

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

Zina Schúrrerová

**^{99m}Tc -methylen difosfonát: Studium stability a mezidruhové
srovnání interakcí v centrálním distribučním kompartmentu**

(rigorózní práce)

vedoucí rigorózní práce : Prof.PharmDr.Ing. Milan Lázníček, CSc.
zadáno : 2004

Handwritten signature

Dovoluji si poděkovat Prof.PharmDr.Ing.Milanu Lázníčkoví, CSc. a RNDr. Petru Kafkovi, CSc. za odborné vedení a pomoc při práci a všem, kteří byli nápomocni vypracování této práce.

OBSAH

Cíl práce.....	4
A. Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -MDP.....	5
1. Teoretická část.....	6
1.1. Nukleární diagnostika.....	7
1.2. Technecium - ^{99m}Tc	9
1.3. ^{99m}Tc -methyldifosfonát (MDP).....	11
1.4. Radiochemická čistota.....	15
1.5. Tenkovrstvá chromatografie ^{99m}Tc -radiofarmak.....	16
2. Experimentální část.....	18
2.1. Materiál.....	19
2.2. Metodika.....	21
2.3. Výsledky.....	23
2.4. Diskuse.....	32
2.5. Závěr.....	35
B. Stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -MDP.....	36
1. Teoretická část.....	37
1.1. Farmakokinetika léčiv.....	38
1.2. Vazebnost léčiv na elementy krve.....	41
1.2.1. Vazebnost na albumin.....	43
1.2.2. Vazebnost na lipoproteiny.....	45
1.2.3. Vazebnost na α_1 -kyselý glycoprotein.....	47
1.2.4. Vazebnost na erytrocyty.....	49
1.3. Stanovení vazebnosti – rovnovážná dialýza.....	51
2. Experimentální část.....	53
2.1. Materiál.....	54
2.2. Metodika.....	56
2.3. Výsledky.....	61
2.4. Diskuse.....	72
2.5. Závěr.....	75
Literatura.....	76

Cíl práce

A. Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -MDP připraveného z kitu v časovém rozmezí 15 minut až 48 hodin po přípravě radiofarmaka :

1. U komerčně dodávaného kitu firmy Lacomed s.r.o.
2. U kitu připraveného na oddělení nukleární medicíny FN v Hradci Králové
3. U komerčně dodávaného kitu firmy Lacomed s.r.o., u něž byla mnohonásobně překročena doba expirace
4. U komerčně dodávaného kitu firmy Lacomed s.r.o. uchovávaného za nestandardních podmínek (6 dní při teplotě 50°C)

B. Stanovení vazebnosti ^{99m}Tc -MDP na plasmatické bílkoviny a distribuce do krevních buněk z hlediska mezidruhového srovnání

Handwritten signature

**A. STANOVENÍ RADIOCHEMICKÉ
ČISTOTY ^{99m}Tc -MDP**

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Nukleární diagnostika

Nukleární medicína vznikla jako jeden z nejmladších lékařských oborů, jehož úkolem je využití otevřených radioaktivních zářičů v diagnostice, terapii a v lékařském výzkumu.(1)

Pro použití in vivo lze používat jen těch radioaktivních látek, která splňují všechna kritéria farmaka dle lékopisu – hovoříme pak o radioaktivních farmacích. Musí vyhovovat všem kontrolním testům jako běžné léky, aby mohla být bezpečně podána lidem. Obvykle však nemají žádný farmakologický účinek, nevykazují žádný vztah mezi farmakologickou dávkou a účinkem a tím se liší od běžných léků. Z hlediska účelu použití dělíme radiofarmaka na radiodiagnostika a radioterapeutika. Více než 95% radiofarmak slouží pro diagnostické účely.(2)

Nukleární diagnostika jsou jak samotné radionuklidy, tak i značené sloučeniny, upravené do příslušné lékové formy, které se aplikují do organismu za účelem získání diagnostické informace.(3) Při návrhu nového farmaka je nejprve vybrána vhodná látka na základě své farmakokinetiky. Musí se buď přednostně hromadit v daném orgánu nebo se musí účastnit příslušné fyziologické funkce. Potom je na takto vybranou látku navázán vhodný radionuklid. Po podání vzniklého diagnostika člověku je radioaktivní záření z něho emitované registrováno detektorem umístěným vně pacientova těla. Podaná radioaktivita musí být dostatečně vysoká pro získání dobrých výsledků a jejich správnou interpretaci a dostatečně nízká vzhledem k minimalizaci absorbované dávky pro pacienta. V diagnostice proto musíme upřednostnit čisté gama zářiče s krátkým fyzikálním poločasem, vyvolávající podstatně menší ionizaci než např. zářiče beta užívané v radioterapii. V menší míře se pak používá pozitronových zářičů.(2)

Radionuklidové zobrazování je tedy založeno na schopnosti detekovat zevně umístěným detektorem elektromagnetické záření vycházející z radionuklidu podaného do těla a akumulovaného

v příslušném orgánu. Jako zobrazovací zařízení se používá scintilační kamera nebo gamakamera, která nám poskytuje planární obraz. K získání prostorového obrazu byla vyvinuta tomografická zařízení. Podle použitého radionuklidu rozlišujeme dva druhy emisní tomografie: PET (pozitronová emisní tomografie) a SPECT (jednofotonová emisní tomografie), která je v dnešní době nejužívanější zobrazovací metodou v nukleární medicíně.

Důležitou výhodou nukleární medicíny jako diagnostické metody je zejména neinvazivní charakter, který umožňuje použití rovněž v pediatrii a při sledování zdravotního stavu pacienta a hodnocení terapie mnoha onemocnění. (2)

1.2. Technecium - ^{99m}Tc

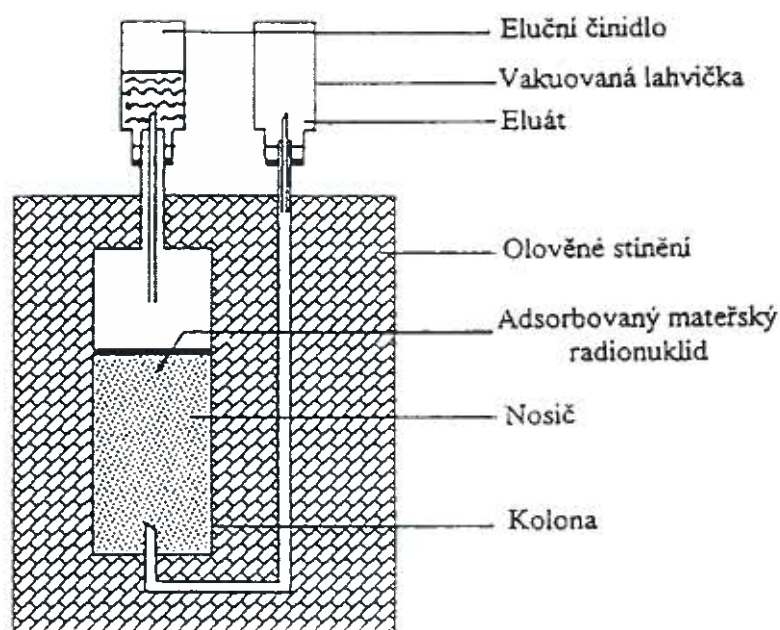
V nukleární medicíně patří k nejpoužívanějším radionuklidům ^{99m}Tc . Tento radionuklid má ideální fyzikální vlastnosti pro diagnostiku in vivo – je to čistý gama zářič s energií 140 keV, která je optimální pro detekci moderními gamakamerami a s fyzikálním poločasem pouhých 6 hodin. Z tohoto důvodu můžeme pacientům aplikovat radioaktivitu stovek megabecquerelů (MBq), což nám umožní získat obrazy výborné kvality při udržení nízké absorbované dávky pro pacienta. ^{99m}Tc je snadno dostupné ve sterilní, apyrogenní a beznosičové formě z molybden – techneciových generátorů.

Radionuklidový generátor je tvořen skleněnou chromatografickou kolonou umístěnou v olověném stínícím válci. Kolona je naplněna adsorpčním materiálem, na který je vázán mateřský radionuklid (^{99}Mo), ten se samovolně přeměňuje na dceřinný (^{99m}Tc). Vzhledem k tomu, že dceřinný prvek má odlišné chemické vlastnosti, může být z kolony vymyt (eluován) vhodným činidlem – obvykle fyziologickým roztokem. Po vymytí dochází k nové produkci dceřinného radionuklidu, který může být opakovaně vymýván. $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$ generátor je možno takto používat týden až 10 dní. ^{99m}Tc je eluováno fyziologickým roztokem ve formě technecistanu sodného ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). Eluát nesmí obsahovat mateřský radionuklid ani adsorpční materiál a musí být sterilní a nepyrogenní. Princip generátoru je znázorněn na obr.1.

^{99m}Tc ve formě technecistanu je málo reaktivní a pouhým přidáním není možno označit žádnou sloučeninu. Pro zvýšení reaktivity je nutno ^{99m}Tc nejprve redukovat do nižších oxidačních stupňů. Rutinně nejpoužívanější chemickou látkou pro redukcí ^{99m}Tc jsou cínaté ionty, nejčastěji ve formě chloridu. V současné době jsou pro výrobu ^{99m}Tc značených radiofarmak běžně na trhu dostupné hromadně vyráběné neradioaktivní soupravy – kity. Ty jsou připravovány ze sloučeniny, která má být označena a cínatých iontů v příslušné formě a množství. Acidita je upravena a rovněž jsou

přítomny konzervační a sterilizační látky. Takto vzniklý roztok je lyofilizován (vysušen mražením) a lahvička soupravy je vyplněna sterilním dusíkem, aby se zabránilo oxidaci cínatých iontů vzdušným kyslíkem. Kity mají dlouhou expirační dobu, mohou být tedy skladovány a použity k výrobě radiofarmaka v době jeho bezprostřední potřeby. Značení ^{99m}Tc je pak možno provést pouhým přidáním technecistanu sodného.

Použití radionuklidových generátorů a komerčně dostupných kitů významně usnadnilo výrobu radiofarmak přímo na odděleních nukleární medicíny. (2)



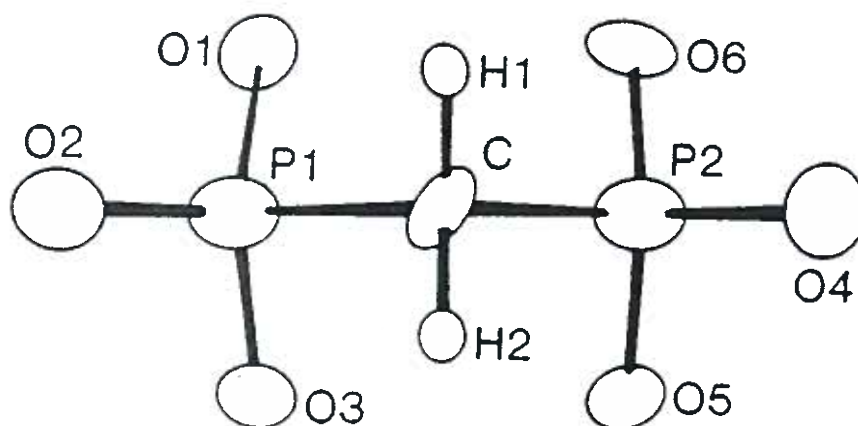
Obr.1: Schéma radionuklidového generátoru

1.3. ^{99m}Tc -methylen difosfonát (MDP)

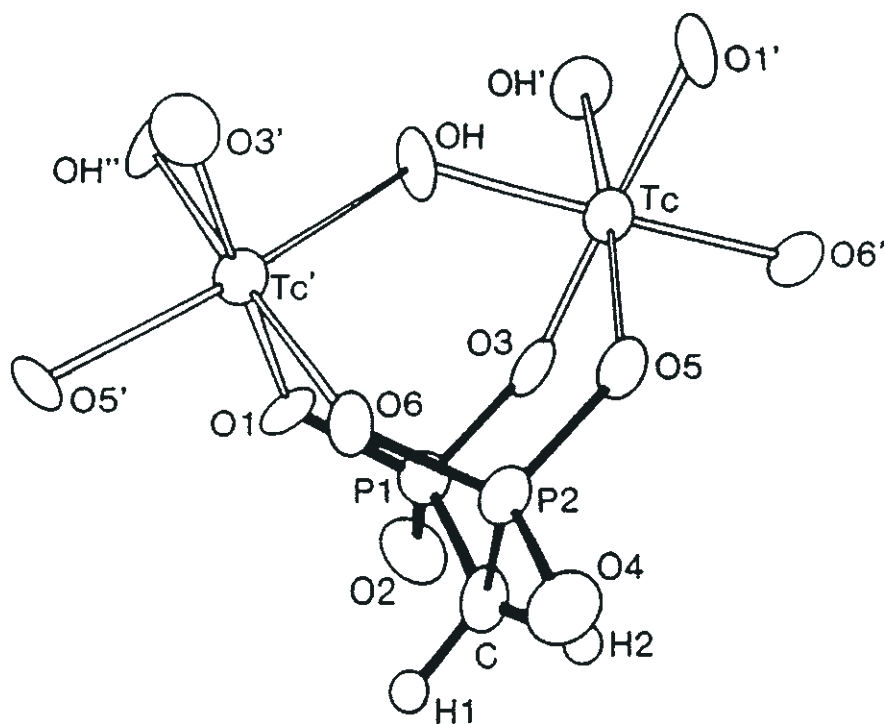
Komplex ^{99m}Tc -MDP byl navržen jako kostní diagnostikum v roce 1973.(4) Rozšířil tak řadu do té doby používaných komplexů technecia s polyfosfáty a 1-hydroxyetyliden difosfonátem (HEDP). Následné srovnávací studie však již tehdy prokázaly významné výhody při použití nové látky. ^{99m}Tc -MDP komplex poskytuje zobrazení ve výborné kvalitě již do dvou hodin po aplikaci (4 hodiny u ostatních) a renální exkrece probíhá rovněž značně rychleji.(5) Tyto poznatky předurčily nové radiofarmakum pro další využití v nukleární diagnostice.

Dnes je ^{99m}Tc -MDP běžně používaným diagnostikem určeným k označení oblastí se změněnou osteogenezí. Uplatňuje se při zobrazení zlomenin, osteomyelitidy, reumatoidní artritidy, kostních nádorů nebo kostních metastáz některých primárních nádorů jako jsou karcinom prsu, plic, prostaty apod. (6) Z četných studií mechanismu vychytávání difosfonátových komplexů v kostech se obecně předpokládá, že se ^{99m}Tc -MDP kumuluje na místech aktivního kostního metabolismu. Kanishi ve své práci odhaluje možnost dvojího mechanismu kumulace ^{99m}Tc -MDP v kosti – adsorpce na povrch hydroxyapatitu a přímé začlenění do krystalické struktury hydroxyapatitu. Následně pak vylučuje vazbu na organickou část kosti (kolagen, buňky). (7) Mikrokrystaly hydroxyapatitu jsou primárně tvořeny z kalcium fosfátu a v malém rozsahu z karbonátu a hydroxidu, mají obrovský povrch a umožňují tak neobyčejně snadnou výměnu svých složek za složky vyskytující se v tkáňových tekutinách. Přeměna podílu této části kostní tkáně je tedy považována při posuzování metabolických přeměn za rozhodující. Změny souvisí hlavně s pohybem a metabolismem kalcia.(8) A právě afinita difosfonátů k pevným kalciovým ložiskům umožňuje diagnostické využití ^{99m}Tc -MDP. Zobrazení struktury MDP nám usnadňuje pochopení tohoto mechanismu. Plošné W molekuly se jeví kolmo na rovinu papíru (O2-P1-C-P2-O4) s potenciálně koordinačními kyslíky O1 a

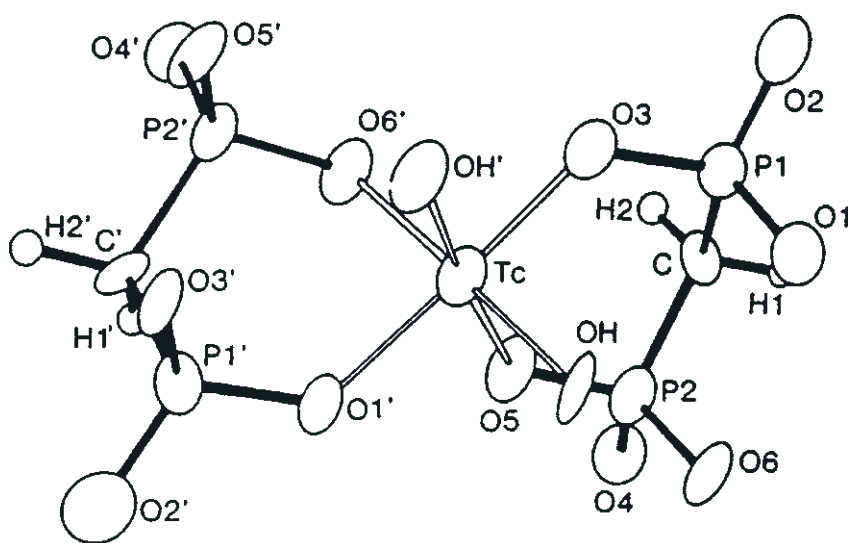
O6 na jedné straně W-roviny a O3 a O5 na druhé straně. (obr.2)
Koordinace jedné molekuly MDP s dvěma centrálními atomy technecia je ukázáno na obr.3. Koordinace jednoho Tc se dvěma molekulami MDP pak zanechává dvě potenciální místa pro kalcium hydroxyapatitu ke koordinaci s O3' a O5' na jednom MDP a O1 a O6 na dalším MDP – obr.4. (9)



Obr.2: Struktura methylen difosfonátu



Obr.3: Strukturální vzorec – koordinace dvou atomů Tc s jednou molekulou MDP



Obr.4: Strukturální vzorec – koordinace jednoho atomu Tc se dvěma molekulami MDP

^{99m}Tc -MDP se může kumulovat i na mnoha místech mimo kostní tkáň vlivem různých benigních a maligních změn.(10) Normálně se distribuuje do měkkých tkání pouze 2-10% ^{99m}Tc -MDP v závislosti na hydrataci a renální funkci. U patologických stavů provázených hyperémií (např. zánět) a změnou kapilární permeability může průnik do měkkých tkání stoupat. Jistý vliv na změnu distribuce radiofarmaka byl pozorován i se zvýšením hladiny fosfátů v tkáních.(11) Mimokostní přítomnost kalcia pak samozřejmě vede ke zvýšené vazbě MDP, což je často evidentní mnohem dříve než lze tato místa detekovat na běžných přístrojích. Běžně můžeme tedy počítat s kumulací MDP v místech infekce měkkých tkání, v místech po předešlém chirurgickém zákroku (jizva), traumatu, po úporném svalovém cvičení (svalové hematomy), u větších svalových nekrot (rhabdomyolýza), ischemií, popálenin.... Následně pak můžeme odhalit různé orgánové změny jako srdeční nebo mozkové infarkty, žilní trombózy, ledvinové záněty nebo kameny a některé primární nádory nebo metastázy. (10) Tato zjištění vedou samozřejmě k dalším možnostem využití ^{99m}Tc -MDP v klinickém hodnocení stavu pacienta.

Vývoj v oblasti radiofarmak neustále probíhá, máme k dispozici množství srovnávacích studií mezi ^{99m}Tc -MDP a dalšími látkami z hlediska hodnocení jejich využití při diagnóze daného patologického stavu. Pro příklad můžeme uvést ^{99m}Tc -citrát, u kterého se předpokládá odlišná lokalizace v kosti pravděpodobně v organické matrix.(12) Nebo ^{99m}Tc -ABP (alendronát), který se jeví býti dokonce lepším kostním diagnostikem.(13) ^{99m}Tc -MIBI (methoxyizobutyl-izonitril) se zdá užitečný v hodnocení některých muskuloskeletárních nádorů.(14) Z pozitronových zářičů může konkurovat ^{18}F ve formě fluoridu.(15) Rozvoj radioimunoanalýzy pak vede k vývoji nových tumorových markerů jako je např. CA 15-3 (cancer antigen), který pomocí jednoduché metody odhaluje přítomnost metastáz u žen s karcinomem prsu.(16) S ohledem na tyto vědecké pokroky však můžeme říci, že ^{99m}Tc -MDP má v moderní diagnostice stále široké uplatnění v každodenní praxi.

