky farmakokinetické studie odpovídají dvoukompartmentovému modelu s rychlou distribucí látek z hlavního do vedlejšího kompartmentu a pomalou eliminací látek ze systému. Všechny tři zkoumané látky vykazují z farmakokinetického hlediska jiné chování, než je zmíněno v úvodu, tedy nelze pro ně použít jednodokompartmentový nelineární model Michaelise-Mentenové.

Rychlý poločas distribuce z hlavního do vedlejšího kompartmentu stejně jako vysoký distribuční objem v rovnovážném stavu u všech tří molekul odpovídá rychlému vychytávání z krevního oběhu a vysokým procentům aktivity v játrech pozorovaných v krátkých časových

intervalech biodistribuční studie. Výrazná aktivita v játrech v dlouhých intervalech (24, 72h) je v souladu s vypočítanými dlouhými eliminačními poločasy.

Porovnání vlivu molekulové hmotnosti na farmakokinetické parametry bylo provedeno vzájemným statistickým porovnáním parametrů  $\alpha$ ,  $\beta$ . To vedlo ke zjištění, že mezi kinetikou zkoumaných molekul neexistuje statisticky významný rozdíl. Pokud toto zjištění srovnáme s výsledky biodistribuce, kde jsou játra hlavním orgánem podílejícím se na snížení aktivity v krvi během distribuční fáze, zjistíme, že i přes to, že je kinetika distribuční a eliminační fáze stejná pro všechny tři molekuly, je celkové množství HA 400 vycytané játry téměř o 25% vyšší (počítáno na celkovou aktivitu v orgánu), za stejný časový interval, než u zbývajících dvou molekul.

Stejně tak je zajímavé vzájemné srovnání celkové plazmatické clearance a distribučního objemu v rovnovážném stavu všech tří molekul. Přesto, že by se dalo na základě výsledků biodistribuce očekávat, že distribuční objem v rovnovážném stavu bude nejvyšší pro HA 400 není tomu tak. Detailnější rozbor výsledků biodistribuce odhalí, že HA 100 a HA 10 jsou oproti HA 400 ve vyšší míře distribuovány i do jiných orgánů než jsou játra. V eliminační fázi potom pravděpodobně dochází k tomu, že zatímco HA400 nebo její fragmenty jsou redistribuovány a vyskytují se tedy ve vyšších koncentracích v plazmě a snižují tak zmíněný distribuční objem, k redistribuci HA 100 a HA 10 v takové míře zdaleka nedochází a jejich distribuční objemy jsou vyšší.

Při analýze farmakokinetického chování HA je nezbytné brát v úvahu fakt, že farmakokinetické parametry byly stanoveny z celkové aktivity  $^{111}\text{In}$  v plazmě. Přitom v plazmě může být přítomna nejen původní látka, ale i její fragmenty a vzájemný poměr jednotlivých radioaktivně značených forem se bude s časem měnit. Tento fakt ještě více komplikuje interpretaci dosažených výsledků i tvorbu jednoznačných závěrů o vlivu molekulové hmotnosti na farmakokinetické chování HA.

### *Perfuze jater*

Celková aktivita perfuzátu v čase 10min od začátku pokusu se u všech tří molekul významně liší od aktivity dodané do systému v čase 0. Pokud budeme vycházet z výsledků biodistribuce a farmakokinetiky pak i v případě perfuze jater in situ dochází v průběhu

několika minut od začátku experimentu k pravděpodobnému nasycení transportních mechanismů pro HA. Následný lineární průběh poklesu aktivity viditelný z grafů č. 24-26 je pravděpodobně kombinací několika dějů, jako např. přechod HA z perfuzní tekutiny do jater, částečný návrat produktů štěpení HA v játrech zpět do perfuzní tekutiny. <sup>108)</sup>



## **7. ZÁVĚR**

Výsledky získané v této práci vytvořily komplexní obraz pohybu a chování zkoumané  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA o třech různých Mw v podmínkách in vivo. Porovnaly závislost Mw na chování látky a zároveň odhalily některé rozdíly v chování námi použité molekuly s molekulami použitými v jiných pokusech a vytvořily možné hypotézy důvodu tohoto odlišného chování.

V úvodu bylo zjištěno, že stabilita použité molekuly je dostatečná a umožňuje získávání reprodukovatelných výsledků.

Základní předpoklad biodistribuce námi použitých molekul a to rychlé vychytávání molekul s vyšší Mw játry se potvrdil i v našem experimentu. Odhalil základní rozdíl mezi současnými znalostmi o distribuci molekul značených  $^3\text{H}$  nebo  $^{14}\text{C}$  a  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA, spočívající ve výrazně delší době setrvání námi zkoumané látky v játrech a absence redistribuce do jiných tkání nebo rychlé eliminace. Dále prokázal, že biodistribuce látky s vyšší Mw (400kDa) se odlišuje od molekul s nižší Mw (10 a 100kDa).

Dvoukompartimentový farmakokinetický model použitý pro výpočet farmakokinetických parametrů všech tří molekulových hmotností  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA ukázal, že přes to, že se distribuční objem v rovnovážném stavu a plazmatická clearance látky s vyšší Mw (400kDa) odlišuje od molekul s nižší Mw (10 a 100kDa), mají všechny tři molekuly stejný průběh distribuční a eliminační fáze.

Výsledky perfuze jater mají opět stejný průběh pro všechny tři použité molekulové hmotnosti. Pravděpodobné rychlé vychytání  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA ze systému následuje fáze s kinetikou, která by se dala popsat jako pseudonultého řádu s předpokládanou redistribucí fragmentů  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA z jaterních buněk do perfuzní tekutiny a zpět.

## **8.SOUHRN**

Disertační práce se zabývá studiem biodistribuce a farmakokinetiky hyaluronové kyseliny značené izotopem  $^{111}\text{In}$  a možných rozdílů v závislosti na molekulové hmotnosti HA. HA je v organismech přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan s řadou důležitých funkcí jak na orgánové, tak na buněčné úrovni, při fyziologických i patologických dějích. Její charakter fyziologické látky zároveň velmi znesnadňuje možnosti jejího sledování v organismu. Vytvořením vhodného derivátu a reprodukovatelného postupu značení této molekuly izotopem se stalo stěžejním bodem celé práce.

V experimentální části byla molekula DTPA-HA, vytvořená na pracovišti společnosti CPN Dolní Dobrouč, značena známou metodou používanou běžně pro vazbu  $^{111}\text{In}$  na molekulu DTPA. Byl vytvořen reprodukovatelný postup, při kterém je 0,4M acetátový pufr pH 5,5 smíchán se stejným objemem, gelovou filtrací přečištěné, DTPA-HA a požadovaným množstvím izotopu  $^{111}\text{In}$  a celá směs je míchána 0,5h. Takto byly značeny molekuly DTPA-HA o třech molekulových hmotnostech 10, 100 a 400kDa, které se ukázaly být dostatečně stabilní a vlastnostmi podobné nativní HA.

S vytvořenými HA 10, 100 a 400 byly provedeny biodistribuční, farmakokinetické a eliminační studie a perfuze jater in situ.

Biodistribuce ukázala podobné chování všech tří sledovaných molekulových hmotností. U všech se objevilo rychlé vychytávání z krevního oběhu játry a pomalá eliminace z organismu. S vyšší molekulovou hmotností bylo vychytávání kvantitativnější.

Pro výpočet farmakokinetických parametrů byl použit dvoukompartmentový model. Výsledky ukazují na rychlou distribuční a velmi pomalou eliminační fázi, kde s molekulovou hmotností roste distribuční objem centrálního kompartmentu a poločas eliminace a naopak klesá poločas distribuce a plazmatická clearance.

Eliminace všech tří molekul proběhla převážně renálně jen s velmi malým přispěním GIT. HPLC analýza Mw HA nalezené v moči odpovídala nízkomolekulárním fragmentům. Pouze v případě HA 10 se objevil peak, ve stejném elučním čase jako u standardu této molekuly.

Při perfuzi jater došlo během prvních 10 minut k vychytání velkého podílu aktivity játry a následná fáze ukazuje kinetiku prvního řádu.

Získané výsledky byly použity pro další výzkum v rámci oddělení radiofarmak farmaceutické fakulty UK a dále pro další výzkum v rámci spolupráce se společností CPN, Dolní Dobrouč, za jejíž podpory byl tento výzkum proveden.

## **9.SUMMARY**

This PhD thesis, is dealing with physiological properties of Hyaluronic Acid labelled with  $^{111}\text{In}$  isotope. HA is naturally occurring Glycosaminoglycan within organisms with many important functions on the cellular and organ level, including physiological and pathological processes. Its character of physiologically occurring substance makes its tracing in the organism very difficult. Thus preparation of suitable derivative and repeatable procedure of labelling of this molecule became the most important point of the whole work.

During the experimental part DTPA-HA molecule created by CPN Dolni Dobrouč has been labelled using well-known method used for labelling of DTPA molecules with  $^{111}\text{In}$ . A reproducible procedure has been created where 0,4 M Acetate buffer pH 5,5 is mixed with an equal volume of DTPA-HA purified by gel filtration and required amount of isotope  $^{111}\text{In}$  and the whole mixture is mixed for 0,5 h. This method was used for labelling of DTPA-HA molecules of three different molecular weights 10, 100 and 400kDa, which proved to be sufficiently stable and having properties of native HA.

Newly created HA 10, 100 and 400 were used for biodistributional, pharmacokinetic and elimination studies and for liver perfusion in situ.

Biodistribution revealed the same behaviour of all three examined molecular weights. A rapid uptake by liver from circulation and slow elimination from organism appeared. With higher molecular weight uptake was more quantitative.

Two-compartment model was used for calculation of pharmacokinetic parameters. Results show fast biodistribution phase and slow elimination phase, where with increasing molecular weight the volume of central compartment and elimination half-life grows and on the contrary distribution half-life and plasma clearance are getting lower.

Elimination of all three molecules was mostly renal with only small contribution of GIT. HPLC analysis of Mw of HA recovered from urine corresponded to low molecular weight fragments. Only for HA 10 a peak appeared with the same elution time as for the standard.

A huge amount of activity was taken up by liver within first ten minutes of liver perfusion. The following phase corresponded to the first order kinetics.

The results obtained were used for further research in the department of radiopharmacy of Faculty of Pharmacy, Charles University, and for further research in collaboration with the Contipro C a.s., Dolní Dobrouč, which supported the conduct of this research.



## **10. PŘÍLOHY**

## 10.1 Seznam publikací

### *Publikace:*

- 1) Svanovský, E., Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové, Česká a Slovenská farmacie, 2007, 6: 264-268
- 2) Svanovský, E., Velebný, V., Lázníčková, A., Lázníček, M., The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with  $^{111}\text{In}$  after intravenous administrativ to rats, Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet., 2008, 33: 149-157
- 3) Čožíková, D., Lázníčková, A., Hermannová, M., Svanovský, E., Paleka, L., Buffaa, R., Šedová, P., Koppová, R., Petřík, M., Šmejkalová, D., Lázníček, M., Velebný, V., Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with (111)In, (125)I and (14)C, J. Pharm. Biomed. Anal., 2010, 52:517-24

## 10.2 Publikace

Svanovský, E., *Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové, Česká a Slovenská farmacie, 2007, 6: 264-268*

### Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové

SVANOVSKÝ E.

Contipro C. a. s., Dolní Dobrouč

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie

Došlo: 9. října 2007 / Přijato: 30. října 2007

#### SOUHRN

##### Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová tvoří jednu z hlavních složek extracelulární matrix, její fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti ukazují na široké spektrum možností využití této molekuly jak v průmyslu, tak lékařských vědách. Tato přehledná práce prezentuje současné znalosti z výzkumu kyseliny hyaluronové, popisuje základní chování při fyziologických, patologických procesech stejně jako její hlavní farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti.

**Klíčová slova:** kyselina hyaluronová – biodistribuce – farmakokinetika – hojení ran

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 264–268

#### SUMMARY

##### Physiology and pharmacology of hyaluronic acid

Hyaluronic acid represents one of the main components of the extracellular matrices. Its physical-chemical and biological properties offer a wide spectrum of use of this molecule, both in industry and medical sciences. The review paper presents our contemporary knowledge gained in the research of hyaluronic acid, describing its principal behaviour in physiological and pathological processes as well as its principal pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

**Key words:** hyaluronic acid – biodistribution – pharmacokinetics – wound healing

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 264–268

*Má*

Kyselina hyaluronová (HA) je mnohdy považována pouze za molekulu extracelulární matrix. Minulý a současný výzkum však objevuje stále nové a nové funkce této molekuly jak na buněčné, tak na orgánové úrovni.

Všechny získané znalosti o této molekule poukazují na to, že HA je molekula velkého významu. Je nutná pro správnou funkci lidského organismu. Její všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů, jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran a dalších, ukazuje na celou řadu možností využití této molekuly jako léčivé látky.

Doposud však existuje celá řada otázek o této molekule, které nebyly objasněny. Jedná se především o otáz-

ky mechanismu účinku na buněčné úrovni, přesné mechanismy a role HA při hojení ran a v neposlední řadě také její vliv na tumorogenezi a metastatickou aktivitu nádorových buněk.

Díky svým unikátním vlastnostem našla HA již řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích. V revmatologii, oftalmologii, diabetologii, farmaceutické technologii a dalších oblastech, například při hojení ran.

Její potenciál co by léčivé látky je veliký a možnosti dalšího využití při terapii chorob jsou stále předmětem zkoumání. Stejně tak jsou zkoumány možnosti jejího využití jakožto farmaceutického poloproduktu pro tvorbu nových derivátů s vlastnostmi nosičů terapeutických látek.

Adresa pro korespondenci:  
Mgr. Evžen Svanovský  
U Vodárny 6, 678 01 Blansko  
e-mail: evsva@seznam.cz

### **Současný výzkum a možnosti terapeutického využití kyseliny hyaluronové**

Dnes už si HA našla svoje místo v řadě různých léčebných postupů a na dalších možnostech jejího využití se v současnosti pracuje. V níže uvedené kapitole jsou zmíněny hlavní možnosti jejího využití a také některé indikace, ve kterých se již využívá.

Jednou z nejvýznamnějších snah o využití HA je vytvoření derivátů pro tvorbu mikrokapslí ke zvýšení biologické dostupnosti některých léčiv. Vlastnosti těchto derivátů HA vylepšují její biokompatibilitu. Lipofilní vlastnosti usnadňují průnik biologickými membránami a zvyšují schopnost její biodegradace <sup>1)</sup>.

Výhodné je použití HA v kosmetice a kosmetické chirurgii. Jako fyziologická komponenta tkání nemá velké nežádoucí účinky a shoda v chemickém složení HA produkované streptokoky s lidskou, umožňuje její aplikaci bez předchozího testování bezpečnosti na zvířatech. HA je v této oblasti využívána zejména pro vyhlazování vrásek a zvěšování rtů. Má také své výhody pro pacienty odmítající chirurgický zákrok. HA se aplikuje jako dermální injekce jen s použitím anestetického gelu aplikovaného před zákrokem <sup>2)</sup>.

Důležitou indikací pro použití HA je osteoartritida. V této indikaci se používají především intraartikulární injekce. Vzhledem k tomu, že distribuce HA do kloubu po intravenózním, nebo perorálním podání není dostatečně potvrzena, má intraartikulární aplikace své opodstatnění. Byl porovnáván přínos léčby intraartikulární injekcí HA s léčbou kortikosteroidy nebo NSA <sup>3-6)</sup>. Intraartikulárně podávané injekce HA používané při klinickém výzkumu terapie osteoartritidy se často liší v molekulové hmotnosti. Rozdíl v účinku HA o nízké a vysoké molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) je zřejmý. Zdá se, že druhá jmenovaná HA je efektivnější při redukování projevů zánětu kloubu a při obnově viskozity synoviální tekutiny. Ne všechny studie však naznačují totéž a je těžké mezi nimi porovnávat. Mnoho lékařů hodnotí lépe HA o vysoké  $M_r$  jako lépe snižující bolestivost osteoartrického kloubu. Přesný mechanismus účinku HA obou  $M_r$  v kloubní šterbině není bohužel dosud objasněn. Je však známo, že zde snižuje celkovou produkci oxidu dusnatého a PGE<sub>2</sub>. Proto je HA využitelná nejen jako viskoelastický činidel, ale také jako biologicky aktivní látka pro terapii osteoartritidy <sup>4)</sup>.

Zdá se, že odpověď postiženého kloubu na terapii HA je obdobná jako odpověď na terapii kortikosteroidy. Nevýhodou HA stále zůstává způsob aplikace pro účinnou léčbu. Intraartikulární injekce není přijatelným řešením pro všechny pacienty <sup>5)</sup>. Je však zřejmé, že celkové nežádoucí účinky vyvolané HA jsou a budou podstatně nižší než ty vyvolané dlouhodobým podáváním kortikosteroidů nebo nesteroidních antiflogistik.

Role hyaluronanu sodného v hojení ran je v současné době již dobře známa a byla prokázána klinickou studií provedenou v České republice prof. Sobotkou s přípravkem Hyodine <sup>6)</sup>. HA má při hojení ran různého původu řadu účinků, a to při všech fázích hojení rány: zánětu, formaci granulační tkáně a reepitelizaci. Při zánětlivé

fázi je produkce HA obvykle zvýšena a bylo prokázáno, že exogenně podaná HA zvyšuje produkci některých cytokinů podporujících migraci prozánětlivě působících buněk do místa zánětu. Při tvorbě granulační tkáně HA uplatňuje svoji schopnost vytvářet matrix nutnou pro migraci a zachytávání buněk v místě defektu. Mimo vliv na migraci při tvorbě granulační tkáně podporuje její tvorbu také zvýšenou angiogenezi. Reepitelizace probíhá také za přítomnosti HA a je podporována její schopností tvorby nutného extracelulárního matrix. K celkovému zacelení defektu také přispívají schopnosti HA jako vychytávače volných radikálů <sup>6)</sup>.

