



**^{11}C -IZOTÓPPAL JELZETT KOFFEINSZÁRMAZÉKOK
RADIOZINTÉZISE A SZÖVETI ADENOZINRECEPTOR
ELOSZLÁS PET-VIZSGÁLATÁHOZ**

doktori (PhD) értekezés

Boros István

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2002

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem **TTK Kémia** Doktori Iskola **Reakciókinetika és katalízis** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2002. július 04.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Boros István doktorjelölt 1994 – 2002 között a fent megnevezett Doktori Iskola **Reakciókinetika és katalízis** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2002. július 04.

témavezető aláírása

Dr. Joó Ferenc

DE TTK Fizikai Kémiai Tanszék

Tanúsítom, hogy Boros István doktorjelölt 1994 – 2002 között a fent megnevezett Doktori Iskola **Reakciókinetika és katalízis** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2002. július 04.

témavezető aláírása

Dr. Mária Teréz

DE OEC PET-Centrum

Tartalomjegyzék

Rövidítések

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi előzmények	4
2.1. Adenozinreceptor ligandumok	4
2.2. PET-radioizotópokkal jelzett vegyületek	9
2.2.1. A PET-technika alkalmazása	9
2.2.2. Általános kritériumok	12
2.2.3. Radiofarmakonok	14
2.2.4. ¹¹ C-izotóp	20
2.2.5. Minőségellenőrzés	22
3. Eredmények	28
3.1. Prekurzorok és inaktív ligandumok	28
3.1.1. Xantinszármazékok	28
3.1.2. 7-Metil-sztilixantinszármazékok	30
3.2. Radiokémiai szintézis	32
3.2.1. Sztilixantinszármazékok [¹¹ C]metilezése	32
3.2.2. [¹⁸ F]Adenozinszármazékok előállítása	39
3.3. A_{2A}-adenozinreceptor szelektivitás farmakológiai elemzése	40
3.4. A [¹¹C]CSC antagonistája és az adenozinreceptor kötődésének előzetes vizsgálata különféle biológiai rendszerekben	43
3.4.1. Receptor-ligandum kötődés specifikusságának vizsgálata	43
3.4.2. A receptor-ligandum kötődés szervezeten belüli eloszlásának vizsgálata	46

3.4.3. PET-vizsgálatok	49
3.4.4. A [¹¹ C]CSC receptor-ligandum kötődés kinetikáját leíró állandók meghatározása négykompartmentes modell alapján nyúlágyban PET-vizsgálattal	53
4. Anyagok és módszerek	56
5. Összefoglalás	78
5.1. Összefoglalás	78
5.2. Summary	82
5.3. Köszönetnyilvánítás	91
Irodalomjegyzék	92
Az értekezésben felhasznált közlemények	100
Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények	100
Az értekezés kapcsolódó előadások, poszterek	101

Rövidítések

CT	Computerized Tomography (komputer tomográfia)
cps	count/second (beütés/másodperc)
DAR	Differential Absorption Ratios (differenciális felvételi tényező)
EOB	End of Bombardment (besugárzás vége)
EOS	End of Synthesis (szintézis vége)
fp.	forráspont
GM-cső	Geiger-Müller számláló cső
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagyfelbontású folyadékkromatográfia)
MS	Mass Spectrum (tömegspektrum)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (mágneses magrezonancia)
op.	olvadáspont
PET	Positron Emission Tomography (pozitron emissziós tomográfia)
ROI	Region of Interest (érdekeltségi terület)
RSS	Residual Sum of Squares (legkisebb négyzetek elve)
Rt	retenciós idő
SPECT	Single Photon Emission Computerized Tomography (egy fotont emittáló komputer tomográfia)
TACT	Time Activity Curve (idő akkumuláció görbe)
TLC	Thin Layer Chromatography (vékonyréteg kromatográfia)
VOI	Volume of Interest (érdekeltségi térfogat)

7-metilxantinszármazékok:

SC	(E)-8-sztiril-1,3,7-trimetilxantin
ASC	(E)-8-(3-azidosztiril)-1,3,7-trimetilxantin
CSC	(E)-8-(3-klórsztiril)-1,3,7-trimetilxantin
ISC	(E)-8-(3-jódsztiril)-1,3,7-trimetilxantin
NSC	(E)-8-(3-nitrosztiril)-1,3,7-trimetilxantin

3,4-DMSC	(<i>E</i>)-8-(3,4-dimetoxisztyril)-1,3,7-trimetilxantin
3,5-DMSC	(<i>E</i>)-8-(3,5-dimetoxisztyril)-1,3,7-trimetilxantin
3,4,5-TMSC (KF18446)	(<i>E</i>)-8-(3,4,5-trimetoxisztyril)-1,3,7-trimetilxantin
NDPrSC	(<i>E</i>)-1,3-dipropil-7-metil-8-(3-nitrosztiril)xantin
3,4-DMDPrSC	(<i>E</i>)-8-(3,4-dimetoxisztyril)-1,3-dipropil-7-metilxantin
3,5-DMDPrSC	(<i>E</i>)-8-(3,5-dimetoxisztyril)-1,3-dipropil-7-metilxantin

Xantinszármazékok:

SX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-sztirilxantin
CSX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3-klórsztiril)xantin
ISX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3-jódsztiril)xantin
NSX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3-nitrosztiril)xantin
3,4-DMSX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3,4-dimetoxisztyril)xantin
3,5-DMSX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3,5-dimetoxisztyril)xantin
3,4,5-TMSX	(<i>E</i>)-1,3-dimetil-8-(3,4,5-trimetoxisztyril)xantin
NDPrSX	(<i>E</i>)-1,3-dipropil-8-(3-nitrosztiril)xantin
3,4-DMDPrSX	(<i>E</i>)-8-(3,4-dimetoxisztyril)-1,3-dipropilxantin
3,5-DMDPrSX	(<i>E</i>)-8-(3,5-dimetoxisztyril)-1,3-dipropilxantin

Egyéb vegyületek

CGS 21680	2-[<i>p</i> -(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'- <i>N</i> -etilkarboxamidoadenozin
CPA	<i>N</i> ⁶ -ciklopentiladenozin
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DPCPX	1,3-dipropil-8-ciklopentilxantin
FDG	2-fluor-2-dezoxi-glukóz
NECA	5'- <i>N</i> -etil-karboxamidoadenozin
TATM	1,3,4,6- <i>O</i> -tetraacetyl-2-trifluormetánszulfonsav-mannóz
THF	tetrahidrofurán
ZM 241385	4-{2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3- <i>a</i>][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil}fenol

1. Bevezetés

Az adenoszinreceptorok élettani szerepének vizsgálata jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi. Ismeretes, hogy a P1-típusú adenoszinreceptorok különböző szöveti sejtek membránján expresszálódnak és a központi idegrendszer és a perifériás szövetek működésének szabályozásában egyaránt kiemelkedő fontosságúak.

Az adenoszinnek meghatározó szerepe van a koszorúerek keringés szabályozásában, valamint az endogén kardioprotekcióban. Ez magában foglalja a prekondicionáló, anti-iszkémiás, antiarritmiás hatásokat, valamint az energiaellátást és mikrovaskularizációt elősegítő effektusokat is. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy a krónikus metilxantin (koffein) kezelés a centrális és perifériális adenoszinreceptorok túlszabályozásához vezet (up regulation). Azt is kimutatták, hogy bizonyos sejteken az adenoszin analógokkal történő tartós expozíció az adenoszinreceptorok deszenzibilizációját eredményezi (down regulation). Statisztikai adatok bizonyítják, hogy a benzodiazepin készítmények tartós szedése a fatális kimenetelű myocardialis infarktusok kialakulásának gyakoriságát ötszörösére növeli. Hosszú időn át fenntartott magas koffein dózisok ugyancsak növelik az infarktusok kockázatát. Mindezek a kísérleti tapasztalatok arra engednek következtetni, hogy a pszichotróp szerekekkel, benzodiazepin, metilxantin készítményekkel végzett tartós terápia alapvetően módosíthatja a purinerg receptormechanizmusokat. Felvetődik a kérdés, hogy magyarázhatják-e az előzőekben részletezett megfigyeléseket az adenoszinreceptor expresszióban bekövetkező változások? Az ilyen hatások tanulmányozásához kitűnő segédletet biztosíthat egy PET-izotóppal jelzett receptor ligandum.

A pozitron emissziós tomográfia a szöveti biokémia tanulmányozását lehetővé tevő képalkotó eljárás. A módszer alkalmazása során pozitronbomló izotóppal megjelölt, biológiailag aktív vegyületet (radiofarmakon) juttatnak a vizsgálatban résztvevő

személybe vagy más élő rendszerbe. A PET-kamerával meghatározható a radiofarmakonok háromdimenziós eloszlása, amely képszerű formában karakterizálja az egyes szervek, szövetek kvantitatív biokémiai paramétereit, például a glukóz anyagcsere, az aminosav transzport, a fehérjeszintézis, a sejtosztódás, a szöveti oxigénfelhasználás vagy a (neuro-, illetve egyéb) receptorstátusz jellemzőit.

A specifikus adenzinreceptor kötőhelyek feltérképezésében jelenleg a PET az egyik legígéretesebb és világviszonylatban is a legkifinomultabb technika. A PET rendkívül nagy érzékenysége lehetővé teszi az egyes biológiai struktúrák olyan alacsony koncentrációban (pM) történő vizsgálatát, amely más képalkotó eljárások számára a detektálási küszöb alatt marad.

Célkitűzések:

A Ph.D. program keretében célunk volt, nagy specifikus aktivitású, pozitront emittáló izotóppal jelzett adenzinreceptor ligandumok előállítása és a jelzett ligandumok kötődésének és szervezeten belüli eloszlásának *in vivo* és *in vitro* biológiai vizsgálatai.

A kutatási téma keretében pozitront emittáló izotóppal jelzett, nagy specifikus aktivitású adenzinreceptor ligandumok szerves preparatív és radiokémiai szintézisének megvalósítása volt a feladatunk, biztosítva azt, hogy a radiofarmakonok előállítása automatizált technológiával történjen. A program összetevői:

- P1 xantin típusú adenzinreceptor antagonisták előállítása és ^{11}C -PET-izotóppal történő jelölése;
- a radiofarmakon előállítás automatizálása;
- a szintetizált jelzetlen és jelzett receptor ligandumok kémiai minőségvizsgálata;

- nagy specifikus aktivitású, ^{11}C -jelzett klórsztrilkoffein ($[^{11}\text{C}]\text{CSC}$) előállítása, automatizált szintézise és minőségellenőrzése;
- A_{2A} -adenozinreceptor szelektivitás farmakológiai elemzése.

A kutatási téma keretében további feladatunk volt a $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ antagonistá és az adenzinreceptor kötődésének előzetes vizsgálata különféle biológiai rendszerekben. E kutatási feladat keretein belül:

- a receptor-ligandum kötődés specifikusságának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata;
- a receptor-ligandum kötődés szervezeten belüli eloszlásának *in vivo* és *ex vivo* tanulmányozása;
- a $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ ligandum-receptor kötődéskinetika vizsgálata pozitron emissziós tomográfiával nyúlban.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Adenozinreceptor ligandumok

A szervezet, a különböző szövetek, sejtek egybehangolt működésének szabályozása bonyolult neurohumorális mechanizmusok révén valósul meg. Az élő szervezetben ubiquiter módon előforduló adenozinnak kiemelkedő jelentősége van a homeosztázis kialakításában, szinte valamennyi sejtől felszabadulhat, neurotranszmitter, autokrin, illetve parakrin szabályozó hatással rendelkezik. Egyre inkább elfogadottá válik az a felismerés, hogy nincs olyan sejt vagy szövet, amelynek a működésében az adenozinreceptor mechanizmusok ne játszanának alapvető regulációs szerepet.

Az adenozinnak számos olyan élettani hatása van, amelyek régóta ismertek [15], de ezen hatások több részlete jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezi [10, 11, 54, 92]. Drury és Szent-Györgyi 1929-ben leírták az adenozin szívfrekvenciát csökkentő és értágító hatását [16], a preszinaptikus purinerg receptorok aktiválásával különböző neurotranszmitterek felszabadulását gátolja. A myocardiumban gátolja az adenilcikláz aktiválásán keresztül reguláló szerek hatását [4], szabályozza a szívkoszorúerek perfúziójának mértékét, a gasztrointesztinális traktus motilitását és szekretoros aktivitását. Az adenozin gátolja a trombocita aggregációt [62], amiben a trombociták felszínén expresszált purinerg A₂-receptoroknak van szerepe, fokozza az eritropoetin termelést a vesékben [99], immunológiai folyamatok szabályozásában vesz részt [6].

A központi idegrendszerben található nagyszámú purinerg receptor megváltozott működésével számos idegrendszerbeli kórkép (epilepszia, depresszió, skizofrénia) hozható összefüggésbe [48]. Megváltozott purinerg receptormechanizmusok játszhatnak szerepet az asthma bronchiale [14], az angina pectoris [93] patogenézisében.