1.4. Radiochemická čistota

Jelikož jsou radiofarmaka přípravky určené k podání člověku, musí splňovat požadavky řady přísných kontrolních testů. Používají se veškeré kontrolní testy jako u neradioaktivních léků – chemické a fyzikálně chemické metody (stanovení chemické čistoty apod.) a biologické zkoušky (sterilita, pyrogenní látky). Navíc je nutno provést měření radioaktivity, radionuklidové a radiochemické čistoty. Zavedení kitů a užívání krátkodobých radionuklidů vyžaduje provádění testů kontroly kvality přímo na pracovišti nukleární medicíny dříve, než je možné povolit jejich podání pacientům. (2,17)

Radiochemická čistota je jedním z důležitých parametrů kvality radiofarmak. Je definována jako část celkové radioaktivity obsažená v přípravku v požadované chemické formě a je vyjádřena v procentech. Radiochemické nečistoty vznikají u radiofarmak jako důsledek změn (rozkladu) požadované chemické formy např. působením rozpouštědla, teploty, světla nebo radiolýzou popř. dochází k vazbě radionuklidu na chemické nečistoty v přípravku. Přítomnost radiochemických nečistot v radiofarmaku má za následek zkreslení scintigrafických obrazů v důsledku nízké akumulace v cílovém orgánu a vysoké akumulace v okolních tkáních. V důsledku změny biodistribuce se navíc může nepřiměřeně zvýšit absorbovaná dávka pacientem. Ke stanovení radiochemické čistoty může být v principu použita jakákoliv analytická separace, avšak s přihlédnutím k rychlosti a jednoduchosti se nejčastěji používá chromatografie na plošných nosičích. (2,17)

1.5. Tenkovrstvá chromatografie

^{99m}Tc -radiofarmak

Tenkovrstvá chromatografie je nejběžněji užívaná metoda pro stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc - radiofarmak. Principem této analytické metody je pohyb mobilní fáze (rozpouštědla) po tenké vrstvě stacionární fáze (sorbent). V závislosti na různé distribuci mezi stacionární a mobilní fází putují jednotlivé složky vzorku různou rychlostí a tím dojde k separaci. Vzdálenost každé složky vzorku je vyjádřena hodnotou Rf. Rf je relativní poloha složky ve vztahu k čelu mobilní fáze a je specifická pro jednotlivé chemické sloučeniny.

Jako stacionární fáze jsou dnes nejčastěji používány rychle se vyvíjející tenké vrstvy ITLC (Instant Thin – Layer Chromatography). Jsou používány pro rychlou a přesnou analýzu radiochemické čistoty na odděleních nukleární medicíny v nemocnicích a také jsou doporučovány pro stanovení mnoha radiofarmak v Evropském lékopisu. ITLC materiál je tvořen vrstvou skleněných vláken impregnovanou silikagelem (př. ITLC-SG, GELMAN Sc.) nebo kyselinou křemičitou (př. ITLC-SA, GELMAN Sc.). Materiál je sice sám o sobě drahý, ale může být nastříhán na malé proužky cca 1cm. To výrazně snižuje náklady bez ovlivnění výsledku. Proužky jsou velmi křehké, proto je třeba zvýšené opatrnosti při manipulaci. Stejným způsobem jako ITLC materiály se používají i různé typy papíru. Mají sice horší vlastnosti, ale jsou mnohem dostupnější, dají se dobře stříhat, a tak jsou v mnoha případech stále používány (př. Whatman No 1, Whatman 3 MM, Whatman 31ET)

Výběr mobilní fáze záleží nejvíce na chemických vlastnostech dané sloučeniny a možných nečistotách. Hlavními nečistotami v ^{99m}Tc radiofarmaceutických přípravcích je nezreagovaný technecistan ($^{99m}\text{Tc O}_4$)⁻ a hydrolyzované (redukované) technecium – koloid. Použitím silikagelu nebo papíru jako stacionární fáze závisí chování technecistanu na jeho rozpustnosti v mobilní fázi. V polárním

rozpouštědla jako je fyziologický roztok, 80% methanol, aceton nebo methylethylketon, technecistan putuje s čelem mobilní fáze ($R_f=0,8-1$). Naopak v nepolárním, lipofilním rozpouštědle (např. ethylacetát, chloroform) a při vysušení vzorku (žádný obsah vody), technecistan zůstává na startu. Tc – koloid neputuje v žádném TLC systému, protože to je nerozpustný koloidní materiál, a tak zůstává na startu ($R_f=0,0$). Žádná změna v mobilní fázi nemůže změnit chování koloidu. Pro kontrolu radiofarmak značených ^{99m}Tc jsou tak ve většině případů používány dvě vyvíjecí soustavy. V jedné soustavě se stanoví množství technecistanu a ve druhé je pak stanoven koloid.

Pro vyvíjení chromatogramu se používají skleněné kyvety, které se plní rozpouštědlem asi do výšky 5mm. Zakrytím zamezíme vypařování rozpouštědla. Na chromatografickou vrstvu se nanáší vzorek obvykle o objemu cca 5 μl . Příliš velké množství vzorku by mohlo mít za následek nedostatečnou separaci a falešné výsledky. Vysoušení skvrny se nedoporučuje kromě případu, kdy použijeme mobilní fázi nemísící se s vodou (chloroform). Chromatogram je vložen svisle do vyvíjecí kolony, rozpouštědlo musí být vždy pod linií aplikace vzorku. Materiály s malou mechanickou pevností musí být připevněny (např. na skleněnou tyčinku v koloně), jinak mohou sklouznout do roztoku nebo se dotýkat stěny kolony během vyvíjení. Hotový chromatogram vyndáme z kolony, označíme čelo a vysušíme.

Existuje několik metod vyhodnocení chromatogramů. Obvykle se používají různé scintilační detektory. V jednodušším případě změříme celý chromatogram, nebo můžeme proužky chromatogramů rozstříhat na několik částí a samostatně změřit. U všech metod se radiochemická čistota počítá z poměru radioaktivity požadované složky k celkové radioaktivitě a vyjadřuje se v procentech.(18) Požadavky výrobce i Českého lékopisu 2002 na radiochemickou čistotu ^{99m}Tc -MDP jsou : Procento aktivity odpovídající technecistanovému iontu na chromatogramu získanému v jedné soustavě není větší než 2,0 % a součet procent aktivity odpovídající nečistotám na chromatogramech získaných z obou soustav (včetně technecistanového iontu) není větší než 5,0 %. (19)

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Materiál

Vzorky

Vzorek 1 : 8 – MDP kit pro přípravu injekce ^{99m}Tc – MDP

složení : 8,0 mg MDP
0,6 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0 mg kys.gentisová

č.š. 053 exp. 25.3.04

výrobce : ÚJV Řež, a.s.

Vzorek 2 : magistraliter připravený 5 – MDP kit

složení : 5,0 mg MDP
0,25 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0 mg kys.gentisová

č.š. 9.2.04 exp. 9.8.04

výrobce : oddělení nukleární medicíny FN v HK

Vzorek 3 : 7,5 – MDP kit pro přípravu injekce ^{99m}Tc – MDP

složení : 7,5 mg MDP Na_2
0,45 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

č.š. 134 exp. 20.4.95

výrobce : ÚJV Řež

Vzorek 4 : viz vzorek 1

Vzorky 1 a 2 uchovávají za předepsaných podmínek tj. 5-15°C a s vyhovující expirací

Vzorek 3 uchovává za běžné pokojové teploty a s prošlou expirací téměř 9 let

Vzorek 4 uchovává za nestandardních podmínek tj. 50°C po dobu 6 dní, expirace viz vzorek 1

Generátor

$^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátor Drygen, aktivita $A = 12,5 \text{ GBq}$ ke dni dodání,
dodavatel : oddělení nukleární medicíny FN v HK

Chromatografické soustavy

Laboratorní pomůcky : 2 skleněné kyvety s víkem, skleněná tyčinka,
svorky k připevnění stacionární fáze,
pipeta o objemu $5\mu\text{l}$, stříkačky, jehly

Stacionární fáze : 1.soustava : tenká vrstva ITLC SG
2.soustava : papír Whatman 4

oba materiály nastříhány na cca 1 cm proužky

Mobilní fáze : 1.soustava : roztok NaCl 0,15 mol/l (0,9%)
2.soustava : směs aceton – voda v poměru 9:1

aceton dodala firma Lachema a.s., č.atestu 30 020 0155

Ostatní

Natrium chloratum Biotika sol. isotonika injekcie č.š. 030600 pro
ředění eluátu z generátoru technecia

2.2. Metodika

Postup :

Kontrola radiochemické čistoty byla provedena chromatografií na tenké vrstvě ITLC SG a papíře – tj.ve dvou soustavách. V 1. soustavě na tenké vrstvě se stanoví obsah redukováného hydrolyzovaného technecia, které při vyvíjení roztokem chloridu sodného 0,15 mol/l zůstává na startu, zatímco volný technecistan a komplex $^{99m}\text{Tc-MDP}$ putuje s čelem mobilní fáze. Ve 2. soustavě na papíře se stanoví obsah technecistanu, který se při vyvíjení směsí aceton-voda (9:1) pohybuje s čelem mobilní fáze. Postup byl zvolen podle doporučení výrobce.

K obsahu lahvičky každého vzorku se pomocí injekční stříkačky přidalo přes zátku 5ml injekčního roztoku technecistanu sodného o celkové aktivitě cca 20MBq. (Sterilní eluát z generátoru technecia se ředil sterilním isotonickým roztokem chloridu sodného). Obsah lahvičky se promíchal a vzorky se odebíraly v intervalech 15min, 6h, 24h a 48h. Nejprve se injekční stříkačkou odebralo množství cca 0,5ml do zkumavky a potom bylo pipetováno 5 μ l přímo na start stacionární fáze obou chromatografických soustav. U časových intervalů 24 a 48 hodin se aplikovalo dvojnásobné množství z důvodu velkého poklesu aktivity γ -zářiče (poločas rozpadu ^{99m}Tc je 6 hodin). Po aplikaci vzorků byly proužky stacionární fáze ponořeny do vyvíjecích soustav. Hotové chromatogramy byly vysušeny, rozstříhány na deset částí a u každé byla změřena aktivita na automatickém měřiči γ -aktivity 1480 WIZARD (Wallac). Od každého vzorku byly k dispozici dvě lahvičky přípravku, pro každou z nich byla provedena dvě měření v obou soustavách. To znamená, že pro jeden vzorek získáme čtyři výsledky z každé soustavy.

Pro ověření správnosti postupu byl stejným způsobem změřen vzorek samotného technecistanu (eluát z generátoru o aktivitě cca 1mCi) a vzorek hydrolyzovaného technecia (eluát + SnCl_2 v konc. HCl úprava pH na 6-7 pomocí NaOH) opět v obou soustavách.

Výpočty :

Z každého chromatogramu bylo změřeno 10 hodnot aktivity. Jelikož rozložení aktivity všech složek vzorku se nalézá v blízkosti startu a čela chromatogramu, je možno celkovou aktivitu počítat :

$$A = A_1 + A_2 + A_7 + A_8 + A_9 + A_{10}$$

A – celková aktivita chromatogramu

A₁₋₂ – aktivita v blízkosti startu

A₇₋₁₀ – aktivita v blízkosti čela

V 1.chromatografické soustavě je tedy množství koloidu dáno vztahem :

$$\%koloidu = \frac{A_1 + A_2}{A} \times 100$$

Ve 2.chromatografické soustavě je pak množství volného technecianu dáno vztahem :

$$\%technecis. = \frac{A_7 + A_8 + A_9 + A_{10}}{A} \times 100$$

Výsledná hodnota radiochemické čistoty je dána množstvím komplexu ^{99m}Tc-MDP vyjádřeno v procentech :

$$\%komplexu = 100 - \%koloidu - \%technecis.$$

2.3. Výsledky

Tabulky :

Tab. 1 : Radiochemická čistota (RČ) – vzorek 1 interval 15 min

	číslo měření			
% zastoupení	1	2	3	4
technecistan	1,648	0,532	3,507	0,458
koloid	4,636	0,445	0,870	0,703
komplex	93,716	99,023	95,623	98,839
RČ	96,800 ± 2,236			

Tab. 2 : Radiochemická čistota – vzorek 1 - oprava

	Čas měření			
% zastoupení	15min	6 hod	24 hod	48 hod
technecistan	0,069	0,043	1,739	1,269
	0,033	0,035	0,262	1,912
	0,038	0,006	1,022	1,016
	0,019	0,025	1,142	1,427
koloid	0,288	0,332	0,992	2,022
	0,281	0,240	0,661	1,659
	0,190	0,214	0,967	2,540
	0,242	0,201	0,944	2,002
komplex	99,643	99,625	97,268	96,709
	99,686	99,725	99,077	96,429
	99,772	99,780	98,011	96,444
	99,739	99,774	97,914	96,570
Průměr. hod.	99,710	99,726	98,068	96,538
Směr. odchylka	0,057	0,072	0,749	0,130

Tab. 3 : Radiochemická čistota – vzorek 2

% zastoupení	Čas měření			
	15min	6 hod	24 hod	48 hod
technecistan	0,180	0,175	0,562	2,025
	0,110	0,095	0,116	1,407
	0,152	0,102	0,988	1,889
	0,173	0,091	0,115	0,640
koloid	3,004	1,603	1,362	3,547
	2,745	2,106	1,467	4,605
	2,509	1,549	1,019	1,457
	3,525	2,011	1,221	2,048
komplex	96,816	98,222	98,076	94,429
	97,145	97,798	98,416	93,988
	97,339	98,349	97,993	96,654
	96,303	97,898	98,664	97,312
Průměr. hod.	96,901	98,067	98,287	95,596
Směr. odchylka	0,453	0,261	0,311	1,634

Tab. 4 : Radiochemická čistota – vzorek 3

% zastoupení	Čas měření			
	15min	6 hod	24 hod	48 hod
technecistan	0,022	0,088	0,323	0,013
	0,021	0,077	0,272	0,013
	0,032	0,083	0,213	0,010
	0,026	0,096	0,262	0,898
koloid	3,265	0,583	0,188	0,544
	0,523	0,733	0,191	0,409
	0,312	0,462	0,190	0,677
	0,465	0,430	0,169	0,503
komplex	96,713	99,329	99,489	99,443
	99,456	99,190	99,537	99,578
	99,656	99,455	99,597	99,313
	99,509	99,474	99,569	98,599
Průměr. hod.	98,834	99,362	99,548	99,233
Směr. odchylka	1,416	0,131	0,046	0,436

Tab. 5 : Radiochemická čistota – vzorek 4

% zastoupení	Čas měření			
	15min	6hod	24hod	48hod
technecistan	0,007	0,007	0,038	0,488
	0,008	0,005	0,077	0,042
	0,015	0,021	0,009	0,195
	0,017	0,021	0,037	0,137
koloid	0,256	0,298	0,338	0,021
	0,245	0,306	0,276	0,014
	0,167	0,218	0,291	0,016
	0,171	0,448	0,246	0,048
komplex	99,737	99,695	99,624	99,491
	99,747	99,689	99,647	99,944
	99,818	99,761	99,700	99,789
	99,812	99,531	99,717	99,815
Průměr. hod.	99,779	99,669	99,672	99,760
Směr. odchylka	0,042	0,098	0,044	0,192

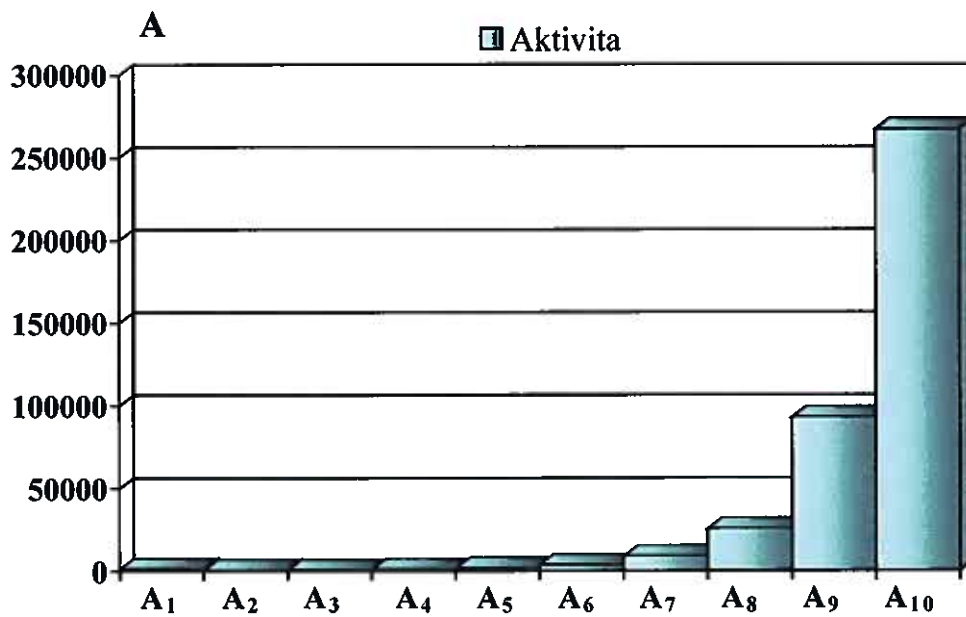
Tab. 6 : Ověření postupu – stanovení samotného technecistanu a koloidu

% zastoupení	chromatografická soustava	
	1	2
technecistan	99,900	99,810
koloid	99,540	99,940

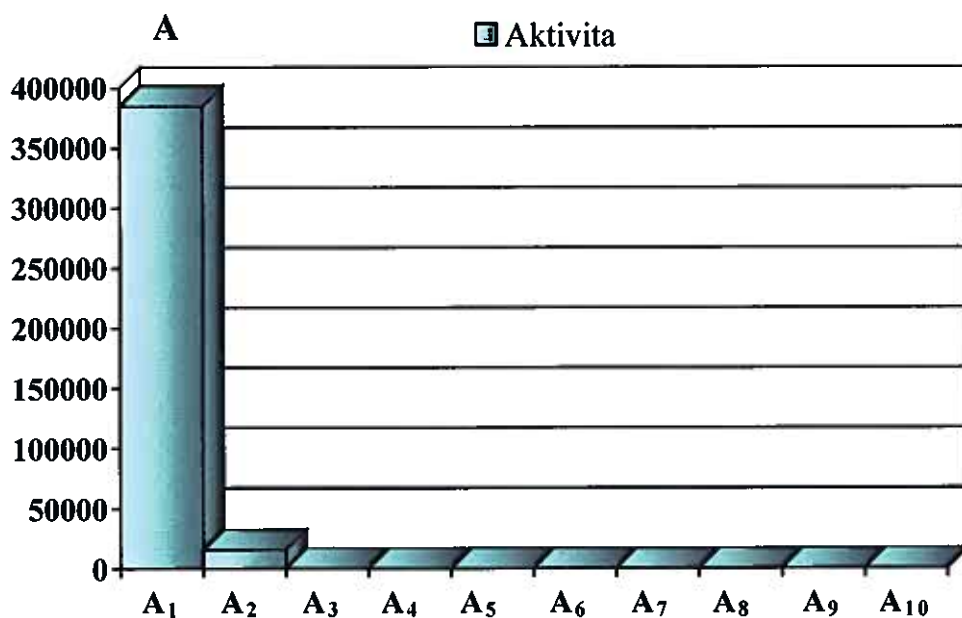
Grafy :