### **Fyziologické funkce kyseliny hyaluronové**

HA je lineární glykosaminoglykan složený z jednotek disacharidů tvořených kyselinou glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Jeho molekulová hmotnost se liší podle typu tkáně, ve které se nachází. Zaujímá velký prostorový objem a je chopen pojmout velké množství vody <sup>7)</sup>.

V živých organizmech je HA všudypřítomná a je přítomnou součástí tělesných tekutin a tkání. Je hojně přítomna v těle a je syntetizována řadou buněk. Normální hladina HA v plazmě je nízká (300 ng/ml u člověka) a je 10× nižší než hladina v lymfě <sup>8)</sup>.

HA tvoří vysoce hydratovaný obal kolem mnoha buněčných typů <sup>9)</sup>. Nejvyšší koncentrace HA se objevují v synoviální tekutině, sklívci, kůži a v místech její degradace, játrech a slinivce <sup>10)</sup>.

Její celkové množství v lidském organismu je odhadováno asi na 15 g <sup>11)</sup>.

HA má v organismu mnoho fyziologických funkcí a tyto se liší v závislosti na typu tkáně, ve které se uplatňuje.

HA slouží v tkáni jako molekula vytvářející odpor vodě a tekutinám proudícím extracelulárním prostorem. Podílí se na udržení osmotického tlaku. Na základě své konformace stéricky vytlačuje některé molekuly z prostoru, který sama zaujímá, a v neposlední řadě se podílí na regulaci molekulárního transportu, kde působí jako jakési síto pro postupné propouštění molekul o různé molekulové hmotnosti <sup>12)</sup>.

Udržuje vodu, zachovává extracelulární prostor a zprostředkovává transport iontů a nutričních látek. Dále se podílí na zvlhčování stratum corneum a udržování její flexibility <sup>13)</sup>. Je významnou součástí synoviální tekutiny <sup>14)</sup>. V kloubu udržuje správnou lubrikaci chrupavky, a tím jeho správnou funkci <sup>15)</sup>. HA také reguluje funkce granulocytů, ovlivňuje oxidační poškození tkání, je endogenní stimulatorem produkce řady cytokinů, reguluje rychlost produkce endoteliálních buněk a fibroblastů <sup>16)</sup>.

Oligosacharidy HA indukují angiogenezi v pokožce <sup>16)</sup>. V neposlední řadě podporuje HA také tumorogenezi, buněčnou proliferaci a migraci <sup>17 19)</sup>.

### **Úloha kyseliny hyaluronové při patologických dějích**

Mimo zmíněné fyziologické funkce je HA přítomna také řady patologických dějů, jejichž průběh lze odha-

lit na základě změn její koncentrace v krvi, nebo na základě přítomnosti jejích fragmentů a degradačních produktů.

Mezi tyto patologické děje patří především revmatoidní artritida, fibróza nebo jiná onemocnění jater a některé další zánětlivé procesy v lidském organismu.

HA obsažená v synoviální tekutině je schopna inhibovat migraci, chemotaxi, fagocytózu a adheenci leukocytů. Může také ovlivnit produkci řady mediátorů zánětlivých procesů obsažených v synoviální tekutině. Stejně jako má součást HA kyselina D-glukuronová schopnost působit jako scavenger.

Strukturní změny HA, týkající se například délky jejího řetězce, mohou mít výrazný význam na funkci synoviální tekutiny, jako jsou absorpce nárazu, rozptýlení energie při traumatu a konzervace a lubrikace chrupavky. Při patologických stavech nastává změna ve složení a velikosti molekuly HA <sup>20</sup>.

Při revmatoidní artritidě jsou v krvi pacienta nacházeny antigenní komplexy vznikající vazbou malých molekul HA na protilátky typu IgG. Tyto malé molekuly vznikají díky degradaci velkých molekul volnými radikály produkovanými neutrofilními granulocyty a monocyty, které revmatický kloub infiltrují. Vysokomolekulární HA nutná pro lubrikaci kloubní chrupavky je produkována jen zdravými buňkami, zatímco kloubní tkáň infiltrovaná monocyty a neutrofilny produkuje pouze molekuly o malé molekulové hmotnosti. Degradace HA pak vede k masivnímu uvolnění volných radikálů. Vychytávače radikálů (scavengery) chrání HA před degradací v synoviální tekutině, a zlepšují tak stav revmatického kloubu <sup>21</sup>.

HA je mimo osteoartritidy také markerem poškození jater (cirhóza, fibróza včetně dalších poškození způsobených virovým onemocněním nebo působením xenogenních látek) a biliární atrezie. Indikace je možná díky tomu, že za normálních podmínek je 90 % HA degradováno jaterními endoteliálními buňkami. Při jejich poškození se toto procento snižuje a dojde ke zvýšení plazmatické koncentrace HA. Na základě statistik je potvrzeno, že plazmatické koncentrace HA korelují s plazmatickými koncentracemi bilirubinu. Plazmatická koncentrace HA v těchto případech vypovídá pouze o stavu jaterní fibrózy a nikoli o stavu jaterních funkcí <sup>22</sup>.

Mimo svoji roli při patologii revmatoidní artritidy a poškození jater, má HA velký vliv také při karcinogenním procesu. Interakcí se specifickým CD44 receptorem indukuje HA buněčnou motilitu, facilitovanou invazi rakovinných buněk a indukuje angiogenezi <sup>23</sup>.

#### **Farmakodynamika kyseliny hyaluronové**

Při zmíněných procesech je účinek HA na buněčné úrovni a následně i na úrovni tkáňové a orgánové, zprostředkovan vazbou na charakteristické receptory. Pro svoji vazbu využívá HA mimo jiné i receptory pro chondroitin sulfát <sup>24</sup>.

Hlavní receptor pro HA je molekula CD44 <sup>25</sup>.

CD44 je transmembránový receptor všudypřítomný v lidském těle. Je spojen s G-proteinem a celou řadou kinas, které zprostředkovávají jeho odpověď. Vazba HA

na tento receptor vede k celé řadě buněčných odpovědí, jako jsou přilnavost, organizace a obrat extracelulární matrix na povrchu buněčné membrány a zprostředkování migrace lymfocytů v průběhu zánětu. Tento receptor může existovat v celé řadě izoform <sup>26</sup>.

Jedním z receptorů, který se svojí funkcí a expresí podobá CD44, je RHAMM. Oba receptory, jak CD44, tak RHAMM, se podílejí na regulaci přenosu buněčných signálů <sup>27</sup>.

#### **Farmakokinetické parametry kyseliny hyaluronové**

Farmakokinetické parametry HA jsou v současné době prostudovány jen omezeně. HA nenesou na povrchu žádné antigenní struktury a její slabá odolnost vůči fyzikálním vlivům (vysoké, nízké pH, vysoká teplota), klade značně náročné podmínky pro její sledování v organizmu.

Známy je především distribuční objem HA, který je u člověka asi 5,4 l <sup>28</sup>, a plazmatický poločas, který se pohybuje od 3,5 do 6,0 min <sup>29</sup>.

#### **Absorpce**

Topická aplikace HA jako hydrofilní molekuly a její průnik přes silně lipofilní stratum corneum by se mohla jevit obtížnou. Avšak HA je schopna se v určitých případech přiblížit amfifilní povaze a proniknout i do hlubších vrstev pokožky <sup>30</sup>. Přičemž pokožkou je HA transportována zejména difuzí <sup>31</sup>.

Podle dalších studií nezávisí pasáž HA přes pokožku pouze na pasivním transportu, ale může být zprostředkovaná i aktivními formami transportu.

Tímto způsobem proniká HA přes pokožku až do oběhu, kde se objevuje asi po 30 minutách od aplikace <sup>30</sup>.

Subkutánně podaná HA, značená <sup>125</sup>I-tyramincellobiosa, do zadní nohy králíka se nejprve koncentruje v pokožce v místě vpichu. Menší koncentrace se objevují zejména v játrech a lymfatické uzlině na straně vpichu. Po 48 hodinách se poměr mění, koncentrace v pokožce se snižuje a koncentrace v játrech mírně stoupá. HA je po vpichu stále degradována na nízkomolekulární fragmenty <sup>32</sup>.

Intraperitoneální podání HA ovlivňuje rovnováhu transperitoneálně přenášených proteinů a mění permeabilitu intersticia <sup>33</sup>.

Vstřebávání HA po perorálním podání není dosud příliš známé. Na základě pokusu se značenou <sup>99m</sup>Tc-HA na potkanech můžeme uvažovat o její absorpci ze střevního lumen, vzhledem k aktivitě měřené v krvi, svalech, slinných žlázách a kostech, ramenních kloubech a pátéř <sup>34</sup>. Mechanismus absorpce HA ze střeva není však dosud znám.

Pro intravenózní podání platí, že farmakokinetické parametry jako clearance, distribuce a plazmatický poločas jsou ovlivněny celkovou plazmatickou koncentrací HA a celkovým průtokem krve játry <sup>35</sup>.

Nejvyšší koncentrace v krvi se objevují během první hodiny. HA je poté z plazmy vychytávána do ostatních tkání prvky RES. Čtyři hodiny od podání je nejvyšší koncentrace v játrech, slezině, kostní dřeni a lymfatických uzlinách v periferních oblastech.

V malých koncentracích může být exogenně podaná HA nalezena také v ledvinách, plicích, nadledvinách nebo kosterním svalstvu <sup>36)</sup>.

#### Biotransformace

Samotná biotransformace HA probíhá různými způsoby a na různých místech. Nejčastějším místem biodegradace HA jsou zmiňovaná játra, a to zejména při parenterálních způsobech podání. Topické podání naopak vyžaduje degradaci již v pokožce <sup>31)</sup>.

Katabolismus HA zahrnuje degradaci jejího polysacharidového řetězce na monomery, které jsou dále využívány jinými tkáněmi <sup>8)</sup>.

HA je vychytávána z oběhu převážně neparenchymatickou frakcí jaterních buněk. Endoteliální buňky degradují HA až na nízkomolekulární produkty <sup>37)</sup>.

Vychytávání a degradace HA jsou způsobeny schopností buněk vázat HA pomocí receptorů několika typů. Jsou to transmembránové receptory (CD44, RHAMM) a některé další (HABP, LYVE, LAIYLIN, ICAM, VCAM).

Schopnost jaterních endoteliálních buněk endocytovat HA není čistě specifická pro HA, vzhledem k tomu, že o stejný mechanismus soutěží také chondroitin a heparin <sup>39)</sup>.

Degradace HA je následně zprostředkována enzymaticky. Na tomto ději se podílejí jak enzymy specifické pro HA – hyaluronidasy, kterých je několik podtypů, tak enzymy podílející se i na jiných dějích – glukuronidasy, glykosidasy a některé další <sup>37)</sup>.

V epidermis (topické podání) je obrat HA taktéž rychlý. Keratinocyty v monokultuře si ponechávají část HA jako součást buněčné vrstvy, část na povrchu plazmatické membrány a část v intracelulárním kompartmentu <sup>40)</sup>.

V synoviální tekutině je obrat HA závislý na velikosti molekuly. Zatímco velké molekuly setrvávají v synoviální špičce, malé molekuly jsou odsouvány a degradovány <sup>21)</sup>.

Degradačními produkty tvořené po úplné degradaci se při analýze chovají jako laktáty a acetáty. Můžeme tedy říci, že metabolismus HA je v souladu s metabolismem acetylových skupin přes acetyl-CoA <sup>29)</sup>, <sup>32)</sup>.

Exkrece HA je převážně extrarenální <sup>41)</sup> a je limitována molekulovou hmotností molekuly <sup>29)</sup>.

#### ZÁVĚR

Informace získané a uvedené v tomto článku jsou výsledkem několikaleté vědecké činnosti různých pracovišť zabývajících se výzkumem této látky. I přesto je celá řada otázek o HA dosud nezodpovězena. Zajímavé budou zejména odpovědi na funkci a úlohu HA a jejich degradačních produktů při tumorogenezi a metastatické aktivitě nádorových buněk. Zcela objasněn není také vliv molekulové hmotnosti HA při různých fyziologických i patofyziologických procesech.

Dnes již můžeme říci, že HA je jistě velmi zajímavou molekulou, která si zaslouží velkou pozornost odborné společnosti. Může být přínosem pro terapii řady chorob, v jejichž indikacích se doposud nevyužívá. U dalších chorob, jako je zmíněná revmatoidní artritida, může její širší nasazení vést ke snížení celkových nežádoucích účinků a zlepšení kvality života pacienta. Stejně tak může hrát velkou roli při terapii nevyléčitelných onemocnění, jako jsou určité formy rakoviny, kde je již její funkce zkoumán.

Všechny tyto otázky snad budou brzy vyřešeny a HA se dočká širšího terapeutického využití.

#### LITERATURA

1. **Esposito, E., Menegatti, E.:** *Int. J. Pharm.*, 2005; 288, 35-49.
2. **Andre, P.:** *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2004; 23, 218-222.
3. **Seth, S. L., Brigham, B. R., Winston, J. W.:** *J. Bone Joint Surg. AM.*, 2003; 85, 1197-1204.
4. **Roux, C., Fontas, E., Breuil, V.:** *John Bone Spine*, 2007; 74, 368-372.
5. **Qvistgaard, E., Chrstensen, R., Torp-Pedersen, S.:** *Osteoarthr. Cartilage*, 2006; 14, 163-170.
6. **Fuchs, S., Monikes, R., Wohlmeiner, A.:** *Osteoarthr. Cartilage*, 2006; 14, 82-86.
7. **Maneiro, E., Andres de M. C.:** *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2004; 22, 307-312.
8. **Sobotka, L.:** *Sestra*, 2004; 6, 20-21.
9. **Chen, J. W. Y., Abatangelo, G.:** *Wound Rep. Reg.*, 1999; 7, 79-89.
10. **Laurent, T. C.:** *Acta. Otolaryngol.*, 1987; 442, 7-24.
11. **Nimrod, A., Elchanaan, E., Ezov, N.:** *J. Ocul. Pharmacol. TH.*, 1992; 8, 161-172.
12. **Cohen, M., Klein, E., Addadi, L.:** In: *Hyaluronan 2003 (The Cleveland Clinic Foundation and Matrix Biology Institute, Eds.)*, Cleveland 2003, s. 10.
13. **Fraser, J. R. E., Laurent, T. C.:** In: *The biology of hyaluronan (John Wiley & sons eds.)* Chirchester, Ciba foundation 1989, s. 41-53.
14. **Reed, R. K., Lilja, K., Laurent, T. C.:** *Acta. Physiolog. Scand.*, 1988; 134, 405-411.
15. **Laurent, T. C.:** *Acta Otolaryngol.*, 1987; 442, 7-24.
16. **Sakai, S., Yasuda, R., Sayo, T.:** *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 114, 1184-1187.
17. **Komatsu, S., Iwata, H., Nabeshima, T.:** *Arzneim.-Forsch.*, 1999; 49, 427-433.
18. **Zhong, S. P., Campoccia, D., Doherty, P. J.:** *Biomaterials.*, 1994; 15, 359-365.
19. **Sattar, A., Rooney, P., Kumar, S.:** *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 103, 576-579.
20. **Liu, D., Pearlman, E., Diaconu, E.:** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996; 93, 7832-7837.
21. **Kosaki, R., Watanabe, K., Yamaguchi, Y.:** *Cancer Res.*, 1999; 59, 1141-1145.
22. **Sohara, Y., Ishiguro, N., Machida, K.:** *Mol. Biol. Cell.*, 2001; 12, 1859-1868.
23. **Punzi, L., Pianon, M., Schiavon, F.:** In: *Redefinig hyaluronan (Abantagelo, G., Weigel, P. H. Eds.)*, Padua, Italy, 1999, s. 137-142.
24. **Prehm, P.:** In: *Redefinig hyaluronan (Abantagelo, G., Weigel, P. H. Eds.)*, Padua, Italy, 1999, s. 129-135.
25. **Kobayashi, H., Horikoshi, K., Yamataka, A.:** *J. Pediatr. Surg.*, 1999; 34, 1791-1794.