Mindemellett nem elhanyagolhatók azok a megfigyelések sem, amelyek arra utalnak, hogy számos centrális és perifériás támadáspontú gyógyszer hatásmechanizmusában lényeges szerepe van a purinerg receptoraktiváció megváltoztatásának. Így ma elfogadott, hogy a benzodiazepinek, a meprobamat, a barbiturátok és a triciklikus antidepresszánsok hatásában jelentős összetevő a purinerg komponens [61, 92]. Újabb irodalmi adatok szerint a krónikus metilxantin kezelés mind a centrális, mind pedig a perifériás adozinreceptorok túlszabályozását idézi elő. Az adott példák alapján tehát feltételezhető, hogy minden olyan patológiás állapot, illetve gyógyszeres kezelés, amely a P₁ típusú purinerg receptorok fokozott, illetve csökkent aktivációját eredményezi, maga után vonhatja az adozinreceptorok down, illetve up regulációját.

A purinerg receptorok osztályozása

A purinerg hatások vizsgálata és az eredmények rendszerezése szükségessé tette a purinerg receptorok osztályozását. Ez többféle szempont szerint történhet, ma a legáltalánosabban elfogadott az 1980-ban, Burnstock által javasolt rendszer [10]. E felosztásnak megfelelően a purinoceptorok két fő típusa különböztethető meg: a P₁ és a P₂ receptorok csoportja. Elkülönítésük az egyes receptorokra ható agonisták és antagonisták, a szignáltranszdukcióban résztvevő mechanizmusok típusa, illetve a ligandum-receptor kölcsönhatásnak az adenilcikláz aktivitására kifejtett hatása alapján történik.

A 2.1. táblázat tartalmazza azokat a kritériumokat amelyek alapján a P₁ és a P₂-receptorok elkülöníthetőek.

2.1. Táblázat A purinerg receptorok osztályozása

	Természetes ligandum	Antagonisták	Agonisták +	cAMP-re gyakorolt hatás	Effektor rendszer
P ₁	Adenozin (ADO)	Metilxantin	ADO AMP ADP ATP	Van	G fehérjéhez csatolt
P ₂	ATP, ADP, diadenozin-tetrafoszfát	Quinidin; Imidazolin; Apamin	ATP ADP AMP ADO	Nincs	G fehérjéhez csatolt, Intrinsic ioncsatorna membrán pórus

Ahol: ADO: adenozin, AMP: adenozin-monofoszfát, ADP: adenozin-difoszfát, ATP: adenozin-trifoszfát
+ a ligandumok felsorolása csökkenő kötődési állandó szerint történt.

A P₁ típusú purinerg receptorok

Valamennyi adenozinreceptor effektor mechanizmusa G fehérjéken keresztül valósul meg. Rekombináns adenozinreceptorok aminosav szekvenciáinak vizsgálata alapján a P₁ típusú receptorok 4 alcsoportba sorolhatók (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) [58, 59, 60]. Ezeknek az adenozinreceptoroknak a struktúrája homológiát mutat a bakteriorhodopszin struktúrájával, aminek alapján az adenozinreceptorok a G proteinhez kapcsolt receptorok szupercsaládjába sorolhatóak [10, 25].

Az A₁-receptorok számos hatást közvetítenek. Agonistákkal való kölcsönhatásuk, telítésük gátolja az adenilcikláz [63, 100], fokozza a membrán K⁺ konduktanciáját [98], a foszfolipáz C aktivitását [5], a proteinkináz C szignált és a Ca²⁺ felszabadulást. E hatások pertussis toxinnal gátolhatók, ami arra utal, hogy azok G_{i(1-3)} illetve G₀ fehérjékhez kötődtek [24, 71]. Az A_{2A}- és A_{2B}-receptorok transzmembrán szakasza nagy homológiát mutat, de az A_{2A} citoplazmatikus domain-je lényegesen nagyobb a többi receptorénál [20, 91]. Az A_{2(A-B)}-receptorok egyik közös sajátossága, hogy kölcsönhatásuk, telítésük az adenilcikláz aktivitását fokozza. Stimuláló hatásukat valószínűleg G_s-fehérjén keresztül valósítják meg. Nincs bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az A_{2(A-B)} által aktivált

G_s-fehérje az adenilcikláz aktivitásának fokozásán kívül egyéb folyamatokat is aktiválna vagy gátolna. A nemrégiben elkülönített A₃-receptorhoz kötődő agonisták adenilcikláz gátló hatása miatt ez a receptortípus G_i-kapcsolt receptornak tűnik [1, 102].

2.2. táblázat P₁-típusú adenzinreceptorok főbb sajátosságai

Altípus	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
G-protein	G _{i(1,3)}	G _s	G _s	G _{i(2,3)}
Hatások	cAMP↓ AC↓ K ⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	cAMP↑ AC↑	cAMP↑ AC↑	cAMP↓ AC↓
Agonisták	<i>erős</i> (0,3-3 nM): CPA, CHA, R-PIA, ADAC <i>közepes</i> (3-30 nM): NECA , Ado, 2-CIAdo <i>gyenge</i> (30-350nM): SPIA, DPMA <i>nagyon gyenge</i> (>350nM): CV1808, APEC	<i>erős</i> (1-20 nM): NECA , APEC, CGS21680 <i>közepes</i> (20-200 nM): CV1808, 2-CIAdo, R-PIA, ADAC <i>gyenge</i> (200-500nM): S-PIA, CHA, CPA	<i>erős</i> (0,5-5 μM): NECA , <i>közepes</i> (5-20 μM): 2-CIAdo, Ado, R-PIA, <i>gyenge</i> (20-100 μM): S-PIA <i>nagyon gyenge</i> (>100 μM): CV1808, CGS21680	<i>Erős</i> (< 10 nM): N-Bz-NECA, <i>Közepes</i> (10-30 nM): 2-CIAdo, Ado, R-PIA <i>Gyenge</i> (100-1000 nM): CGS 21680 <i>Nagyon gyenge</i> : (>1 μM): Ado
Antagonisták	<i>erős</i> (0,5-2 nM): CPX, XAC <i>közepes</i> (20-200 nM): CPT, 8-PT, CGS15943 <i>gyenge</i> (1-20 μM): teofillin, 8-pST, IBMX, KF17387 <i>nagyon gyenge</i> (>20 μM): koffein, DMPX, CSC	<i>Erős</i> (20-100 nM): CSC , XAC, CGS15943, KF 17837 <i>közepes</i> (0,2-2 μM): CPT, 8-PT, CPX <i>gyenge</i> (1-20 μM): teofillin, 8-pSPT, IBMX, DMPX <i>nagyon gyenge</i> (>30 μM): koffein	<i>erős</i> (20-100 nM): XAC, CPX CGS15943, 8-PT <i>közepes</i> (0,5-10 μM): 8-pSPT, CPX <i>gyenge</i> (1-20 μM): teofillin, IBMX, DMPX <i>nagyon gyenge</i> (>30μM): koffein, KF 17837	<i>Erős</i> (1-20 nM): BW-A 522
Előfordulás	agy (kortex, hipokampusz, kisagy), vese, here, zsírszövet	agy (striátum, nukleusz accumbens, tuberkulum olfaktorium)	gyomor, béltraktus	Here

Ahol: cAMP: ciklikus-adenozin-monofoszfát; AC adenilcikláz; Ado: adenzin; 2-CIAdo: 2-klór-adenozin; R-PIA: (R)-N⁶-(2-fenilizopropil)adenozin; S-PIA (S)-N⁶-(2-fenilizopropil)adenozin; KF17837: (E)-1,3-dipropil-7-metil-(3,4,5-trimetoxisztril)xantin; CPX: 8-ciklopentilxantin; CPT: 8-ciklopentilteofillin; DMPX: (E)-1,3-dimetil-7-propilxantin; CHA: N⁶-ciklohexiladenozin; CPA: N⁶-ciklopentiladenozin; BW-A 522: 3-(3-jód-4-aminobenzil)-8-(4-oxiacetil)-1-propilxantin; ADAC: adenzin-amin-kongener; CV 1808: 2-feniladenozin; APEC: 2-[(2-aminoetilamino)karboniletilfeniletilamino]-5'-N-etilaminokarboxamidoadenozin; XAC: xantin-amin-kongener; 8-PT: 8-fenilteofillin; 8-pST: 8-p-szulfenilteofillin; IBMX: 3-izobutil-1-metilxantin; CGS15943: 9-klór-2-(2-furanil)-5,6-dihidro-[1,2,4]-triazolo[1,5]kinazolin-5-imin-monometánszulfonát; N-Bz-NECA: N⁶-benzil-NECA;

A 2.2. táblázatban a P₁-típusú adenzinreceptorok főbb sajátosságait tüntettük fel [23].

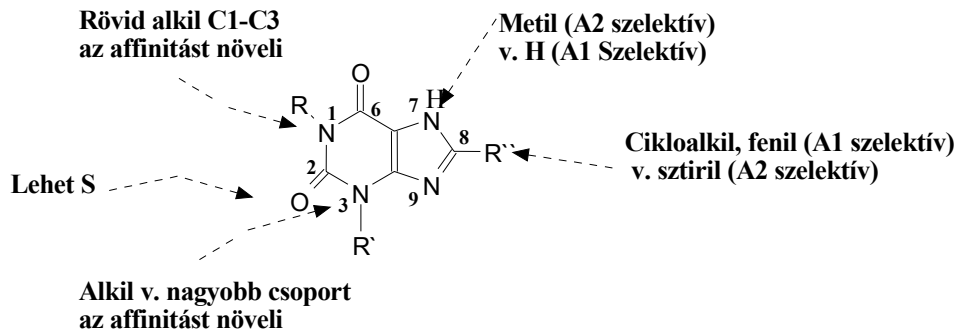
Az A_{2A}-receptoroknak kiemelt jelentőségük van, azok a szervezet életfontosságú szerveire lokalizálódnak. Nagyon sok A_{2A} kötőhely van az agy dopaminerg szinapszisokban gazdag területein, a periférián pedig a koszorúserek azok, amelyek különösen nagy denzitásban tartalmaznak ilyen receptorokat. Az A_{2A}-receptorok szerepe mind az élettani, mind a patológiás folyamatok megértése szempontjából alapvetőnek látszik. Mindezek alapján reális az az igény, hogy olyan A_{2A}-receptor jelző tracerek kerüljenek kifejlesztésre, amelyek lehetőleg nagy affinitással kötődnek, ugyanakkor szelektívek az A_{2A}-receptorokra.

A rendelkezésre álló farmakológiai eszközök (ideértve a radioaktív izotóppal jelzett ligandumokat) segítségével egyelőre csak az A₁- és A_{2A}-receptorok lokalizációjáról vannak ismeretek [23]. Az A₁-receptorok erős expressziót mutatnak az agyban (kortex, kisagy, hippokampusz). A központi idegrendszerben az A_{2A}-receptorok főként a striátumban találhatóak, míg az A_{2B}-receptorok „egész test” eloszlást mutatnak [8, 47, 78].

Az adenzinreceptor ligandumok kémiai szerkezetük alapján két főbb csoportba sorolhatók:

1. Adenzinszármazékok
2. Xantinszármazékok

Az eddigi tapasztalatok szerint az adenzinszármazékok agonista, a xantinszármazékok antagonistá hatást fejtenek ki. Az adott származék szelektivitását nagymértékben a vegyület szerkezete határozza meg. A 2.1. ábrán a xantinszármazékok szerkezet-specifitász összefüggését mutatjuk be [44].



2.1. ábra Szerkezet-specifititás összefüggés xantinszármazékoknál

A nagy affinitású, antagonistá hatású adenozinreceptorok (i) lapos (sík), (ii) aromás vagy π -elektronokban gazdag, (iii) nitrogéntartalmú, gyakran 6:5 fuzionált heterociklusos vegyületek. A xantinszármazékok 8-sztíril-szubstitúciója növeli az A_2 -receptor szelektivitást, illetve metilcsoport kapcsolása a 7-es helyzetbe fokozza az A_2 affinitást. A sztírilcsoport további szubsztitúciója (klór- vagy metoxi-csoportokkal) az A_2 szelektivitás növekedéséhez vezet [46].

2.2. PET-radioizotópokkal jelzett vegyületek

2.2.1. A PET-technika alkalmazása

A specifikus purinerg receptor kötőhelyek feltérképezésében jelenleg a PET a legígéretesebb és világviszonylatban is a legkifinomultabb technika. A PET rendkívül nagy érzékenysége lehetővé teszi az egyes biológiai struktúrák olyan alacsony koncentrációban (pM) történő vizsgálatát, amely más képalkotó eljárások számára a detektálási küszöb alatt marad [22, 26, 27].

A PET-vizsgálatok egyik előnye a többi képalkotó eljárással szemben az, hogy a segítségükkel nyert adatok abszolút egységekben kifejezhetők, így az egyes képekhez, ROI-okhoz (Region Of Interest), illetve VOI-okhoz (Volume Of Interest) meghatározott numerikus értékekkel jellemezhető biokémiai

paraméterek (aktivitás és koncentráció) rendelkeznek. A receptor regulációs folyamatok analízise megköveteli a kvantitálást, ehhez pedig a rekonstruált képen (adatokon) különböző matematikai transzformációkat szükséges elvégezni. E transzformációk eredményeként a nyers, elsődleges PET-adatokból (tér és időkoordinátákkal paraméterezett radioaktivitás koncentráció adatok) biokémiai adatokhoz jutunk. A transzformációk alapja az adott receptorligandum farmakokinetikáját leíró, úgynevezett tracer-kinetikai kompartmentmodellek alkalmazása. Ennek során a modellben szereplő biokémiai paramétereket (kötődési állandó, transzport állandók) optimalizáló algoritmusok segítségével úgy választjuk meg, hogy azok értékeiből a modell alapján meghatározott (receptorligandum akkumulációs) kinetikai görbék a PET-vizsgálattal kapott farmakokinetikai görbékhez a legjobban illeszkedjenek. A biokémiai állandók optimalizált értékei, illetve azoknak helytől való változásai képszerűen megjeleníthetők [3, 52].