Graf 1 : Příklad rozložení aktivity na chromatogramu

a) 1. soustava - 0,9 % NaCl

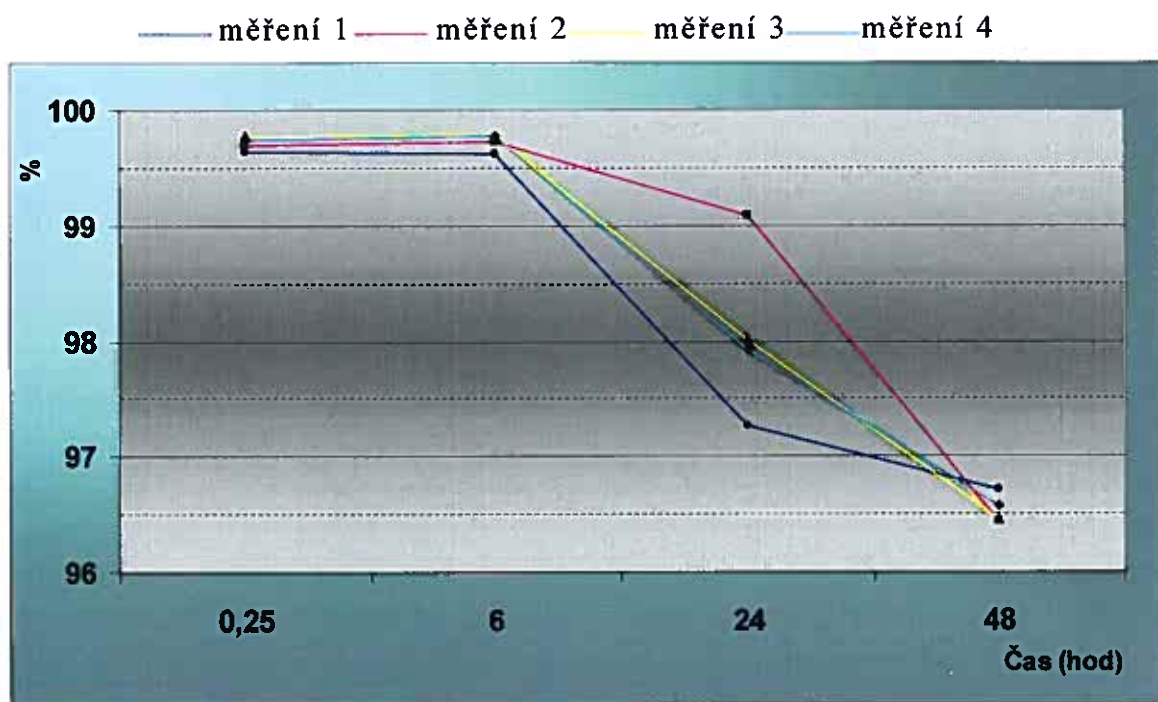


b) 2. soustava – aceton : voda (9:1)

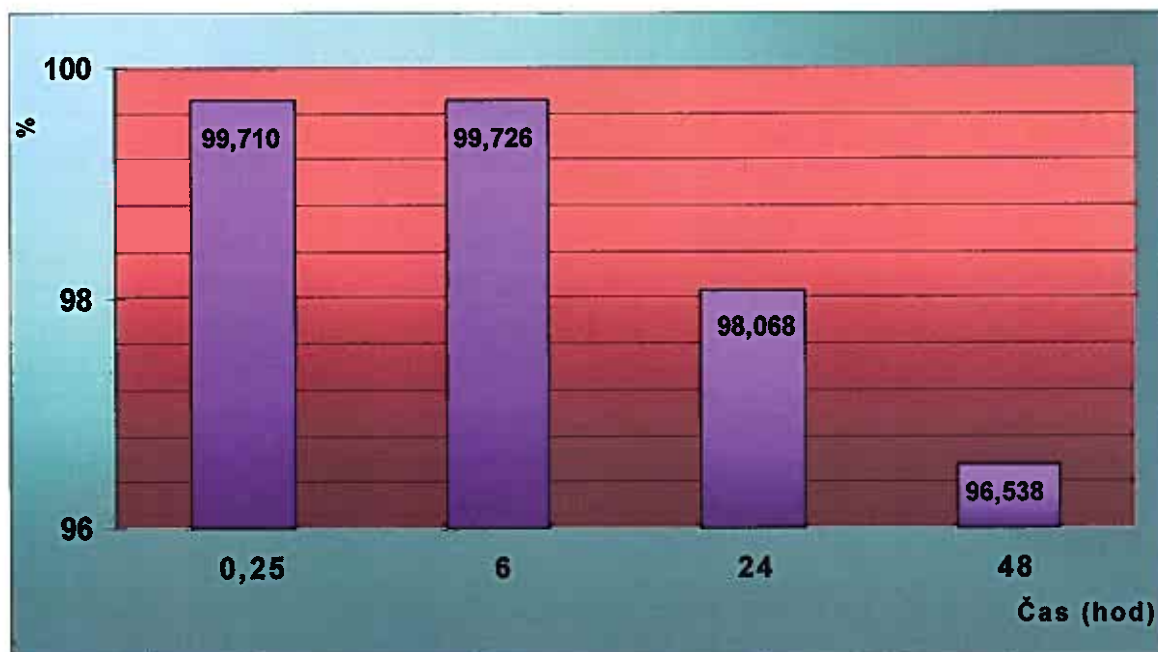


Graf 2 : Radiochemická čistota : časový průběh – vzorek 1

a) jednotlivá měření

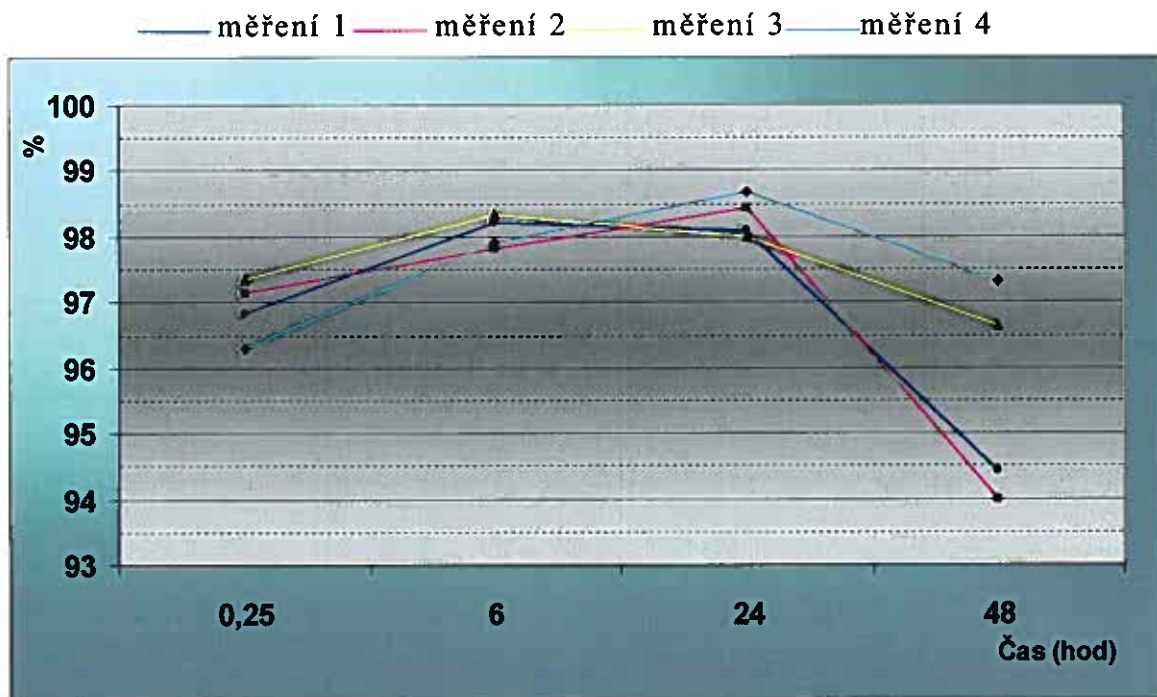


b) průměrné hodnoty

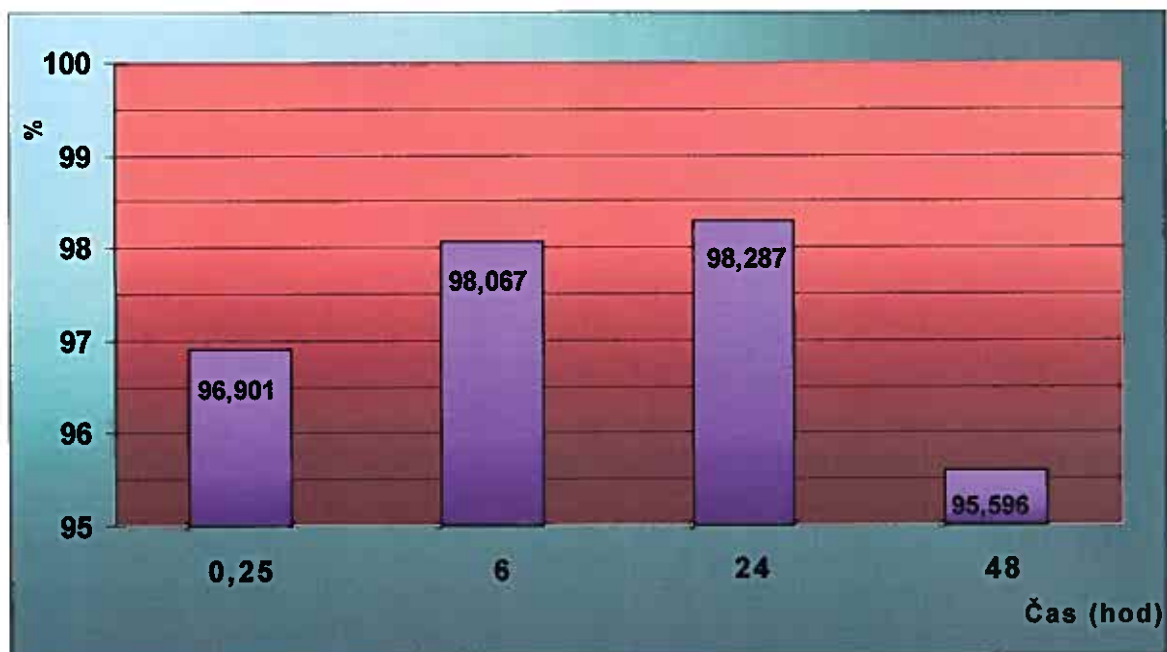


Graf 3 : Radiochemická čistota : časový průběh – vzorek 2

a) jednotlivá měření

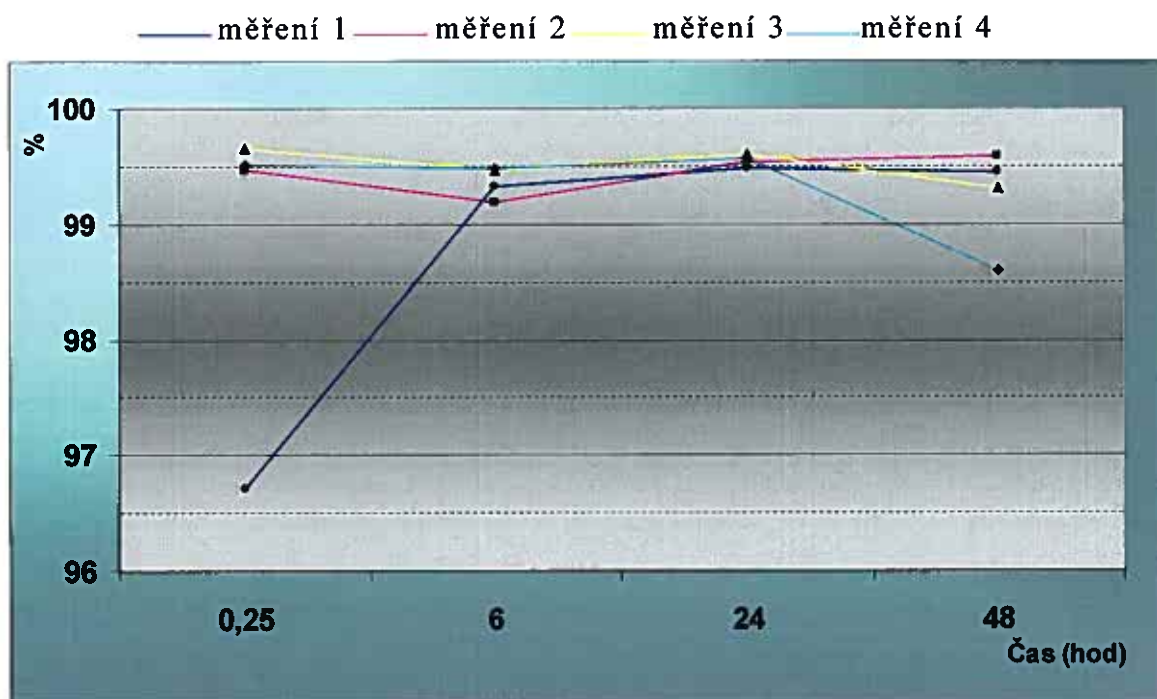


b) průměrné hodnoty

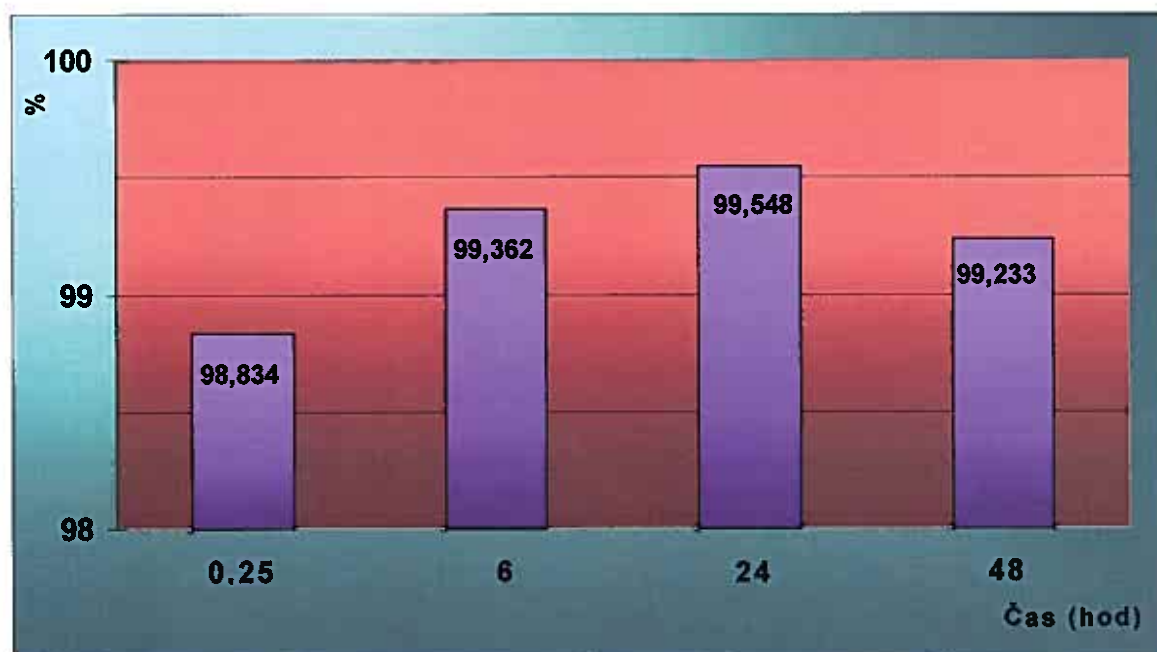


Graf 4 : Radiochemická čistota : časový průběh – vzorek 3

a) jednotlivá měření

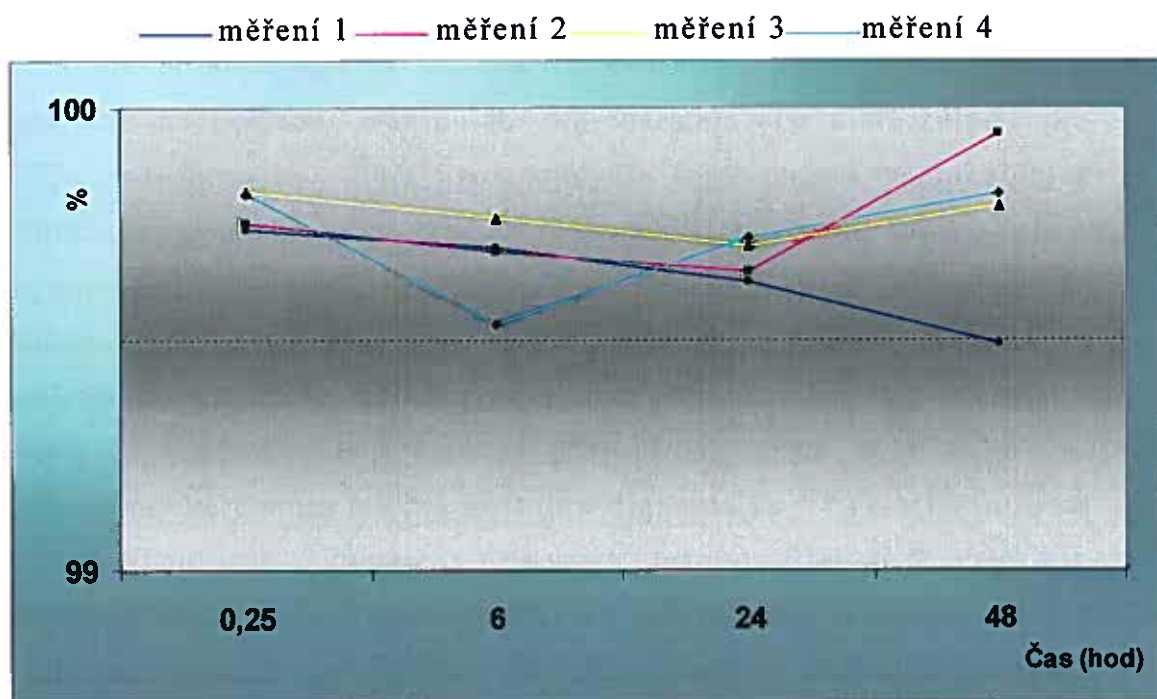


b) průměrné hodnoty

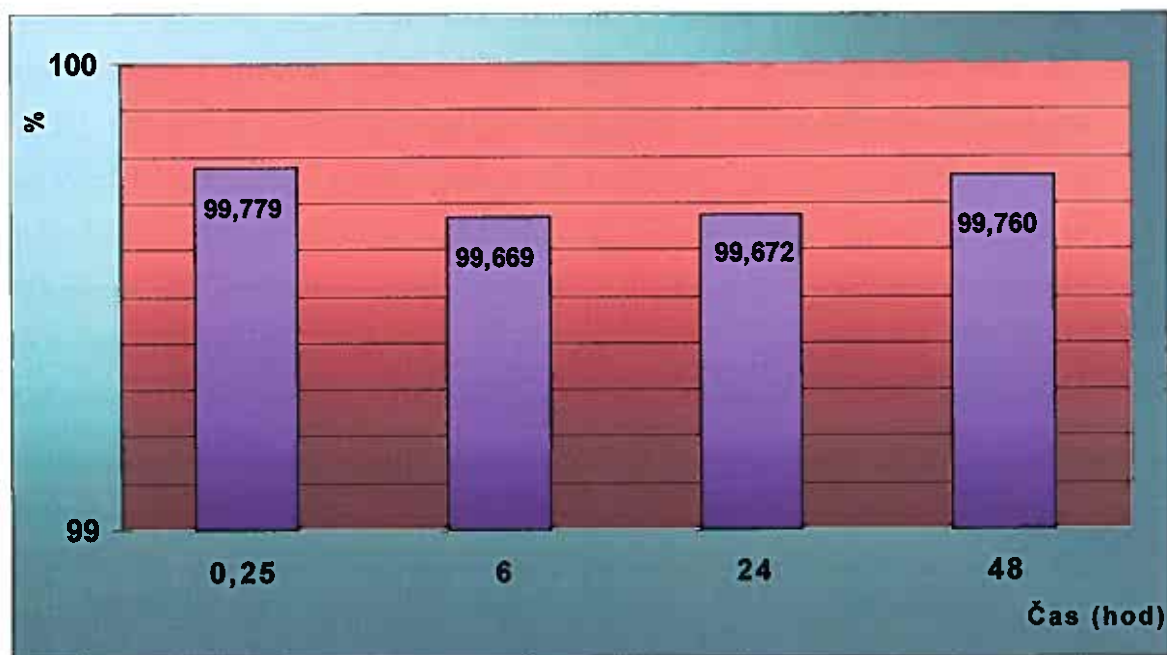


Graf 5 : Radiochemická čistota : časový průběh – vzorek 4

a) jednotlivá měření



b) průměrné hodnoty



2.4. Diskuse

Na bezpečnost a účinnost léčiv je obecně kladen velký důraz a jejich dosažení vyžaduje přísný protokol o kvalitě daný výrobcem. Přesně i to platí pro radiofarmaka, ve srovnání s ostatními skupinami léčiv ale odpovědnost za kvalitu radiofarmaka podaného pacientovi plně leží na poslední manipulaci s preparátem. To platí zvláště pro ^{99m}Tc radiofarmaka, která jsou obvykle značena na nemocničních odděleních použitím komerčně dostupných kitů a generátorů – obojí registrované s detailním popisem pro uživatele. Nicméně chemická reakce v průběhu přípravy může vést k vedlejším reakcím a nečistotám. Proto je mimo jiné nutné měření takového parametru jakým je radiochemická čistota. (20) V této práci byla stanovena radiochemická čistota (RČ) kostního diagnostika ^{99m}Tc -MDP a to ve čtyřech skupinách : komerční přípravek, magistraliter připravený kit, přípravek s prošlou expirací a přípravek uchovávaný za nestandardních podmínek tj. 6 dní při teplotě 50°C . U všech vzorků byla současně sledována časová závislost RČ a to v intervalech 15min, 6, 24 a 48 h.