26. **Duterme, C., Mertens-Strijthagen, J., Flamion, B.:** In: Hyaluronan 2003 (The Cleveland Clinic Foundation and Matrix Biology Institute, Eds.), Cleveland 2003, s. 56.
27. **Laurent, T. C., Fraser, J. R. E., Pertoft, H.:** Biochem. J., 1986; 234, 653-658.
28. **Kensuke, M., Underhill, C. B., Lesley, J.:** J. Exp. Med., 1990; 172, 69-75.
29. **Day, J. A., Prestwich, G. D.:** J. Biol. Chem., 2002; 277, 4585-4588.
30. **Turley, E. A., Noble, P. W., Lilly, Y. W.:** J. Biol. Chem., 2002; 277, 4589-4592.
31. **Lebel, L., Gabrielsson, J., Laurent, T. C.:** Eur. J. Clin. Invest., 1994; 24, 621-626.
32. **Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., Pertoft, H.:** Biochem. J., 1981; 200, 415-424.
33. **Brown, T. J., Alcorn, D., Robert, J.:** J. Invest. Dermatol., 1999; 113, 740-746.
34. **Tammi, R., Saamanen Anna-Marja, Maibach, H. I.:** J. Invest. dermatol., 1991; 97, 126-130.
35. **Laurent, U. B. G., Dahl, L. B., Reed, R. K.:** Exp. Physiol., 1991; 76, 695-703.
36. **Breborowicz, A., Polubinska, A., Pawlaczyk, K.:** Periton. Dialysis Int., 2001; 21, 130-135.
37. **Schauss, A. G., Balogh, L. G., Polyak, A. G.:** In: Experimental Biology 2004 – Translating the genom, Washington 2004, Abstract č. 129.4.
38. **Lebel, L., Fraser, J. R., Kimpton, W. S.:** Pharm Res., 1989; 6, 677-682.
39. **Fraser, J. R. E., Appelgren, Lars-Erik, Laurent, T. C.:** Cell Tissue Res., 1983; 233, 285-293.
40. **Smedsrod, B., Pertoft, H., Eriksson, J.:** Biochem. J., 1984; 223, 617-626.
41. **Knudson, W., Peterson, R. S., Embry, J. J.:** In: Hyaluronan 2003 (The Cleveland Clinic Foundation and Matrix Biology Institute, Eds.), Cleveland 2003, s. 48.

Grober, U.: **Mikronahrstoffe. Beratungsempfehlungen für die Praxis.** 2. vyd. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2007, 385 s., 10 obr., cena 22 Euro.

Nové kapesní vydání objasňuje problematiku léčiv s mikrolátkami, jež jsou součástí výživy a patří mezi ně vitaminy, minerální látky a aminokyseliny (tzv. potravinové doplňky). Předmluva objasňuje základní pojmy z ortomolekulární medicíny, která má za úkol zachovat kvalitní zdraví nebo i zlepšit ošetřování nemocí způsobených změnami koncentrace těchto látek v těle. Objevitelem a zakladatelem byl americký biochemik J. L. Pauling – nositel Nobelových cen z roku 1954 a 1962. Vědecky se vychází v ortomolekulární medicíně z kauzálního využívání tělu vlastních látek ve fyziologických, příp. farmakologických dávkách pro prevenci a terapii chronicko degenerativních nemocí závislých na výživě, nejedná se o další druh alternativní medicíny. Vychází se zde z poznatků biochemie, věd o výživě, farmakologie, fyziologie, imunologie a je to spojka mezi moderní vědou o výživě a medicinou. Základem jsou správně podávané a dávkované tzv. mikro a makro dávky z celého výběru. Cílem je prevence řady nemocí souvisejících s výživou, zlepšení stavu individuálně nemocných, optimalizace farmakoterapie, zvýšení účinku podávaných léčiv, snižování nežádoucích vedlejších projevů a zachování výkonnosti a vitality i při vyšším stáří nemocných.

První část příručky obsahuje základní vlastnosti nejběž-

nějších mikrovýživných látek rozdělených do 7 skupin: a) vitaminy ve vodě rozpustné (10 druhů), v olejích (5), vitaminy, např. karnitin,  $Q_{10}$ , cholin, b) minerální látky (5) a stopové prvky (13), c) antioxidanty, d) esenciální mastné kyseliny, konjugované kyseliny, linolé, squalen, e) aminokyseliny (12 druhů). U každé látky jsou popsány její hlavní funkce ve výživě, doporučený příjem a praktické připomínky, možné interakce s léčivými, symptomy nedostatku, tabulky pro jejich využívání, jakož i doporučené HVLP. Druhá část příručky se zaměřuje na vlastní užívání mikrolátek v terapii a prevenci u vybraných skupin populace: v těhotenství nebo v menopauze žen, u kojenců, dětí a mladistvých, jakož i starší části populace. Nejobsaženější díl příručky uvádí abecedně uspořádané nejběžnější druhy nemocí. Tyto jsou stručně charakterizovány, jejich hlavní symptomy, vlivy výživy, doporučený přísun potřebných mikrolátek, jejich denní dávky a druhy HVLP ze skupiny potravinových doplňků. Závěrem jsou rozsáhlé tabulky. První uvádí terapeuticky relevantní interakce mezi léčivými a mikrovýživnými látkami, druhá je přehledem obsahu mikrovýživných látek ve vybraných druzích potravin a poslední má doporučené denní dávky vitaminů pro jednotlivé skupiny nemocných (i podle pohlaví). Příručka má podrobný rejstřík a stručnou charakteristiku autora – lékárníka, který je předním odborníkem z této oblasti v Německu.

J. Malý

Svanovský, E., Velebný, V., Lázníčková, A., Lázníček, M., *The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with <sup>111</sup>In after intravenous administration to rats*, *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.*, 2008, 33: 149-157

EUROPEAN JOURNAL OF DRUG METABOLISM AND PHARMACOKINETICS 2008, Vol. 33, No. 3, pp. 149-157

## The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with <sup>111</sup>In after intravenous administration to rats

E. SVANOVSKÝ<sup>1,2</sup>, V. VELEBNÝ<sup>2</sup>, A. LAZNICKOVA<sup>1</sup>, M. LAZNICEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Contipro C. a.s., Dolní Dobruč 401, Dolní Dobruč, Czech Republic

*Received for publication:* March 19, 2008

*Key words:* Hyaluronic acid, hyaluronan, biodistribution, pharmacokinetics

### SUMMARY

Hyaluronic acid (HA), is a high molecular weight (HMW) glucosaminoglycan with significant activity, and which influences a number of physiological and pathological processes such as tumorigenesis, arthritis, etc. The aim of this study was to determine the difference in the biodistributional pathways of <sup>111</sup>In-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid-hyaluronic acid (<sup>111</sup>In-DTPA-HA) molecule of three different MWs (10, 100 and 450 kDa) in a rat model, and to determine possible relationships between the biodistribution and the MW of the investigated agent for future medical applications. <sup>111</sup>In-DTPA-HA was prepared by mixing activated DTPA and activated HA, then adding <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> to the previously prepared mixture at pH 5.5 in an acetic buffer. Biodistributional studies were performed using 36 male Wistar rats aged 2 months and weighing 280 - 350 g. The radioactivity in the samples was measured via a radiometer and the radioactivity in the different organs, blood, plasma and urine was determined. It was found that 50 - 54% for 10 and 100 kDa and 80% for 450 kDa of the administered dose of radiolabel was present in the liver after 5min. Other organs show no significant increase during the experimental period. The elimination of the radiolabel was mostly renal and in low molecular weight (LMW) form. Radioactivity remained in liver throughout the 72h experimental period. A difference in the biodistribution of 450 kDa and LMW radiolabeled molecules was found. Higher amounts of radiolabel were taken up by the liver when the 450 kDa molecule was used. LMW fractions were found in the urine, and could have been a product of non-enzymatic cleavage. The extended retention of radiolabel in the liver could be related to changes in the polarity of DTPA-HA molecules.

### INTRODUCTION

Hyaluronan (HA) is a glucosaminoglycan with repeating disaccharide units of 1- $\beta$ -4-d-glucuronic acid (1- $\beta$ -3)-N-acetyl-D-glucosamine-1- $\beta$ -4 (1). It creates a highly hydrated coat around different cell types (2). It is ubiquitous in the human body, and its concentrations differ from tissue to tissue (3). The lowest concentrations are found in the plasma and the high-

est in the skin and liver.

HA is taken up rapidly from the bloodstream by reticulo-endothelial system (RES), metabolized in high amounts in the liver endothelial cells and reutilized in its metabolite form in the body (4-5).

The main focus of recent interest in HA research concerns cancer therapy where it may act as a transporter and in the treatment of arthritis, where it has a lubricating action.

The biodistribution of intravenously (i.v.) administered HA has already been studied using <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I and other isotopes as tracers (6-9). However, information about the tissue distribution of HA of differ-

Please send reprint requests to: Evžen Svanovský, U Vodárny 6, 687 01 Blansko, Czech Republic



ent molecular weights (MWs) in the body is still very limited.

The purpose of this study was to characterize and compare the principal distribution and elimination characteristics of HA samples of different MWs (i.e. 10 kDa, 100 kDa and 450 kDa), radiolabeled with  $^{111}\text{In}$  in rats. In brief, HA was conjugated with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and labeled with  $^{111}\text{In}$  according to a previously described method (10). DTPA is a bifunctional chelating agent used for the formation of strong covalent bounds with trivalent metals such as In, Fe and others. DTPA was bound to HA through an amidic bond on the glucuronic acid carboxyl moiety (DTPA-HA), and the conjugate was used for the formation of the chelate with  $^{111}\text{In}$  ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA) (9). The  $^{111}\text{In}$  isotope is a photon-emitting radionuclide with a half-life of 2.8 days, and it can be easily detected in biological organs and tissues.

The stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA *in vitro* and a preliminary analysis of the metabolic pathways of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA molecules of different MWs was also evaluated in the present study.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA

DTPA adducts with HA of different MWs (DTPA-HA) were prepared at CPN Dolni Dobrouc (Czech Republic) using the modified method of Thierry and Winnik (9). In contrast to the reports in the literature, DTPA was activated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) for the binding of dihydrazide of adipic acid (ADH) and after activation of HA with cyanogen bromide (CNBr), ADH-DTPA was added to activated HA for the formation of DTPA-HA.  $^{111}\text{InCl}_3$  was obtained from Amersham Healthcare, UK.

The level of DTPA incorporation was approximately 1 DTPA molecule for one DTPA-HA 10 kDa polymer, 50 dimers for DTPA-HA 200 kDa and 30 dimers in DTPA-HA 450 kDa. The exact level of substitution is not yet known as the analytical method used by Thierry and Winnik and by our laboratory does not seem to be sufficiently exact. These methods do not consider the capacity of DTPA to become bound within the tertiary structure of the HA molecule.

Before radiolabeling, the DTPA-HA was purified by gel permeation chromatography (GPC) on a Sephadex G50 Medium column (Sigma-Aldrich, Czech Republic). Briefly, 0.5 ml of 0.6% (w/v)

DTPA-HA solution was added to a 30 cm column equilibrated with purified water (Millipore quality). 1 ml fractions of the eluate were collected and checked for HA concentrations. For radiolabeling 0.25 ml of purified DTPA-HA solution was mixed with 0.4M acetic buffer pH 5.5 and  $^{111}\text{InCl}_3$  of total radioactivity 5-10 MBq in 0.04 M HCl. After 0.5 h incubation of this reaction mixture, the radiolabeled product was again purified on a Sephadex G50 Medium column of the same dimension to remove free  $^{111}\text{InCl}_3$ . 1 ml fractions were taken and measured to determine the amount of radioactivity. Fractions with the highest activity up to the 13th fraction were collected and used for biodistribution and elimination assays. Activity per dose for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 10 kDa was 2.4-2.9 MCPM, for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 100 kDa 560-790 kCPM, and for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 450 kDa 740-760 kCPM respectively.

### Stability of $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA samples *in vitro*

The stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was examined under *in vitro* conditions both in the experimental preparation and in rat plasma. 0.2 ml of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA solution was mixed together with 2 ml of rat plasma at a temperature of 37 °C and at 24 h interval the concentration of LMW products was measured using HPLC gel chromatography with radiometric detection, and compared with that of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA standards.

## Biological experiments

### Distribution studies

36 male Wistar rats aged 2 months weighing 280-350 g were randomly assigned into twelve groups, 3 animals for each time interval and experimental molecule ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 10, 200 and 450 kDa). The animals were fasted overnight before each experiment, with free access to water. Then 0.2 ml of labeled  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was administered i.v. into vena saphena under ether anesthesia. At 5 min, 1 h, 24 h and 72 h intervals the animals were killed by exsanguination. The blood was collected into glass vials containing dry heparin and together with selected organs and tissues removed to determine the  $^{111}\text{In}$  activity.

### Elimination studies

$^{111}\text{In}$ -DTPA-HA administration procedure was the same as mentioned above. Rats were then placed singly in metabolic cages and at 24 h, 48 h and 72 h in-

tervals urine and feces were collected and analyzed for  $^{111}\text{In}$  activity.

All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy, Hradec Kralove, Czech Republic.

#### Biological analysis

200  $\mu\text{l}$  of the urine from the 24 h elimination study sample was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter and analyzed using a combination of a PL Aquagel OH 60 column with a Hema-Bio 100 column, radiometric detection performed with a Gina Star detector.

### RESULTS

#### Stability of $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA

The stability tests were performed *in vitro*, both in the experimental preparation (in acetic acid buffer pH 5.5) and in rat plasma. Regarding the short plasma half-life of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA, only the stability of the drug at the 24 h time interval was tested. Figures 1 – 3 illustrate the findings at different MWs and Table I shows the percentage of LMW and HMW molecules after 24 h incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

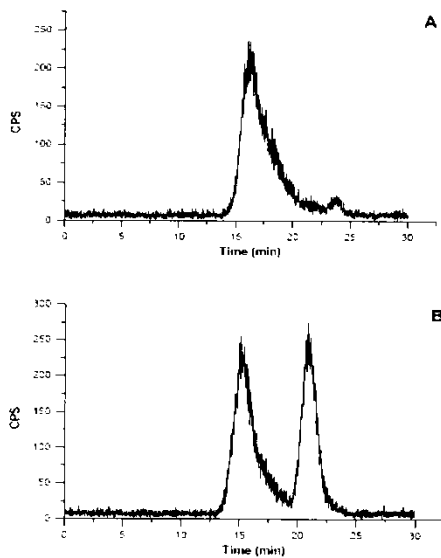


Fig. 1. Stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 450 kDa after 24 h in the experimental preparation (A) and in rat plasma (B) determined by HPLC-gel chromatography.

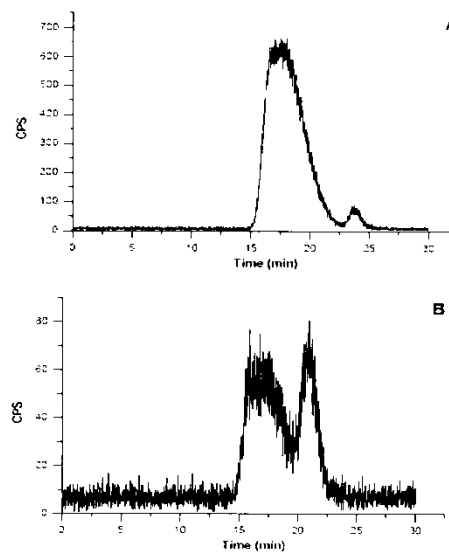


Fig. 2. Stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 100 kDa after 24 h in the experimental preparation (A) and in rat plasma (B) determined by HPLC-gel chromatography.

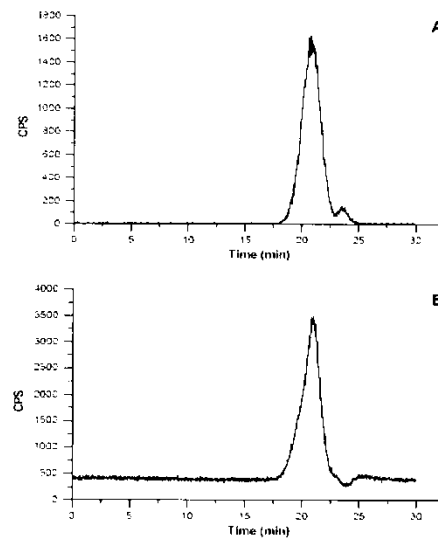


Fig. 3. Stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 10 kDa after 24 h in the experimental preparation (A) and in rat plasma (B) determined by HPLC-gel chromatography.

**<sup>111</sup>In-DTPA-HA distribution in the rat model**

Data acquired from biodistributional studies in the rat model based on the radiometric analysis of vital

organs and body fluids are presented in Tables II-VII. Data for each MW have been presented in two tables: % of dose in whole organ and % of dose per 1 g of tissue.

Table I: Stability of <sup>111</sup>In-DTPA-HA derivatives in rat plasma and in the experimental preparation at 37 °C

Study sample	HMW fraction <sup>a</sup> [%]	LMW fraction <sup>a</sup> [%]	HMW fraction <sup>b</sup> [%]	LMW fraction <sup>b</sup> [%]
<sup>111</sup> In-DTPA-HA 450 kDa	56	44	98	2
<sup>111</sup> In-DTPA-HA 100 kDa	51	49	97.5	2.5
<sup>111</sup> In-DTPA-HA 10 kDa	-	-	98	2

<sup>a</sup> Percentage of HMW/LMW fractions of <sup>111</sup>In-DTPA-HA after 24h in plasma (AUC)

<sup>b</sup> Percentage of HMW/LMW fractions of <sup>111</sup>In-DTPA-HA after 24h in the experimental preparation (AUC)

Table II: Distribution of <sup>111</sup>In-DTPA-HA 10 kDa in rats - % of dose in whole organ.