A radiofarmakonok eloszlásának és az eloszlások kialakulásának analízisét lehetővé tevő kinetikai modellek a különböző farmakonok esetén eltérnek egymástól. Különözhetnek a modellek abból a szempontból is, hogy a tényleges biokémiai, élettani folyamatokat mennyire részletesen írják le [9, 19, 29, 50]. A receptorligandum rendszerek legáltalánosabb analízisét a 4-kompartmentes modell teszi lehetővé. Dolgozatomban egy példán keresztül bemutatom a [^{11}C]CSC nyúlágában való kötődési kinetikájának a 4-kompartmentes modell alapján végzett analízisét.

A PET-technika alkalmazásakor kis energiájú ciklotronok segítségével, jó hozammal állíthatók elő az élő szervezetben nagy mennyiségben előforduló elemek rövid felezési idejű, pozitronbomló izotópjai: ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C , ^{18}F . Ezekkel a „biológiai izotópokkal” az élő szervezetekben található molekulák nagyon nagy hányada megjelölhető anélkül, hogy azok biokémiai sajátosságai megváltoznának [82, 97].

A szöveti környezetbe ágyazott, bomló magokból emittált β^+ (pozitron) részecskék azok energiájától és a szöveti környezettől függően néhány mm-es (0,2 - 2,6 mm) úton lefékeződnek és a közeg molekuláinak elektronjaival kölcsönhatásba lépve a kölcsönhatás helyét két 511 keV energiájú, egymással ellentétes irányú gamma-foton hagyja el. Az adott kölcsönhatásból (szétsugárzásból) keletkezett, összetartozó γ -fotonokat koincidenzában detektáló két kristály olyan térbeli egyenest jelöl ki, amely áthalad a szétsugárzás helyén. Ez a hely 0,2 - 2,6 mm pontossággal megegyezik a pozitronbomlás (a nyomjelzett vegyület, tracer) helyével. Ha a szcintillációs detektorokat gyűrűszerűen helyezzük el a vizsgálati személy körül, egyidejűleg előállítható az összes lehetséges vetítési irányhoz tartozó vetületi kép, amelyekből a radioaktivitás térbeli eloszlása rekonstruálható. Egyetlen gyűrű alkalmazásával csak a (néhány milliméteres) detektorméreték által megszabott vastagságú, korong alakú régió radiofarmakon-eloszlásáról lehet információt kapni. Az egymás mellé helyezett detektorgyűrűk számának növelésével a radiofarmakon-eloszlás tetszőlegesen növelhető térbeli hányada képezhető le egyidejűleg [80].

A Debrecenben működő GE 4096 egész test PET-kamera 8 detektorgyűrűt tartalmaz, gyűrűnként 512 bizmutgermanát detektorral [37]. A kamerát vezérlő számítógép memóriájában tárolt jelekből alkalmas programokkal rekonstruálni lehet a radioaktivitás háromdimenziós eloszlását. A kamera statikus üzemmódban 15 metszeti képet állít elő egyidejűleg, a képsíkok távolsága 6,64 mm [85]. Az adatgyűjtés – a vizsgálat típusától és a megfigyelt régióban felhalmozódott radioaktivitás mennyiségétől függően – 20-30 percig tart.

2.2.2. Általános kritériumok a pozitront emittáló izotóppal jelzett receptorligandumok *in vivo* PET-vizsgálatokban történő alkalmazhatóságára

A receptorszám változás az egyik legkorábbi markere lehet sok esetben egy-egy kórkép megjelenésének vagy az alkalmazott terápia hatékonyságának. Ez magyarázza, hogy széleskörűen elfogadják a rétegvizsgáló képalkotó eljárások kiemelkedő jelentőségét az egyes szervek, szövetek receptoreloszlásának meghatározásában, valamint a képek kvantitálásával történő receptordenzitás-jellemzők számításában [17, 18, 89]. A humán vizsgálatok elkezdése előtt a kiválasztott receptort jelölő radiotracer sokoldalúan kell tesztelni. A radioligandumnak a képalkotás szempontjából való tesztelése két részből tevődik össze.

- 1) Bizonyítani kell, hogy a vegyület nagy affinitással és szelektíven kötődik a vizsgált receptorhoz (ezt elsősorban állat- vagy, ritkább esetben, humán kísérletek alapján végzik).
- 2) Megfelelően tervezett kísérleti protokoll alapján ki kell mutatni, hogy a receptordenzitásban bekövetkezett, esetleges változás (például betegség vagy gyógyszeres kezelés stb. miatt) megbízhatóan meghatározható és megfelelő érzékenységgel detektálható.

Ennek megfelelően a receptorligandummal végzett PET-vizsgálat során elsősorban azt kell eldönteni, hogy a ligandum szöveti akkumulációja a receptorral való specifikus kölcsönhatás következménye-e? A vizsgált receptorhoz való *in vivo* kötődés bizonyítása nagyon komplikált. A ligandum kötődhet funkcionális receptorokhoz, de ugyanakkor a plazma proteinekhez is, valamint a szöveti kompartmentek különböző elemeihez (fehérjékhez, foszfolipidekhez). A nehézséget az jelenti, hogy a nem specifikus kötődések nem kapcsolódnak a transzmembrán jelátvitelhez. A ligandummolekulák bejuthatnak a sejtekbe a membránon keresztül, mivel általában nincs nettó töltésük és többségükben hidrofób (lipofil)

karakterűek. Enzimekkel való kölcsönhatás eredményeképpen PET-izotóppal jelzett metabolitok keletkezhetnek, elsősorban a májban. A májban képződött metabolitok kikerülhetnek a véráramba és a vérrel más szövetekhez eljutva, azokban akkumulálódhatnak. Ha a ligandum-receptor kötődést kívánjuk PET-technikával vizsgálni és az eredményeket képszerűen megjeleníteni, akkor a radioaktív ligandum nem specifikus kötődésének és a metabolitok szöveti akkumulációjának a megjelenített adatokhoz való hozzájárulása a lehető legkisebb mértékű kell, hogy legyen. A receptor-ligandum kötődés jellemzésére felhasználható ligandummal szemben néhány általánosan elfogadott kritériumot lehet megfogalmazni [45, 18, 66, 89]:

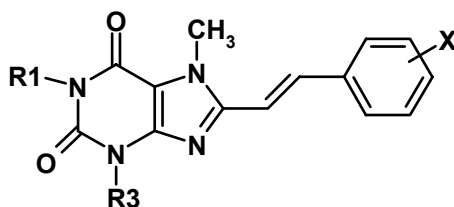
- a ligandum nagy affinitással kötődjön a receptorhoz,
- a ligandumnak nagy legyen az adott receptorhoz való specificitása,
- a ligandum-receptor kötődés koncentrációfüggő legyen (telíthetőség),
- a receptorligandumnak sztereoszelektívnek kell lennie,
- a ligandummal ki lehessen váltani a megfelelő farmakokinetikai hatást,
- a PET-izotóppal jelzett ligandum lehetséges metabolikus folyamatait nyomon lehessen követni,
- a ligandumkötődésnek érzékenyen kell jeleznie a receptordenzitás változását.

Az előállított, pozitront emittáló izotóppal jelzett receptorligandum kötődését a fentieknek megfelelően kell tesztelni az *in vivo* PET-felhasználás előtt. Az általunk vizsgált, ¹¹C-izotóppal jelzett koffeinszármazékok némelyike jól ismert és farmakokinetikailag karakterizált A₂ adozinreceptor antagonisták [23, 45, 62, 91], így az irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy azok eleget tesznek a fenti kritériumoknak.

2.2.3. Radiofarmakonok

A kutatási témában használt koffeinszármazékok közül, néhány A_2 antagonistá hatását ^3H -, illetve ^{14}C -izotóppal jelzett analógokkal végzett kötődési, illetve autoradiográfiás módszerekkel határozták meg. A kiválasztott sztirikoffein-származékokat patkányagyban, *in vitro* radioligandum kötődési módszerrel tanulmányozták. A kapott A_1 - és A_2 -receptorokra vonatkozó affinitási értékeket a 2.3. táblázatban szemléltetjük [45]. Feltételeztük, hogy a témában használt jelzett ligandumok hasonló receptor specifitással és affinitással fognak rendelkezni.

2.3. táblázat. Sztiril-koffein-származékok affinitása patkány agy A_1 - és A_2 -receptoraihoz (*in vitro* radioligandum kötődésvizsgálat)



Vegyület	R_1, R_3	X	K_i (nmol/l)		A_1/A_2 arány
			A_1	A_2	
SC	Me	H	3890 ± 1150	94 ± 36	41
CSC	Me	3-Cl	28200 ± 7000	54 ± 19	520
NSC	Me	3-NO ₂	2140 ± 480	195 ± 44	11
3,4-DMSC	Me	3,4-(MeO) ₂	13790 ± 2420	197 ± 33	70
3,5-DMSC	Me	3,5-(MeO) ₂	$12,5 \pm 6,3\%$	$75,3 \pm 29,1$	>200
TMSC	Me	3,4,5-(MeO) ₃	9200 ± 3560	131 ± 54	70
3,4-DMDPrSC	Pr	3,4-(MeO) ₂	577 ± 42	$31,1 \pm 11,8$	19
3,5-DMDPrSC	Pr	3,5-(MeO) ₂	2630 ± 20	$24,0 \pm 6,0$	110

Újabban PET-módszerrel is vizsgálták néhány sztirilxantin-származék adenoszin antagonistá hatását. Ezzel a módszerrel hatékony A_{2A} PET-receptorligandumnak bizonyult a [^{11}C]KF17837-(*E*)-8-(3,4-dimetoxisztril)-1,3-dipropil-7- ^{11}C metilxantin - [39, 40, 72, 92], a [^{11}C]KF18446 - (*E*)-1,3,7-[7- ^{11}C]-trimetil-8-(3,4,5-trimetoxisztril)xantin - [41, 42], a KF21213 - (*E*)-8-(2,3-dimetil-4-metoxisztril)-1,3,7-[7- ^{11}C]-trimetilxantin - [101], valamint a [4-O-metil- ^{11}C]KW-6002 [30].

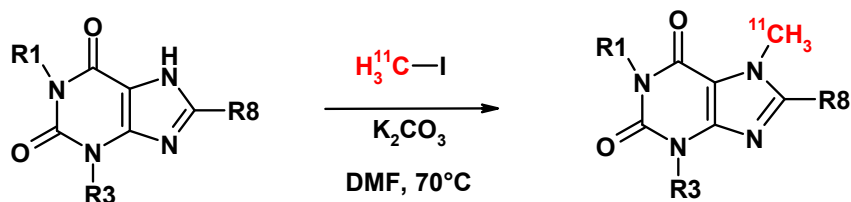
PET-vizsgálatokkal elemezték az (*E*)-8-(3-jódsztril)-3,7-[7- ^{11}C]dimetil-1-propargilxantint ([^{11}C]IS-DMPX) és az (*E*)-8-(3-brómsztril)-3,7-[7- ^{11}C]dimetil-1-propargilxantint ([^{11}C]BS-DMPX), valamint az A_{2A} -receptorokhoz való affinitásukat és szelektivitásukat. *In vitro* membránkötődési vizsgálatok tanúsága szerint mindkét vegyületnek nagyon jó az A_{2A} -receptor affinitása (IS-DMPX esetében $K_i = 8,9$ nM, BS-DMPX esetében $K_i = 7,7$ nM), és magas az A_{2A}/A_1 szelektivitása (IS-DMPX esetében >1100 , BS-DMPX esetében >300). A PET-vizsgálatok eredményei alapján azonban a két ligandum nem alkalmas *in vivo* vizsgálatokra, mert azok a striátum A_{2A} -receptoraihoz alacsony szelektivitással kötődnek és igen jelentős nem-specifikus kötődést mutatnak [43].

PET-vizsgálatokban alkalmazható receptorligandumok előállítása

A P1 típusú antagonisták különböző xantinszármazékok lehetnek. PET-alkalmazású ligandumokként a különböző xantinszármazékok metilezett analógjai – amelyek a jelzés céljára kiválasztott prekursorok ^{11}C -PET-izotóppal történő jelölésével állíthatók elő - valamint a [^{18}F]-izotóppal helyettesített analógok használhatók. SPET-alkalmazásra olyan xantinszármazékok használhatók, amelyekben az N³-helyettesítő jód-123 ($t_{1/2} = 13,02$ h) izotópot tartalmaz.

A 7- ^{11}C metil-xantinszármazékok előállítása jó hatásfokkal és viszonylag egyszerű módon kivitelezhető ^{11}C -izotóppal jelzett

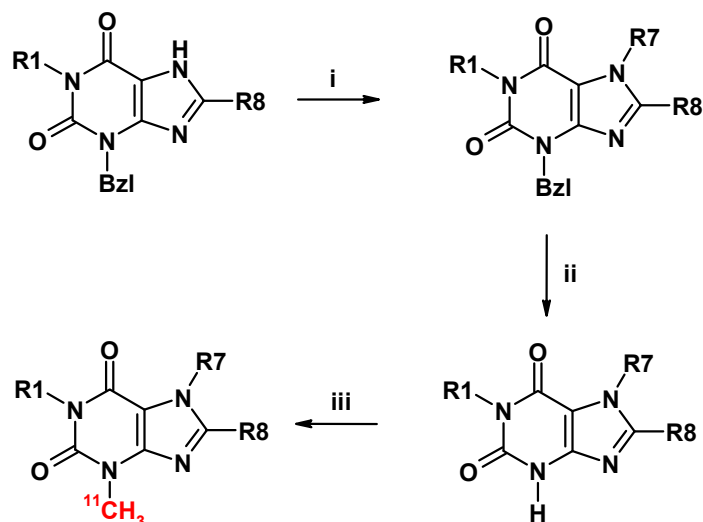
metiljodid ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) segítségével (2.1. reakcióvázlat) [38, 39, 92, 101].