V 1. skupině byl stanoven komerční přípravek s vyhovující expirací a skladovaný podle doporučení výrobce. Celkový výsledek ze čtyř měření (interval 15min.) sice vyhovoval limitu požadavku RČ (95%) viz tab.1, ale poměrně velký rozptyl v jednotlivých měřeních mě vedl k opakování celého procesu. Tato událost byla pravděpodobně způsobena lidskou chybou – po nácviku metody bylo provedeno nové stanovení RČ vzorku se stejnou šarží a dosažené výsledky vykazovaly již nevýznamné rozdíly v jednotlivých měřeních. Hodnoty radiochemické čistoty nepatrně klesaly v závislosti na čase, nicméně i v intervalu 48 hodin byl přípravek shledán vyhovující z tohoto pohledu.(tab.2, graf 2)

Ve 2. skupině byl stanoven magistraliter připravený preparát. Výsledky ukázaly opět vysoké procento přítomného komplexu v požadovaném limitu RČ s významnějším poklesem kvality až v intervalu 48 hodin. Ve srovnání s komerčním přípravkem můžeme pozorovat nepatrně vyšší procento koloidu.(tab.3, graf 3) Tyto jemné

rozdíly mohou být způsobeny v důsledku individuální přípravy kitu. Atmosfériou v hotovém přípravku je vakuum narozdíl od dusíkové atmosféry u komerčních přípravků, další odlišnosti jsou ve složení a to konkrétně v poměru reduktant $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a MDP 1:20 (u komerčních 1:13). V literatuře je publikována zpráva o magistraliter připraveném kitu z roku 1989 v období existence Československa.(21) Pomocí takto připraveného komplexu (MDP : $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 5:1) bylo vyšetřeno 400 pacientů s velmi dobrými výsledky zobrazení. Přípravek byl vyhovující i z hlediska radiochemické čistoty a v té době představoval významnou ekonomickou úsporu pro naše slovenské kolegy. Další publikace o oficiálním použití magistraliter přípravku nebyly nalezeny.

Ve 3. skupině byl stanoven komerčně dodávaný kit s mnohonásobně překročenou dobou expirace. Výsledky překvapivě ukázaly vysoké procento RČ téměř neměnné ve všech časových intervalech.(tab.4, graf 4) V literatuře byl publikován případ, kdy bylo neúmyslně provedeno kostní zobrazení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP komplexem 45 měsíců po expiraci.(22) Výsledky scintigrafie u všech osmi pacientů byly klinicky přijatelné a nebyly pozorovány žádné rozdíly v kvalitě zobrazení ve srovnání s normálním přípravkem, který byl aplikován později. Nikdo z pacientů nepozoroval žádný nežádoucí efekt po aplikaci prošlého přípravku. Vysvětlením pro tato zjištění snad může být vysoká pevnost vazby P-C-P v MDP zmiňovaná v publikacích (5,15), která navíc v inertní atmosféře dusíku těžko podléhá degradaci. Po následném značení technecianem však stabilita vazby technecia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v komplexu má tendenci degradovat v závislosti na stáří MDP. Studie na zvířatech a lidech ukazují, že se stoupajícím stářím MDP klesá stabilita $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP vazby – ve výsledku stoupá koncentrace volného technecianu, který se hromadí ve štítné žláze.(22) Je tedy možné, že i náš přípravek by po aplikaci člověku vykazoval podobné chování. To platí zvláště při použití vyšších aktivit ke značení MDP (stovky MBq) než jaké byly použity v našem experimentu (cca 20MBq).

Ve 4. skupině byl stanoven komerční kit uchovávaný za nestandardních podmínek (6 dní při teplotě 50°C). Dosažené výsledky opět prokázaly nesmírnou stabilitu přípravku, vysoká čistota značeného MDP nepodléhala žádným změnám v čase.(tab.5, graf 5) Je možné, stejně jako v předešlém případě, že při použití vyšších aktivit ke značení a po aplikaci člověku by vzniklý komplex vykazoval vyšší riziko rozpadu. Nicméně získané výsledky mě vedou k předpokladu, že komerční kit je dostatečně stabilní i při zátěžových podmínkách a podmínky stanovené výrobcem jsou spíše jistěním k udržení vysoké kvality přípravku. Nesmíme ale zapomenout, že stanovení radiochemické čistoty je pouze jedním kritériem kvality testovaných vzorků, které musí splňovat požadavky dalších kontrolních testů. U posledních dvou vzorků můžeme tedy např. očekávat zhoršení kvality při zkouškách na sterilitu a pyrogenní látky!

Na závěr je nutné říci, že jak vyplývá z retrospektivních studií stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc radiofarmak (Decristoforo (20) : 7000 preparátů za 7 let, Ponto (23) : 20,000 preparátů během 12 let), příčina nízké RČ není ve většině případů z důvodu malé kvality kitů, ale odráží individuální podmínky na každém pracovišti (stáří eluátu, lidská chyba) a nemůže být zobecňována. K posouzení možných problémů v případě radiofarmak tedy musíme brát v úvahu konkrétní laboratorní podmínky. Příkladem mohou být 2 studie vlivu stáří eluátu na radiochemickou čistotu ^{99m}Tc – exametazinu, kdy v jedné práci prokázali snížení kvality přípravku u staršího eluátu (24) a naopak u druhé nezaznamenali žádný výrazný vliv na hodnotu radiochemické čistoty. (25) Obecně tedy můžeme na ^{99m}Tc radiofarmaka pohlížet jako na bezpečné a efektivní, ale díky nízkému výskytu vad jenom úzká kontrola radiochemické čistoty dovoluje odhalení takovýchto preparátů.

2.5. Závěr

Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -MDP připraveného z kitu ukázalo :

- komerční přípravek je zcela vyhovující v intervalu do 48 hodin, opakování experimentu bylo v důsledku chybného měření v počátku stanovení
- magistraliter připravený kit ukázal nepatrně vyšší podíl koloidu v nečistotách, ale výsledná hodnota RČ je v limitu a srovnatelná s komerčním přípravkem, pokles kvality až v posledním časovém intervalu (48h)
- komerční kit s prošlou expirací stejně jako kit uchovávaný za nestandardních podmínek splnili požadavek RČ podobně jako normální přípravek

**B. STANOVENÍ VAZEBNOSTI
^{99m}Tc-MDP**

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Farmakokinetika léčiv

Série nových látek, které přicházejí do farmakologického výzkumu jako látky dosud neznámých vlastností, je třeba otestovat na nezákladnější účinky.(26) K pochopení účinků a použití léčiv z obecného hlediska je třeba znát farmakokinetické a farmakodynamické otázky. Zatímco farmakodynamika detailně sleduje mechanismus účinku podané látky, farmakokinetické údaje nám poskytují informace o pohybu léčiva v organismu tj. o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci.

Pokud není látka aplikována i.v. nebo přímo do místa působení, musí se vstřebat – *absorbovat* z místa podání do systémové cirkulace – krevního oběhu. Samozřejmě záleží na způsobu aplikace, kdy se uplatňují různé transportní systémy přes biologické membrány. Zde potom hrají úlohu jak vlastnosti molekuly látky, jako jsou její velikost, rozdělovací koeficient, disociační konstanta apod., tak i vlastnosti prostředí např. pH, přítomnost volných přenašečů, prokrvení apod.

Málo látek se nachází rozpuštěno v plasmatické vodě, většina se určitou měrou váže na makromolekuly přítomné v krvi – plasmatické bílkoviny, ale i na krevní buňky. Jen nevázaná část má však předpoklady pro transport do okolních tkání nebo tělních tekutin – *distribuci*. Tento proces dále ovlivňuje perfuze tkáně krví, regionální rozdíly pH, přítomnost speciálních tkáňových bariér apod. Míru rozdělení látky ve vodném prostředí organismu nám udává zdánlivý distribuční objem V_d , což je základní farmakokinetický parametr. Za předpokladu, že se ani jedna molekula látky nepřeměnila ani nevyloučila a významnou měrou se neváže na plasmatické bílkoviny či jiné složky (proto označení zdánlivý), je V_d vyjádřen vztahem :

$$V_d = \frac{D}{C}$$

D je množství podané látky a C koncentrace látky v plasmě.

Jenom některé látky se v organismu nemění, převážná většina se v organismu v různé míře chemicky mění – dochází k *biotransformaci*. Tento proces je důležitý pro vyloučení látky z organismu a probíhá ve dvou základních fázích. V první fázi zpravidla vzniká produkt, který má podstatně nižší účinnost než původní látka, někdy však může být naopak účinnější a představuje teprve vlastní účinnou látku anebo je výrazně toxičtější. Ve druhé fázi dochází ke spojení s tělu vlastní látkou a tím ke snížení lipofility, což vede k rychlejšímu vylučování. Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra a někdy už při prvním průchodu látky tímto orgánem dochází k velkému poklesu její aktivity. K významným faktorům ovlivňujícím metabolismus látky patří indukce nebo inhibice enzymů podílejících se na přeměně obvykle vlivem některé další souběžně podané látky.

Ke snížení aktivity látky významně přispívá i její vyloučení – *exkrece*. Látky se vylučují několika různými způsoby ať už v původní formě nebo jako metabolit. Nejvýznamnější je exkrece močí, žlučí, méně pak plícemi, potem, slinami a mlékem. Všechny však mají společné uplatnění podobných transportních systémů jako při absorpci a distribuci. Biotransformace a exkrece se tedy společně podílejí na *eliminaci* látky z organismu. Dobu, za kterou se z organismu eliminuje množství látky na polovinu (exponenciální eliminace) nám udává eliminační poločas $T_{1/2}$ a je dán vztahem :

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

β - eliminační konstanta vyjadřuje rychlost eliminace látky. Dalším důležitým farmakokinetickým parametrem je clearance – udává množství krve, které se za 1 minutu úplně očistí od sledované látky :

$$Cl = \beta \times V_d$$

Umožňuje vyjádření eliminační funkce určitého orgánu obvykle ledvin.

I z této zjednodušené charakteristiky postupu látky v organismu lze vysledovat, že všechny procesy mají společnou nutnost přestupu látky přes biologické membrány. Víme, že jen látka volná může procházet z cévního řečiště do tkání, vyvolat účinek, metabolizovat se a vyloučit ven z organismu. (27) Z toho vyplývá, že vazebnost látky na elementy krve je základní farmakokinetický parametr, který významnou měrou ovlivňuje další osud látky v organismu.

1.2. Vazebnost léčiv na elementy krve

Krev svým složením i funkcemi představuje životně důležitou tekutinu, která cirkuluje cévami krevního oběhu a spojuje všechny orgány a tkáně v těle. Objem krve činí 7 – 10 % celkové tělesné hmotnosti : u žen je to průměru 3,6 l, u mužů 4,5 l krve. Krev je suspenze buněčných elementů v krevní plazmě. Plazma zaujímá zhruba 55 % krve, zbytek připadá na krevní elementy – erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Krevní plazma tvoří tekutou fázi krve, ve které jsou rozpuštěny elektrolyty, živiny, produkty látkové přeměny, vitaminy, plyny a bílkoviny. Celkový objem rozpuštěných látek je zhruba 8 – 9 %. Největší podíl (7 %) připadá na bílkoviny – albuminy (okolo 5 %), globuliny a fibrinogen. V krevní plazmě jsou suspendovány tři základní typy krevních buněk : červené krvinky – erytrocyty, bílé krvinky – leukocyty a krevní destičky – trombocyty. V 1 litru krve je za fyziologického stavu u mužů průměrně 5×10^{12} (u žen $4,5 \times 10^{12}$) erytrocytů.(28)

Po vstupu do cévního řečiště je většina látek z určitého podílu vázána na bílkoviny krevní plazmy, především na albumin.(1) Vazebnost na ostatní proteiny se týká hlavně α_1 -kyselého glykoproteinu a lipoproteinů. Z dalších krevních elementů stojí za povšimnutí interakce léčiv s červenou krevní složkou – erytrocyty. Vazebná reakce může být obecně vyjádřena rovnicí :



Léčivo A reaguje s krevní složkou B za vzniku komplexu AB. Ve tkáních přestupuje do tkáňové tekutiny část volného podílu léčiva. Pokles koncentrace volné látky v plasmě poruší rovnovážný stav a to vede k rozpadu části komplexu a k vytvoření nových rovnovážných podmínek. Vazba na bílkoviny tedy neznemožňuje přestup látky z krve do tkáňového moku, jenom jej zpomaluje. Čím vyšší je pak vazba na

bílkovinu (erytrocyt) – tím nižší a pozvolnější je efekt látky a tím pomalejší je i biotransformace a eliminace. Komplex pak může představovat depo, které pomalým uvolňováním udržuje hladinu látky v organismu po velmi dlouhou dobu. (26) Znalost vazebnosti léčiva na elementy krve má proto veliký význam a poskytuje nám důležité informace o intenzitě účinku a rychlosti eliminace dané látky.

1.2.1. Vazebnost na albumin

Lidský sérum albumin je nejvíce zastoupený protein v plasmě. Narozdíl od ostatních proteinů, které obvykle vykonávají v plasmě jednu specifickou funkci, albumin hraje roli v mnoha fyziologických aktivitách: významně přispívá k udržení koloidně-osmotického tlaku a mezi plasmatickými proteiny má největší vliv i na acidobazickou rovnováhu v krevním řečišti. Zásadní význam albuminu však spočívá v přenosu mnoha různých endogenních a exogenních ligandů tvorbou nekovalentních komplexů na specifických vazebných místech. Např. hraje důležitou roli v transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem a tím nepřímo ovlivňuje jejich metabolismus. Protektivní role albuminu spočívá ve vazbě exogenních toxinů, peroxidačních produktů lipidů, přenosu bilirubinu ze sleziny do jater atd. Co se týká léčiv, albumin odpovídá za většinu vazebnosti v plasmě spolu s kyselým α_1 – glykoproteinem.(29)

Sérum albumin je monomerní protein skládající se čistě z aminokyselin bez dalších sacharidových či jiných skupin. Jeho primární struktura byla ohlášena v sedmdesátých letech – jednoduchý peptidový řetězec se skládá z 585 aminokyselin. Je přítomno 35 cysteinů, které tvoří sedmnáct disulfidových můstků – to významně přispívá ke stabilitě proteinu v cirkulaci. Cystein 34 je jediný s volnou –SH skupinou. Velké procento iontově nabitých aminokyselin jako je kyselina glutamová a lysin propůjčuje albuminu relativně vysokou rozpustnost. Co se týká sekundární struktury, albumin je převážně šroubovitá molekula : 67 % tvoří α – helix, 23 % je natažený řetězec a 10 % zbývá pro β – šroubovici. Terciální struktura byla získána měřením rtg paprsky a ukazuje nám molekulu srdcovitého tvaru nebo také rovnostranného trojúhelníku, kde můžeme rozeznat tři místa s velmi podobným šroubovitým uspořádáním. Nejedná se ale o statickou molekulu, ale velmi flexibilní a měnící svůj tvar zvláště pak v souvislosti s vazbou různých ligandů.(29)

Flexibilita albuminu a rozmístění náboje kolem molekuly dává možnost vazby mnoha látek s rozdílnou strukturou. Nejsilnější vazbu vykazují hydrofobní látky se záporným nábojem. Vazebnost albuminu je často vysoce specifická, alespoň pro nízké koncentrace ligandů. Bylo objeveno několik vazebných míst s různou afinitou, Sudlow a kol. charakterizovali dvě místa, která odpovídají za vazebnost neuvěřitelně vysokého množství různých skupin látek.(30) Na místo I neboli warfarin – azapropazonové vazebné místo se váží mezi jinými také antikoagancia warfarinového typu a nesteroidní antiflogistika jako je phenylbutazon a salicyláty. Místo II – tryptofan – benzodiazepinové vazebné místo je zase specifické pro skupinu profenů, jako je ibuprofen, ketoprofen atd. Tato dvě stabilní vazebná místa odpovídají za vazebnost většiny léčiv v terapeutických koncentracích, při vyšších koncentracích se mohou zapojit další místa s nižší vazebnou afinitou a selektivitou. U lidského sérum albuminu můžeme pozorovat dokonce enantioselektivní vazebnost (nejvyšší mezi plasmatickými proteiny), kde jednotlivé izomery vytváří s proteinem vazbu o různé stabilitě. Pro tuto vyjímečnou specifitu je albumin také někdy označován jako „ tichý receptor „.(29)

Vlivem kompetice dvou nebo více různých látek o stejné vazebné místo na albuminu může dojít k jejich interakci. Jedno léčivo vytěsni druhé z vazby na bílkovinu, a tím zvýší jeho volnou koncentraci v plasmě. Klinické výsledky takovýchto kombinačních terapií mohou vykazovat vyšší odezvu a více vlastností účinku než vyplývá z podané dávky.(31) Množství vázané frakce léčiv je dále ovlivněno některými fyziologickými a patologickými stavy. Je redukováno u novorozenců, během těhotenství a u starších lidí. Snížení vazebnosti může být sledováno u některých onemocnění ledvin, jater a štítné žlázy. Během urémie se v plasmě kumuluje sloučenina, která působí jako inhibitor lékové vazebnosti. Měření vazebnosti léčiv na plasmatické bílkoviny (albumin) je tedy nezbytné i k definování vlivu těchto stavů na farmakologické chování podaných látek.(32)

1.2.2. Vazebnost na lipoproteiny

Lipoproteiny jsou komplexy bílkovin s lipidy, mají obvykle sférický tvar. Jsou tvořeny jádrem, které obsahuje triacylglyceroly a estery cholesterolu, a obalem, kde jsou kromě cholesterolu obsaženy fosfolipidy a specifické apoproteiny. Podle hustoty se lipoproteiny rozdělují na chylomikrony, VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) a HDL (High Density Lipoproteins).(33)

Obecně jsou lipoproteiny zapojeny do transportu lipidů krevním řečištěm. Jejich další funkce spočívá ve vazbě a přenosu mnoha liposolubilních látek. U pacientů s abnormálním lipidovým metabolismem pozorujeme různé hladiny a změny složení plasmatických lipidů (hypo/hypercholesterolémie a/nebo hypertriglyceridémie). Dochází ke změnám lipoproteinové vazebnosti léčiv a tím k ovlivnění účinnosti a bezpečnosti těchto látek.(34) Např. cyclosporin A (CSA), imunosupresivum užívané k potlačení autoimunitních procesů (např. u transplantací), se v plasmě přednostně váže na lipoproteinovou frakci. Několik autorů popisuje snížený farmakologický efekt CSA u hyperlipidemií (35,36) a zvýšený toxický účinek u hypolipidemií.(37)