	5 min	60 min	24 h	72 h
Liver	54.132 ± 8.273	58.966 ± 6.038	56.047 ± 15.718	45.426 ± 9.113
Adrenals	0.020 ± 0.016	0.004 ± 0.003	0.009 ± 0.011	0.003 ± 0.001
Kidney	8.409 ± 6.597	0.658 ± 0.274	1.020 ± 0.653	0.536 ± 0.081
Lung	0.515 ± 0.169	0.385 ± 0.224	0.153 ± 0.135	0.043 ± 0.011
Heart	0.180 ± 0.042	0.125 ± 0.072	0.041 ± 0.033	0.012 ± 0.005
Spleen	1.055 ± 0.313	1.197 ± 0.174	1.340 ± 0.265	1.007 ± 0.147
Stomach	0.684 ± 0.841	0.158 ± 0.079	0.127 ± 0.106	0.052 ± 0.034
Intestine	1.271 ± 0.607	0.581 ± 0.169	0.754 ± 0.431	0.139 ± 0.026
Colon	0.380 ± 0.192	0.143 ± 0.021	1.017 ± 0.296	0.417 ± 0.199
Testes	0.106 ± 0.045	0.133 ± 0.068	0.128 ± 0.099	0.042 ± 0.015
Thyroid	0.023 ± 0.006	0.039 ± 0.046	0.016 ± 0.016	0.002 ± 0.001
Brain	0.076 ± 0.030	0.027 ± 0.018	0.024 ± 0.026	0.003 ± 0.001
Femur	0.326 ± 0.089	0.277 ± 0.049	0.312 ± 0.115	0.303 ± 0.212

Table III: Distribution of <sup>111</sup>In-DTPA-HA 10 kDa in rats - % of dose per 1 g of tissue.

	5 min	60 min	24 h	72 h
Blood	0.942 ± 0.182	0.440 ± 0.298	0.071 ± 0.061	0.009 ± 0.003
Plasma	1.680 ± 0.367	0.748 ± 0.474	0.111 ± 0.088	0.012 ± 0.005
Pancreas	0.260 ± 0.118	0.063 ± 0.048	0.078 ± 0.065	0.029 ± 0.016
Liver	7.137 ± 0.953	8.348 ± 1.390	7.286 ± 2.591	6.118 ± 2.350
Adrenals	0.291 ± 0.245	0.062 ± 0.043	0.159 ± 0.209	0.046 ± 0.024
Kidney	4.863 ± 4.050	0.362 ± 0.152	0.581 ± 0.384	0.293 ± 0.054
Skin	0.074 ± 0.020	0.056 ± 0.012	0.049 ± 0.034	0.021 ± 0.007
Muscle	0.037 ± 0.009	0.039 ± 0.026	0.025 ± 0.022	0.009 ± 0.002
Fat	0.159 ± 0.170	0.054 ± 0.013	0.252 ± 0.309	0.029 ± 0.012
Femur	0.326 ± 0.089	0.277 ± 0.049	0.312 ± 0.115	0.303 ± 0.212

Table IV: Distribution of <sup>111</sup>In-DTPA-HA 100 kDa in rats - % of dose in whole organ.

	5 min	60 min	24 h	72 h
<i>Liver</i>	49.279 ± 2.992	54.074 ± 2.171	56.107 ± 0.595	50.092 ± 1.572
<i>Adrenals</i>	0.011 ± 0.003	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001
<i>Kidney</i>	2.563 ± 0.440	0.285 ± 0.090	0.501 ± 0.046	0.817 ± 0.053
<i>Lung</i>	0.579 ± 0.208	0.172 ± 0.050	0.054 ± 0.011	0.055 ± 0.005
<i>Heart</i>	0.158 ± 0.030	0.042 ± 0.009	0.020 ± 0.003	0.021 ± 0.002
<i>Spleen</i>	0.576 ± 0.086	0.898 ± 0.121	0.730 ± 0.174	0.650 ± 0.181
<i>Stomach</i>	0.160 ± 0.046	0.108 ± 0.044	0.073 ± 0.055	0.051 ± 0.020
<i>Intestine</i>	0.823 ± 0.122	0.399 ± 0.075	0.318 ± 0.035	0.197 ± 0.016
<i>Colon</i>	0.209 ± 0.028	0.111 ± 0.023	0.573 ± 0.138	0.722 ± 0.502
<i>Testes</i>	0.066 ± 0.009	0.062 ± 0.023	0.061 ± 0.020	0.070 ± 0.005
<i>Thyroid</i>	0.019 ± 0.010	0.009 ± 0.004	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.000
<i>Brain</i>	0.060 ± 0.010	0.012 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001

Table V: Distribution of <sup>111</sup>In-DTPA-HA 100 kDa in rats - % of dose per 1 g of tissue.

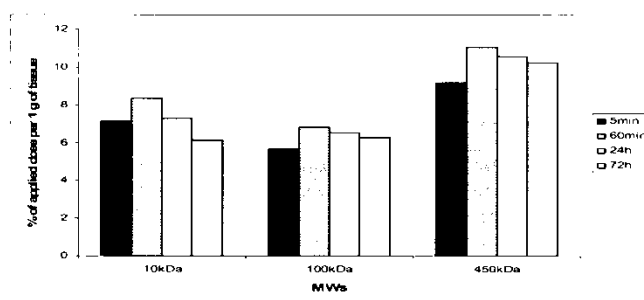
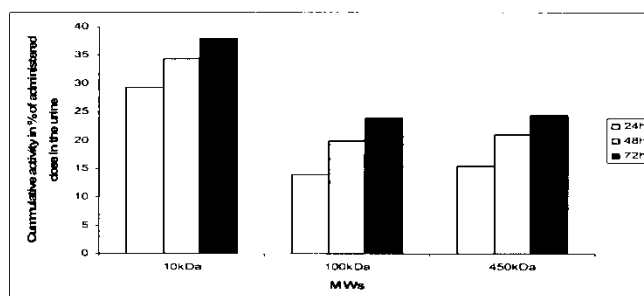
	5 min	60 min	24 h	72 h
<i>Blood</i>	0.967 ± 0.182	0.167 ± 0.036	0.026 ± 0.005	0.013 ± 0.002
<i>Plasma</i>	1.880 ± 0.385	0.313 ± 0.065	0.048 ± 0.012	0.017 ± 0.001
<i>Pancreas</i>	0.150 ± 0.036	0.040 ± 0.015	0.027 ± 0.007	0.035 ± 0.009
<i>Liver</i>	5.875 ± 0.290	6.834 ± 1.356	6.528 ± 0.386	6.291 ± 0.652
<i>Adrenals</i>	0.152 ± 0.019	0.053 ± 0.006	0.042 ± 0.007	0.063 ± 0.016
<i>Kidney</i>	1.334 ± 0.174	0.154 ± 0.056	0.240 ± 0.020	0.400 ± 0.022
<i>Skin</i>	0.025 ± 0.004	0.018 ± 0.005	0.017 ± 0.002	0.022 ± 0.004
<i>Muscle</i>	0.016 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
<i>Fat</i>	0.034 ± 0.008	0.027 ± 0.009	0.022 ± 0.010	0.050 ± 0.047
<i>Femur</i>	0.236 ± 0.048	0.220 ± 0.067	0.167 ± 0.029	0.196 ± 0.061

Table VI: Distribution of <sup>111</sup>In-DTPA-HA 450 kDa in rats - % of dose in whole organ.

	5 min	60 min	24 h	72 h
<i>Liver</i>	75.892 ± 3.527	79.866 ± 2.197	73.484 ± 3.434	66.528 ± 2.154
<i>Adrenals</i>	0.006 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.009 ± 0.006
<i>Kidney</i>	1.063 ± 0.265	0.170 ± 0.002	0.318 ± 0.052	1.027 ± 0.060
<i>Lung</i>	0.414 ± 0.153	0.070 ± 0.008	0.037 ± 0.007	0.050 ± 0.012
<i>Heart</i>	0.044 ± 0.011	0.026 ± 0.011	0.011 ± 0.002	0.039 ± 0.007
<i>Spleen</i>	0.312 ± 0.086	0.320 ± 0.069	0.414 ± 0.071	0.427 ± 0.014
<i>Stomach</i>	0.063 ± 0.026	0.109 ± 0.134	0.020 ± 0.005	0.079 ± 0.004
<i>Intestine</i>	0.302 ± 0.084	0.132 ± 0.026	0.206 ± 0.088	0.349 ± 0.050
<i>Colon</i>	0.404 ± 0.362	0.307 ± 0.293	1.539 ± 1.010	1.125 ± 0.315
<i>Testes</i>	0.018 ± 0.003	0.027 ± 0.007	0.030 ± 0.002	0.097 ± 0.019
<i>Thyroid</i>	0.010 ± 0.007	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.017 ± 0.016
<i>Brain</i>	0.012 ± 0.003	0.005 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.011 ± 0.006

Table VII: Distribution of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 450 kDa in rats - % of dose per 1 g of tissue.

	5 min	60 min	24 h	72 h
Blood	0.211 ± 0.022	0.067 ± 0.005	0.012 ± 0.001	0.025 ± 0.004
Plasma	0.412 ± 0.045	0.125 ± 0.003	0.028 ± 0.004	0.024 ± 0.012
Pancreas	0.047 ± 0.011	0.018 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.063 ± 0.029
Liver	9.173 ± 0.620	11.074 ± 1.432	10.610 ± 1.567	10.259 ± 0.660
Adrenals	0.088 ± 0.024	0.019 ± 0.020	0.038 ± 0.006	0.136 ± 0.080
Kidney	0.535 ± 0.162	0.087 ± 0.007	0.173 ± 0.019	0.598 ± 0.014
Skin	0.011 ± 0.004	0.008 ± 0.001	0.012 ± 0.005	0.032 ± 0.010
Muscle	0.005 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.024 ± 0.005
Fat	0.015 ± 0.006	0.010 ± 0.007	0.018 ± 0.008	0.081 ± 0.034
Femur	0.108 ± 0.014	0.087 ± 0.027	0.110 ± 0.011	0.159 ± 0.015

Fig. 4. Radioactivity in the liver following the administration of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA MW 10, 100 and 450 kDa to rats.Fig. 5. Cumulative elimination of radioactivity via the urine after  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA administration to rats.

The organ with the highest uptake of radioactivity was the liver. The cumulative expression of radioactivity in the liver over 72 h is shown in Figure 4. This figure illustrates the culmination of radioactivity 60

min after administration of the radiolabel and the slow rate of elimination of radioactivity from this organ.

### Elimination studies

The radiometric analyses of urine and feces revealed a very small contribution of gastro intestinal tract (GIT) to radiolabel elimination in comparison to other elimination pathways. Cumulative data acquired from the radiometric analysis of the urine over 72 h showing the percentage of radiolabel eliminated via the urine are presented in Figure 5.

Further analysis of the urine using HPLC chromatography (see section on 'Analysis of biological fluids') revealed mostly LMW fragments appearing in the urine (Fig. 6).

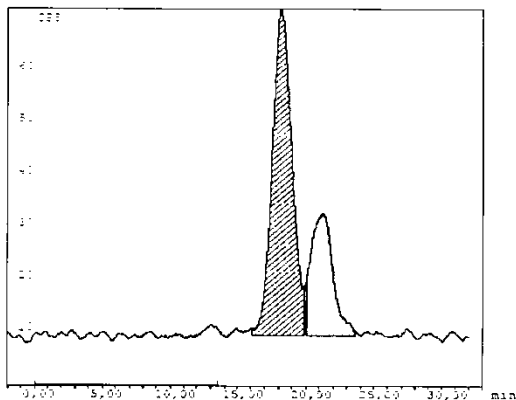


Fig. 6a

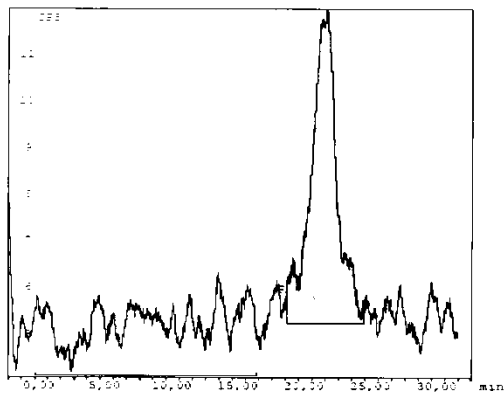


Fig. 6b

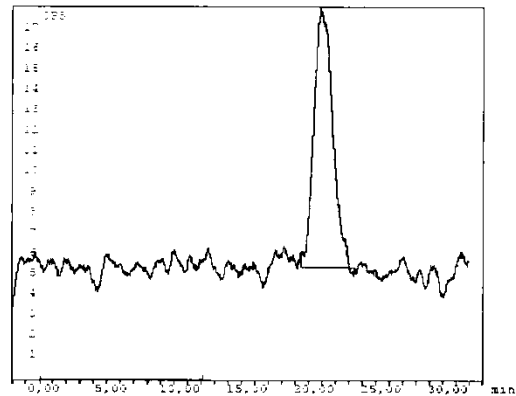


Fig. 6c

Fig. 6. Radioactivity in the urine determined by HPLC-gel chromatography after  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA administration to rats. A: 10 kDa, B: 100 kDa, C: 450 kDa

According to the experiments performed with very LMW fragment standards of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (data not shown), the elution time of these fragments was determined to be 22 - 25 min. Figure 6/A shows a double peak where the first peak is considered to be the parent 10 kDa  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA molecule, as its elution time is in accordance with the elution time of 10 kDa  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA experimental preparation. The other peak probably represents LMW breakdown products when compared with very LMW fragment standard elution times.

### DISCUSSION

HA is widely distributed in various organs and tissues, and a detailed analysis of its activity and elimination following administration represents a major problem. The use of radiolabeled HA in such studies enables a very sensitive and accurate assessment of radioactivity in biological samples and detection of the metabolic pathway of the agent in the body. However, it is necessary to bear in mind that in the case of the parent compound being metabolized, only degradation products containing radiolabel can be detected. In addition to this, the radiolabel could significantly affect the fate of LMW fragments of HA. All these aspects should be taken into account in interpretation of the present results.

The present results indicate that  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA samples of MWs 100 kDa and 450 kDa remained

relatively stable in the experimental preparation in acetic acid buffer, pH 5.5 (less than 5% of LMW degradation products after 24 h were found). On the other hand, their stability in rat plasma was limited and up to 40% of LMW fragments after 24 h incubation were detected. LMW fractions can be a result of enzymatic and non-enzymatic cleavage. It is known that plasma contains low concentrations of hyaluronidases and other hyaluronan lyases, which contribute to HA digestion and degradation (11-13). Also oxygen free radicals are responsible for the partial degradation of HA (14).

The biodistribution of all three MWs of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA samples can be characterized by the very rapid uptake from the bloodstream by the liver; about 50% of the administered drug concentrations for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA of MW 10 kDa and 100 kDa and 75% of the administered drug concentration for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA of MW 450 kDa were found in the liver 5 min following drug administration. The uptake of radioactivity by the liver increased slightly up to 1 h post-dose and at various time intervals thereafter the long-term retention of radioactivity in the liver was also determined.

According to the findings in the literature, the liver uptake of HA is mediated by CD44 receptors which are expressed on the surface of liver endothelial cells in large quantities (15-16).

It is probable that two pathways are involved in  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA pharmacokinetics, namely receptor-mediated uptake of the parent compound by the liver, and degradation of the agent to LMW fragments in the central compartment. These fragments in the central compartment containing  $^{111}\text{In}$ -DTPA a result of blood hyaluronidase, hyaluronan lyases and oxygen free radical activity, are consequently eliminated by the kidneys (in case of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA of MW 10 kDa the parent compound could also be eliminated by the kidneys as it can be excreted via glomerular filtration).

The uptake of radioactivity by the liver can be the result of various mechanisms, as reported by McGary, which are as yet not fully understood (3). It is likely that HMW  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA transported within the liver endothelial cells is cleaved by hyaluronidases to a small oligosaccharide fractions. Based on the findings regarding HA molecules biosynthetically labelled with  $^3\text{H}$  or  $^{14}\text{C}$  isotopes, products of enzymatic digestion of HA should be further redistributed to other organs and tissues (17-18). However this is in contrast to our findings. The prolonged accumulation of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-labeled HA molecules in the liver could be the result of a modification in the

HA chain. It is suggested that this modification by  $^{111}\text{In}$ -DTPA adducts could influence the fate of its metabolites in the body. Contrary to the HA fragments radiolabeled with  $^3\text{H}$  or  $^{14}\text{C}$ , small HA fragments bearing the  $^{111}\text{In}$ -DTPA ligand are probably too polar to be transported away from the cells and redistributed within the organism. A preliminary analysis of the radioactivity in the liver (data not shown), which was performed to determine the MW of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA or its fragments to which  $^{111}\text{In}$  is bound, confirmed the binding of the radiolabel to LMW products in the liver. Unfortunately only a limited proportion of the liver radioactivity in the liquid phase was recovered in these experiments. The rest of the radioactivity was strongly bound to the solid phase of the liver homogenate, and the MW of these radioactive compounds could not be determined.

For the shortest time points post-dose, higher amounts of radioactivity in the kidneys was also determined for all the three MWs administered. The radioactivity in the kidneys was clearly higher, due to the elimination of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA break-down products from the central compartment (blood) into the urine. The highest amounts of radioactivity eliminated via the urine were excreted during the first two hours post-dose. The derived data suggest that this proportion of radioactivity that was not taken up by the liver was consequently eliminated via renal excretion. Urine analysis showed that the eliminated radioactivity was of LMW in nature including radiolabeled degradation products and partly radiochemical impurities ( $^{111}\text{In}$ -DTPA and other forms) which typically amounted to 2-4% of total radioactivity per sample. Urine analysis results for  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA 10 kDa, where a peak for the undegraded compound was apparent, suggests that  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA is not taken up quantitatively from the circulation and that some of it (MW < 10 kDa) can be eliminated via urinary excretion.

The increased radioactivity in the bowels over longer time intervals was due to the partial gastrointestinal elimination of radiolabeled species.

The elimination of radiolabeled HA has also been confirmed in other studies, but with smaller amounts of radioactivity being excreted (7,18).