2.1. Reakcióvázlat a 7- $[^{11}\text{C}]$ metil-xantinszármazékok előállításához

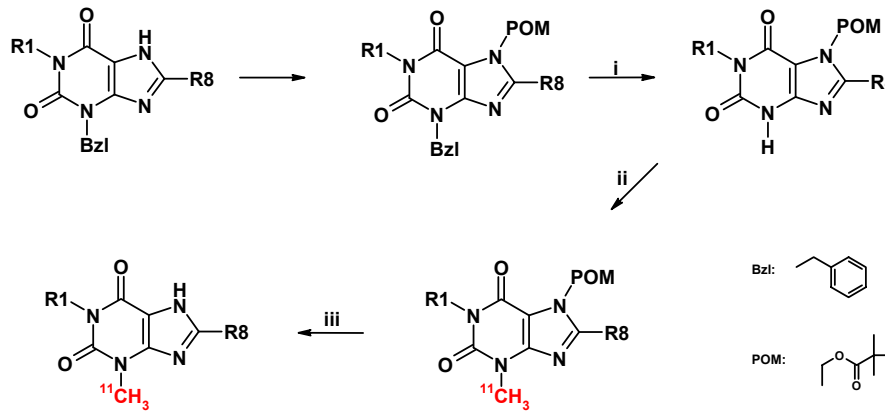
A 3- $[^{11}\text{C}]$ metil-xantinszármazékok előállítása a megfelelő N⁷-védett-N³-dezmetil-xantinszármazék hordozómentes $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -dal történő metilezésével, majd a védőcsoport eltávolításával végezhető el. A kiindulási anyag nem-szimmetrikus karbamidszármazékból, előnyösen N-benzil- vagy N-benzil-N'-propil-karbamidból állítható elő [7]. A benzil-szubsztituens két cél elérésére is alkalmazható. Egyrészt, a benzilcsoport jelenléte sztérikusan szabályozza a karbamid és a ciánecetsav kapcsolását, így a szintézis végén egyetlen termék keletkezik [77]. Másrészt, a benzilcsoport könnyen eltávolítható védőcsoport szerepét is ellátja [83].

Az előállított xantinszármazékot a 7-es helyzetben alkilhalogeniddel alkilezhetjük. Ezután a benzilcsoportot hidrogenolízissel eltávolítjuk, majd a képződött szabad N⁷-aminocsoportot bázikus körülmények között $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -dal metilezhetjük (2.2. reakcióvázlat). Így olyan 3- $[^{11}\text{C}]$ metil-xantinszármazékok állíthatók elő, amelyekbe a 7-es helyzetben előzetesen különböző szénláncú alkilcsoportok építhetők be. Irodalmi adatok szerint azonban már a 7-propil-szubsztituens esetében is lényegesen nő az A₁-affinitás, és így csökken az A₂-szelektivitás [45].



2.2. Reakcióvázlat a 3- ^{11}C metil-xantinszármazékok előállításához (i) RX, K_2CO_3 , DMF; (ii) $\text{NH}_4\text{CO}_2\text{H}$, Pd/C, MeOH, reflux; (iii) CH_3I , K_2CO_3 , DMF

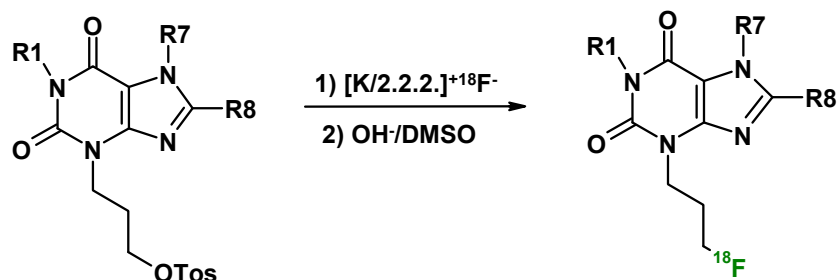
A 7-aminocsoport védésével, majd az aktív metilezést követő védőcsoport lehasításával 7-dezmetil-xantinszármazékok állíthatók elő. A 7-es csoport védésére különösen alkalmas a klórmetil-pivalát (POM-Cl), mivel más védőcsoport, így például a *terc*-butoxi- (BOC) vagy a metil-metil-étercsoport (MOM) általában lehasad a következő hidrogenolízises lépésben [34]. Ezután a benzilcsoportot hidrogenolízissel eltávolítjuk, a képződött szabad N^7 -aminocsoportot bázikus körülmények között ^{11}C CH_3I -dal metilezhetjük, majd erős bázikus közegben a POM-védőcsoportot eltávolíthatjuk (2.3. reakcióvázlat). Az így előállítható 1,3-dimetilxantinszármazékok azonban csak 2-6-szoros A_2 -szelektivitással rendelkeznek, az 1,3,7-trimetilxantinszármazékok 10-500-szoros A_2 -szelektivitásával szemben [45]. A kapott termékek A_1 -adenozinreceptorok feltérképezésében lehetnek hasznosak [34].



2.3. Reakcióvázlat az 1,3-[3-¹¹C]dimetilxantinszármazékok előállításához (i) NH₄CO₂H, Pd/C, MeOH, reflux; (ii) CH₃I, K₂CO₃, DMF; (iii) NaOH, reflux

Egy másik lehetőség PET-radioligandumok előállítására az [¹⁸F]-izotóppal történő jelzés. A vegyületet, amelybe a fluort kívánjuk beépíteni, megfelelően elő kell készíteni a fluor fogadására. A szabad funkciós csoportokat védőcsoportokkal kell ellátni. A funkciós csoportok védelmét úgy kell tervezni, hogy szabad maradjon az a hely, ahová a fluort kívánjuk beépíteni. Ezen a szabad helyen kell egy úgynevezett aktiváló csoportot kialakítani, amely kellően reaktív ahhoz, hogy az inert fluoridionnal reagáljon. Az aktiváló csoportok legtöbbször halogénatomok, szulfonsavészterek vagy feszült gyűrűt tartalmazó, heterociklusok lehetnek. A fluor beépülése után a védőcsoportokat gyors hidrolízissel lehet eltávolítani.

A hordozómentes [¹⁸F]-izotóp beépítésének egyik lehetséges útvonalát a 2.4. reakcióvázlaton szemléltetjük [33].



2.4. Reakcióvázlat a 3-(3-[¹⁸F]fluoropropil)-1,3-dialkylxantinszármazékok előállításához (Tos: toluol-metánszulfonilcsoport, K/2.2.2.: Kriptofix 2.2.2. kelát)

Az így előállítható vegyületek egyik hátránya szintén az R₃ csoport hosszabb szénláncá miatt jelentkező, csökkent A₂-szelektivitás. Így például az 1,3,7-dimetilxantinszármazék A₂-szelektivitása kétszeres az 1,3-dipropil-7-metilxantin-származék, és majdnem 6-szoros az 1,3-diallil-analóg A₂-szelektivitásához képest [46].

A fentiek alapján elmondható, hogy A₂-receptorok PET-vizsgálatára célszerű a 7-es csoport [¹¹C]metiljoddal történő metilezést alkalmazni. A 3-as csoport [¹¹C]metiljoddal történő metilezése alkalmas lehet 3-[¹¹C]metil-7-dezmetil-xantinszármazékok, valamint 3-[¹¹C]metil-7-(hosszabb szénlancú alkil)-xantinszármazékok előállítására, amelyek inkább az A₁-receptorok feltérképezésében használhatók. A₁-receptorok PET- vizsgálatára használhatók még a 3-(3-[¹⁸F]fluoropropil)-1,3-dialkylxantinszármazékok, amelyek a megfelelően előkészített prekursor [¹⁸F]-fluorozásával állíthatók elő.

A jelzés céljára kiválasztott molekulák [¹¹C]-PET-izotóppal történő jelölése a megfelelő 7-dezmetil-aminbázisok (prekursorok) metilezésével történhet, ami ¹¹C-izotóppal jelzett metiljodid ([¹¹C]CH₃I) segítségével oldható meg. A különböző xantinszármazékok [¹¹C]-metilezése eddigi tapasztalataink alapján jó hatásfokkal és viszonylag egyszerű módon kivitelezhető.

2.2.4. ^{11}C izotóp

A ^{11}C -izotóp radioaktív bomlása során 0,96 MeV energiájú pozitront emittál, amelynek maximális hatótávolsága vízben 4,1 mm. A ^{11}C -izotóp könnyen beépíthető különböző szerves molekulákba, ezért jelentős szerephez jutott a receptorligandumok kölcsönhatásainak vizsgálatában. A pozitronemissziós tomográfiában használt, ^{11}C -izotóppal jelzett vegyületek egy adott típusú receptorhoz szelektíven, és nagy affinitással kötődnek, ilyen módon megjelölik az adott receptorban dús vagy éppen szegény régiókat. A PET-módszer a megfelelő receptorligandum alkalmazásával kombinálva, igen fontos eszköz a receptorok szabályozó mechanizmusainak felderítésében.

A ^{11}C -izotóp előállítására több lehetséges mód ismert (2.4. táblázat) [21]. Könnyű kezelhetősége miatt a $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ magreakció a legelterjedtebb módja a ^{11}C -izotóp előállításnak. Ebben az esetben targetanyagként nagytisztaságú, természetes nitrogéngázt használnak [82].

2.4. táblázat ^{11}C -izotóp előállítása

Magreakció	Nyalábenergia (MeV)	Elméleti hozam [MBq(mCi)/ μAh]
$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	13 \rightarrow 3	3820 (103)
$^{11}\text{B}(p,n)^{11}\text{C}^*$	10 \rightarrow 0	3400 (92)
$^{10}\text{B}(d,n)^{11}\text{C}^*$	10 \rightarrow 0	2479 (67)

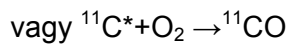
* dúsított targetanyagot igényel

A ^{11}C -jelzett vegyületek előállítására alapvetően két kiindulási vegyületet, nevezetesen a [^{11}C]metánt és [^{11}C]széndioxidot alkalmaznak. A nitrogéngázhoz kevés (kb. 5%) hidrogéngázt keverve [^{11}C]CH₄ keletkezik [21].

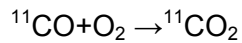
A nagytisztaságú targetgázhoz nyomnyi (1-10 ppm) O₂-gázt keverve [¹¹C]CO₂ keletkezik. A [¹¹C]CO₂ főtermék mellett [¹³N]N₂ és [¹¹C]CO is képződik. Nagyobb energiájú protonnyaláb esetén a ¹⁴N(p,pn)¹³N magreakció miatt, aktív nitrogén keletkezhet. A keletkezett [¹³N]nitrogén a termék kifagyasztásával vagy molekuláris szűrő alkalmazásával könnyen elválasztható. Kis nyalábáramnál vagy rövid idejű besugárzásnál inkább [¹¹C]CO termelődik [82].

[¹¹C]széndioxid előállítás

A targetben alacsony nyalábenergiánál a következő folyamatok mennek végbe:



megnövekedett dózisonál radiolítikus oxidáció megy végbe



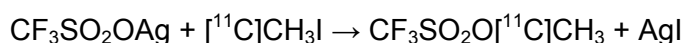
[¹¹C]széndioxid kifagyasztása

A nagy nyomású (1-2x10⁶ Pa) N₂ targetgázból kifagyasztással szeparálható a termék. A targetgáznak a radiokémiai laboratóriumba „szállítása” nagy áramlási sebesség mellett pár perc alatt megtörténik. A klasszikus módszerek szerint a termék kifagyasztását cseppfolyós nitrogénnel (fp. -196°C) vagy cseppfolyós argonnal (fp. -186°C), hosszú spirálalakú csőben hajtják végre. Alkalmazhatók -20°C-ra hűtött molekuláris szűrők is. A további kémiai folyamatokhoz a kifagyasztott [¹¹C]CO₂ termék felmelegítéssel deszorbeálható.

[¹¹C]metiljodid előállítása

A leggyakrabban alkalmazott módszer szerint a kapott [¹¹C]CO₂-ot LiAlH₄-del [¹¹C]CH₃OH vegyületté redukálják, majd ezt HI reagáltatva [¹¹C]CH₃I képződik [82]. Más eljárások szerint HI helyett P₂I₄ [13, 53] illetve (Ph)₃PI₂-ot (trifenil-foszfín-dijodidot) [31] alkalmaznak. Az így előállított [¹¹C]metiljodid metilezési reakcióban használható.

Bizonyos metilezési reakcióknál nem elegendő a [¹¹C]metiljodid reakciókészsége, ezért a



reakcióban keletkezett, több nagyságrenddel reakcióképesebb [¹¹C]metil-triflát alkalmazható [32].