Důležitou roli v metabolismu a přestavbě plasmatických lipoproteinů hraje glykoprotein LTP I (lipid transfer protein) někdy také označován CETP (cholesteryl ester transfer protein). Usnadňuje přenos esterů cholesterolu z HDL do LDL a VLDL se vzájemnou výměnou za triglyceridy. Jakékoli změny ve skladbě či distribuci lipoproteinů v důsledku nemoci, diety nebo terapie léky mohou mít za následek změnu lipidového přenosu. Lidské tělo rozpozná lipofilní léčivo jako lipidovou částici a zvýšená hladina CETP může zvýšit přenos těchto látek mezi jednotlivými lipoproteiny. Např. antimykotikum amphotericin B (Amp B) se v plasmě přednostně váže (cca 70%) na HDL protein. Zvýšená hladina CETP má za následek přenos Amp B na LDL a komplex Amp B – LDL významně zvyšuje

rozvinutí lékově indukované toxicity pro ledviny. Objev přenosu lipofilních látek mezi jednotlivými lipoproteiny naznačuje možnost použití CETP v oblasti distribuce léčiv.(34)

1.2.3. Vazebnost na α_1 -kyselý glykoprotein

Zatímco pro kyselá léčiva je dominantní vazba na albumin, pro basická léčiva má zásadní význam vazba na α_1 -kyselý glykoprotein (AGP). I přes mnohem menší vazebnou kapacitu vykazuje poměrně vysokou afinitu k léčivům, proto hraje významnou roli v celkové plasmatické vazebnosti látek.(38)

AGP se skládá z jednoduchého peptidového řetězce a pěti karbohydrátových zbytků – proto se také řadí do skupiny glykoproteinů, mukoproteinů a α_1 -globulinů. Polypeptidový řetězec je tvořen 183 aminokyselinami a obsahuje dvě disulfidové vazby. Pět karbohydrátových částí je připojeno k asparaginovým zbytkům v první polovině peptidu. (39) Bylo získáno několik heterogenních forem AGP lišících se molekulovou hmotností a elektroforetickým profilem. Tento fenomén nazýváme mikroheterogenitou AGP a vzniká v souvislosti s použitou metodou izolace, stanovení, původem vzorku (plasma, moč), stavem pacienta atd. Molekulová hmotnost se tedy pohybuje od 37,000 do 54,000 , obecně se však udává hodnota 40,000. (38)

Od konce 60. let je AGP známý jako přenašeč steroidů. (40) Později se ukázalo, že AGP má vysokou vazebnou afinitu pro mnoho basických léčiv.(41) Z fyziologických látek se jedná o vazbu katecholaminů, z toho také vyplývá přítomnost vazebných míst pro přenos léčiv ovlivňujících adrenergní receptory (např. β -blokátory). (42) Dokonce u některých kyselých léčiv AGP také významně přispívá k celkové plasmatické vazebnosti zvláště při onemocněních, kdy koncentrace AGP roste a/nebo koncentrace albuminu klesá.(43) Platí to zvláště pro léčiva, která neobsahují karboxylovou skupinu a sdílejí společné vazebné místo na albuminu (místo I). Pro různá léčiva existuje různý počet vazebných míst a nejvíce afinitní místo se vyskytuje na hydrofobní části proteinového řetězce (hydrofobní povaha vazby léčiv). U chirálních látek pak můžeme sledovat stereoselektivní vazebnost na AGP.(38)

Normální hladina AGP se pohybuje v rozmezí 40-110 mg/100ml. Tato hodnota se však velmi významně mění vlivem různých fyziologických a patologických stavů. Dokonce se ukázalo, že hladina AGP je závislá na závažnosti nemoci, při akutních stavech dochází až k dvojnásobnému vzestupu hladiny AGP. Proto bývá AGP přiřazován mezi proteiny akutní fáze a hladina AGP v plasmě může být použita jako diagnostická a prognostická hodnota během léčby mnoha nemocí. Jisté také je, že hladina AGP může kolísat při léčbě některými léky vlivem enzymové inhibice a indukce. S nižšími hladinami je pak třeba počítat u novorozenců.(38)

1.2.4. Vazebnost na erythrocyty

Červené krvinky tvoří nejpočetnější část mezi buněčnými elementy krve – v 1 litru krve je za fyziologického stavu u mužů průměrně 5×10^{12} a u žen $4,5 \times 10^{12}$ erythrocytů. (28) Od ostatních buněk se však liší absencí jádra a nemají ani další buněčné organely jako jsou mitochondrie a endoplasmatické retikulum. Mají tvar bikonkávního disku a plasmatická membrána je tvořena lipidovou dvouvrstvou skládající se hlavně z fosfolipidů, cholesterolu a proteinů. Mezi hlavní membránové proteiny patří receptory, transportní systémy (iontové výměny, přenos glukózy apod.) a enzymy. Další enzymy a proteiny jsou přítomny v cytosolu, mnoho enzymů se podílí na metabolické přeměně léčiv. Hlavní funkci červenýchrvinek zastává hemoglobin – protein přenášející O_2 , CO_2 mezi tkáněmi. Životnost červenýchrvinek je v průměru 100-120 dní a během této doby procestují asi 250 km celým kardiovaskulárním systémem. (44)

V minulých letech byla lékové vazebnosti na erythrocyty věnována mnohem menší pozornost než stanovení vazebnosti na plasmatické bílkoviny. U mnoha léčiv se však červené krvinky významně podílejí na celkové vazebnosti látek v krvi. Léčiva se mohou vázat na membránu a/nebo na hemoglobin, karboanhydrázu a další vazebné proteiny v cytosolu erythrocytů. Z fyziologických látek se jedná o přenos steroidních hormonů (45), jsou přítomny β -adrenergní (46) a insulinové receptory (47) apod. V mnoha případech je základním mechanismem přestupu látek přes erythrocytární membránu pasivní difuze. Hnací silou tohoto procesu je koncentrace volné látky v plasmatické vodě a důležitým kritériem pro přestup je lipofilita (48) a velikost molekuly. Lipofilní organické látky penetrují do buňky rozpuštěním v lipidové dvouvrstvě membrány a velmi malé hydrofilní sloučeniny vstupují přes vodní kanály. Jistý vliv na podíl erythrocytární vazebnosti má i chirální charakteristika látky. Je jasné, že rozdělení léčiv do erythrocytárního kompartmentu se velmi liší : u některých léčiv se jedná o velmi rychlý proces (sekundy až minuty), u jiných

dochází k ustanovení rovnováhy podstatně déle. Např. léčiva s primární aminoskupinou reagují s mastnými kyselinami v membráně buňky (opoždění přestupu látky). U většiny látek je vazebnost teplotně závislá, u mnoha dalších pozorujeme vliv pH. Některé látky podléhají degradaci vlivem metabolismu erythrocytárními enzymy. Všechna tato fakta musí být zohledněna pro určení konkrétních podmínek stanovení vazebnosti jednotlivých látek.(44)

Určení rozsahu vazebnosti na erythrocyty se dá stanovit metodou in vivo popř. in vitro. Kromě praktických výhod existuje několik důvodů pro upřednostnění in vitro postupu. Lidské tělo reprezentuje otevřený systém (in vitro – uzavřený systém) a zvláště u léčiv, kde dochází k pomalému ustanovení vazebné rovnováhy, nelze zamezit současné distribuci léčiva do tkání a jeho eliminaci. Také pro léčiva, kde ustanovení vazebné rovnováhy probíhá téměř okamžitě, představuje in vitro metoda jedinou možnost pro získání přesnějších výsledků. Vlastní experiment tedy probíhá při 37°C a pH 7,4. Léčivo je přidáno ke stabilizované krvi, promícháno a jednotlivé vzorky odebírány v časových intervalech. Po následné centrifugaci je stanovena koncentrace léčiva v červených krvinkách a plasmě zvlášť. Současně zjistíme čas potřebný k ustanovení vazebné rovnováhy. U některých léčiv je poměr vázaného léčiva v krevních buňkách závislý na volné koncentraci léčiva v krvi (saturace vazby na bílkoviny plasmy).Proto paralelně stanovíme vazebnost v systému erythrocyty-pufr.(44)

Informace o rozdělení léčiv do červených krevních buněk je důležitá k pochopení farmakokinetického a farmakodynamického chování látky. Stále více jsou zkoušeny popř. vyvíjeny sloučeniny s prodlouženým účinkem s využitím na prevenci nebo léčbu chronických komplikací, znalost vazebnosti popř. potenciální kumulace v erythrocytech je pak důležitá pro předpověď možné hematotoxicity nebo jiných nepříznivých účinků. (49) Navíc pro některá léčiva, která nelze stanovit běžnými metodami (rovnovážná dialýza), je určení erythrocytární vazebnosti alternativní metodou pro stanovení plasmatické vazebnosti látky.(44)

1.3. Stanovení vazebnosti-rovnovážná dialýza

Ke stanovení vazebnosti na plasmatické bílkoviny a k určení charakteru interakce léčivo – protein se užívá mnoha různých metod. K nejvíce užívaným metodám patří ultrafiltrace, ultracentrifugace a rovnovážná dialýza. Všechny tyto metody jsou založeny na separaci a analýze volné frakce léčiva po ustanovení rovnováhy. Další možností může být použití vysoce výkonné afinitní chromatografie (HPAC). Tato metoda poskytuje řadu výhod (není nutná separace) a nabízí nám přesnost, citlivost a reprodukovatelnost chromatografického systému. Retenční parametr měřené látky se stává přímo úměrný relativnímu množství léčiva vázaného na imobilizovaný protein. Další výhodou je možnost studia chování enantiomerů chirálních látek při použití racemátu. Jiný přístup zahrnuje použití spektroskopických metod jako je fluorescenční, absorpční (UV) spektroskopie a cirkulární dichroismus (CD). Tyto metody nám navíc mohou poskytnout přímé informace o vazebných interakcích. Jedna z nedávno objevených metod je použití optických biosenzorů pro přímé monitorování vazebnosti malých molekul na albumin.(29) V této práci byla použita metoda rovnovážné dialýzy.

Prvotní studie vazebnosti léčiv rovnovážnou dialýzou byla představena umístěním dialyzační trubice naplněné albuminovým roztokem do kádinky obsahující dialyzační médium. Objemy uvnitř a vně trubice byly 5 a 20ml. Tento model byl omezující, když bylo potřeba albumin nahradit plasmou, zvláště u studií používajících krev plodu kvůli limitované dostupnosti krve nebo u studií vazebnostních parametrů kvůli velkému počtu požadovaných vzorků. Navíc, jak stoupá objem pufru srovnáno s plazmou, stoupá rozředění plasmatických difundujících látek. Colowick a Womack v roce 1969 navrhli 1 ml buňku pro studium vazebnosti difundujících látek. Ehrnebo v roce 1971 studoval vazebnost různých látek za použití soustavy cel. Objem 0,5 ml plazmy byl dialyzován proti stejnému

objemu pufru. Potom byl publikován návrh miniaturního dialyzačního systému, kde mohla být rovnovážná dialýza provedena pomocí malého množství plazmy 50 – 100 μ l.(32)

Výhodou komerčních buněk je možnost vyzkoušet až 20 vzorků najednou, použití plazmatických objemů nižších než 1 ml a dialýza proti stejnému objemu pufru. Mezi nevýhody rovnovážné dialýzy patří rozředění plazmy. Rozředění plazmatických solí může být alespoň částečně kompenzováno použitím pufru obsahujícího 5,58 g/l NaCl. Rozředění plazmatické bílkoviny je dáno přitažlivostí vody albuminem a není možno to potlačit. Nejběžněji užívaným pufrem je isotonický fosforečnanový pufr pH 7,4 , avšak často je používána polovina koncentrace, protože fosforečnan může inhibovat vazebnost kyselých léčiv. Rozředění albuminu jako následek dialýzy je málo důležité, protože malé změny v albuminové koncentraci poskytují zanedbatelné změny v množství navázaného léčiva. Další nevýhodou je délka času požadovaného pro rovnováhu. Při použití komerční membránové dialýzy jsou požadovány 2-4 hodiny k dosažení rovnováhy a čtyřhodinová dialýza je optimální pro většinu kyselých a basických léčiv. Podle některých okolností je požadována delší dialyzační doba a musí být brána v úvahu možná degradace vazebnosti proteinů a léčiva. Je vhodné zvlhčit membránu nebo celou trubici pufrem 0,5 – 1 h před začátkem dialyzační procedury. Membrány mohou být lehce poškozeny, a tak s nimi musí být zacházeno opatrně. Léčiva se také mohou vázat na dialyzační buňkové komponenty nebo na membránu s následnou redukcí jejich koncentrace v dialyzačním prostředí. Limitovaný počet léčiv se váže na membránu takovou měrou, že se výsledky studie stávají bezvýznamné. Tak musí být provedena pilotní studie ke zjištění, zdali buňkové součásti včetně membrány jsou vhodné pro tato léčiva. Jsou dostupné membrány různé tloušťky a v případě léčiva, které se váže na membránu, je důležité použít tu nejtenčí. Je rovněž důležité poznamenat, že rozsah vazebnosti je tepelně závislý. Metoda je prováděna obvykle při tělesné teplotě.(32)

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Materiál

Biologický materiál

V experimentech byla použita krev pěti živočišných druhů :

- lidská – krevní konzerva z transfúzního oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové, konzervovaná antikoagulačním roztokem CPD-A₁ v poměru 1 : 4
- hovězí heparinizovaná z masokombinátu Salma Březhrad
- vepřová heparinizovaná z masokombinátu Salma Březhrad
- králíčí heparinizovaná získaná od samce králíka rodu šedá činčila o hmotnosti 3,4 kg, odebraná z inkulované ušní žíly zvířete
- potkaní heparinizovaná získaná ze samců potkanů kmene Wistar (SPF, VÚFB Rosice) o hmotnosti 210 – 240 g, odebraná z vypreparované arteria carotis zvířat v éterové anestezii

Testovaná látka

Byl použit komplex ^{99m}Tc MDP , firemní název MDP – kit pro přípravu injekce MDP (^{99m}Tc) , číslo šarže 134 , výroba ÚJV ŘEŽ. Celkem bylo použito pět lahviček, každá obsahovala sterilní apyrogenní komponenty v lyofilizované formě : 7,5 mg MDP a 0,45 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Směs byla uzavřena v inertní atmosféře pryžovou zátkou upevněnou kovovou objímkou. K obsahu lahvičky byl za sterilních podmínek přidán sterilní eluát z generátoru technecia (zředěný sterilním izotonickým roztokem NaCl) o aktivitě 150-500 MBq a objemu 5 ml.

Pomocné látky

Jako pufr byl použit izotonický fosfátový Sorensenův roztok o pH 7,4 připravený ze dvou dílů KH_2PO_4 (0,9075 g/100ml) a osmi dílů $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (2,3900 g/100ml). Oba fosforečnany dodala Lachema Brno. Jako antikoagans byl použit Heparin Spofa o koncentraci 5000 m.j./ml , ampule po 2 ml. Pro stanovení radiochemické čistoty $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ byly potřeba dvě chromatografické soustavy – jedna s acetonem a druhá s 0,9 % NaCl.

2.2. Metodika

Příprava materiálu k experimentu

Odebranou a stabilizovanou krev jsem přefiltrovala přes gázu. Část jsem použila k přípravě plasmy a erythrocytární suspenze centrifugací po dobu 5 min při 3-4000 ot/min. Plasmu jsem odsála a uložila do chladu k pozdějšímu stanovení plasmatické vazebnosti testované látky. Erythrocyty jsem doplnila fosfátovým pufrem na původní objem, promíchala a stejným způsobem centrifugovala. Supernatant jsem odsála a celý postup opakovala třikrát. Nakonec jsem krevní buňky doplnila fosfátovým pufrem a promíchala. U celé krve i připravené erythrocytární suspenze jsem stanovila hematokrit tj. poměr krvinek a plasmy (pufri).

Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -MDP

Pro kontrolu radiochemické čistoty injekce jsem použila chromatografii na tenké vrstvě silikagelu ITLC SG (GELMAN) . Jeden vzorek jsem po nanesení na start a vysušení vyvíjela v acetonu a druhý v 0,9% NaCl. Po vysušení jsem chromatogramy vyhodnotila na přístroji Automatic TLC- linear analyzer (Berthold, Rakousko). Při chromatografii v 0,9% NaCl putuje komplex ^{99m}Tc -MDP a $^{99m}\text{TcO}_4^-$ s čelem mobilní fáze, zatímco redukované hydrolyzované technecium zůstává na startu. Při vyvíjení v acetonu se pohybuje $^{99m}\text{TcO}_4^-$ s čelem.

Stanovení distribuce ^{99m}Tc -MDP v krvi a suspenzi erytrocytů

5 ml krve a 5 ml suspenze jsem temperovala v termostatu 20 min při teplotě 37 °C . K oběma vzorkům jsem přidala po 20 μl ^{99m}Tc -MDP, promíchala a udržovala při stejné teplotě. Po 5, 15, 30, 60 a 90 min jsem odebírala 0,5 ml z každé soustavy do Eppendorfovy zkumavky a centrifugovala 5 min při 5-6000 ot/min. Pro zjištění distribuce ^{99m}Tc -MDP jsem pipetovala po 20 μl plasmy a suspenze z první zkumavky a supernatantu a krevních buněk z druhé zkumavky do měřících lahvíček a změřila aktivitu na γ – spektrometru Tesla Liberec. Kvůli snížení rizika chyby jsem aktivitu měřila vždy i se špičkami užitými k pipetování. Podle výsledků jsem zjistila, zda došlo k ustanovení rovnováhy a podle toho jsem ukončila pokus po 120 min. V závěru jsem provedla čtyři odběry po 0,5 ml z každé soustavy a zpracovala je stejně jako ostatní.

Stanovení plasmatické vazebnosti ^{99m}Tc -MDP

Plasmatickou vazebnost in vitro jsem stanovila metodou rovnovážné dialýzy při 37 °C v rotujícím plexisklovém bloku s osmi dialyzačními komůrkami. Objem 0,45 ml plasmy byl dialyzován proti stejnému objemu pufru s testovanou látkou (0,02 ml ^{99m}Tc -MDP bylo přidáno k 5 ml fosfátového pufru o pH 7,4) přes celofánovou semipermeabilní membránu. Po 4 hodinách jsem odpipetovala po 200 μl plasmy a pufru do měřících lahvíček a změřila aktivitu i s použitými špičkami na γ – spektrometru Tesla Liberec. Od každého živočišného druhu jsem stanovila 4 vzorky.