The slightly increased radioactivity in the spleen corresponded to the fact that this organ is a part of the RES. No specific accumulation of radioactivity in other organs and tissues was determined.

This study revealed basic pathways of distribution of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA molecules, its breakdown products, and showed slight differences in the behavior of

molecules of different MWs in the rat model, as well as it demonstrated differences in biodistribution of these modified molecules compared with parent compound. This investigation suggests that molecules of higher molecular weight (MW >400 kDa) are more rapidly and more quantitatively taken up by the liver and therefore merit further investigation.

### Acknowledgments

This study was carried out with the financial and technical support of Contipro C a. s., Dolní Dobruč, Czech Republic and with scientific and technical assistance provided by Drs. Lázníček and Lázníčková from the Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic.

### REFERENCES

1. Westerberg G., Bergstrom M., Gustafson S., Lindquist U., Sundin A., Langstrom B. (1995): Labelling of polysaccharides using [<sup>11</sup>C]Cynogen bromide. In vivo and in vitro evaluation of <sup>11</sup>C-hyaluronan uptake kinetics. *Nucl. Med. Biol.*, 22, 251-256.
2. Klein C.E., Addadi L. (2003): Hyaluronan-mediated adhesion: visualizing pericellular hyaluronan and studying its role in cell matrix adhesion. In *Hyaluronan 2003*. Cleveland, OH, USA, p. 10.
3. McGary C.T., Raja R.H., Weigel P.H. (1989): Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 257, 875-884.
4. Fraser J.R.E., Appelgren L.E., Laurent T.C. (1983): Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. *Cell Tissue Res.*, 233, 285-293.
5. Smedsrod B., Pertoft H., Ericsson J. (1984): Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 223, 617-626.
6. Fraser J.R.E., Kimpton W.G., Laurent T.C. (1988) Uptake of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.*, 256, 153-158.
7. Fraser J.R.E., Laurent T.C., Pertoft H. (1981): Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.*, 200, 415-424.
8. Laurent U.B.G., Dahl L.B., Reed R.K. (1991): Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally in lymph nodes and liver. *Exp. Physiol.*, 76, 695-703.
9. Komatsu S., Iwata H., Nabeshima T. (1999): Studies on the kinetics, metabolism and re-utilisation after intra-articular administration of hyaluronan to rabbits. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 49, 427-433.
10. Thierry B., Winnik M.F., Merhi Y. (2004): Radionuclides-hyaluronan-conjugate thromboresistant coatings to prevent in-stent restenosis. *Biomaterials*, 25, 3895-3905.
11. Northup S.N., Ostasiw O.R., Brown H.D. (1973): Development of the hyaluronidase activity assay as a cancer screening test. *Clin. Biochem.*, 6, 220-228.
12. Lepperdinger G., Mullegger J., Kreil G. (2001): Hyal2 - less active, but more versatile? *Matrix Biol.*, 20, 509-514.
13. Muckenschnabel L., Bernhardt G., Spruss S., Dietl B., Buschauer A. (1998): Quantitation of hyaluronidases by the Morgan - Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Lett.* 131, 13-20.
14. Tammi R., Saananen A.M., Maibach I.A., Tammi M. (1991): Degradation of newly synthesised high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *Invest. Dermatol.*, 97, 126-130.
15. Day J.A., Prestwich G.D. (2002): Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J. Biol. Chem.*, 277, 4585-4588.
16. Turley E.A., Noble P.W., Lilly Y.W. (2002): Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.*, 277, 4589-4592.
17. Nimrod A., Elchunan E., Ezov N. (1992): Absorption, distribution, metabolism and excretion of bacteria-derived hyaluronic acid in rats and rabbits. *J. Ocular Pharmacol.*, 8, 161-172.
18. Fraser J.R.E., Laurent T.C., Laurent U.B.G. (1984): Elimination of hyaluronic acid from the bloodstream in the human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 11, 17-25.

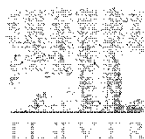


Čožiková, D., Lázníčková, A., Hermannová, M., Svanovský, E., Paleka, L., Buffa, R., Šedová, P., Koppová, R., Petřík, M., Šmejkalová, D., Lázníček, M., Velebný, V., Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with  $(^{111}\text{In})$ ,  $(^{125}\text{I})$  and  $(^{14}\text{C})$ , *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 52:517-24

G Model

PBA-7586; No. of Pages 8

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)



## Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with $^{111}\text{In}$ , $^{125}\text{I}$ and $^{14}\text{C}$

D. Cožiková<sup>a,b,\*</sup>, A. Lázníčková<sup>b</sup>, M. Hermannová<sup>a</sup>, E. Svanovský<sup>b</sup>, L. Palek<sup>a</sup>, R. Buffa<sup>a</sup>, P. Sedová<sup>a</sup>, R. Koppová<sup>a</sup>, M. Petřík<sup>b</sup>, D. Šmejkalová<sup>a</sup>, M. Lázníček<sup>b</sup>, V. Velebný<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Contipro C a.s., Dolní Dobruč 401, 561 02 Dolní Dobruč, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 September 2009

Received in revised form 5 February 2010

Accepted 5 February 2010

Available online xxx

#### Keywords:

Hyaluronan

Radiolabeling

$^{111}\text{In}$

$^{125}\text{I}$

$^{14}\text{C}$

Kinetic stability

### ABSTRACT

Three different procedures for the labeling of hyaluronan (HA) with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$  radionuclides were compared, and the kinetic stability of radiolabeled HA under different conditions (saline, artificial gastric juice and plasma) was established. Modification of HA structure with bifunctional chelating agents (DTPA) or with the prosthetic group (tyramine or tyrosine) was essential prior  $^{111}\text{In}$  and  $^{125}\text{I}$  labeling. These chemical labeling techniques were fast, simple and inexpensive, and labeled agents with a high specific activity were obtained. The only disadvantage of these methods was the occurrence of unknown functional groups in the HA molecule requiring further characterization of the compound. Conversely, HA labeling with  $^{14}\text{C}$  by biotechnological synthesis was found to be rather expensive and time-consuming process. Although, the final product  $^{14}\text{C}$ -HA was identical to natural HA its low specific activity presents certain limitation for its application in biological experiments. Stability studies showed that  $^{14}\text{C}$ -HA and  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA were stable in all studied mediums. In the case of  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA, stability slightly decreased in rat plasma and in artificial gastric juice with increasing time. The least stable was  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA, which degraded completely after 48 h in artificial gastric juice. Kinetic stability studies may provide primary information concerning the properties of radiolabeled HA *in vitro*, which is essential for the use and explanation of its behavior in biological experiments.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hyaluronan (HA) is a macromolecular glycosaminoglycan composed of repetitive disaccharide units, each consisting of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid. HA is present in nearly all vertebral tissues. It is known that HA participates in various physiological processes, including tissue morphogenesis, fluid homeostasis of the tissues, wound repair, inflammation, atherosclerosis, angiogenesis, cell motility, and tumor progression.

The biocompatibility, nonimmunogenicity and unique viscoelastic and lubricating properties have led to the wide use of HA in therapy for ophthalmic surgery, arthritis, tendon repair, cosmetic applications etc. [1–7]. The clinical use of HA has led to an increased interest in exogenously administered HA in the body [8–10]. As HA is a ubiquitous matrix macromolecule, widespread in the entire organism, exogenously administered HA cannot be directly determined by analytical techniques. For this reason, a selection of

specific procedures and methods enabling HA determination in biological systems is one of the crucial steps in pharmacokinetic, biodistribution and fragmentation studies [11–24]. For HA labeling, three separate strategies (the isotopic labeling method, the bifunctional approach for labeling with radiometals, and radioiodination via the electrophilic substitution of reactive aromatic amino acid residues) may be employed. All means have been used in the design of radiolabeled HA for biological studies.

The isotopic labeling method involves the replacement of a part of constitution atoms of HA to their radioactive isotopes, either  $^3\text{H}$  or  $^{14}\text{C}$  [11–17]. The bifunctional approach uses bifunctional coupling agents for the conjugation of the biomolecule and the chelation of the radionuclide. The selection of a bifunctional coupling agent is largely determined by the nature of the radiometal. The bifunctional coupling agent should form a stable complex of selected radionuclide in high yield, having a high thermodynamic and kinetic stability with respect to dissociation. In addition, the bifunctional coupling agent could easily be attached to the biomolecule. This binding should be kinetically inert and the modification should not change the physicochemical and biological characteristics of HA [25–29]. In iodination, reactive aromatic amino acid tyrosine or its derivative tyramine, have been attached to the HA molecule and the resulting adduct may be radiolabeled

\* Corresponding author at: Contipro C a.s., Dolní Dobruč 401, 561 02 Dolní Dobruč, Czech Republic. Tel.: +420 608 216 942; fax: +420 465 543 793.  
E-mail address: [cozikova@contipro.cz](mailto:cozikova@contipro.cz) (D. Cožiková).

directly [18–24]. The latter two approaches, however, may have impact on biological behavior of radiolabeled compound.

The current study was designed to compare procedures for labeling HA with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ , and to determine the kinetic stability of radiolabeled HA under different conditions (namely saline, plasma and artificial gastric fluid). The aim of this study was to evaluate the advantages and limitations of the three different HA radiolabeling strategies, and determine their effect on biological behavior.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

DTPA-HA, Tm-HA and Trs-HA were prepared by CPN Ltd. (Dolní Dobruška, Czech Republic). Diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA), sodium acetate, sodium azide, Sephadex G-50 medium and 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -DI-phenylglycouril (iodogen) were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Hydrochloric acid, sodium chloride and toluene were acquired from Lachema (Brno, Czech Republic). Pepsin powder was purchased from Dr. Kulich Pharma (Hradec Kralove, Czech Republic). Silver nitrate was supplied by Penta (Prague, Czech Republic). All these reagents were of analytical-reagent grade. Carrier free  $^{111}\text{In}$ - $\text{InCl}_3$  in 0.04 M HCl (15.4 TBq/mg, 1 mCi/0.1 mL) was obtained from Amersham (Buckinghamshire, UK). Carrier free  $^{125}\text{I}$ -NaI in 0.04 M NaOH (>600 GBq/mg, 10 mCi/0.05 mL) was supplied by the Institute of Isotopes Co., Ltd. (Budapest, Hungary). Glucose, D-[ $^{14}\text{C}$ (U)] (13.3 GBq/mmol, 1 mCi/mL), liquid scintillation cocktail Ultima Gold<sup>TM</sup> and aqueous based tissue solubilizer Solvable<sup>TM</sup> were purchased from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (USA). Plasma was acquired from male Wistar rats weighing 190–230 g after a 12-h overnight fasting following instructions from the Institutional Ethical Committee.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Chromatography

Molecular weights (MW) of non-radioactive samples of HA were determined by the chromatography system Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Shropshire, UK) consisting of an isocratic pump (G1310A), an automatic injector (G1313A), and the following column system: PL aquagel-OH mixed and PL aquagel-OH 60 8  $\mu\text{m}$  (300 mm  $\times$  7.5 mm) (Agilent Technologies, Shropshire, UK) columns connected in series and thermostated at ambient temperature. The samples were filtered through Acrodisc<sup>®</sup> 25 nm Syringe Filters w/0.2  $\mu\text{m}$  Supor<sup>®</sup> Membrane (Pall Corporation). The injection volume was 100  $\mu\text{L}$ . Eluent (0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5) was monitored using a Multi-angle laser light scattering photometer DAWN<sup>®</sup> EOS<sup>TM</sup> and a Refractive index detector Optilab rex (Wyatt Technology Corporation). The flow rate of the mobile phase was kept at 0.8 mL/min. Data acquisition and molecular weight calculation were accomplished using Astra software Version 5.3.2.15 (Wyatt Technology Corporation). The specific refractive index increment ( $dn/dc$ ) of 0.155 mg/mL was used for sodium hyaluronate. Limit of detection (LOD) for refractometric detector amounted to 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for HA.

The radioactive samples were analyzed using the Shimadzu GPC set (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) comprising of a LC-10AD Isocratic Pump, Column Oven CTO-10A Thermostat, columns: PL aquagel-OH 60 8  $\mu\text{m}$ , 300 mm  $\times$  7.5 mm (Agilent Technologies, Shropshire, UK) combined with HEMA-BIO 1000 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  8 mm (Tessek, Prague, Czech Republic) and Radiometric Detector (Raytest Gabi Star, Straubenhardt, Germany). As the mobile phase 0.2 M acetate buffer with 0.05% (w/v) sodium azide

pH 7.5 was used at the flow rate of 0.8 mL/min, the injection volume was 100–200  $\mu\text{L}$ . Each sample was filtered through Cronus Syringe filters PTFE 13 mm, 0.45  $\mu\text{m}$  (SMI-Lab Hut Ltd., Gloucester, UK). The GPC fractions were collected by FC 204 Fraction Collector (Gilson, Inc., Middleton, USA). Recording, evaluation and quantitative analysis of chromatograms as well as the controlling of valve switching was done by a PC supported program from Raytest GINA Star<sup>TM</sup> Version 2.18 (Straubenhardt, Germany). Sensitivity (Signal to Noise Ratio) is easily optimized by adjusting flow cell volumes and integration times. For the particular application requirements two flow cell volumes (10 and 250  $\mu\text{L}$ ) are available. Data records were quantified if the ratio signal to noise baseline was greater than 3. LOD for the radioactivity detector is dependent on the efficiency (depending on the isotope, the discriminator settings in the Gabi Star), the background, the flow rate and the measuring cell volume, and was calculated by the next equation:

$$\text{Detections limit} = \frac{2 \times \text{Background} \times \text{flow rate}}{\text{Cell volume} \times \text{efficiency}}$$

#### 2.2.2. FTIR spectroscopy

For the characterization of prepared HA derivatives Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was recorded on Shimadzu FTIR 8400S (Shimadzu Corporation) in KBr pellet with hydraulic press SSP-10A. Approximately 30 mg of the sample was mixed with 50 mg of potassium bromide in a ceramic mortar to give a homogeneous mixture and placed into a hydraulic press and pressed under 90 kN for 2 min to form a tablet. The spectra were measured in the region of wave number from 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.2.3. NMR spectroscopy

$^1\text{H}$  NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) was recorded on Bruker Avance III spectrometer at 500 MHz. The samples were dissolved in deuterated water at a concentration of 2–4 mg/mL. NMR spectra were used to determine degree of substitution (DS). Fig. 1 shows an example of  $^1\text{H}$  NMR spectrum, which was measured for the DS determination. In case of DTPA-HA, DS was calculated from the ratio of integrated signals of DTPA (3.1–3.2 ppm), and the acetamide group of N-acetylglucosamine of HA (2.0 ppm). The ration of integrated signals at 1.9 ppm, 6.5–8.0 ppm were used to calculate DS of Tm(Trs)-HA.

#### 2.2.4. UV–vis spectroscopy

An aromatic benzene ring in a tyrosine structure absorbs UV light between 290 and 300 nm, depending on pH conditions (the more basic conditions the higher absorption maximum wavelength and absorbance). HA absorbance can be detected at lower wavelengths from about 280 nm. Thus, it was possible to use direct DS determination, as the spectra of HA and tyrosine does not interfere. All samples were dissolved overnight in  $\text{NaCO}_3/\text{NaHCO}_3$  buffer (pH 11) at concentration of 0.5 mg/mL. A set of tyrosine solution in the range of concentrations 1–25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was used to construct calibration curve.

#### 2.2.5. Preparation of DTPA-HA

Firstly, DTPA was dissolved in de-mineralized water and activated by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) at pH 5–6. Dihydrazide of adipic acid (ADH) was used as a linker in the reaction. The reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature. Secondly, HA was activated by cyanogen bromide at basic pH 9–10 and a low temperature (10 to 5  $^{\circ}\text{C}$ ). 6 min after activation of HA, a hydrazido-derivative of DTPA was added and stirred for 20 h at room temperature. The amine group of the linker reacted with one of the hydroxyl groups in HA via the carbonyl group to form adduct DTPA-HA. A scheme of the reaction is shown in Fig. 2. The final product was purified by dialysis and lyophilized. 100 mg of

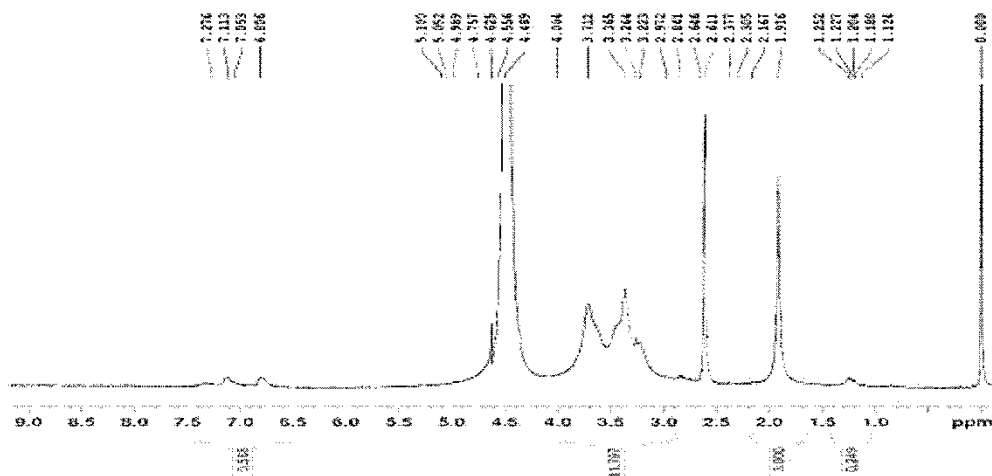


Fig. 1. An example of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Tm-HA ( $\text{D}_2\text{O}:\text{DM50}$  1:1);  $\delta$  (ppm) 7.1–6.8 (tyramine aromatic protons), 4.8–4.3 (water and 2 HA protons – anomeric), 3.8–3.2 (10 HA protons – carbohydrate backbone), 2.8 (tyramine  $\text{CH}_2$ ) and 1.9 (3 HA protons – acetyl  $\text{CH}_3$ ).