2.2.5. A PET-radiofarmakonok minőségellenőrzése

A PET Centrumban kifejlesztett nyomjelző molekulák törzskönyveztetése az előírásoknak megfelelő, az Országos Gyógyszerészeti Intézethez (OGYI) benyújtott beadványok alapján történt. A betérjesztett dokumentációk részét képezte a radiofarmakonok minőségellenőrzési rendszere, amely szerint az alábbi jellemzőket kell meghatározni [67, 74, 75, 76]:

- (a) Radionuklidos tisztaság.* A jelző izotóptól eltérő radioaktív izotóp jelenlétére utaló paraméter. A PET-farmakonok megfelelő radionuklidos tisztasága <0,5%, amely könnyen elérhető, mivel a besugárzás alatt a kívánt izotópon kívül általában nem keletkezik jelentős mennyiségű más radionuklid.
- (b) Kémiai tisztaság.* A szintézis során a radioaktív készítménybe szennyező inaktív vegyületek kerülhetnek, amelyek a vizsgálat szempontjából zavaró hatásúak, esetleg toxikusak. Kromatográfiás tisztító lépésekkel

legtöbbször könnyen biztosítani lehet a megkívánt kémiai tisztaságot.

- (c) *Radiokémiai tisztaság.* Adott jelző izotóp a hordozómolekulától eltérő kémiai formában is jelen lehet a végtermékben. A radiokémiai szennyezők általában nem jelentenek veszélyt a betegre nézve, azonban rontják a vizsgálat hatékonyságát. A kromatográfiás tisztító lépésekkel a megkívánt radiokémiai tisztaság biztosítható.
- (d) *Fajlagos aktivitás:* egy jelzett vegyület fajlagos aktivitásán a vegyületnek a tömegegységére vonatkoztatott radioaktivitását értjük. Egysége a Bq/mol (Ci/mol). A PET-radiofarmakonok általában nem tartalmaznak hozzáadott hordozót (*non carrier added* készítmények), de a környezetben mindig jelen van a radionuklid stabil formája is, így az elméleti, legnagyobb fajlagos aktivitás csak közelíthető. Főleg toxikus hatású tracerek esetén szükséges a lehető legmagasabb fajlagos aktivitás elérése. Elméleti számítások szerint a ^{11}C -izotóp maximális fajlagos aktivitása $3,4 \times 10^8$ GBq/mmol ($9,23 \times 10^6$ Ci/mmol), ahol minden molekula radioaktív. Irodalmi adatok alapján a ^{11}C -izotóp gyakorlati fajlagos aktivitása 36,8-184,2 GBq/mmol (1-5 Ci/mmol), de receptor-vizsgálatokhoz már a 3,7-11 TBq/mmol (100-300 mCi/mmol) értékek is elegendőek.

- (e) *Farmakológiai tisztaság követelményei*

sterilitás: egyszer használatos, steril szűréssel könnyen biztosítható;

pirogenmentesség csak a technológiai fegyelem szigorú megtartása esetén garantálható, a vizsgálatokat utólagosan és időszakosan végzik (Limulus-teszt);

pH: a radiofarmakon oldat pH-jának a fiziológiailag elfogadható, kb. 5-8 tartományban kell lennie;

izotónia: a kész radiofarmakont intravénás használatra steril izotóniás oldatba veszik fel;

stabilitás: a radiofarmakon izotópjának rövid felezési ideje megszabja a felhasználás időtartamát. Ugyanakkor a megszabott lejárató idő végéig a készítmény radiokémiai tisztasága nem csökkenhet az előírt határérték alá sem oxidáció, sem radiolízis, sem más folyamat következtében.

Preparatív és analitikai módszerek

A radiofarmakonok elválasztása és tisztítása az esetek egy részében, analízise azonban minden esetben kromatográfias módszerrel történik. Az inaktív vegyület detektálására legelterjedtebb az UV-abszorpciós detektor. E mellett használnak még refraktometriás, elektrokémiai vagy IR-abszorpciós detektorokat. A fenti detektorok valamelyikével kapcsolják sorba a radioaktivitást jelző detektort. A TLC-módszert párhuzamos analitikai eljárásaként alkalmazzák. Az izotópok viszonylag rövid felezési ideje miatt javasolt olyan kromatográfias módszereket alkalmazni, amelyek rövid idő alatt megbízható eredményt adnak.

Bizonyos radiofarmakonok elválasztása, tisztítása az automatizált panelen ioncserélő gyantával töltött oszlop segítségével történhet. Így állítják elő például a [¹¹C]metionint Ag11A8 ioncserélő gyanta és C₁₈ SepPak oszlop alkalmazásával. Előfordulhat azonban, hogy a farmakon nem választható el az előállító panelen. Ebben az esetben preparatív HPLC-módszert alkalmaznak.

A szintézis végén elengedhetetlen a radioaktív termék radioaktivitásának és az inaktív termék mennyiségének meghatározása. Ez elsősorban a receptorvizsgálatoknál kötelező,

ahol a detektálható biomolekulák mennyisége kicsi, vagy amikor a farmakon toxikus. Ilyenkor nagyon fontos, hogy minél nagyobb legyen a termék radioaktivitása és minél kisebb annak inaktív része, azaz a termék fajlagos aktivitás értéke a lehető legnagyobb legyen.

Elméleti számítások szerint a ^{11}C -izotóp maximális fajlagos aktivitása $3,4 \times 10^8$ GBq/mmol ($9,23 \times 10^6$ Ci/mmol). Ilyen fajlagos aktivitás értékek az esetek többségében még igen toxikus anyagok alkalmazását is lehetővé teszik. A radiokémiai folyamatok közben azonban inaktív vegyületek kerülnek a reakcióterbe és a reakció elegybe, így ugyanaz a farmakon szintetizálódik, csak inaktív formában. A ^{11}C -izotóp esetében ez a jelenség fokozottan jelentkezik, mivel a stabil ^{12}C -izotóp mindenhol előfordul a természetben. Általában az összes hordozó kb. 1/3-a a targetrendszerben, besugárzás alatt, a targetanyag fémfelületéből kikerülő inaktív szénből keletkezik. A targetben képződő $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ -ot tovább „hígítja” a szintézis során, különböző oldószerekből (főként a LiAlH_4 éteres vagy THF-es oldatából), hordozó gázokból származó inaktív széndioxidot.

Detektorok

A radioaktivitás mérése különféle detektorokkal történhet. A PET-izotópok esetében a pozitron annihilációból keletkező, 511 keV-es γ -részecsket detektáljuk. Az aktivitásmérő egy kalibrált ionizációs kamra. A szintézis közben keletkező gázok, folyadékok felgyülemlésének monitorozására kisméretű, flexibilis Geiger Müller számláló csövek (GM-csővek) használhatók, amelyek megfelelő ólomárnyékolással egymáshoz viszonylag közel is elhelyezhetők. A termék HPLC-analíziséhez szcintillációs detektort használnak.

A szintézis automatizálása

A ^{11}C -izotóppal jelölt PET-farmakonok rövid felezési ideje megköveteli, hogy a felhasználni kívánt farmakont a vizsgálathoz közel, annak tervezett időpontjához igazodva lehessen előállítani.

Egy gyártási tétel átlagosan csak egy-két beteg vizsgálatát teszi lehetővé, emiatt a PET-farmakonok szintézise a gyógyszergyártás speciális esetének tekinthető. A radiofarmakon-szintézist célszerű automatizálni.

Mivel a jelzőanyag intravénás injekció, vagy inhalálás útján kerül humán felhasználásra, fontos a gyártástechnológia standardizálása, valamint gyors, minél szélesebb körű minőségellenőrzést biztosító analitikai módszerek integrálása a gyártási folyamatba. Ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy bizonyos típusú minőségellenőrző vizsgálatok elvégzésére (sterilitás, pirogenitás, stb.) nincs mód a nyomjelző anyag beadása előtt az azonnali alkalmazás miatt. A jelzőanyag megfelelő minőségét számos esetben csak a technológia megbízhatósága biztosíthatja. A humán célú gyártás megkezdése előtt a kidolgozott technológiát, egy úgynevezett kipróbálási szakaszban, az összes lehetséges szempontból tesztelik. Egy gyártástechnológia humán célokra akkor válik alkalmassá, ha a termék minőségi paraméterei a kipróbálási szakasz alatt elfogadhatónak, és a szórási határokon belül állandónak bizonyulnak.

A kémiai szintézis során a besugárzással előállított izotópot, klasszikus szerves kémiai módszerekkel megfelelő jelzett intermedierré konvertálják ($^{11}\text{CH}_3\text{I}$, $^{13}\text{NH}_3$, $\text{CH}_3\text{COO}^{18}\text{F}$, [Kriptofix- K^+] $^{18}\text{F}^-$). Ezután történhet a beépítés, amelyek során az izotóp a kívánt kémiai struktúrához kovalensen kötődik. A szintézis-stratégia annál előnyösebb, minél későbbi lépésben kerül beépítésre a jelölő izotóp, ugyanis így érhető el a lehető legrövidebb szintézisidő. Ez azt is jelenti, hogy a radioaktív szintézist megelőzően elő kell állítani egy ilyen, jó fogadókészségű molekulát, az úgynevezett prekuzort. Az ilyen inaktív prekuzormolekula és a radioaktív intermedier reakciójával, majd az esetlegesen jelenlévő védőcsoportok eltávolításával nyerhető a célvegyület. További tisztítási lépések szükségesek azonban ahhoz, hogy a kémiai szempontból megfelelő struktúrájú anyagból *in vivo* felhasználásra alkalmas radiofarmakon

legyen. A tisztítás során történik a tracer molekulához képest nagy mennyiségű kiindulási anyag maradékának, az aktív és inaktív melléktermékeknek az eltávolítása, a pH és az izotóniás sókoncentráció beállítása, valamint az esetleges mikrobiológiai szennyezőket eltávolító steril szűrés.

A jelölő izotópok igen kis száma (10^{10} - 10^{15} db. atom), a nagyon rövid szintézis idők szükségessége és a lehető legmagasabb fajlagos aktivitás iránti igény gyakran jelentős módosításokat tesz szükségessé. Az ezek többségében a kezdeti aktivitásnak csak néhány százaléka alakul át, illetve marad a szintézis végére, ezért igen magas kezdeti aktivitással kell dolgozni. A jelentős sugárveszély miatt ilyen szintű aktivitás csak kellően árnyékolt vegyi fülkében, távirányítású, vagy teljesen automatizált, illetve robot-rendszerek segítségével kezelhető.

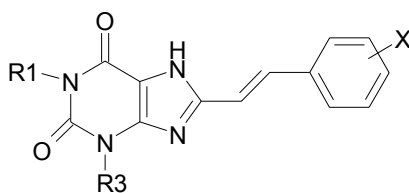
3. Eredmények

3.1. Prekurzorok és inaktív ligandumok

3.1.1. Xantinszármazékok

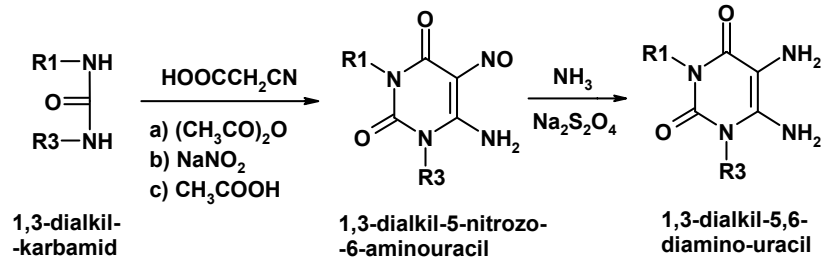
A kísérleteinkhez kiválasztott tíz, P1 típusú, antagonistá hatású sztirilxantin-származékot (3.1. táblázat) az irodalomban ismert eljárásokkal állítottuk elő [46].

3.1. táblázat Az előállított prekurzorok



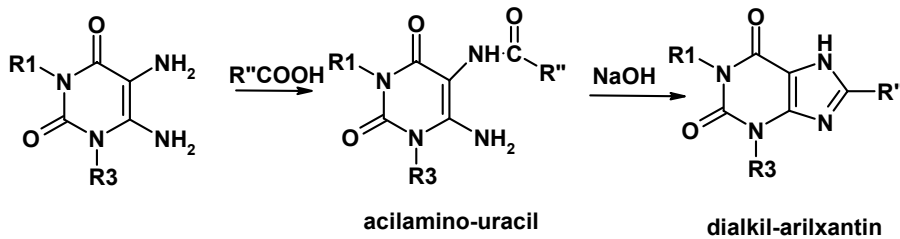
Prekurzor	R ₁ ,R ₃	X	Prekurzor	R ₁ ,R ₃	X
SC	Me	H	3,5-DMSX	Me	3,5-(MeO) ₂
CSX	Me	3-Cl	3,4,5-TMSX	Me	3,4,5-(MeO) ₃
ISX	Me	3-I	NDPrSX	Pr	3-NO ₂
NSX	Me	3-NO ₂	3,4-DMDPrSX	Pr	3,4-(MeO) ₂
3,4-DMSX	Me	3,4-(MeO) ₂	3,5-DMDPrSX	Pr	3,5-(MeO) ₂

A szintézis első lépésében a kiindulási karbamidszármazékot ciáncetsavval kondenzáltuk, a köztterméket alkálikus közegben ciklizáltuk, NaNO₂ alkalmazásával nitrozáltuk, majd a nitrozocsoportot redukáltuk, így előállítottuk az 1,3-dialkil-5,6-diamino-uracil vázat (3.1. reakcióvázlat) [77].