Výpočty :

Při výpočtech vazebnostních parametrů jsem vycházela z práce Holmberga a spolupracovníků. (50)

Plasmatická vazebnost f_p (tj. poměrné množství léčiva navázaného na plasmatické bílkoviny z celkového množství léčiva obsaženého v plasmě) je dána vztahem :

$$f_v = A_{BUF} / A_{PL}$$

$$f_p = 1 - f_v$$

f_v – frakce volného léčiva v plasmě

f_p – frakce vázaného léčiva v plasmě

A_{BUF} – aktivita (resp. koncentrace) v pufru

A_{PL} – aktivita (resp. koncentrace) v plasmě

Hodnota R udává míru ochoty léčiva vázat se v krvi na erytrocyty, analogická hodnota R_s se týká suspenze :

$$R = \frac{A_{BC}}{A_{PL} \times (1 - f_p)}$$

$$R_s = A_{BCS} / A_{BUF}$$

A_{BC} – aktivita (resp. koncentrace) ve frakci centrifugovaných buněk vzorku krve

A_{PL} – aktivita (resp. koncentrace) ve frakci plasmy vzorku krve

A_{BCS} – aktivita (resp. koncentrace) ve frakci centrifugovaných buněk vzorku suspenze

A_{BUF} – aktivita (resp. koncentrace) ve frakci supernatantu (tj. pufru) vzorku suspenze

Rozdělení léčiv v krvi mezi erythrocyty (λ_{BC}), plasmatické bílkoviny (λ_{PP}) a plasmatickou vodu (λ_{PW}) je dáno vztahy :

$$\lambda_{BC} = \frac{A_{BC} \times H}{A_{BC} \times H + A_{PL} \times (1 - H)}$$

$$\lambda_{PP} = \frac{A_{PL} \times f_p \times (1 - H)}{A_{BC} \times H + A_{PL} \times (1 - H)}$$

$$\lambda_{PW} = 1 - \lambda_{BC} - \lambda_{PP}$$

H – hematokrit krve

Vazebnost léčiv na erythrocyty v systému erythrocyty – pufr je dána vztahem :

$$\lambda_{BCS} = \frac{A_{BCS} \times H_s}{A_{BCS} \times H_s + A_{BUF} \times (1 - H_s)}$$

H_s – hematokrit suspenze

Procentuální vyjádření distribuce látky v krvi :

$$\%E = \frac{A_{BC} \times H \times 100}{A_{BC} \times H + A_{PL} \times (1 - H)}$$

$$\%P = 100 - \%E$$

$$\%E_s = \frac{A_{BCS} \times H_s \times 100}{A_{BCS} \times H_s + A_{BUF} \times (1 - H_s)}$$

$$\%P_s = 100 - \%E_s$$

$\%E$ – procento látky navázané na krevní buňky ve vzorku krve

$\%P$ – procento látky v plasmě (vzorek krve)

$\%E_s$ – procento látky navázané na krevní buňky ve vzorku suspenze

$\%P_s$ – procento látky v pufru (vzorek suspenze)

2.3. Výsledky

V tabulkách 1–3 jsou zaznamenány hodnoty hematokritu a vazebnostních parametrů (počítáno ze čtyř měření) se svými směrodatnými odchylkami :

f_P - frakce ^{99m}Tc -MDP navázaného v plasmě

R - poměr koncentrace testované látky v krevních buňkách a plasmě

R_S - analogický údaj pro erytrocytární suspenzi

H - hematokrit krve

H_S - hematokrit suspenze

λ_{PP} - frakce testované látky navázaná na plasm. bílkoviny (vzorek krve)

λ_{BC} - frakce testované látky navázaná na krevní buňky (vzorek krve)

λ_{PW} - frakce testované látky v plasmatické vodě (vzorek krve)

λ_{BCS} - frakce testované látky navázaná na krevní buňky (vzorek suspenze)

Grafy 1-5 zobrazují časové závislosti průběhu distribuce ^{99m}Tc -MDP v celé krvi a erytrocytární suspenzi :

$\%P$ - procento testované látky v plasmě (vzorek krve)

$\%E$ - procento testované látky v erytrocytech (vzorek krve)

$\%P_S$ - procento testované látky v pufru (vzorek suspenze)

$\%E_S$ - procento testované látky v erytrocytech (vzorek suspenze)

Grafy 6-7 zobrazují mezidruhové srovnání vazebnostních parametrů

Grafy 8-9 zobrazují stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc -MDP

Tabulky :

Tab.1 : Vazebnostní parametry ^{99m}Tc -MDP a jejich směrodatné odchylky

Živočišný druh	Vazebnostní parametry		
	f_p	R	R_s
potkan	$0,496 \pm 0,040$	$0,065 \pm 0,008$	$0,047 \pm 0,007$
králík	$0,837 \pm 0,028$	$0,227 \pm 0,060$	$0,109 \pm 0,011$
prase	$0,798 \pm 0,042$	$0,347 \pm 0,117$	$0,463 \pm 0,066$
skot	$0,673 \pm 0,054$	$0,409 \pm 0,041$	$0,317 \pm 0,062$
člověk	$0,360 \pm 0,064$	$0,044 \pm 0,005$	$0,133 \pm 0,010$

Tab.2 : Parametry rozdělení ^{99m}Tc -MDP v krvi a jejich směrodatné odchylky

Živočišný druh	Parametry rozdělení			
	H	λ_{BC}	λ_{PP}	λ_{PW}
potkan	0,52	$0,034 \pm 0,004$	$0,479 \pm 0,002$	$0,487 \pm 0,002$
králík	0,37	$0,021 \pm 0,005$	$0,819 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,001$
prase	0,34	$0,035 \pm 0,012$	$0,770 \pm 0,009$	$0,195 \pm 0,002$
skot	0,30	$0,054 \pm 0,005$	$0,636 \pm 0,003$	$0,309 \pm 0,002$
člověk	0,39	$0,018 \pm 0,002$	$0,233 \pm 0,001$	$0,749 \pm 0,002$

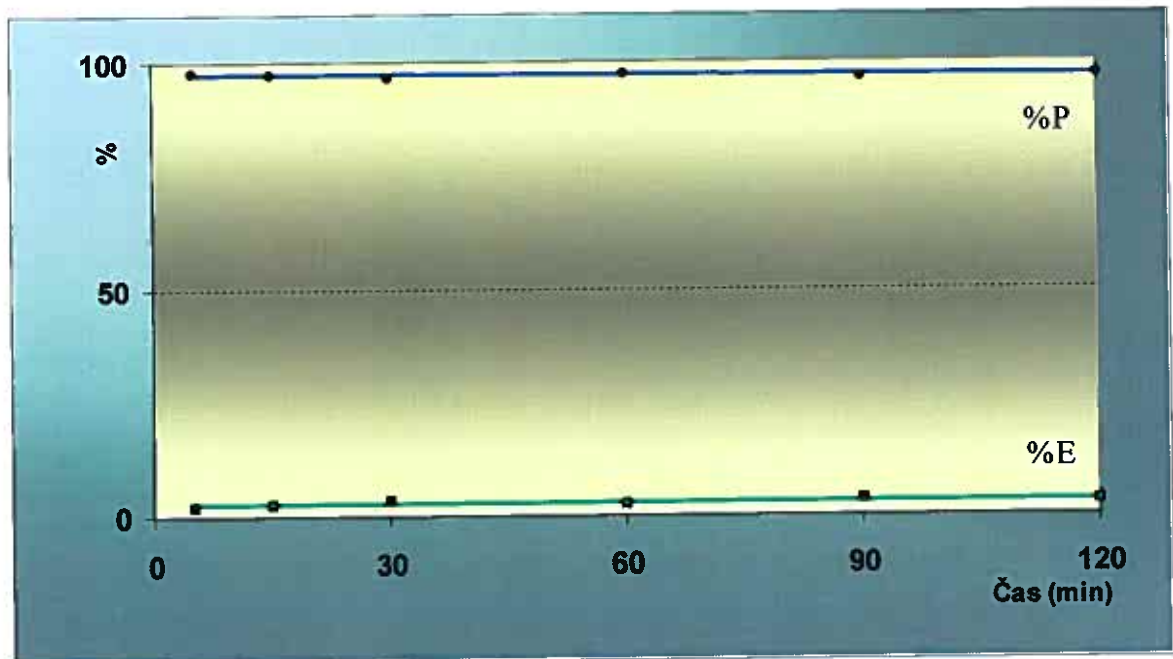
Tab.3 : Parametry rozdělení ^{99m}Tc -MDP v systému erytrocyty-pufr a jejich směrodatné odchylky

Živočišný druh	Parametry rozdělení	
	H_s	λ_{BCS}
potkan	0,52	$0,048 \pm 0,007$
králík	0,43	$0,076 \pm 0,007$
prase	0,26	$0,140 \pm 0,017$
skot	0,36	$0,151 \pm 0,025$
člověk	0,39	$0,079 \pm 0,005$

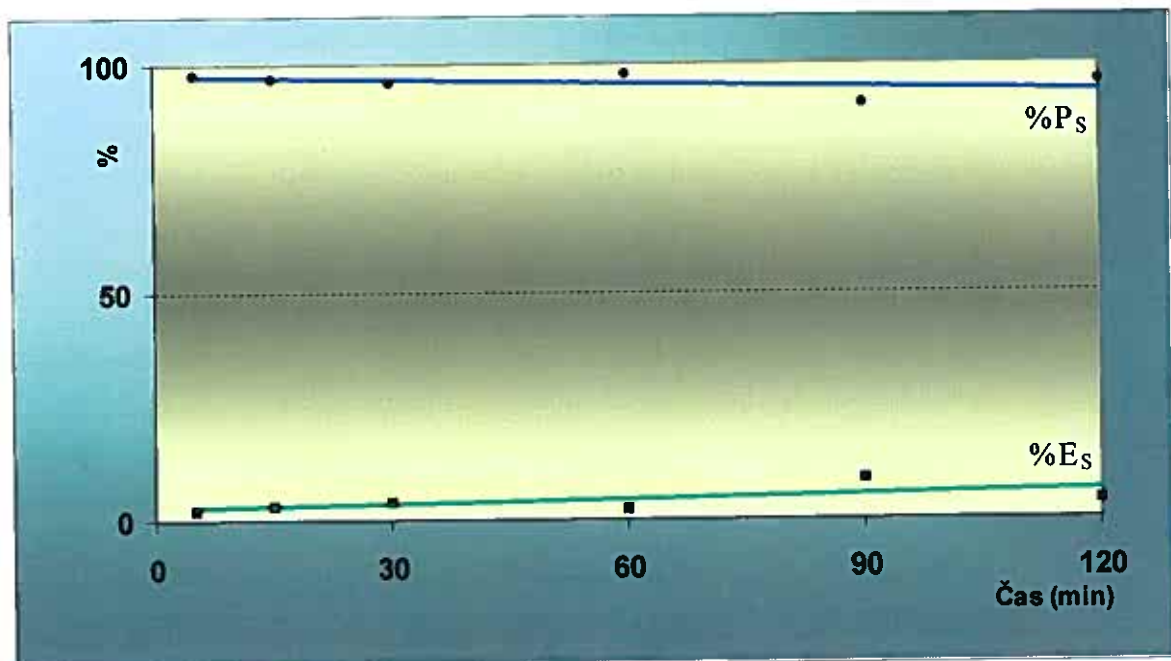
Grafy :