DTPA-HA was dissolved in 20 mL of de-mineralized water and dialyzed (cut-off 3500 g/mol) against 0.1% (w/v) NaOH and 0.1% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$  for three days, and then against de-mineralized water for four days. The synthesized DTPA-HA had MW of 80–100 kDa and DS 4.5%.

#### 2.2.6. Labeling of DTPA-HA with isotope $^{111}\text{In}$

DTPA-HA was dissolved in de-mineralized water at a concentration of 0.16% (w/v). 250  $\mu\text{L}$  of the DTPA-HA solution (corresponding to 0.4 mg DTPA-HA) was mixed with 250  $\mu\text{L}$  of 0.4 M acetic buffer pH 5.0 and approximately 20–50  $\mu\text{L}$  of  $^{111}\text{In-Cl}_3$  in 0.04 M HCl corresponding to 0.2–0.3 mCi (7.4–11 MBq) in dependence of the age of the isotope. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. After purification on Sephadex G-50 (the glass column 30 cm  $\times$  1 cm, solid phase: Sephadex G-50, mobile phase: de-mineralized water) the most radioactive fractions of  $^{111}\text{In-DTPA-HA}$  were collected (1 fraction  $\sim$  1 mL) and analyzed. The purity of the final radioactive fractions was confirmed using the

Shimadzu GPC set. The specific activity of the final product  $^{111}\text{In-DTPA-HA}$  used for stability studies was about 18–28 MBq/mg (the volume activity was 2.5–5.5 MBq/mL).

#### 2.2.7. Preparation of Tm-HA and Trs-HA

Two different adducts of HIA with tyrosine (Trs) or tyramine (Tm) were prepared. After 5 min of HA activation with cyanogen bromide (2 M excess to the amount of HA dimers) at low temperature ( $-10$  to  $-5^\circ\text{C}$ ) and pH 11 (0.25 M carbonate buffer), tyrosine or tyramine were added in equimolar amount with respect to HA dimers. The mixture was left to warm slowly to room temperature and stirred for an additional 24 h. Then, HA was precipitated using 100% 2-propanol and four times washed with 10 $\times$  excess of 80% 2-propanol in water. The precipitate was dried by washing with 100% 2-propanol twice and dried for 24 h at  $40^\circ\text{C}$ . A scheme of the reaction is shown in Fig. 3. MW of Tm-HA was 100–110 kDa with DS 4.4%, MW of Trs-HA was 170–180 kDa and its DS 4.1%.

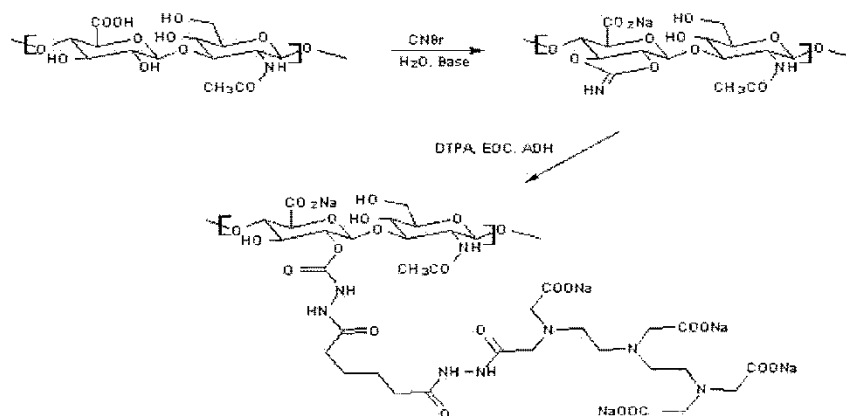


Fig. 2. Synthesis of DTPA-HA.

Please cite this article in press as: D. Cozikova, et al., Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ , J. Pharm. Biomed. Anal. (2010), doi:10.1016/j.jpba.2010.02.005

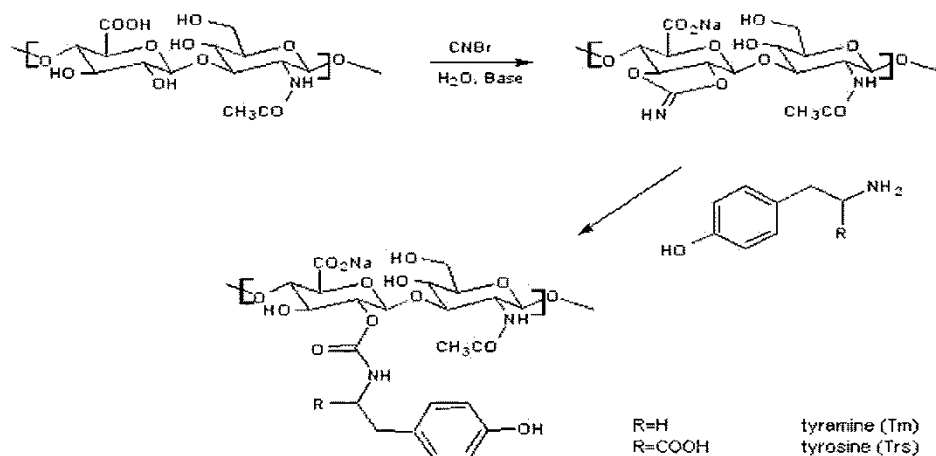


Fig. 3. Synthesis of Tm-HA or Trs-HA.

### 2.2.8. Labeling of Tm-HA and Trs-HA with $^{125}\text{I}$

0.5 mL of 0.001% (w/v) solution of Tm-HA (or Trs-HA) in 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 (corresponding to 5  $\mu\text{g}$  Tm(Trs)-HA) was added to reacti-vial (Supelco) with 10  $\mu\text{g}$  of iodogen (deposited on the tube walls) together with 2  $\mu\text{l}$  of  $^{125}\text{I}$ -NaI in 0.04 M NaOH (corresponding activity 0.4 mCi (15 MBq)). After stirring the mixture for 15 min, gel filtration on Sephadex G-50 was used for purification of the iodinated product. The most radioactive fractions were filtered through silver chloride to remove the remaining radioiodide bound to Tm(Trs)HA with non-specific binding. The purity was proven by GPC on Shimadzu GPC set. The specific activity of the final products  $^{125}\text{I}$ -Tm(Trs)-HA used for stability studies was about 0.8–1.8 MBq/ $\mu\text{g}$  (the volume activity was 1.3–4.5 MBq/mL).

### 2.2.9. Labeling of HA with $^{14}\text{C}$

Fermentation method for producing HA is generally known. HA is produced by the cultivation of a microorganism belonging to the genus *Streptococcus*, which is an hemolytic and capable of producing HA in a culture medium. The microorganism can grow in a culture medium, preferably containing carbon sources, inorganic salts, and optional organic trace nutrients [30].

The molecule  $^{14}\text{C}$ -glucose was incorporated into the structure of HA during 15-h fermentation process in a micro-reactor of 100 mL. After cultivation, HA was isolated from the cultivated mixture by centrifugal separation followed by precipitation by organic solvent. HA radiolabeled with carbon-14 ( $^{14}\text{C}$ -HA) was purified using GPC with fraction collector. High molecular weight fractions were collected and lyophilized. The specific activity of the final product  $^{14}\text{C}$ -HA used for stability studies was about 4.5 kBq/mg. The molecular weight of the final product was 120–150 kDa.

### 2.2.10. Stability studies in vitro

The stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA,  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA,  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA and  $^{14}\text{C}$ -HA was investigated under three different conditions. Namely, saline pH 7.5 at 25 °C, fresh rat plasma at 37 °C, and artificial gastric juice pH 1.7 at 37 °C [31]. The samples of radiolabeled HA were mixed with the above-mentioned solutions in the ratio 1:1 (v/v). The mixtures were then analyzed by GPC with radiometric and refractometric detection at intervals of 0, 1, 2, 4, 24 and 48 h. The collected fractions (1 fraction ~ 1 mL) of the samples labeled with  $^{111}\text{In}$  and  $^{125}\text{I}$  were analyzed by Automatic Gamma Counter 1480

Wizard<sup>TM</sup> 3<sup>o</sup> (Wallac, Finland). The samples labeled with  $^{14}\text{C}$  were measured after an addition of a liquid scintillation cocktail (5 mL of the cocktail were added to 1 mL of collected fraction) on Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer, USA).

## 3. Results and discussion

HA is a ubiquitous component of human extracellular matrix. For this reason it is very difficult to determine the effect of exogenously administered HA in the body. The importance of an accurate assessment of HA pharmacokinetic and metabolism is, however, crucial for the analysis of the mechanism of HA effects in the body. One possible way to solve the problem is the employment of a radiolabel attached to the HA molecule as radioactivity is easily detectable in biological samples. This approach links labeling chemistry, labeled product stability, structure changes of the parent agent during the labeling procedure, time, and cost effectiveness.

Biological behavior of an unlabeled HA (both its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties) is of course affected by its molecular weight (MW). The effect of HA of different MW on the living system is comprehensively described in some reviews [32–34]. Distribution and elimination characteristics of HA are also dependent on its molecular weight (a moderated escape of high molecular weight HA from the central distribution compartment, a ceased elimination by glomerular filtration of agents having molecular weight over 70,000 etc.). Also enzymatic degradation and fragmentation of HA is dependent on its structure and size [35–37].

### 3.1. Radiolabeling techniques

Attaching a bulky chelating moiety or a prosthetic group to the HA molecule and adding a radiolabel is one of the promising methods. A wide variety of bifunctional chelating agents and prosthetic groups have been developed in recent years for the convenient radiolabeling of biomolecules. DTPA derivative was chosen in this work for further experiments because these derivatives are known to be suitable structures for labeling with a number of radionuclides including as  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , radiolanthanoides etc. Present paper analyzes conditions for labeling of DTPA-HA with  $^{111}\text{In}$ . It was revealed that the quality of labeling with isotope  $^{111}\text{In}$  was dependent on the purity of the reaction environments, particularly on

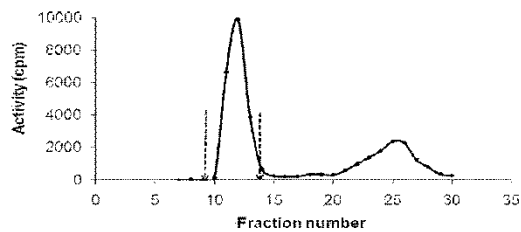


Fig. 4. Example of GPC analysis of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (MW = 80–100 kDa). Separation was accomplished on a glass column 30 cm  $\times$  1 cm, solid phase: Sephadex G-50, mobile phase: de-mineralized water. Arrows designate elution region of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA.

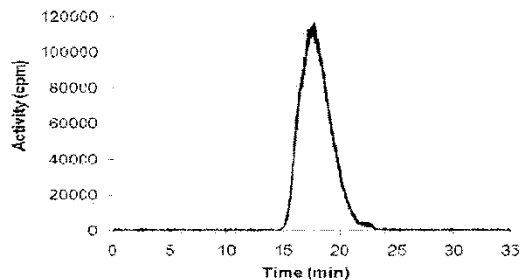


Fig. 5. Example of GPC analysis of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (MW = 80–100 kDa). For analysis GPC Shimadzu set with radiometric Gabi-Star detection was used.

the degree of contamination with trivalent metals which might be competitively bound to the DTPA chelator. For the separation of the radiolabeled products from a low molecular weight activity, GPC analysis on a glass column with Sephadex G-50 was used (Fig. 4). The final purity of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was verified using Shimadzu GPC set (Fig. 5).

Radiolabeling of Tm-HA and Trs-HA adducts with  $^{125}\text{I}$  by oxidative iodination (an electrophilic substitution) was a routine radiochemical procedure requiring the purification of radiolabeled HA by chromatography on Sephadex. Although both HA derivatives

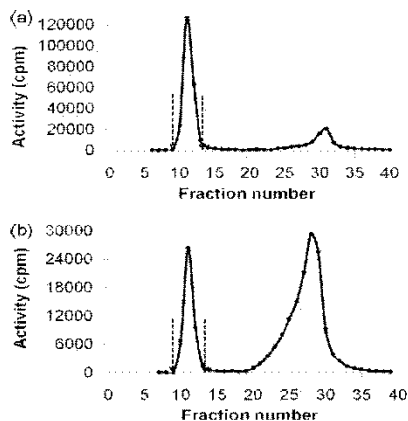


Fig. 6. Example of GPC analysis on glass column 30 cm  $\times$  1 cm, solid phase: Sephadex G-50 and mobile phase: de-mineralized water. (a)  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA (MW = 100–110 kDa) and (b)  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA (MW = 170–180 kDa). Marked peaks designate  $^{125}\text{I}$ -Tm(Trs)-HA.

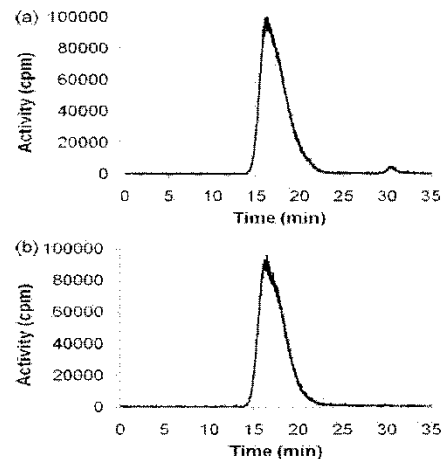


Fig. 7. Example of GPC analysis using GPC Shimadzu set: (a)  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA after separation on Sephadex G-50 without subsequent filtration and (b)  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA after separation on Sephadex G-50 and filtration through the silver chloride sediment.

are structurally similar (tyramine is decarboxylated tyrosine) it was revealed that the radiolabeling efficiency of Trs-HA was lower than that of Tm-HA (Fig. 6a and b). GPC analysis of radiolabeled products  $^{125}\text{I}$ -Tm(Trs)-HA on the Shimadzu GPC set showed the presence of a low molecular weight impurity (free iodide) after purification on Sephadex G-50 (Fig. 7a). To remove traces of free radioiodide, filtration through silver chloride precipitate was employed (Fig. 7b). Silver ions bound redundant iodine ions and thus enhanced the quality of labeling.

Labeling of HA with metal radionuclides or radioiodine requires the presence of chelating moiety or a prosthetic group in the HA molecule; on the other hand, biosynthetic labeling of HA with  $^{14}\text{C}$  results in a non-modified natural HA molecule. The preparation of  $^{14}\text{C}$ -HA is a time-consuming and expensive process, in which

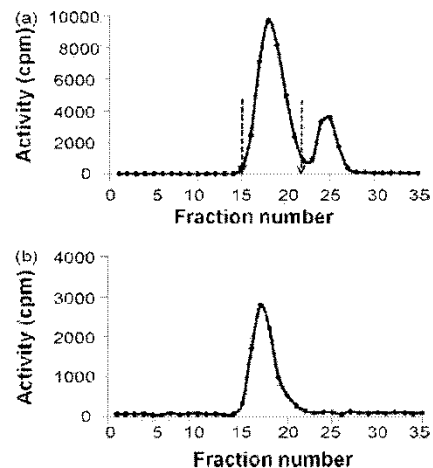


Fig. 8. (a) Example of GPC analysis of cultivation product ( $^{14}\text{C}$ -HA) and (b) example of GPC analysis of  $^{14}\text{C}$ -HA after purification from low molecular weight activities.

Please cite this article in press as: D. Cozíkova, et al., Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ , J. Pharm. Biomed. Anal. (2010), doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.005

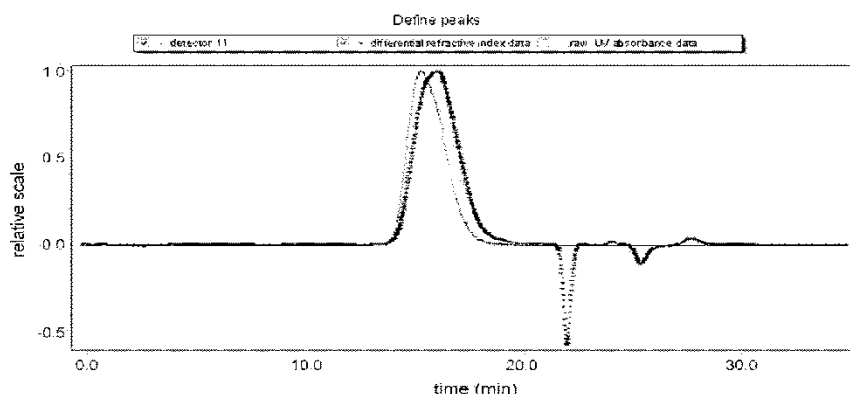


Fig. 9. Example of GPC analysis of HA (MW = 100–110 kDa) using Agilent 1100 Series chromatography system with light scattering detection (thin line) and refractometric detection (thick line).

$^{14}\text{C}$ -glucose was metabolized into the structure of HA during cultivation. The final radiolabeled product should be consequently purified from low molecular weight radioactive impurities. An example of such purification by GPC on Shimadzu set is shown in Fig. 8a and b. Fractions containing  $^{14}\text{C}$ -HA were collected and lyophilized for further experiments.