3.1. A Traube szintézis reakcióvázlata.

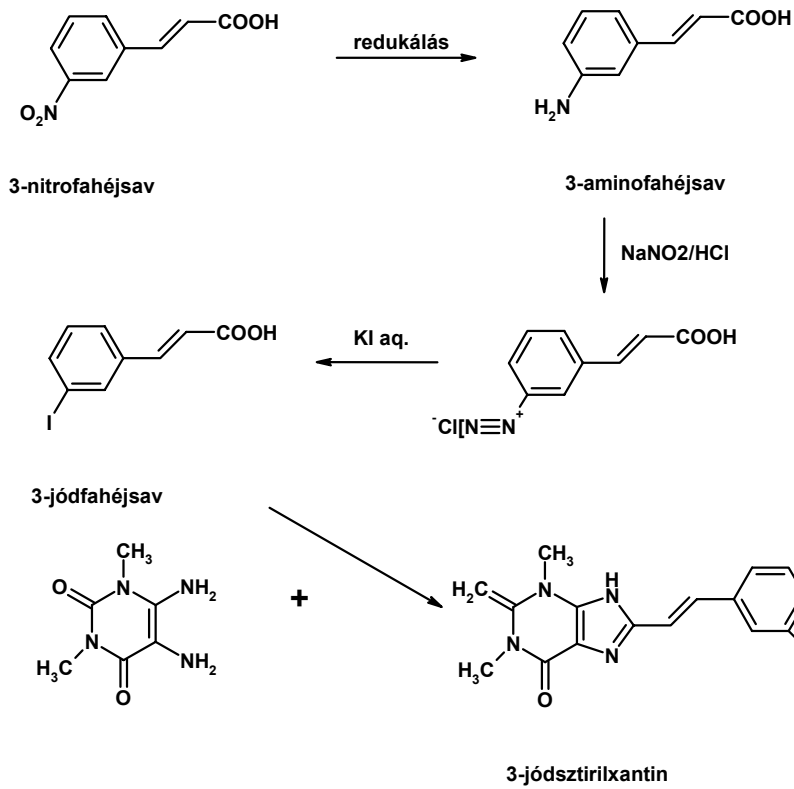
Ezután a kapott uracilszármazékot különböző transz-fahéjsavakkal acileztük, majd a kapott amidouracilt bázikus körülmények között ciklizáltuk, így előállítottuk a megfelelő prekuzormolekulákat [7, 90].



3.2. A prekuzor szintézis reakcióvázlata

Az általunk szintetizált új ISX előállításához alkalmazott 3-jód-fahéjsavat az irodalomban ismert [79] eljárással, m-nitrofahéjsav redukálásával, majd a kapott aminofahéjsav diazotálásával és jódozásával (3.3. reakcióvázlat) állítottuk elő. A kapott jódfahéjsavat a fenti módszer szerint 5,6-diaminouracillal reagáltattuk.

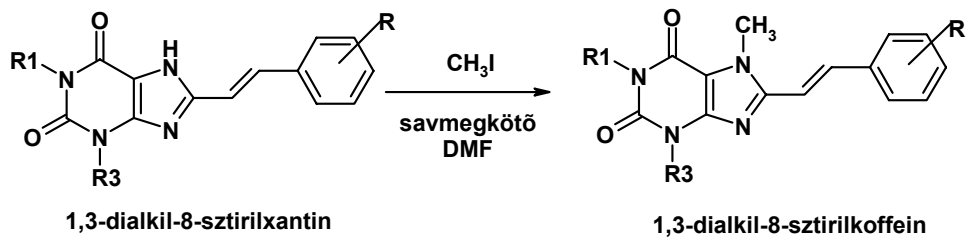
Az előállított vegyületek szerkezetét olvadáspont (op.) mérésekkel, NMR- és MS-vizsgálatokkal igazoltuk.



3.3. Reakcióvázlat az 1,3-dimetil-8-(3-jódsztiril)xantin előállításához

3.1.2. 7-Metil-sztirilxantin-származékok

Ezután a kapott prekuzormolekulák metilezésével előállítottuk a megfelelő, inaktív 7-metil-sztirilxantin-származékokat (3.4. reakcióvázlat).



3.4. Reakcióvázlat a metilezéshez

A 3.2. táblázatban a metilezés reakcióhozamait mutatjuk be. Az adatok tanúsága szerint a metilezés minden esetben jó reakcióhozammal hajtható végre.

3.2. Táblázat. 7-Metil-sztilixantin-származékok előállítása

Vegyület	Reakcióhozam (%)	Vegyület	Reakcióhozam (%)
SC	84,9	3,5-DMSC	84,8
CSC	95,8	3,4,5-TMSC	68,9
ISC	87,5	NDPrSC	68,8
NSC	89,5	3,4-DMDPrSC	61,7
3,4-DMSC	94	3,5-DMDPrSC	60,5

Az előállított vegyületek szerkezetét olvadáspont mérésekkel, NMR- és MS-vizsgálatokkal igazoltuk. Ezután meghatároztuk a vegyületek DMSO-oldhatóságát (3.3. táblázat), amely adatok a biológiai vizsgálatokhoz szükségesek.

3.3. Táblázat. 7-Metil-sztilixantin-származékok oldhatósága DMSO-ban

	20°C		40°C	
	mg/ml	mmol/ml	mg/ml	mmol/ml
SC	10	0,03375	50	0,16874
CSC	12,5	0,03779	100	0,30233
3,4-DMSC	11	0,03087	27,5	0,07717
3,4,5-TMSC	12,5	0,03235	25	0,0647

TLC-vizsgálatok alapján kidolgoztuk a vegyületek azonosítására alkalmas, analitikai HPLC, valamint az elválasztásukat lehetővé tevő megfelelő preparatív HPLC-eljárásokat. A csúcsoakat 290 nm hullámhosszra beállított UV-detektorral azonosítottuk. A megfelelő hullámhosszt 3D diódasoros detektoron felvett spektrum alapján határoztuk meg. Futtatószerként különböző összetételű, víz-acetonitril elegyet használtunk, melynek áramlási sebessége 1 ml/min volt. A megfelelő futtatószer beállítása fontos paraméter, mivel a

radioaktív termék elválasztása ugyancsak HPLC-rendszerben történik. A termék rövid felezési ideje miatt szükséges megtalálni azt a futtatószerkeletet, amellyel a terméket legrövidebb idő alatt lehet azonosítani, izolálni. A 3.3. táblázatban bemutatjuk az adott vegyület esetében alkalmazott, optimalizált futtatószer összetételét és a kapott retenciós idő (Rt) értékeket.

3.3. Táblázat. Az előállított vegyületek HPLC-retenciós ideje

Vegyület	MeCN:H ₂ O [%]	Rt. [perc]	Vegyület	MeCN:H ₂ O [%]	Rt. [perc]
SX	6:4	3,71	SC	6:4	5,55
CSX	7:3	3,45	CSC	7:3	5,43
ISX	7:3	4,77	ISC	7:3	7,6
NSX	7:3	5,12	NSC	7:3	8,84
3,4-DMSX	6:4	3,03	3,4-DMSC	6:4	4,45
3,5-DMSX	1:1	5,48	3,5-DMSC	1:1	10,17
TMSX	1:1	3,98	TMSC	1:1	6,35
NSPrX	1:1	5,83	NSPrC	1:1	9,98
3,4-DMDPrSX	6:4	6,77	3,4-DMDPrSC	6:4	13,28
3,5-DMDPrSX	1:1	5,65	3,5-DMDPrSC	1:1	10,20

A továbbiakban a kapott adatok alapján dolgoztuk ki a radioaktív termék elválasztására alkalmazott preparatív HPLC-módszert.

3.2. Radiokémia szintézis

Az adenzin típusú agonistákat ¹⁸F-PET-izotóppal, míg a xantin típusú antagonistákat ¹¹C-izotóppal célszerű megjelölni.

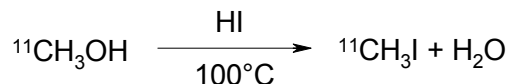
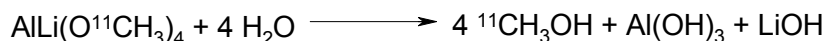
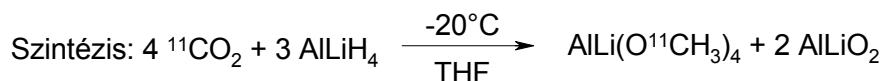
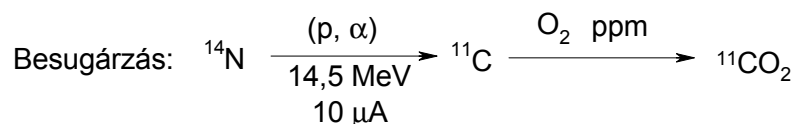
3.2.1. Sztirilxantinok [¹¹C]metilezése

Az inaktív kísérletek alapján feltételezhető, hogy a jelzés céljára kiválasztott xantin-molekulák ¹¹C-PET-izotóppal történő

jelölése a megfelelő 7-dezmetil-aminbázisok (prekurzorok) metilezésével történhet, ami ^{11}C -izotóppal jelzett metiljodid ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) segítségével oldható meg. Az irodalmi adatok alapján a CSX prekursorból $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -dal előállítható $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -radiofarmakont választottuk ki biológiai kísérleteinkhez.

$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ szintézis

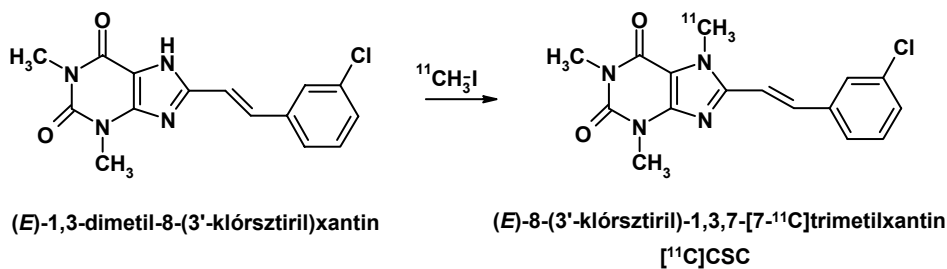
A $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -ot a 3.5. reakcióvázlat szerinti eljárással állítottuk elő. Ennek megfelelően a kiindulási $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ -ot ismert módszerrel [88], LiAlH_4 -gyel $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ -lá redukáltuk, majd a képződött $[^{11}\text{C}]\text{metanolt HI}$ -dal reagáltattuk, és az így kapott $[^{11}\text{C}]\text{metiljodidot}$ metilezési reakcióban használtuk tovább.



3.5. Reakcióvázlat a $[^{11}\text{C}]\text{metiljodid}$ előállításához

$[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ előállítása

A 8-(3-klórsztiril)-1,3,7-[7- ^{11}C]trimetil koffein ($[^{11}\text{C}]\text{CSC}$) radiokémiai szintézise a CSX $[^{11}\text{C}]\text{metiljodiddal}$ való metilezésével történik (3.6. reakcióvázlat).



3.6. Reakcióvázlat [¹¹C]CSC radiokémiai szintézise

A pontos reakciókörülményeket, reakcióhozamokat a 3.4. táblázatban mutatjuk be.

3.4. Táblázat. Radiokémiai szintézis optimalizálása (savmegkötő kiválasztása)

mg prekursor / ml DMF	Katalizátor	Rk. hőm °C	Rk. idő (perc)	Hozam* (%)
1/0,4	5 mg K ₂ CO ₃	60	10	19,9
1/0,4	8 mg K ₂ CO ₃	60	10	33,6-40,2
1/0,4	10 mg K ₂ CO ₃	60	10	39,9-47,3
1/0,4	10 mg K ₂ CO ₃	60	12	32,9
1/0,4	14 mg K ₂ CO ₃	60	10	21,6
1/0,4	10 mg Cs ₂ CO ₃	60	10	20,3-24,3
1/0,4	10 ml NaOH (5M)	60	10	8

* radiokémiai szintézis végére korrigálva, a kiindulási [¹¹C]CO₂-re számolva

A 3.4. táblázatból látható, hogy a reakció kálium- vagy cézium-karbonát jelenlétében jó hozammal megy végbe. A legjobb hozam 0,4 ml DMF-ben, 10 mg kálium-karbonát jelenlétében, 60°C-on és 10 perc alatt érhető el.

Az anyagot preparatív HPLC-rendszerben elválasztottuk a szennyezésektől, majd előkészítettük a [¹¹C]CSC-t tartalmazó frakciót a farmakológiai vizsgálatokra. A késztermékből mintát vettünk az analitikai HPLC-vizsgálatra.

A 3.5. táblázatban a radiokémiai szintézis legfontosabb jellemzőit tüntettük fel a szintézis végén, az EOB-tól (End of Bombardment) 25-30 percre számolva.