Graf 1 : Průběh distribuce ^{99m}Tc -MDP v čase – potkan

a) krev

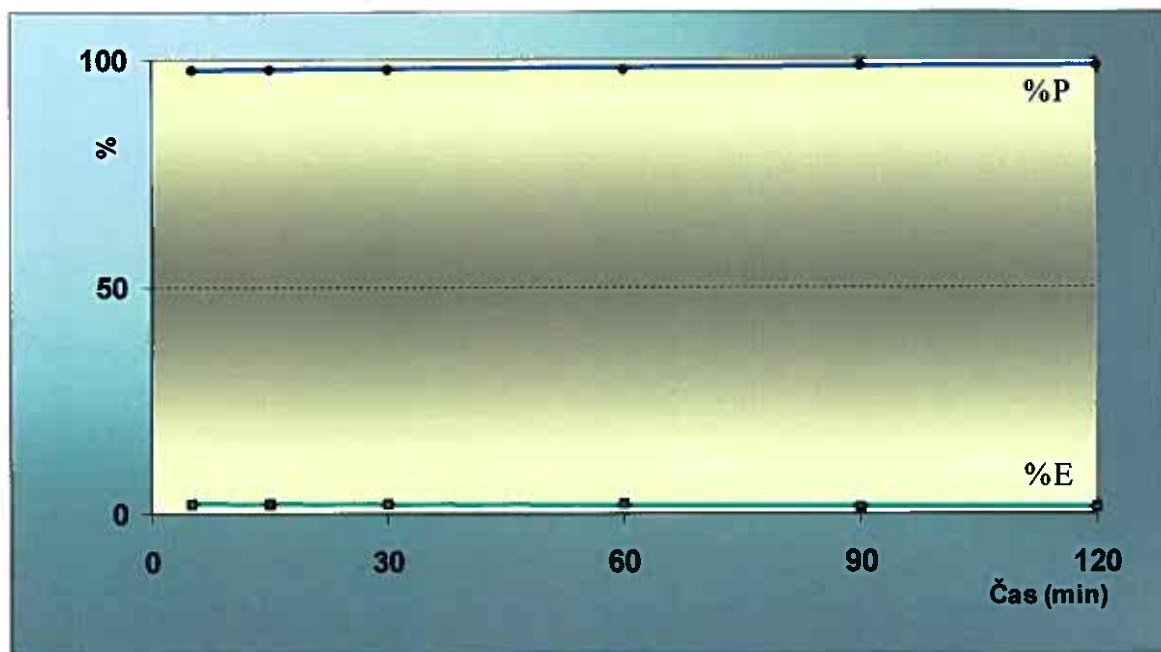


b) suspenze erytrocytů

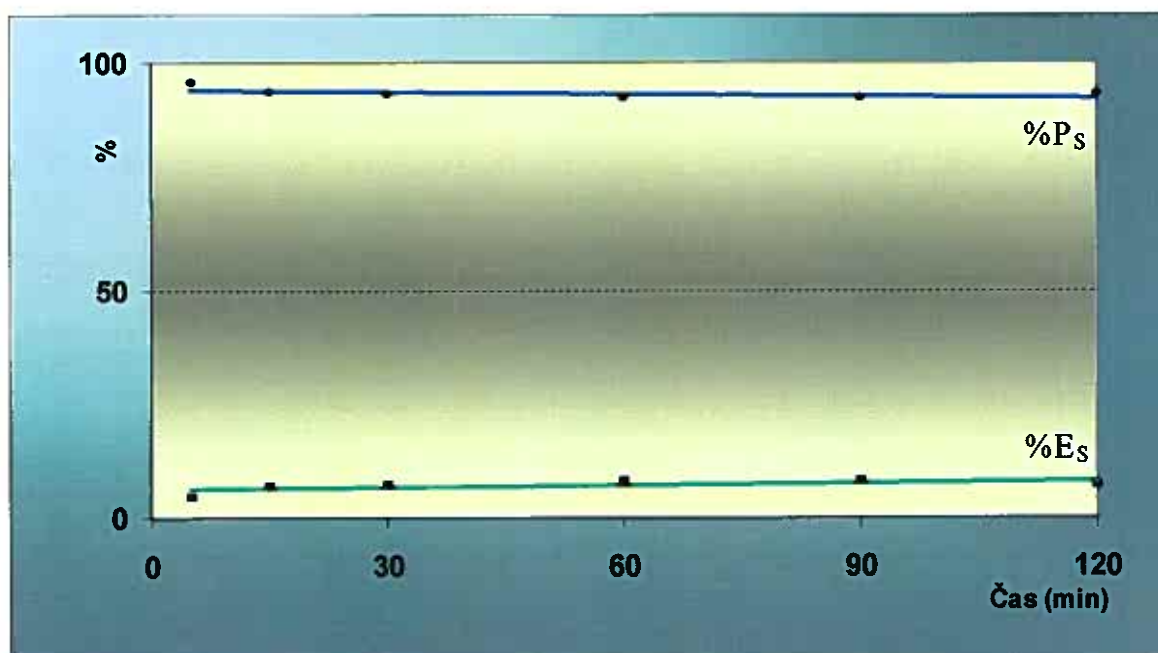


Graf 2 : Průběh distribuce ^{99m}Tc -MDP v čase – králík

a) krev

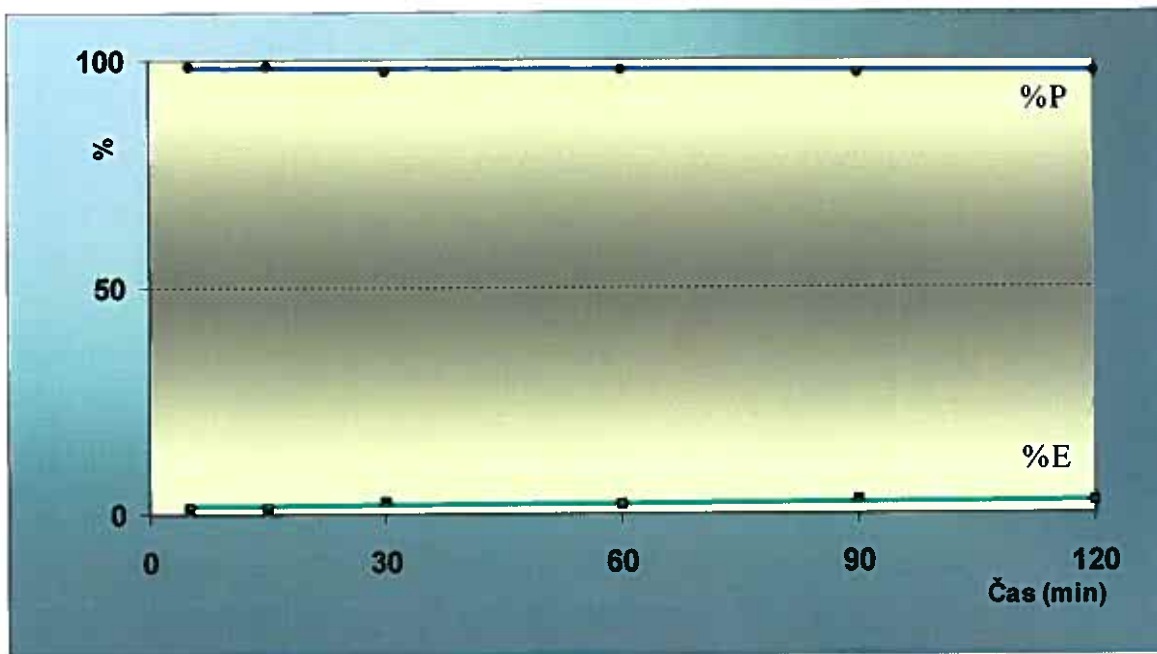


b) suspenze erytrocytů

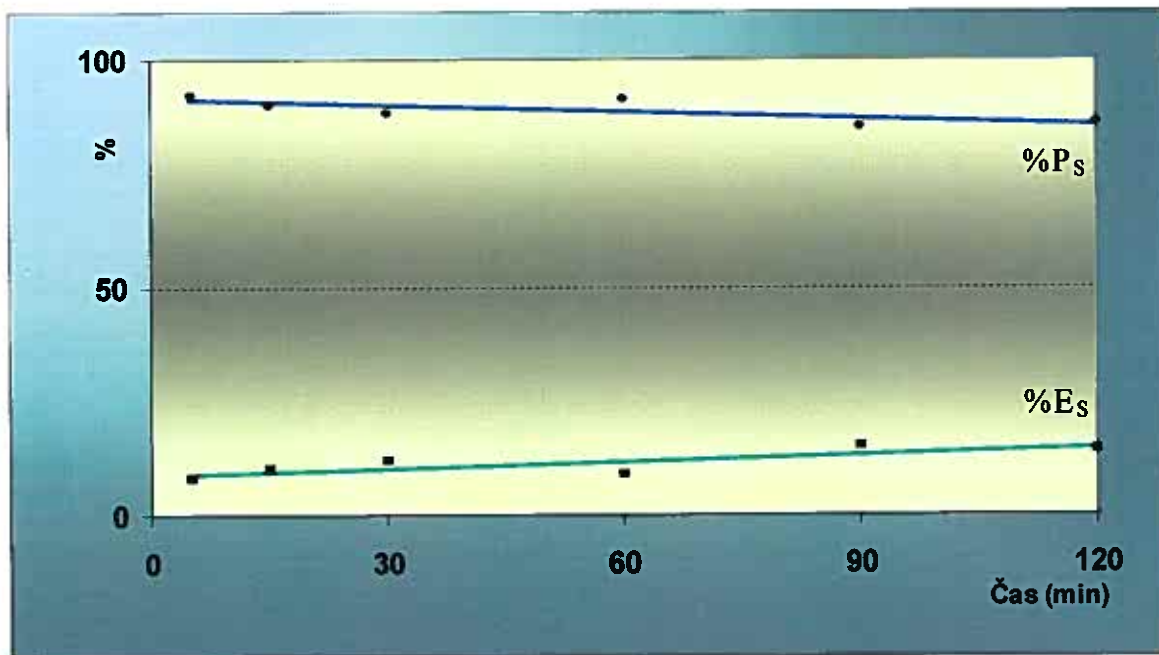


Graf 3 : Průběh distribuce ^{99m}Tc -MDP v čase – prase

a) krev

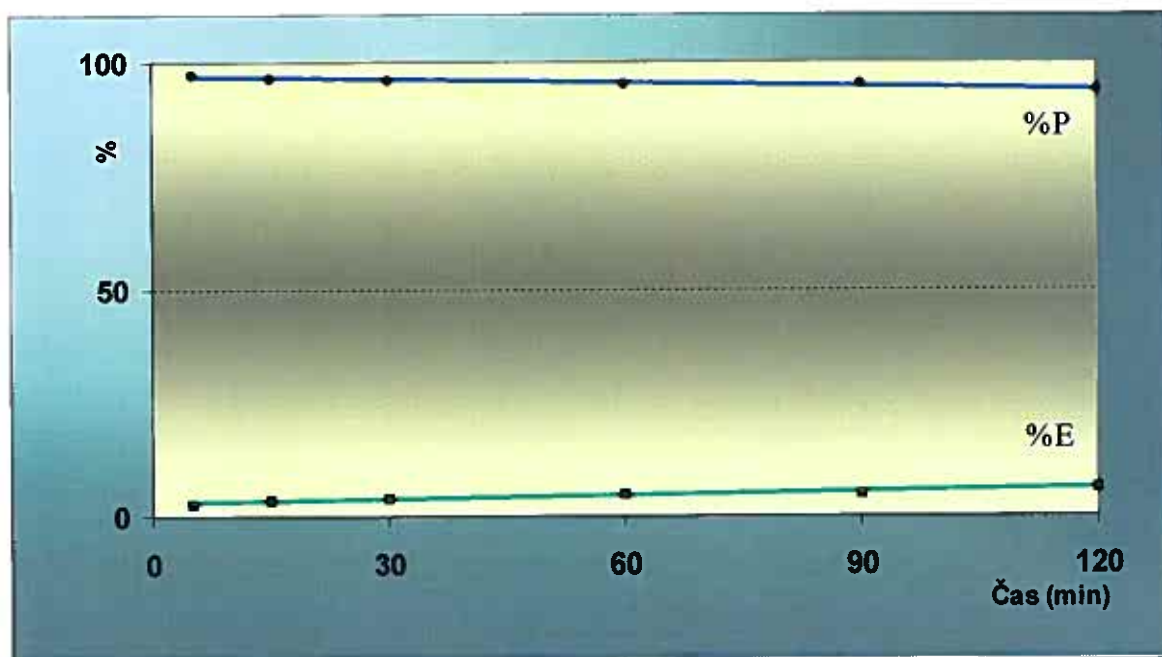


b) suspenze erytrocytů

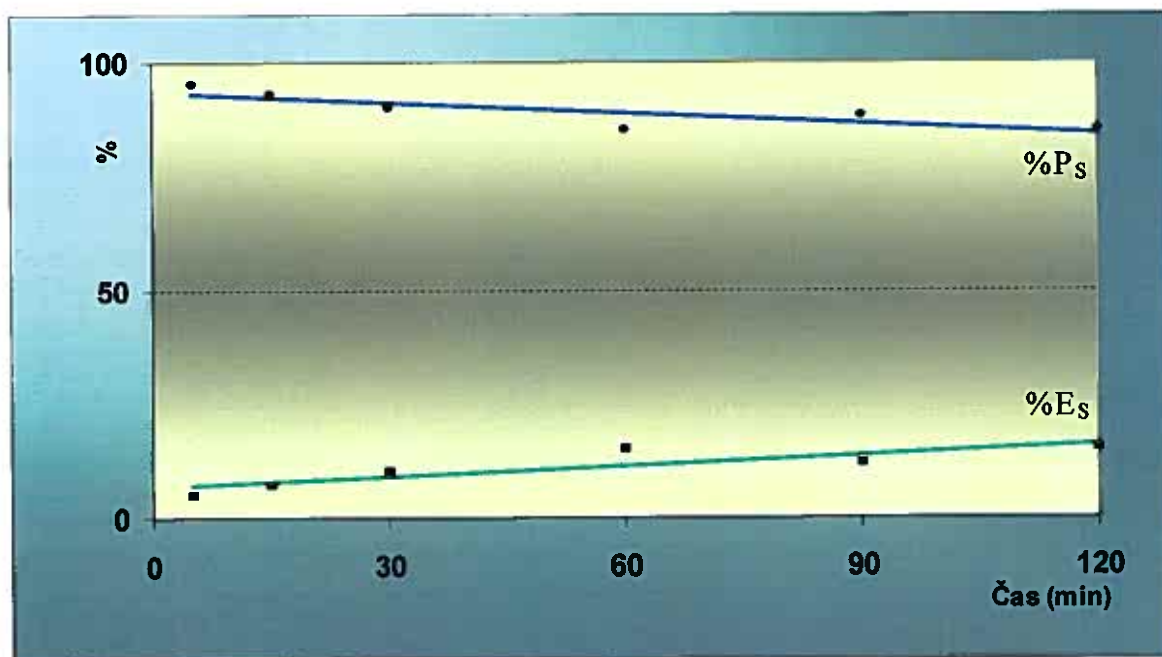


Graf 4 : Průběh distribuce ^{99m}Tc -MDP v čase – skot

a) krev

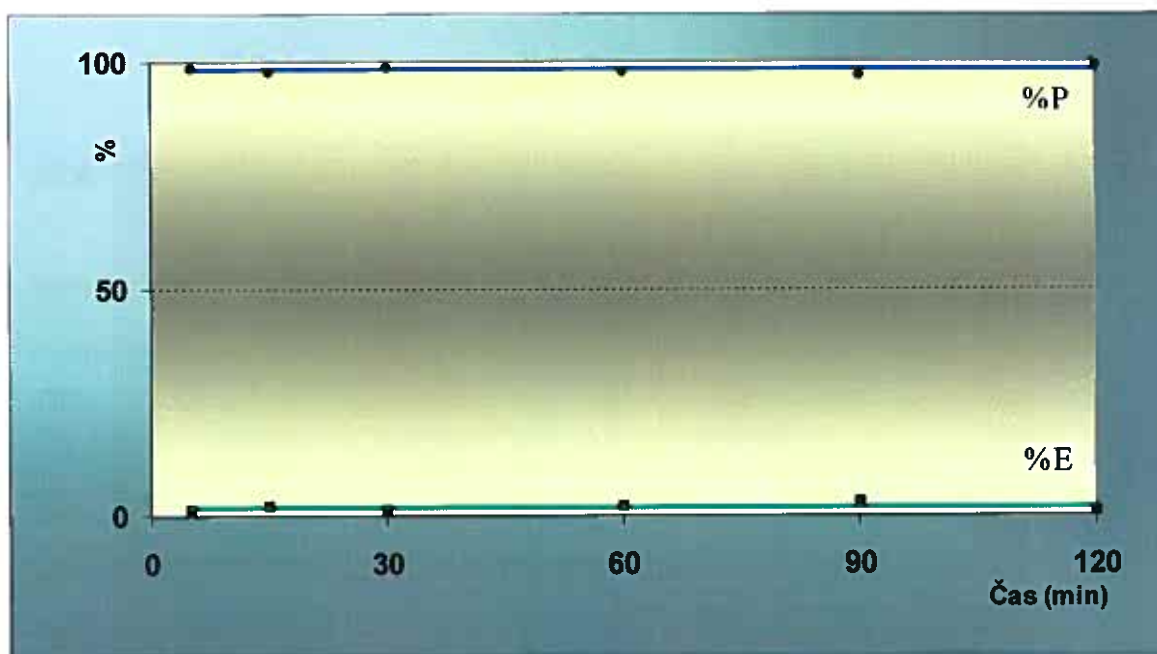


b) suspenze erytrocytů

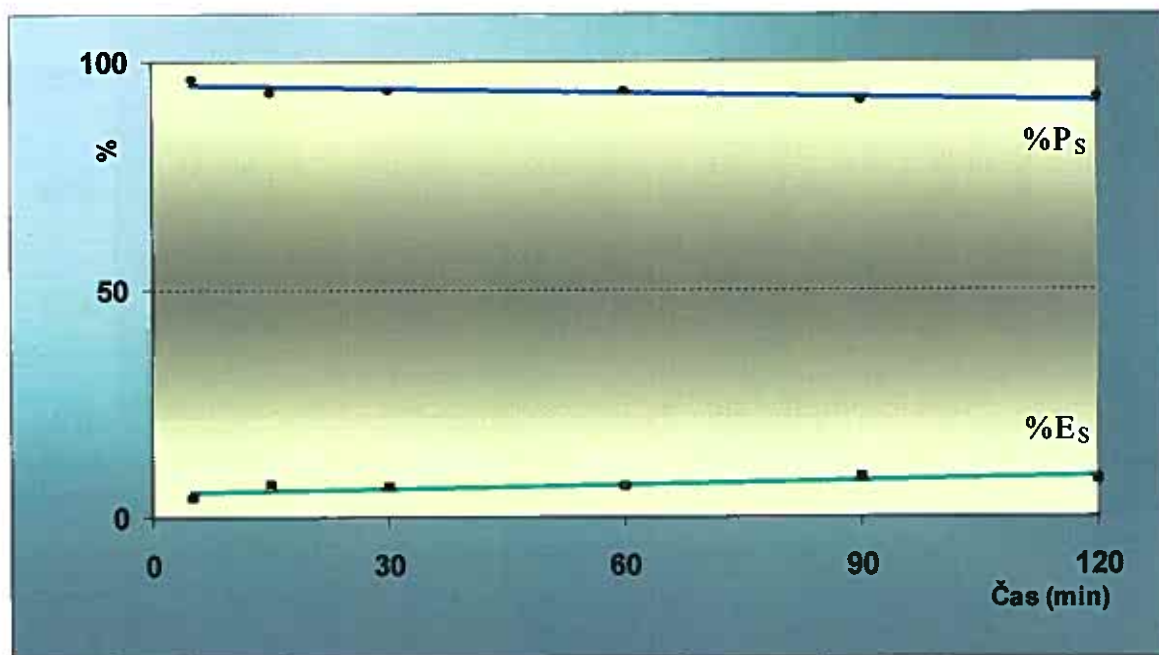


Graf 5 : Průběh distribuce ^{99m}Tc -MDP v čase – člověk

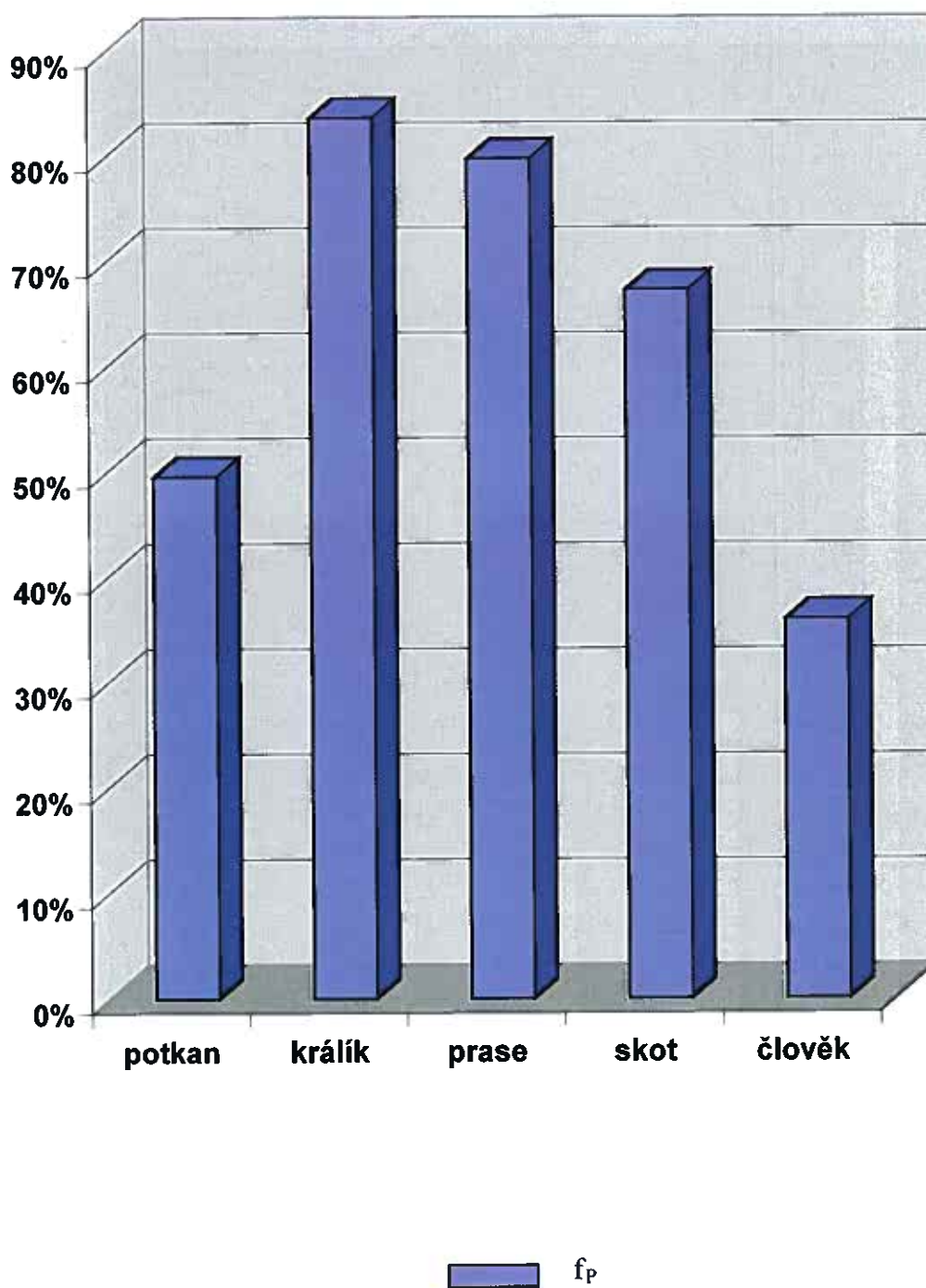
a) krev



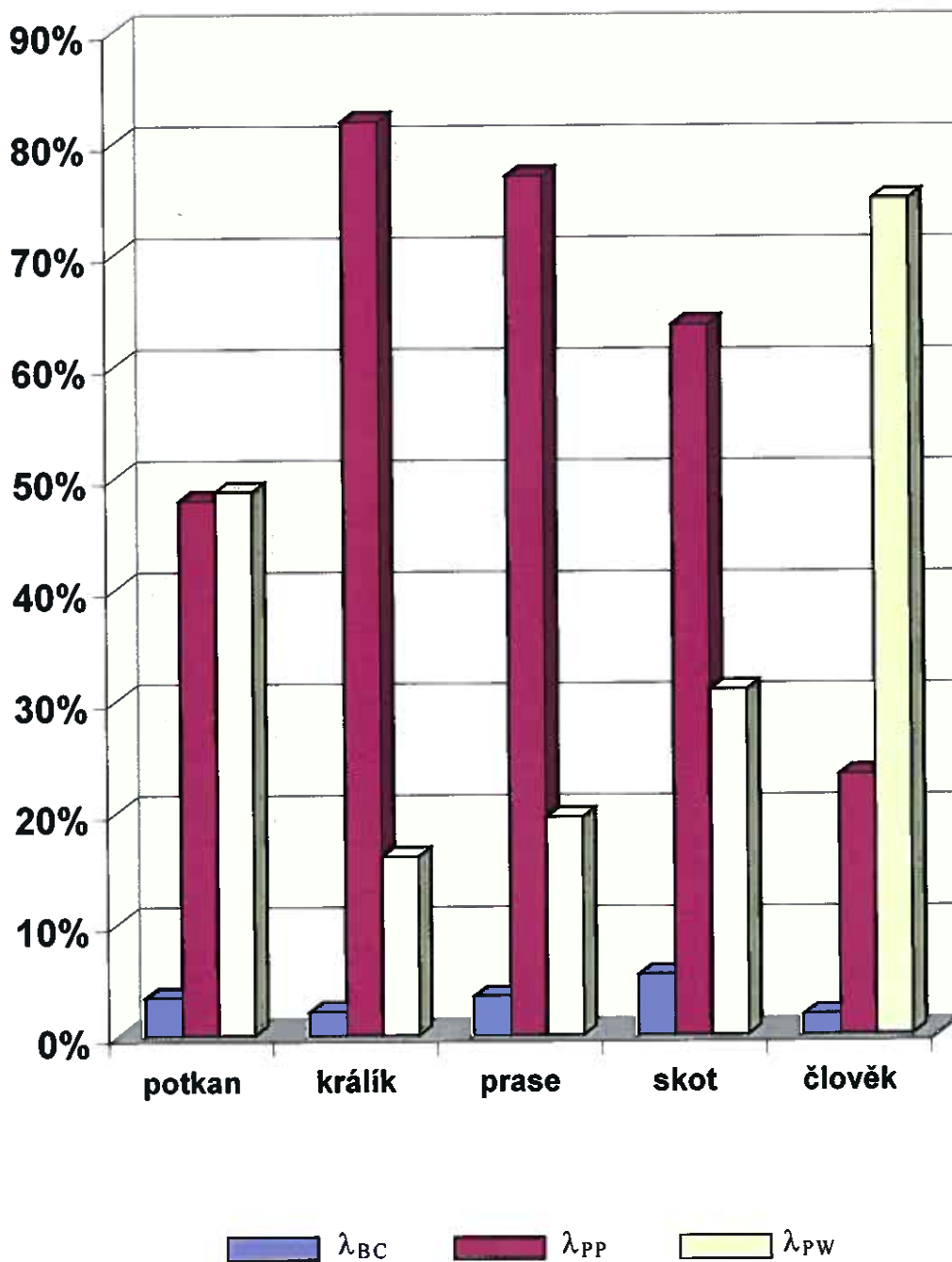
b) suspenze erytrocytů



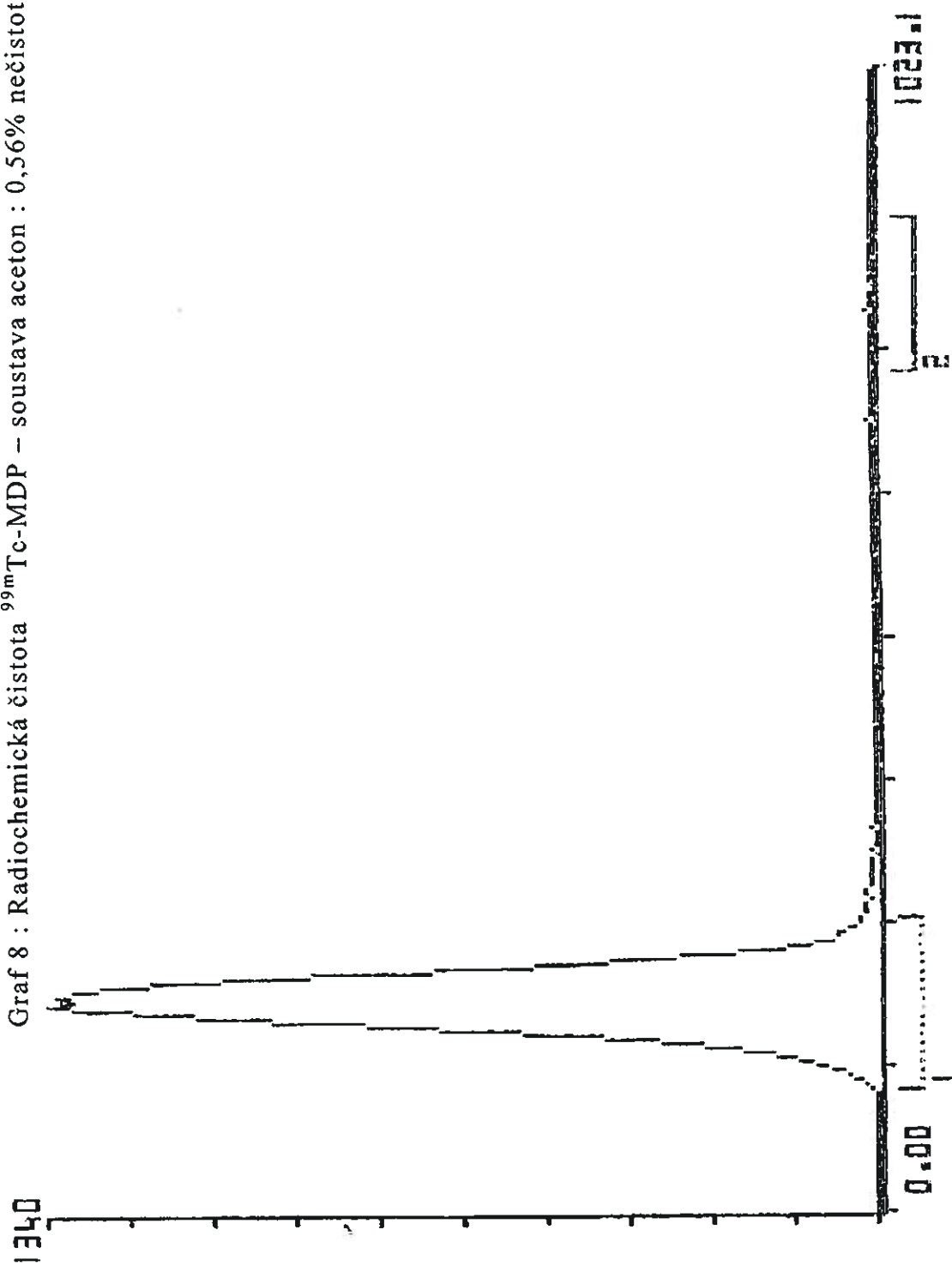
Graf 6: Frakce ^{99m}Tc -MDP navázaná v plasmě (f_p) – mezidruhové srovnání