### 3.2. Kinetic stability

The stability of natural and modified HA samples was studied before a radioactive moiety was introduced. For the MW determination an Agilent 1100 Series chromatography system with a multi-angle laser light scattering photometer and refractive index detector was used. Records from both detectors denote almost the same profile with a short shift due to dead volume among both detectors in cascade (Fig. 9).

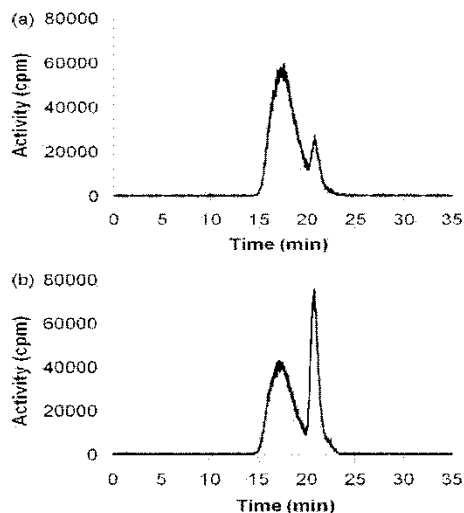


Fig. 10. Example of GPC analysis of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (MW = 80–100 kDa) on Shimadzu GPC set.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA mixed with plasma in the ratio 1:1 (a) immediately analyzed and (b) the same mixture analyzed after 24 h.

Results of stability tests that were carried out in *in vitro* experiments are summarized in Tables 1 and 2. Original and modified HA samples with DTPA, and tyrosine, were found to be stable in a phosphate buffer. A slightly lower stability of Tm-HA in this medium may be explained by the partial degradation of the HA structure during the chemical modification process. In artificial gastric juice the molecular weight of HA and Trs-HA was practically unchanged, while under similar conditions MW of Tm-HA decreased for about 25% in 48 h. Similarly, MW of DTPA-HA decreased down approximately to 33 kDa.

The stability of radioactive HA ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA,  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA,  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA and  $^{14}\text{C}$ -HA) was assessed in three different mediums: acetate buffer (pH 7.5) at 25 °C, artificial gastric juice (pH 1.7) at 37 °C, and fresh rat plasma at 37 °C. Radiochemical purity-time decrease of radiolabeled HA in different mediums was determined using a GPC Shimadzu set with radiometric detection. In Fig. 10 an example of chromatographic records of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA mixed with rat plasma is shown.

Stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was relatively low, particularly in acidic medium and rat plasma. Fig. 11 shows that the radioactive complex of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was relatively stable in acetate buffer, but in rat plasma radiochemical purity decreased to about 48% within 48 h. In an artificial gastric juice degradation of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA was very rapid the parent agent was completely broken down during 48 h.

The decomposition of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA might be a result of three different processes, namely due to the fragmentation of HA to products of substantially smaller molecular weights, due to cleavage of  $^{111}\text{In}$ -DTPA bound to HA, and due to the release of  $^{111}\text{In}$  from the chelate. In fact, HA modification with DTPA could cause destabi-

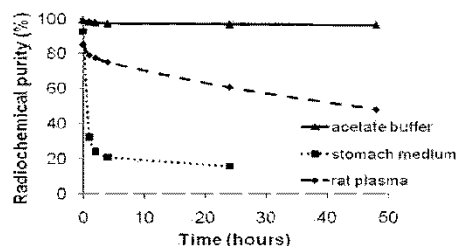


Fig. 11. Stability of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA (MW = 80–100 kDa) in three different mediums.

Please cite this article in press as: D. Cozíkova, et al. Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ . J. Pharm. Biomed. Anal. (2010), doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.005

**Table 1**  
Kinetic stability of HA samples analyzed in phosphate buffer pH 7.5 at 25 °C.

Time (h)	Average of MW $\pm$ SD (n = 3)			
	HA (100–110 kDa)	DTPA-HA (80–100 kDa)	Tm-HA (100–110 kDa)	Trs-HA (170–180 kDa)
0	107.15 $\pm$ 0.07	82.02 $\pm$ 0.06	101.55 $\pm$ 0.64	178.10 $\pm$ 2.40
1	105.55 $\pm$ 0.64	81.09 $\pm$ 0.30	95.39 $\pm$ 1.40	177.15 $\pm$ 1.20
2	105.30 $\pm$ 0.28	81.17 $\pm$ 0.30	95.56 $\pm$ 1.85	177.28 $\pm$ 0.74
4	106.50 $\pm$ 0.42	81.05 $\pm$ 0.47	94.28 $\pm$ 1.51	176.15 $\pm$ 0.49
24	104.40 $\pm$ 2.12	80.87 $\pm$ 0.16	89.50 $\pm$ 2.31	174.73 $\pm$ 2.79
48	104.90 $\pm$ 0.14	80.80 $\pm$ 0.57	85.59 $\pm$ 0.20	175.00 $\pm$ 0.99

**Table 2**  
Kinetic stability of HA samples analyzed in artificial gastric juice pH 1.7 at 37 °C.

Time (h)	Average of MW $\pm$ SD (n = 3)			
	HA (100–110 kDa)	DTPA-HA (80–100 kDa)	Tm-HA (100–110 kDa)	Trs-HA (170–180 kDa)
0	107.59 $\pm$ 0.24	81.39 $\pm$ 1.20	100.84 $\pm$ 2.78	174.25 $\pm$ 0.35
1	107.35 $\pm$ 1.91	80.61 $\pm$ 0.37	94.43 $\pm$ 2.67	173.45 $\pm$ 0.92
2	107.55 $\pm$ 0.64	80.53 $\pm$ 0.72	91.20 $\pm$ 2.72	173.30 $\pm$ 3.11
4	104.25 $\pm$ 0.92	80.65 $\pm$ 0.30	83.74 $\pm$ 0.96	175.05 $\pm$ 1.32
24	103.70 $\pm$ 0.42	44.59 $\pm$ 2.30	74.48 $\pm$ 0.16	174.64 $\pm$ 1.28
48	104.58 $\pm$ 0.64	33.32 $\pm$ 1.77	73.63 $\pm$ 0.76	172.80 $\pm$ 1.77

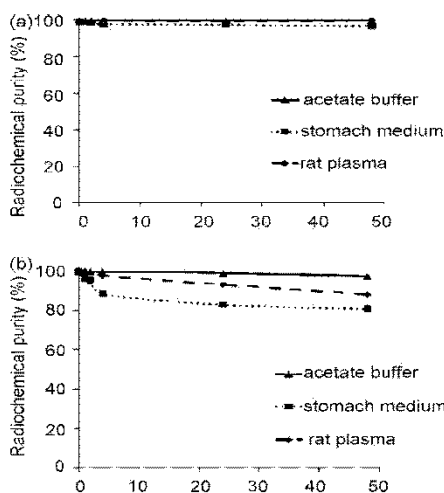
lization of some bounds near the site of DTPA-coupling to HA. As chelation of  $^{111}\text{In}$  with DTPA produces a relatively stable complex, the first of the two above-mentioned possibilities was probably crucial for the rapid formation of  $^{111}\text{In}$ -containing low molecular weight species in our stability studies. The other possibility to explain decomposition of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA is an autoradiolytic degradation of the agent. In our experiments this process is probably negligible due to relatively low volume activity used (approx. 2–3 MBq/mL) and due to the fact that  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA of the same volume activity in buffer is practically stable.

*In vitro* stability studies show lower stability of  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA in comparison to  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA (Fig. 12a and b). A certain limitation of IIA labeling with radioiodine resides in the exposition of the agent to oxidizing reagents during the labeling procedure. HA may not tolerate these conditions and its stability may be decreased. Further limitation of the use of iodinated macromolecules for biological

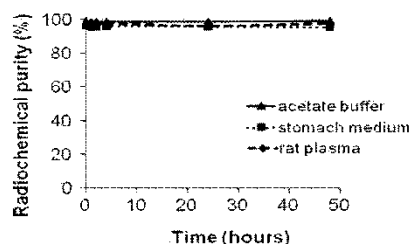
studies is that they frequently suffer of *in vivo* deiodination. Iodinated tyrosine is structurally similar to the thyroid hormones that are known to be rapidly deiodinated by enzymes found in the liver, kidney and thyroid. For these reasons, an attachment of tyramine as the prosthetic group for radioiodination of HA seems to be a better choice than the labeling procedure employing Trs-IIA.

Direct biotechnological labeling of HA with  $^{14}\text{C}$  (using  $^{14}\text{C}$ -glucose as a metabolic substrate) results in the product most familiar to the natural compound. Unfortunately, a molecular weight distribution of the radiolabeled product is not predictable and radiochemical yields are very low. In addition, the specific activity of the product is limited due to radiosensitivity of the cell culture used. However, long-term stability of the radiolabeled species is excellent (Fig. 13) and comparable with that of an unlabeled HA (Tables 1 and 2).

In summary, the kinetic stability studies may provide primary information concerning properties of radiolabeled HA *in vitro* which is essential for the use and definition of its character in biological experiments. Radiolabeling of HA, previously modified with DTPA, tyrosine or tyramine is fast, simple and inexpensive, and a labeled agent with a high specific activity is feasible. However, a crucial disadvantage of this approach is the presence of an unnatural group in the IIA structure requiring further characterization of the compound. This structural change may substantially alter stability of the radiolabeled product. In contrary to that, labeling of HA with  $^{14}\text{C}$  by biotechnological synthesis is a very expensive, time-consuming process requiring a special apparatus. Although the final product is identical to natural HA, the low specific activity of  $^{14}\text{C}$ -HA limits its application in biological experiments.



**Fig. 12.** Stability of  $^{125}\text{I}$ -Tm(Trs)-HA in three different media (a)  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA (MW = 100–110 kDa) and (b)  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA (MW = 170–180 kDa).



**Fig. 13.** Stability of  $^{14}\text{C}$ -HA (MW = 120–150 kDa) in three different media.

Please cite this article in press as: D. Cozikova, et al., Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ , J. Pharm. Biomed. Anal. (2010), doi:10.1016/j.jpba.2010.02.005

#### 4. Conclusion

The aim of this study was to prepare HA labeled with isotope  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$ , and to prove the kinetic stability of the radio-labeled products under the following conditions: saline, artificial gastric juice and fresh rat plasma.

This study has demonstrated that  $^{111}\text{In}$  and  $^{125}\text{I}$  labeling of modified HA can be simple, fast and inexpensive, and under certain conditions may yield products with high specific activity. Conversely, common methods involving HA labeling with isotope  $^{14}\text{C}$  yield identical product to physiological HA but with a very low final specific activity. Furthermore, the process of preparation is lengthy and expensive.

Stability studies showed that  $^{14}\text{C}$ -HA and  $^{125}\text{I}$ -Tm-HA were both stable in all three mediums. The stability of  $^{125}\text{I}$ -Trs-HA slightly decreased in rat plasma and artificial stomach medium with increasing time. The least stable was  $^{111}\text{In}$ -DTPA-HA, which was completely degraded after 48 h in artificial gastric juice. The reason for the lower stability might be the structural change of the HA molecule in the modification process.

The results of the kinetic stability of radiolabeled HA gave us important and essential information about the degradation process *in vitro*, which is one of the crucial steps leading to the further understanding of the biological behavior of HA *in vivo*.

#### Acknowledgements

The authors thank J. Hoderova and E. Teichmanova for their excellent technical assistance.

#### References

- [1] M.B. Brown, S.A. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin, *J EADV* 19 (2005) 308–318.
- [2] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, Distribution, function and turnover, *J. Intern. Med.* 242 (1997) 27–33.
- [3] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, Hyaluronan, *FASEB J.* 6 (1992) 2397–2404.
- [4] R. Stern, G. Kogan, M.J. Jedrejcas, L. Soltes, The many ways to cleave hyaluronan, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 537–557.
- [5] B.P. Toole, Hyaluronan in morphogenesis, *Cell Dev. Biol.* 2 (2001) 79–87.
- [6] T.C. Laurent, *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Portland Press, London, 1998, pp. 319–355.
- [7] P.D. Ward, S.L. Thibeault, S.D. Gray, Hyaluronic acid: its role in voice, *J. Voice* 16 (2002) 303–309.
- [8] L. Balogh, A. Polyak, D. Marhe, R. Kiraly, J. Thuroczy, M. Terez, G. Janoki, Y. Ting, L.R. Bucci, A.G. Schauss, Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10582–10593.
- [9] S. Huang, P. Ling, T. Zhang, Oral absorption of hyaluronic acid and phospholipids complexes in rats, *World J. Gastroenterol.* 16 (2007) 945–949.
- [10] J. Du, N. White, N.D. Eddington, The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse, *Biopharm. Drug Dispos.* 25 (2004) 109–116.
- [11] T.J. Brown, U.B. Laurent, J.R. Fraser, Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labeled hyaluronan from the knee joint of the rabbit, *Exp. Physiol.* 76 (1991) 125–134.
- [12] J.R.E. Fraser, W.G. Kimpton, T.C. Laurent, R.N.P. Cahill, N. Vakakis, Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue, *Biochem. J.* 256 (1988) 153–158.
- [13] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, H. Petroft, E. Baxter, Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit, *Biochem. J.* 200 (1981) 415–424.
- [14] J. Lafferla, L.A. Culp, Differences in hyaluronate binding to plasma and cell surface fibronectin, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 719–726.
- [15] B. Smedsrød, H. Pertoft, S. Eriksson, J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, Studies *in vitro* on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells, *Biochem. J.* 223 (1984) 617–626.
- [16] A. Tengblad, U.B.G. Laurent, K. Lijja, R.N.P. Cahill, A. Engström-Laurent, J.R.R. Fraser, H.E. Hansson, T.C. Laurent, Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood, *Biochem. J.* 236 (1986) 521–525.
- [17] G. Westerberg, M. Bergström, S. Gustafson, U. Lindqvist, A. Sundin, B. Langström, Labelling of polysaccharides using  $^{11}\text{C}$  Cyanogen bromide. *In vivo* and *in vitro* evaluation of  $^{11}\text{C}$ -hyaluronan uptake kinetics, *Nucl. Med. Biol.* 22 (1995) 251–256.
- [18] L.B. Dahl, T.C. Laurent, B. Smedsrød, Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: coupling of  $^{125}\text{I}$ -tyramine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation, *Anal. Biochem.* 175 (1988) 397–407.
- [19] S. Gustafson, T. Bjorkman, J.E. Westlin, Labelling of high molecular weight hyaluronan with  $^{125}\text{I}$ -tyrosin: studies *in vitro* and *in vivo* in the rat, *Glyco-conjugate J.* 11 (1994) 608–613.
- [20] U.B.G. Laurent, L.B. Dahl, R.K. Reed, Catabolism of hyaluronana in rabbit skin takes place locally in lymph nodes and liver, *Exp. Physiol.* 76 (1991) 695–703.
- [21] C.T. McGary, R.H. Raja, P.H. Weigel, Endocytosis of hyaluronin acid by rat liver endothelial cells, *Biochem. J.* 257 (1989) 875–884.
- [22] A. Nimrod, E. Ezra, N. Ezov, G. Nachum, B. Parisada, Absorption, distribution, metabolism and excretion of bacteria-derived hyaluronic acid in rats and rabbits, *J. Ocul. Pharm.* 8 (1992) 161–172.
- [23] Ch. Tzaicos, J.R.E. Fraser, E. Tsotsis, W.G. Kimpton, Inhibition of hyaluronan uptake in lymphatic tissue by chondroitin sulphate proteoglycan, *Biochem. J.* 264 (1989) 823–828.
- [24] J.A. Weigel, R.C. Raymond, C. McGary, A. Singh, P.H. Weigel, A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9808–9812.
- [25] S. Gouin, M.V.V. Grayeb, F.M. Winnik, Gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid hyaluronan conjugates: preparation, properties and application, *Macromol. Symp.* 186 (2002) 105–110.
- [26] J. Karhu, L. Harju, A. Ivaska, Determination of the solubility products of nitrilotriacetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid and diethylenetriaminepentaacetic acid, *Anal. Chim. Acta* 380 (1999) 105–111.
- [27] P. Mlkochova, S. Bystricky, B. Steiner, E. Machova, M. Kous, V. Velebný, M. Kremlar, Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives, *Biopolymers* 82 (2006) 74–79.
- [28] M. Sillanpää, A. Oikari, Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay, *Chemosphere* 32 (1996) 1485–1497.
- [29] B. Thierry, F.M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, M. Tabrizian, Radioisotopes-hyaluronan-conjugate thromboresistant coatings to prevent in-stent restenosis, *Biomaterials* 25 (2004) 3895–3905.
- [30] H. Akasaka, H. Komaki, T. Arai, Fermentation method for producing hyaluronic acid, *US Patent* 4,801,539 (1989).
- [31] *Czech Pharmacopoeia 2002*, Grada Publishing, Prague, 2002, pp. 7738.
- [32] G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 17–25.
- [33] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltes, Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1718–1745.
- [34] K.L. Goa, P. Benfield, Hyaluronic acid, A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing, *Drugs* 47 (1994) 536–566.
- [35] G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, J. Schiller, R. Mendichi, Hyaluronic acid: its function and degradation in *in vivo* systems, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 34, 2006, pp. 789–882.
- [36] L. Soltes, R. Mendichi, G. Kogan, J. Schiller, M. Stankovska, J. Arnhold, Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan, *Biomacromolecules* 7 (2006) 659–668.
- [37] L. Soltes, V. Brezova, M. Stankovska, G. Kogan, P. Gemeiner, Degradation of high-molecular-weight hyaluronan by hydrogen peroxide in the presence of cupric ions, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 639–644.