3.5. Táblázat. A [¹¹C]CSC radiokémiai szintézisek eredményei

Sorsz.	Termelt aktivitás (mCi)	Végtermék aktivitása* (mCi)	Rk.** hozam (%)	Konc (μmol/ml)	Fajlagos akt. (mCi/μmol)
CSC001	8,47				
CSC003	36,2	2,34	19,99		
CSC004	11,76	0,306	6,6		
CSC005	36,0	9,3	40,9		
CSC006	14,18	3,06	33,56	0,35	11,38
CSC008	4,61	0,637	24,29	0,817	1,22
CSC010	37	4,65	20,24	0,147	6,12
CSC011	101,1	11,67	32,9	0,631	8,003
CSC012	70,6	7,4	47,33	0,663	7,1
CSC013	65,2	7,42	39,8	0,74	9,56
CSC014	90,4	8,36	28,77	0,92	8,7
CSC015	104,47	10,54	30,15	0,54	17,75
CSC016	70,3	6,02	25,78	0,535	10,23
CSC017	76,0	5,46	21,6	0,32	15
CSC019	55,7	4,62	30,52	0,0289	171,98
CSC020	91,4	10,55	30,3	0,0072	246
CSC022	62,8	5,38	36,6	0,16	44
CSC023	77,6	12,77	37,6	0,193	74,7
CSC024	64,1	4,75	29,96	0,124	40,5

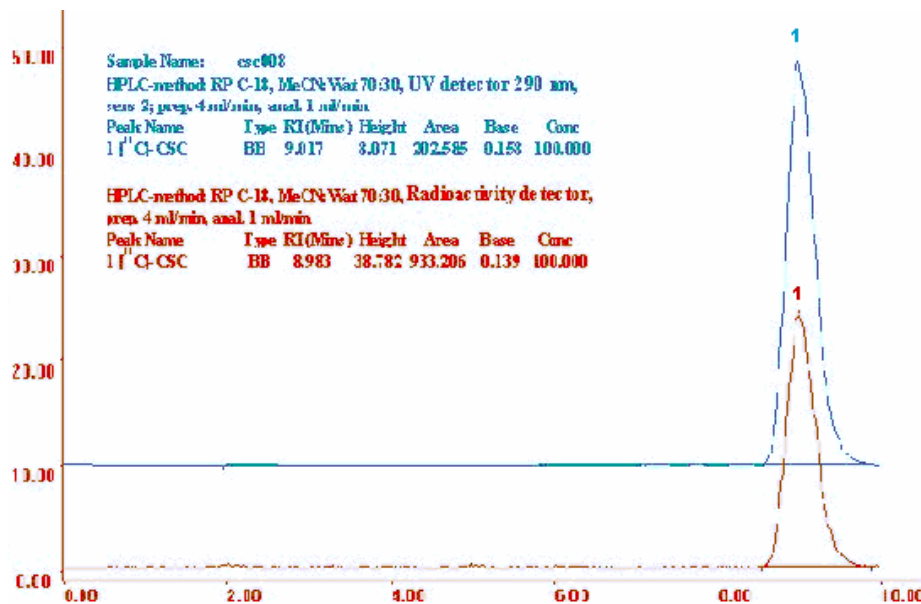
* mért adat; ** besugárzás végére korrigálva, a kiindulási [¹¹C]CO₂-re számolva

A kiindulási [¹¹C]CO₂-ra vonatkoztatva az átlagos, bomlás-korrigált hozam 30 % volt, így a szintézis végén átlagosan 904 MBq

(24,5 mCi) [¹¹C]CSC-t termeltünk. A legjobb fajlagos aktivitás 9,1 TBq/μmol (246 mCi/μmol) volt.

A 3.1. ábrán a végtermék egyik HPLC-futtatását mutatjuk be. Az analitikai HPLC-módszerben futtatószerként acetonitril : víz 7 : 3 arányú elegyét használtuk. A futtatószer áramlási sebessége 1 ml/min volt. A felső görbén a radioaktivitás detektor jele látható. A 9,07 percnél megjelenő, 1 jelű csúcs a [¹¹C]CSC termék. Az alsó görbén az UV detektor kimenetét mutatja az *E*-[¹¹C]CSC termék 8,983 percnél látható csúcsnak felel meg. Az analitikai HPLC-vizsgálat szerint a végtermék tisztasága legalább 99%. A termékben nem találtunk prekuzort, a lehetséges szennyező, az *E-Z* izomerizációból származhat.

3.1. ábra [¹¹C]CSC termék analitikai HPLC kromatogramja

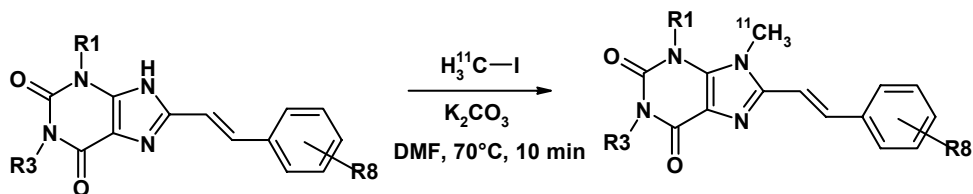


Fent: radioaktivitás detektor; lent: UV detektor; 1 csúcs [¹¹C]CSC.

7-[¹¹C]metil-sztirilxantin-származékok előállítása

Az általunk kifejlesztett rendszerben kísérleteket végeztünk további 1,3-dialkil-sztirilxantin-származékok [¹¹C]metiljoddal való

metilezésével. A radioaktív szintéziseket a 3.7. reakcióvázlat szerint hajtottuk végre.



3.7. reakcióvázlat 7-[¹¹C]metil-sztirilxantin-származékok előállítására

A [¹¹C]metilezés kálium-karbonát jelenlétében, 70°C hőmérsékleten és 10 perc alatt nagyon jó radiokémiai hozammal megy végbe. Ilyen körülmények között a xantinszármazék kivánt 7-N-metilezése a meghatározó. A [¹¹C]metilezés termékeit a 3.3. táblázatban bemutatott Rt-értékek segítségével azonosítottuk. A 3.6. táblázatban a 7-[¹¹C]metil-sztirilxantin-származékok előállításának reakcióhozamait mutatjuk be. A kapott eredmények 3-5, egymástól független szintézis átlagértékei.

3.6. Táblázat. [¹¹C]Metilezési reakciók jellemzői

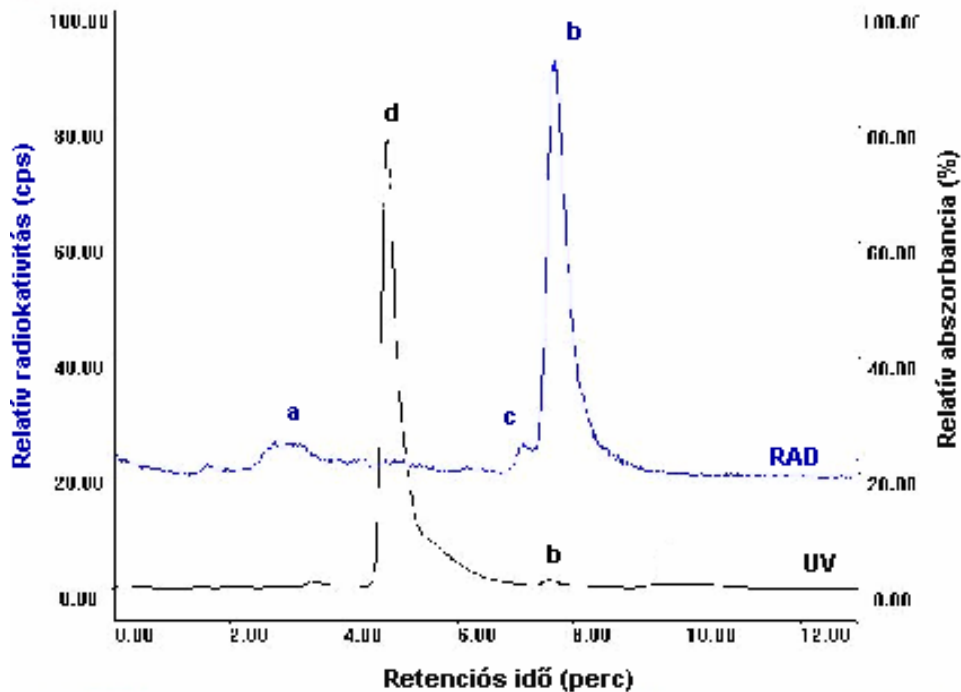
Prekursor	Termék	mg prekursor / ml DMF	Radiokémiai hozam* %	% E-Z izomerizáció**
SX	SC	1/0,6	62±3	nem észlelt
CSX	CSC	1/0,4	67±4	nem észlelt
ISX	ISC	1/0,6	90±4	4,4±0,5
NSX	NSC	1/0,6	51±5	1,1±0,5
3,4-DMSX	3,4-DMSC	1/1,0	93±4	35,2±3
3,5-DMSX	3,5-DMSC	1/0,5	89±5	nem észlelt
TMSX	TMSC	1/0,8	68±5	50,6±3
NSPrX	NSPrC	1/0,5	35±4	nem észlelt
3,4-DMDPrSX	3,4-DMDPrSC	1/0,7	72±5	nem észlelt
3,5-DMDPrSX	3,5-DMDPrSC	1/1,0	89±5	nem észlelt

*a szintézis végén, a kiindulási [¹¹C]metiljodidra számolva; ** egyensúlyi érték a mérés időpontjában

Az átlagos bomlás-korrigált hozamot a kiindulási [^{11}C]metiljodidra számoltuk. A [^{11}C]metiljodid aktivitását az automatikus szintézisrendszerben lévő, kalibrált detektor által mutatott beütésszámból határoztuk meg. A specifikus aktivitás 1,85 és 5,55 MBq/ μmol (50-150 mCi/ μmol) között volt. Ugyancsak a 3. táblázatban mutatjuk be a reakcióelegyben a fény hatására végbemenő 7- ^{11}C]metil-sztirilxantin-származékok *E-Z* izomerizációját [73].

A 3.2. ábrán az (*E*)-1,3-dimetil-8-(jódsztiril)xantin (ISX) [^{11}C]metilezése után kapott reakcióelegy HPLC-kromatogramját mutatjuk be.

3.2. ábra (*E*)-1,3-dimetil-8-(jódsztiril)xantin [^{11}C]metilezés analitikai HPLC-kromatogramja



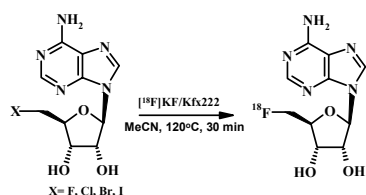
Fent: radioaktivitás detektor jele; lent: UV detektor jele. a csúcs [^{11}C]CH₃I; b csúcs *E*- ^{11}C]ISC; c csúcs *Z*- ^{11}C]ISC; d csúcs ISX (kiindulási anyag).

A felső görbén a radioaktivitás detektor jele látható. A 3,23 percnél megjelenő, a jelű csúcs a [¹¹C]metiljodidnak, a 7,72 percnél megjelelő, b jelű csúcs a [¹¹C]ISC *E*-izomerének és a 7,60 percnél megjelelő, c jelű csúcs a [¹¹C]ISC *Z*-izomerének felel meg. Az alsónak az UV detektor jelén a kiindulási (*E*)-1,3-dimetil-8-(jódsztilil)xantin 4,77 percnél jelentkező, d csúcs, míg az *E*-[¹¹C]ISC terméknek a 7,60 percnél látható, b csúcs felel meg.

3.2.2. [¹⁸F]-adenozinszármazékok előállítása

Kísérleteket folytattunk hordozómentes ¹⁸F-izotoppal jelzett adenzin-származékok előállítására. Tapasztalataink szerint az adenzin ¹⁸F-jelzése esetében az alábbi nehézségekkel is szembe kell nézni. Az adenzin két gyűrűs egységből épül fel: purinbázisból (adenin) és szénhidrátból (ribóz). Mindkét egységben több funkciócsoport található, és ezek a csoportok szoros kölcsönhatásban vannak egymással, így előfordulhat, hogy a kialakított aktiválócsoport nem a fluoridionnal reagál, hanem esetleg valamely szomszédos csoporttal [55].

Az első kísérleteket 5'-deoxi-5'-halogénadenozin-származék nukleofil fluorozásával, valamint homogén izotópcserével hajtottuk végre [55]



3.8. reakcióvázlat az 5'-deoxi-5'-[¹⁸F]fluoradenozin előállításához

3.7. Táblázat [¹⁸F]F-adenozin (Ado) szintézis eredmények

Prekurzor	X	Hozam %
FAdo	F	0
ClAdo	Cl	0,248
BrAdo	Br	0,488
IAdo	I	1,070

A reakcióhozamok növelése érdekében további kísérleteket végeztünk N⁶-benzoi-2',3'-izopropilidénadenozin-5'-szulfonsav-

észterek radio-fluorozására [57], de ebben az esetben nem kaptunk kielégítő reakcióhozamokat.

Mindezek alapján olyan jelzés tűnt megvalósíthatónak, ahol a ^{18}F -jelző ágens az adenzin funkciós csoportjaitól távol, hosszabb szénlánc, vagy cikloalkilcsoport végére kerül. Így nukleofil szubsztitúciós kísérleteket végeztünk a P1 típusú agonisták közül az N-alkil-karboxamid típusú adenzinszármazékok ^{18}F -cal történő jelzésére. A FNECA szintézise eddigi tapasztalataink alapján jó hozammal oldható meg egy új stratégia alkalmazásával. E szerint először egy fluor-18-jelzett kismolekulát állítunk elő ($[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), majd ezt beépítjük az adenzin-struktúrába. Ezzel a módszerrel jó hozammal és nagy specifikus aktivitással állítottuk elő a PET-izotóppal jelzett adenzinreceptor ligandumot [56].