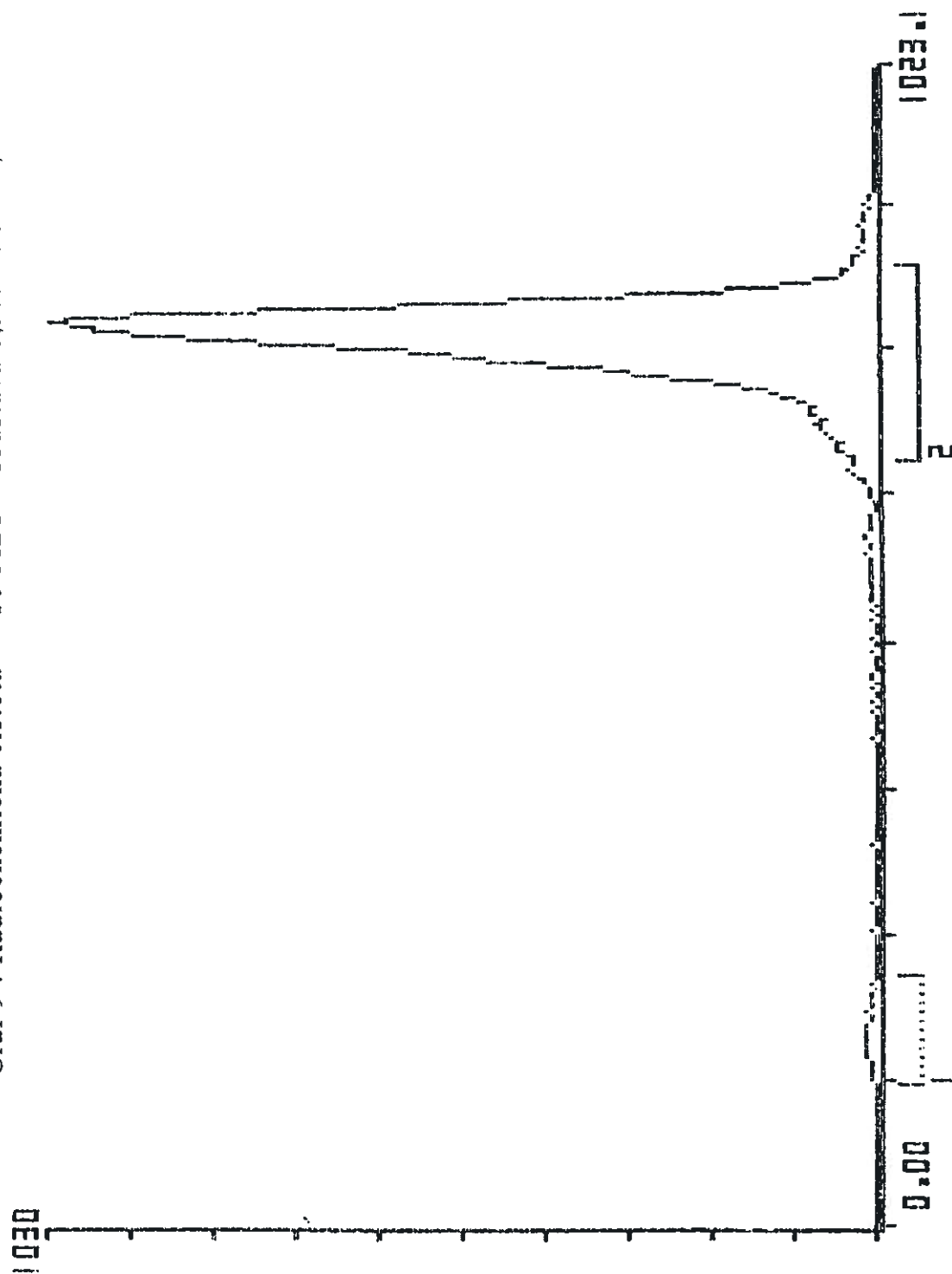
Graf 7 : Frakce ^{99m}Tc -MDP navázaná na plasmatické bílkoviny (λ_{PP}),
v krevních buňkách (λ_{BC}) a volná frakce v plasmatické vodě (λ_{PW})
– mezidruhové srovnání



Graf 8 : Radiochemická čistota ^{99m}Tc -MDP – soustava aceton : 0,56% nečistot



Graf 9 : Radiochemická čistota ^{99m}Tc -MDP – soustava 0,9% NaCl : 1,55% nečistot



2.4. Diskuse

Stanovení rozsahu plasmatické vazebnosti léčiv má zásadní význam pro analýzu jejich farmakokinetického chování, protože pouze ta část léčiva, která je ve volné formě, může pronikat přes biologické membrány. Pro studované radiofarmakum $^{99m}\text{Tc-MDP}$ to hlavně znamená ovlivnění rychlosti jeho přestupu do kostní tkáně a jeho eliminace ledvinami. Přestože byly publikovány údaje o vazebnosti této látky na lidskou plasmu (51,52), výsledky jednotlivých autorů se značně liší a dále bylo potřeba získat údaje o distribuci $^{99m}\text{Tc-MDP}$ do krevních buněk a mezidruhové srovnání rozdělení této látky v krvi. Z tohoto důvodu byla práce zaměřena na analýzu interakcí $^{99m}\text{Tc-MDP}$ se složkami centrálního distribučního systému u několika živočišných druhů.

Stanovení časové závislosti průběhu distribuce $^{99m}\text{Tc-MDP}$ do krevních buněk jak v celé krvi, tak i v suspenzi erytrocytů ukázalo, že studovaný komplex nepřechází ve významné míře do krevních buněk v časovém intervalu do 2h po přidání radiofarmaka. (Grafy 1-5) Určitý podíl aktivity nalezený ve frakci krevních buněk může být způsoben zbytkovým objemem plasmy (pufru), který po centrifugaci zůstává v erytrocytární frakci. Mírný časový nárůst aktivity ^{99m}Tc v krevních buňkách u studovaných živočišných druhů bude patrně způsoben postupným uvolňováním technecia z komplexu, jehož kinetická a termodynamická stabilita není příliš vysoká. Případně přítomné volné technecium by bylo díky svému chemickému chování nalezeno ve formě hydratovaného oxidu jako koloid v buněčné frakci – to platí zvláště pro systém erytrocyty-pufr (absence bílkovin), kde se dá dokonce vypočítat nárůst aktivity (koloidu) v buněčné frakci se stoupajícím podílem vodné fáze (pufru) ve vzorku (klesající hodnota hematokritu) viz.tab.3. Z dosažených výsledků tedy vyplývá, že komplex $^{99m}\text{Tc-MDP}$ neproniká pozorovatelnou rychlostí přes membránu krevních buněk u studovaných živočišných druhů, ani se ve znatelné míře na tuto membránu neváže.

Stanovení vazebnosti $^{99m}\text{Tc-MDP}$ na plasmatické bílkoviny ukázalo, že tato vazebnost se u studovaných živočišných druhů výrazně liší. (tabulka 1, graf 6) Frakce komplexu vázaného na plasmatické bílkoviny klesá při mezidruhovém srovnání v pořadí : králík, prase, skot, potkan a člověk. Hodnota plasmatické vazebnosti nalezená u člověka je do určité míry ovlivněna způsobem konzervace krve, kdy přidání roztoku CPD-A1 vede ke zředění plasmy, při kterém se koncentrace bílkovin přibližně o 1/3 sníží. Stanovený rozsah vazby je tedy nižší než odpovídá fyziologickým podmínkám (5% albuminu v krevní plasmě). Hodnoty vazebnosti na plasmatické bílkoviny jsou ovlivněny použitím různých metod stanovení. (52)

metoda	hodnoty vazebnosti
precipitace s TCA (trichloroctová kyselina)	$70,3 \pm 1,8$
rovnovážná dialýza	$45,0 \pm 2,8$
ultrafiltrace	$69,2 \pm 4,0$

Hodnota plasmatické vazebnosti $36,0 \pm 6,4$ získaná v mé práci je srovnatelná s tímto literárním údajem i přes jiné podmínky dialýzy ($+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin). Data získaná precipitační a ultrafiltrační metodou jsou si blízká a poměrně vyšší než hodnota získaná rovnovážnou dialýzou. Výsledky dialýzy záleží na stabilitě komplexu radiofarmakum-protein , a tak touto metodou stanovíme pouze technecium ireverzibilně vázané na bílkovinu.(52)

Distribuce $^{99m}\text{Tc-MDP}$ v celé krvi je ovlivněna jak jeho vazbou na plasmatické bílkoviny, tak i vazebností na krevní buňky. Vzhledem k velmi nízkému podílu studovaného radiofarmaka v krevních buňkách má zásadní význam pro jeho distribuci v krvi vazebnost na plasmatické bílkoviny. Mezidruhové srovnání distribučních poměrů nalezených v celé krvi je tedy analogické s výsledky získanými při studiu vazebnosti na plasmatické bílkoviny. (tabulky 1-2, grafy 6-7)

Distribuce ^{99m}Tc je pochopitelně ovlivněna chemickou formou v jaké se tento radionuklid v přípravku nachází. Z výsledků studia radiochemické čistoty přípravku vyplývá, že více jak 98% aktivity je ve formě $^{99m}\text{Tc-MDP}$ (grafy 8-9) a přítomné radiochemické nečistoty nebudou dosažené výsledky ovlivňovat více jak ze 2%. Dá se usuzovat, že tyto radiochemické nečistoty ve formě redukovaného hydrolyzovaného ^{99m}Tc byly v experimentech nalezeny ve frakci krevních buněk.

Z dosažených výsledků vyplývá, že vazebnost $^{99m}\text{Tc-MDP}$ na plasmatické bílkoviny je při mezidruhovém srovnání rozdílná a tyto rozdíly se projevují v mezidruhově různém rozdělení látky v celé krvi. K této skutečnosti je nutno přihlížet při přenosu farmakokinetického chování komplexu $^{99m}\text{Tc-MDP}$ z experimentu na zvířeti směrem k člověku.

2.5. Závěr

Při studiu distribuce kostního radiofarmaka $^{99m}\text{Tc-MDP}$ v krvi a suspenzi erytrocytů bylo zjištěno, že komplex nepřechází ve významné míře do krevních buněk během časového intervalu 2h. Vazebnost na plasmatické bílkoviny je poměrně rozsáhlá a u studovaných živočišných druhů se výrazně liší – klesá v pořadí : králík, prase, skot, potkan a člověk. Distribuce v celé krvi je dána vazebností na plasmatické bílkoviny a klesá ve stejném pořadí.

Literatura

1. Bláha V. a kol. : Nukleární medicína, Karolinum Praha, 1997, 90
2. Lang, O. : Nukleární medicína, Karolinum Praha, 1998, 52
3. Melichar, B. a kol. : Chemická léčiva, Avicenum Praha, 1987, 992
4. Subramanian, G. et al : ^{99m}Tc -MDP : A superior agent for skeletal imaging, J.Nucl.Med., 14,1973,640
5. Subramanian, G. et al : ^{99m}Tc -MDP – A superior agent for skeletal imaging : comparison with other technetium complexes, J.Nucl.Med., 16 (8), 1975, 744-755
6. Lázníček, M. a kol. : Comparison of biological characteristics of EDTMP complexes with ^{99m}Tc , ^{111}In and ^{153}Sm in rats, Appl.Radiat.Isot., 45 (9), 1994, 949-953
7. Kanishi, D. : ^{99m}Tc -MDP accumulation mechanism in bone, Oral.Surg.Oral.Med.Oral.Pathol., 75 (2), 1993, 239-46
8. Dienstbier, Z. a kol. : Nukleární Medicína, Avicenum Praha, 1973, 376
9. Francis, M.D., Tofe, A.J. : Experimental basis for phosphate and phosphonate scintigraphy, J.Label.Comp.Radiopharm., 19,1982, 181-206
10. Kaye, J., Hayward, M. : Soft tissue uptake on ^{99m}Tc methylene diphosphonate bone scan imaging : pictorial review, Australas.Radiol., 46 (1), 2002, 13-21
11. Cronhjort, M. et al : Influence of phosphate balance on the activity distribution of ^{99m}Tc -hydroxy-methylene diphosphonate. Experimental studies in the mouse., Acta Radiol., 39 (4), 1998, 427-33
12. Bhatnagar, A. et al : ^{99m}Tc -citrate : a new bone imaging radiopharmaceutical, Nucl.Med.Comm., 20 (11), 1999, 1067-76
13. Arteaga de Murphy, C. et al : Radiopharmacokinetic data for ^{99m}Tc -ABP – a new radiopharmaceutical for bone scanning : comparison with ^{99m}Tc -MDP, Nucl.Med.Biol., 24 (1), 1997, 27-33

14. Ozcan, Z. et al : Correlation of ^{99m}Tc -sestamibi uptake with blood-pool and osseous phase ^{99m}Tc -MDP uptake in malignant bone and soft-tissue tumors, *Nucl.Med.Commun.*, 22 (6), 2001, 679-83
15. Blake, G.M. et al : Quantitative studies of bone with the use of ^{18}F -fluoride and ^{99m}Tc -methylene diphosphonate, *Semin.Nucl.Med.*, 31 (1), 2001, 28-49
16. del Rocio Estrada-Sanchez, G. et al : Reliability of CA 15-3 in the follow up of female patients with breast carcinoma and bone metastases, *Rev.Invest.Clin.*, 55 (4), 2003, 412-8
17. Lázníček, M., Komárek, P. : *Základy radiofarmacie*, Karolinum Praha, 1998, 106
18. Rakias, F., Zolle, I. : Handbook of quality control methods of ^{99m}Tc – radiopharmaceuticals in nuclear medicine (Part I), International Atomic Energy Agency Vienna (In Press)
19. Český lékopis, Svazek I-V, Grada Publishing a.s., 2002, 5756
20. Decristoforo, C. et al : Radiochemical purity of routinely prepared ^{99m}Tc radiopharmaceuticals : a retrospective study, *Nucl.Med.Commun.*, 21 (4), 2000, 349-354
21. Lepej, J. a kol. : Magistraliter pripravený metyléndifosfonát (MDP) a jeho klinické hodnotenie v rádionuklidovej diagnostike skeletu, *Československá farmacie*, 38 (5), 1989, 204-9
22. Riveros, E.G. : Unintentional human skeletal imaging with ^{99m}Tc -methylene diphosphonate 45 month beyond expiration, *Ann. Nucl. Med.*, 13 (5), 1999, 367-368
23. Ponto , JA : Technetium- 99m radiopharmaceutical preparation problems : 12 years of experience, *J.Nucl.Med.Technol.*, 26 (4), 1998, 262-4
24. Millar, AM : Effect of source and age of sodium pertechnetate Tc 99m on radiochemical purity of technetium Tc 99m exametazime, *Am.J.Hosp.Pharm.*, 50 (1), 1993, 103-6
25. Ponto, JA : Effect of pertechnetate source and age on the radiochemical purity of technetium Tc 99m exametazime, *Am.J.Hosp.Pharm.*, 47 (11), 1990, 2511-3

26. Wenke, M., Mráz, M., Hynie, S. : Farmakologie pro lékaře 1. díl, Avicenum Praha, 1983, 708
27. Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M. : Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing , 2002, 694
28. Fendrich, Z. a kol. : Farmakologie pro farmaceuty I, Karolinum Praha, 2002, 207
29. Bertucci, C., Domenici, E. : Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin : methodological approaches and physiological relevance, *Curr.Med.Chem.*, 9 (15), 2002, 1463-81
30. Sudlow, G. et al : The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol.Pharmacol.*, 11 (6), 1975, 824-32
31. Nilson, J.L.G. : Chemical aspects of drug interaction, *Pharma International*, 1, 1971, 1-4
32. Pacifici, G.M., Viani, A. : Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences., *Clin.Pharmacokinet.*, 23 (6), 1992, 449-468
33. Šantavý, F. a kol. : Biochemie pro studující medicíny, Avicenum Praha, 1975, 359
34. Kwong, M., Wasan, K.M. : Cholesteryl ester transfer protein facilitates the movement of water-insoluble drugs between lipoproteins : a novel biological function for well-characterized lipid transfer protein, *Biochem. Pharmacol.*, 64 (12), 2002, 1669-1675
35. Nemunaitis, J., Deeg, H.J., Yee, G.C. : High cyclosporin levels after bone marrow transplantation associated with hypertriglyceridaemia, *Lancet*, 2, 1986, 744-5
36. De Klippel, N. et al : Cyclosporin leukoencephalopathy induced by intravenous lipid solution, *Lancet*, 339, 1992, 1114
37. de Groen, P.C. et al : Central nervous system toxicity after liver transplantation. The role of cyclosporine and cholesterol., *N.Engl.J.Med.*, 317 (14), 1987, 861-866
38. Kremer, J.M. et al : Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein i health and disease, *Pharmacol.Rev.*, 40 (1), 1988, 1-47
39. Schmid, K. et al : Struktura of alpha-1-acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions,

- and homology with immunoglobulins., *Biochemistry*, 12 (14), 1973, 2711-2724
40. Ganguly, M. et al : Steroid-protein interaction XIV. Interaction between human alpha-1-acid glycoprotein and progesterone, *Biochemistry*, 6 (9), 1967, 2803-2814
41. Piafsky, K.M., Borga, O. : Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha 1-acid glycoprotein for interindividual variations., *Clin.Pharmacol.Ther.*, 22, 1977, 545-549
42. Sager, G. et al : Binding of catecholamines to alpha-1 acid glycoprotein, albumin and lipoproteins in human serum, *Biochem.Pharmacol.*, 36 (21), 1987, 3607-3612
43. Urien, S. et al : Evidence for binding of certain acidic drugs to alpha 1-acid glycoprotein, *Biochem.Pharmacol.*, 31 (22), 1982, 3687-9
44. Hinderling, P.H. : Red blood cells : a neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Pharmacol.Rev.*, 49 (3), 1997, 279-295
45. Koefoed, P., Brahm, J. : The permeability of human red cell membrane to steroid sex hormones, *Biochim.Biophys.Acta*, 1195 (1), 1994, 55-62
46. Sager, G., Jacobsen, S. : Beta-adrenergic ligand binding to receptors on human erythrocytes and lymphocytes, *Therapie*, 37 (6), 1982, 629-634
47. Puukka, R. et al : Erythrocyte insulin binding in normal infants, children and adults, *Hormone Res.*, 17, 1983, 185-196
48. Lázníček, M., Lázníčková, A. : The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs., *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 13 (7), 1995, 823-8
49. Yu, S. et al : A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery, *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, 19 (2), 2005, 250-4
50. Holmberg, L. et al : Pethidine binding to blood cells and plasma proteins in old and young subjects, *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 23 (5), 1982, 457-461

51. Savelkoul, T.J. : Protein-binding and urinary excretion of $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})\text{-MDP}$ and $^{99m}\text{Tc}\text{-MDP}$, *Int.J.Nucl.Med.Biol.*, 12 (2), 1985, 125-131
52. Vanlič-Razumenič, N. et al : Interaction of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals with transport proteins in human blood, *Nucl.Med.Biol.*, 20 (3), 1993, 363-365