## **11. POUŽITÉ ZKRATKY**

## Seznam použitých zkratek:

CS – Chondroitin sulfát  
CNBr – Cyanogen bromid  
DS – Dermatan sulfát  
DTPA - Diethylentriaminopentaoctová kyselina  
ECM – Extracelulární matrix  
EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide  
GAG - Glykosaminoglykan  
GIT – Gastro-intestinální trakt  
HA – Hyaluronová kyselina  
HAS – Hyaluronan syntáza  
HA 10 – <sup>111</sup>In-DTPA-HA, Mw: 10kDa  
HA 100 - <sup>111</sup>In-DTPA-HA, Mw: 100kDa  
HA 400 - <sup>111</sup>In-DTPA-HA, Mw: 400kDa  
HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
HS – Heparan sulfát  
HYABP – Hyaluronan binding protein  
Hyal - Hyaluronidáza  
IL-1 – Interleukin 1  
IP<sub>3</sub> – Inositol trifosfát  
i.v. - Intravenózní  
KS – Keratan sulfát  
Mr, Mw – Molekulová hmotnost  
NSA – Nesteroidní antiflogistika  
PKN – Proteinkináza  
PLC – Fosfolipáza C  
RES – Retikulo-endoteliální systém  
SD – Směrodatná odchylka

## **12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. Volpi, N., Schiller, J., Stern, R., Role, metabolism, chemical modifications and applications of Hyaluronan; *Current medicinal chemistry*, 2009, 16: 1718-1745
2. [Http://en.wikipedia.org/wiki/Biodistribution](http://en.wikipedia.org/wiki/Biodistribution)
3. Dostálek, M., a kol., *Farmakokinetika*, Grada Publishing, 2006, 16-33
4. Yoon, J.H., Halper, J., Tendon proteoglycans: biochemistry and function, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2005; 5:22-34
5. <http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.html>
6. Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W., In: *Harperova Biochemie, H+H*, Jinočany, Czech Republic, 2001: 674-681
7. Volpi N., Therapeutic applications of glycosaminoglycans, *Current Medicinal Chemistry*, 2006; 13:1799-1810
8. Marcum, J.A., McKenney, J.B., *et al.*, Anticoagulantly active heparin-like molecules from mast cell-deficient mice, *Am. J. Physiol.*, 1986; 250 (5 Pt 2): H879–888
9. Nader, H.B., *et al.*, Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates?, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999; 32 (5): 529–538
10. Trowbridge J.M., Gallo L. R., Dermatan Sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan, *Glycobiology*, 2002; 12 (9): 117R-125R
11. Ronca, F., Palmieri, L., Panicucci, P., Ronca, G., Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate, *Osteoarthritis Cartilage*, 1998; 6 Suppl A: 14-21
12. Yamaguchi, Y., Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2000; 57: 276-89
13. Viapiano, M.S., Matthews, R.T., From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology, *Trends. Mol. Med.*, 2006; 12: 488-96
14. Conte, A., Volpi, N., Palmieri, L., Bahous, I., Ronca, G., Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate, *Arzneimittelforschung*, 1995; 45: 918-25

15. Funderburgh, J.L., Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and fiction, *Glycobiology*, 2000; 10: 951-958
16. Laurent, T.C., Biochemistry of hyaluronan, *Acta Otolaryngol.*, 1987; 442: 7-24
17. Pummill, P.E., Kane, T.A., Kempner, E.S., DeAngelis, P.L., The functional molecular mass of the Pasteurella hyaluronan synthase is a monomer, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007; 1770(2): 286-90
18. Prehm, P., Hyaluronan in rheumatoid arthritis: a review, In Abantagelo, G., Weigel, P. H. (Eds), *Redefinig hyaluronan*. Padua, Italy, 1999; p. 129-135
19. Weigel, P.H., Hascall, V.C., Tammi, M., Hyaluronan synthases, *J. Biol. Chem.*, 1997; 272(22): 13997-4000
20. Nimrod, A., Elchanan, E., Ezov, N., Absroption, distribution, metabolism and excretion of bacteria-derived hyaluronic acid in rats and rabbits, *J. Ocul. Pharmacol. TH.*, 1992; 8: 161-172
21. Reed, R. K., Lilja, K., Laurent, T. C., Hyaluronan in the rat with special reference to the skin, *Acta. Physiol. Scand.* 1988; 134: 405-411
22. Cohen, M., Klein, E., Addadi, L., Hyaluronan mediated adhesion: Visualizing pericelular hyaluronan and studying its role in cell matrix adhesion. In *Hyaluronan 2003* Cleveland, USA, 2003; p. 10
23. Fraser, J.R.E., Laurent, T. C., Turnover and metabolism of hyaluronan. In John Wiley & sons, *The biology of hyaluronan*. Ciba foundation, Chichester, UK 1989; 41-53
24. Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J. Int. Med.*, 1997; 242: 27-33
25. Zhong, S. P., Campoccia, D., Doherty, P. J., Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase, *Biomaterials*, 1994; 15: 359-365
26. Sattar, A., Rooney, P., Kumar, S., Application of angiogenic oligosacharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin, *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 103: 576-579

27. Liu, D., Pearlman, E., Diaconu, E., Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 7832-7837
28. Kosaki, R., Watanabe, K., Yamaguchi, Y., Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity, *Cancer Research*, 1999; 59: 1141-1145
29. Sohara, Y., Ishiguro, N., Machida, K., Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner, *Mol. Biol. Cell.*, 2001; 12: 1859-1868
30. Sakai, S., Yasuda, R., Sayo, T., Hyaluronan exists in the normal stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 114: 1184-1187
31. Komatsu, S., Iwata, H., Nabeshima, T., Studies on the kinetics, metabolism and re-utilisation after intra-articular administration of hyaluronan to rabbits *Arzneim.-Forsch.*, 1999; 49: 427-433
32. Turley, E. A., Noble, P. W., Lilly, Y. W., Signaling properties of hyaluronan receptors, *J. Biol. Chem.* 2002; 277, No. 7: 4589-4592
33. Evanko, S.P., Tammi, M.I., Tammi, R.H., Wight, T.N., Hyaluronan-dependent pericellular matrix, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2007; 59(13): 1351-65
34. Laurent, T.C., Fraser, J.R.E., Pertoft, H., Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells, *Biochem. J.* 1986; 234: 653-658
35. Day, J. A., Prestwich, G. D., Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, No. 7: 4585-4588
36. Lilly, Y. W., Singleton, A. P., Diedrich, F., Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-γ promotes phospholipase Cγ1 activation, Ca<sup>2+</sup> signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation, *J. Biol. Chem.*, 2004; 279, No. 28: 29654-29669
37. Cleland, R.L., Wang, J.L., Detweiler, D.M., Polyelectrolyte properties of podium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid, *Macromolecules*, 1982; 15: 386-395
38. Brown, T. J., Alcorn, D., Robert, J., Absorption of hyaluronan applied to the surface of intact skin, *J. Invest. Dermatol.*, 1999; 113: 740-746

39. Tammi, R., Saamanen Anna-Marja, Maibach, H. I., Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture, *J. invest. dermatol.*, 1991; 97: 126-130
40. Laurent, U. B. G., Dahl, L. B., Reed, R. K., Catabolism of hyaluronana in rabbit skin takes place locally in lymph nodes and liver, *Experimental Physiology*, 1991; 76: 695-703
41. Breborowicz, A., Polubinska, A., Pawlaczyk, K., Intraperitoneal hyaluronan administration in conscious rats: Absorption, metabolism, and effects on peritoneal fluid dynamics, *Peritoneal Dialysis International*, 2001; 21: 130-135
42. Schauss, A. G., Balogh, L. G., Polyak, A.G., Absorption, distribution and excretion of 99mtechnecium labeled hyaluronan after single oral doses in rats and beagle dogs, <http://select.biosis.org/faseb/eb2004:data/FASEB001587.html> (2004)
43. Balogh, L., Polyak, A., Mathe, D., Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs, *J. Agric. Food. Chem.*, 2008; 56(22): 10582-93
44. Lebel, L., Fraser, JR., Kimpton, WS., A pharmacokinetic model of intravenously administrated hyaluronan in sheep, *Pharm Res*, 1989; 6(8): 677-82
45. Fraser, J. R. E., Appelgren, Lars-Erik, Laurent, T. C., Tissue uptake of circulating hyaluronic acid, *Cell. Tissue. Res.*, 1983; 233: 285-293
46. Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Pertoft, H., Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit, *Biochem. J.*, 1981; 200: 415-424
47. Lebel, L., Gabrielsson, J., Laurent, T.C., Kinetics of circulating hyaluronan in humans, *European Journal of Clinical Investigation*, 1994; 24: 621-626
48. Laurent, T.C., Fraser, E.R., Hyaluronan, *FASEB J.*, 1992; 6: 2397-2404
49. Fraser, J.R., Laurent, T.C., Engström-Laurent, A., Laurent, U.G., Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1984; 11(1): 17-25

50. Lebel, L., Fraser, J.R., Kimpton, W.S., A pharmacokinetic model of intravenously administrated hyaluronan in sheep, *Pharm Res*, 1989; 6(8): 677-82
51. Smedsrod, B., Pertoft, H., Eriksson, J., Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells, *Biochem. J.*, 1984; 223: 617-626
52. McGray, C. T., Raja, R. H., Weigel, P. H., Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells, *Biochem. J.*, 1989; 257: 875-884
53. Knudson, W., Peterson, R. S., Embry, J. J., Cellular regulation of CD44-mediated catabolism of hyaluronan, In: *Hyaluronan 2003 Cleveland, USA, 2003*, p. 48
54. Stern, R., A pathway for HA catabolism in somatic tissues. In *Hyaluronan 2003 Cleveland, USA, 2003*, p. 46
55. Stern, R., Jedrzejak, M.J., Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action, *Chem. Rev.*, 2006; 106(3): 818-39
56. Tammi, R. H., Pasonen-Seppanen, S., Kultti, A., Hyaluronan degradation in epidermis, In *Hyaluronan 2003 Cleveland, USA, 2003*, p. 49
57. <http://www.sigmaaldrich.com/thumb/prodimages/h/hyaluronidase.jpg>
58. Fraser, J. R. E., Kimpton, W. G., Laurent, T. C., Uptake of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem. J.*, 1988; 256: 153-158
59. Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., Laurent, U. G. B., Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1984; 11: 17-25
60. Lindqvist, U., Groth, T., Lebel, L., Evaluation of various models of hyaluronan kinetics for assessment of liver function, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1997; 57: 49-58
61. Punzi, L., Pianon, M., Schiavon, F., Mechanism of the action of hyaluronan in joint diseases. In Abantagelo, G., Weigel, P. H. (Eds), *Redefining hyaluronan*. Padua, Italy, 1999; p. 137-142
62. Kobayashi, H., Horikoshi, K., Yamataka, A., Hyaluronic acid: a specific prognostic indicator of hepatic damage in biliary atresia, *J. Pediatr. Surg.*, 1999; 34: 1791-1794



63. Duterme, C., Mertens-Strijthagen, J., Flamion, B. The hyaluronidase hyal2 modifies the exposure of cells to hyaluronan, In *Hyaluronan 2003* Cleveland, USA, 2003, p. 56
64. Zheng, C., Toole, B. P., Kinney, D. S., Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers, *Int. J. Cancer*. 1998; 77: 396-401
65. Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Hyaluronan: Fundamental principles and applications in cancer, *Journal of Internal Medicine*, 1997; 242: 41-48
66. Knudson, W., Tumor-Associated Hyaluronan, *American Journal of Pathology*, 1996; 148: 1721-1726
67. Toole, B. P., Wight, T. N., Tammi, I. M., Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 4593-4596
68. Simpson, A. M., Reiland, J., Burger, R. S., Hyaluronan synthase elevation in metastatic prostate carcinoma cells correlates with hyaluronan surface retention, a prerequisite for rapid adhesion to bone marrow endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276: 17949-17957
69. Stern, R., Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology, *Pathologie-Biologie*, 2005; 53(7): 372-82
70. Jojovic, M., Delpech, B., Expression of hyaluronate synthase in human primary tumours and their metastases in scid mouse, *Cancer Letters*, 2002; 188: 181-189
71. Rooney, P., Kumar, S., Ponting, J., The role of hyaluronan in tumor neovascularization (review), *Int. J. Cancer*., 1995; 60: 632-636
72. Ichikawa, T., Itano, N., Sawai, T., Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells, *J. Invest. Dermatol*, 1999; 113: 935-939
73. Setälä, L. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate, *British Journal of Cancer*, 1999; 79: 1133-1138
74. Hall, C. L., Turley, E. A., Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis, *Journal of Neuro-Oncology*, 1995; 26: 221-229

75. Turley, E. A., Hyaluronan and cell locomotion, *Cancer Metastasis Rev.*, 1992; 11: 21-30
76. Lokeshwar, V. B., Obek, C., Pham, H. T., Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade, *The Journal of Urology*, 2000; 163: 348-356
77. Lokeshwar, V. B., Obek, C., Soloway, M. S., Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive urine marker for bladder cancer, *Cancer. Res.*, 1997; 57: 773-777
78. Drobnik, J., Hyaluronan in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991; 7: 295-308
79. Chen, M. J., Peng, Y., Yang, Y. S., Increased hyaluronan and CD44 expressions is intravenous leiomyomatosis, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2005; 84: 322-328
80. Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L. V., Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005; 13(17): 5043-54
81. Luo, Y., Prestwich, D. G., Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate, *Bioconjugate Chem.*, 1999; 10: 755-763
82. Luo, Y., Ziebell, R. M., Prestwich, G. D., A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells, *Biomacromolecules*, 2000; 1: 208-218
83. Coradini, D., Pellizzaro, C., Maglierini, G., Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line, *International Journal of Cancer*, 1999; 81: 411-416
84. Speranza, A., Pellizzaro, C., Coradini, D., Hyaluronic acid butyric esters in cancer therapy, *Anti-Cancer Drugs*, 2005; 16: 373-379
85. Akima, K., Ito, H., Iwata, Y., Evaluation of antitumor activities of hyaluronate binding antitumor drugs: Synthesis, Characterization and antitumor activity, *Journal of Drug Targeting*, 1996; 4: 1-8
86. Luo, Y., Bernshaw, J. N., Lu, Z-R., Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates, *Pharm. Res.*, 2002; 19: 396-402

87. Eliaz, E. R., Szoka, F. C., Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: A strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells, *Cancer Research*, 2001; 61: 2592-2601
88. Esposito, E., Menegatti, E., Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study, *Int. J. Pharm.*, 2005; 288: 35-49
89. Hedén P, Sellman G, von Wachenfeldt M., Body shaping and volume restoration: the role of hyaluronic acid, *Aesthetic. Plast. Surg.*, 2009; 33(3): 274-82
90. Andre, P., Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2004; 23(4): 218-22
91. Gosh P., Guidolin, D., Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: Are the effects molecular weight dependent?, *Semin. Arthr. Rheum.*, 2002; 32: 10
92. Leopold, S.S., Redd, B.B., Warne, W.J., Corticosteroid compared with hyaluronic acid injections for the treatment of osteoarthritis of the knee. A prospective, randomized trial, *J. Bone. Joint. Surg. Am.*, 2003; 85-A(7): 1197-203
93. Maneiro, E., de Andres, M.C., Fernández-Sueiro, J.L., The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes: the importance of molecular weight, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2004; 22(3): 307-12
94. Brzusek D., Petron D., Treating knee osteoarthritis with intra-articular hyaluronans, *Current medical research and opinion*, 2008; 24: 3307-3322
95. Sobotka, L.: *Sestra*, 2004; 6: 20-21
96. Chen, J. W. Y., Abatangelo, G., Functions of hyaluronan in wound repair, *Wound Rep. Reg.*, 1999; 7: 79-89
97. Lázníček, M., Komárek, P., *Základy radiofarmacie, Karolinum, Praha*, 1997
98. Chalabala, M., a kol., *Technologie léků, Galén, Praha*, 2001
99. Květina J., a kol., *Radiofarmaka, Avicenum, Praha*, 1987

100. Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Pertoft, H., Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit, *Biochem. J.*, 1981; 200: 415-424
101. Thierry, B., Winnik, M.F., Merhi, Y., Radionuclides-hyaluronan-conjugate thromboresistant coatings to prevent from in-stent restenosis, *Biomaterials*, 2004; 25: 3895-3905
102. Ivanov, P.I., Bontchev, G.D., Bozhikov, G.A., Study of the  $^{111}\text{In}$ -DTPA complex by the electromigration method, *Applied radiation and isotopes*, 2003; 58: 1-4
103. Weigel, P.H., McGary, C.T., Weigel, J.A., Use of iodinated hyaluronan derivatives to study hyaluronan binding, endocytosis, and metabolism by cultured cells, *Methods Enzymol.*, 2003; 363: 382-91
104. Lazničková, A., Osobní konzultace
105. Northup, S.N., Ostasiw, O.R., Brown, H.D., Development of the hyaluronidase activity assay as a cancer screening test, *Clin Bioch.*, 1973; 6, 220-228
106. Lepperdinger, G., Mullegger, J., Kreil, G., Hyal2-less active, but more versatile? *Matrix Biol.*, 2001; 20: 509-514.
107. Muckenschnabel, I., Bernhardt, G., Spruss, S., Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers, *Cancer Letters*, 1998; 131: 13-20
108. Lázníček, M., Osobní konzultace