3.3. Az $\text{A}_{2\text{A}}$ -adenzinreceptor-szelektivitás farmakológiai elemzése

A DE Gyógyszertani Intézettel közös együttműködés keretében, Dr. Szentmiklósi József tanár Úr irányításával az előállított tíz 7-metil-sztilixantin-származék közül a CSC-vel, 3,5-DMSC-vel, 3,4,5-TMSC-vel, valamint az új ISC-vel és a szintén új ASC-vel [(E)-8-(3-azidosztilil)-3,5,7-trimetilxantin] [35], farmakológiai vizsgálatokat végeztünk. Referenciavegyületként a jelenleg leghatékonyabb $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptor blokkoló, ZM 241385 jelzésű vegyületet használtuk, amely nem xantinszármazék.

A vizsgálatokat a következő preparátumokon végeztük el:

- Pitvari myocardium (A_1 típusú adenzinreceptorokat hordozó szövet). A pitvari szívizomrostok felszínén extracelluláris lokalizációjú A_1 -receptorok helyezkednek el, amelyek aktivációja felelős az adenzin kardiodepresszív hatásáért. Az A_1 -receptorok szerepét mind tengerimalac,

mind pedig patkány szívpitvarán sikerült egyértelműen kimutatni [12, 58].

- Tengerimalac pulmonális artéria (A_1 - és A_{2B} -receptorokat hordozó szövet). Kimutatták, hogy a tengerimalac pulmonális artéria azon ritka értípusok egyikét képviseli, ahol adenzin hatására komplex receptorális mechanizmusok aktiválódnak. A purin nukleozid beadását követően 5 mp-en belül nagy felfutási meredekségű kontrakció alakul ki, amelyet egy gyors, majd egy lassan kifejlődő relaxáció követ. Ha a kísérleteket $0,3 \mu\text{mol/l}$ DPCPX (specifikus A_1 -adenozinreceptor antagonistá) jelenlétében végezzük, akkor a kontrakció helyett az adenzin vagy NECA beadása után gyors relaxáció alakul ki. Specifikus adenzin analógokkal és antagonistákkal végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a kontrakcióért A_1 -adenozinreceptor-aktiváció, a gyors relaxációért pedig A_{2B} -adenozinreceptor-aktiváció felelős [94].
- Patkány pulmonális artéria (A_{2A} -receptorokat hordozó szövet). Ami a patkány artéria pulmonális purinergreceptor-ellátottságát illeti, ismert, hogy ez az érféleség – eltérően a tengerimalac tüdőerektől, és a koronáriákhoz hasonló módon – A_{2A} -adenozinreceptorokat tartalmaz, amelyek aktiválása révén lassan kifejlődő relaxáció alakul ki [95].

A Schild-féle regressziós analízissel [2] kapott pA_2 -értékeket az alábbi 3.8. táblázatban tüntettük fel. Látható, hogy a koffein nem szelektív (azonos pA_2 -értékek, egységnyi A_{2A}/A_{2B} és A_{2A}/A_1 arány). A CSC esetében az A_{2A} -szelektivitás, főleg az A_{2A}/A_{2B} szelektivitás szempontjából már jelentősnek mondható. Bár a 3,5-DMSC és a 3,4,5-TMSC szelektívek, sőt ilyen szempontból "kiegyensúlyozott" vegyületek, de nem érik el a CSC hatását. Igen figyelemreméltó a következő két 7-metil-sztrilxantin-származék, az azid- és a jódsztrilxantin-koffein. Az azidszármazék igen erős szelektivitással rendelkezik

és nagyon gyengén hat az A_{2B} - és A_1 -receptorokra. Külön hangsúlyozandó a jódsztrilkoffein, amelynek mintegy 500x-os A_{2A}/A_1 szelektivitása kiemelkedő a vizsgált purinerg-antagonisták között, ugyanakkor az A_{2A} affinitása, amelyet a pA_2 -érték fémjelez, csaknem akkora, mint a jelenlegi legerősebb A_{2A} -blokkoló ZM-vegyületé, amely viszont nem a legspecifikusabb az általunk vizsgált molekulák között.

3.8. táblázat. 7-Metil-sztrilixantinszármazékok adenozin-altípus-specifitásának vizsgálata izolált szöveteken

Vegyület	pA_2 (A_{2A}) patkány pulm. artéria	pA_2 (A_{2B}) t.malac pulm. artéria	pA_2 (A_1) t.malac pitvari myo- cardium	A_{2A}/A_{2B}	A_{2A}/A_1
Koffein	4,60	4,54	4,54	1	1
CSC	6,49	4,74	5,41	56	12
3,5-DMSC	6,58	5,92	5,72	5	7
3,4,5-TMSC	6,59	5,82	5,73	6	7
ASC	6,33	4,41	4,28	83	112
ISC	7,67	6,51	>5	15	>468 !
ZM 241385	7,91	7,06*	6,50	7	26

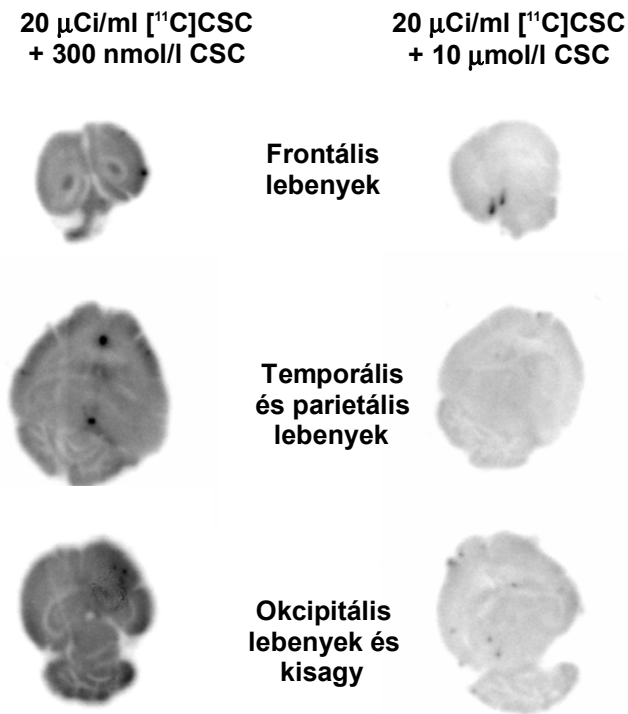
Id. 81, Pouchet 1995

Az eredményeinket figyelembe véve a vizsgált vegyületeket a szelektivitás szempontjából 4 csoportra különíthetjük el: az első csoportban nincs szelektivitás, ilyen a koffein; a második csoportban az A_{2B} - és A_1 -re vetített hatás azonos, ez a 3,5-DMSC, 3,4,5-TMSC és az ASC közös vonása; a harmadik csoportban az A_{2A}/A_{2B} -arány az erősebb: ennek prototípusa a CSC; és végül a negyedik csoportba tartozik a jódsztrilkoffein, amelynek főleg az A_{2A}/A_1 -aránya kiemelkedő.

3.4. A [¹¹C]CSC-antagonista és az adenzinreceptor kötődésének előzetes vizsgálata különféle biológiai rendszerekben

3.4.1 Receptor-ligandum-kötődés specificitásának vizsgálata

A ligandumkötődés specificitását *in vitro* és *in vivo* kompetíciós, vagy leszorítós módszerekkel vizsgáltuk. A 3.3. ábrán autoradiográfiás módszerrel mutattuk ki egér agyszeleteken a jelzett és az inaktív CSC közötti kompetíciót.



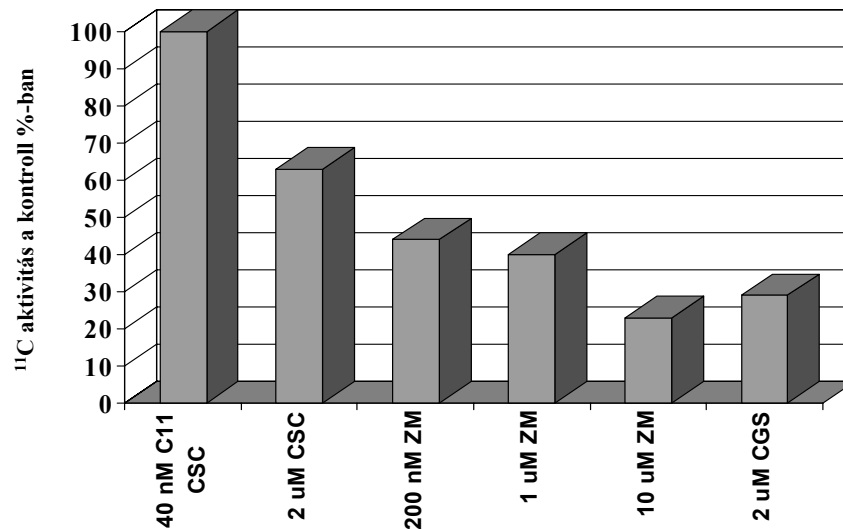
3.3. ábra: A CSC specifikus kötődésének bizonyítása *in vitro* kompetíciós vizsgálattal egér agyon

Az agyszeleteken mért [¹¹C]CSC-aktivitás mértéke mintegy 70-80 %-al csökkent, ha a mintát 10 μ mol/l inaktív CSC jelenlétében

inkubáltak. Természetesen mindkét esetben azonos volt a [^{11}C]-radioaktivitás koncentrációja (20 $\mu\text{Ci/ml}$).

Hasonló eredményre jutottunk, amikor a CSC specifikus kötődését vizsgáltuk egy olyan sejtvonalon, amelynek membránjában nagy denzitással expresszálódnak az A_1 - és A_{2A} -adenozinreceptorok [84].

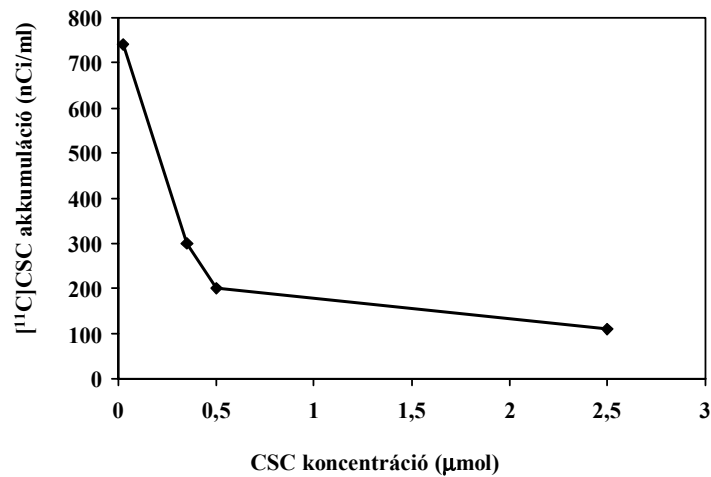
A 3.4. ábrán bemutatott adatok azt mutatják, hogy a [^{11}C]-izotóppal jelzett CSC kötődése hideg, A_{2A} -specifikus adenzinreceptor-ligandumokkal, például inaktív CSC-vel visszaszorítható. A ZM 241385 jelenlétében a kompetíció mértéke még fokozottabb volt. Ez a nagy affinitású (K_d értéke 10nM) és nagy specifitású, nem-xantin típusú A_{2A} -antagonista [49] a koncentrációtól függő mértékben lecsökkentette a CSC kötődését. Hasonló kompetíciót mutattunk ki a CSC és a CGS 21680 között. A CGS nagy affinitású (K_d értéke 10nM), nagy szelektivitású A_{2A} -agonista. A jelzett CSC koncentrációja minden kísérletben azonos volt (40 nmol/l).



3.4. ábra: A [^{11}C]CSC specifikus kötődése DDT1 MF2 sejtvonalon (n=3)

A [^{11}C]CSC specifikus kötődését *in vivo* PET-vizsgálattal is bizonyítottuk nyúlágban.

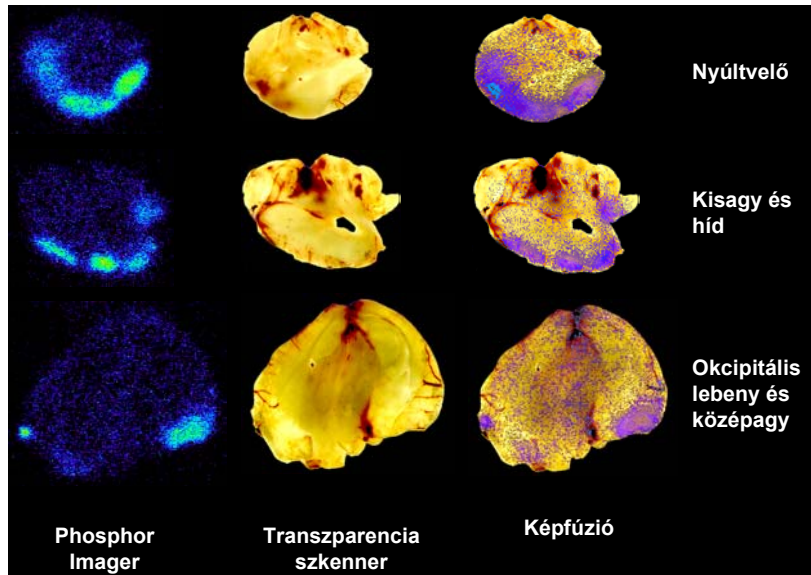
Az állatokba 1,5 mCi [^{11}C]CSC-ligandumot és vele egyidejűleg, különböző dózisban, inaktív CSC-t injektáltunk. A [^{11}C]CSC-kötődését a beadás pillanatától monitoroztuk az agyban. A nyulakba beinjektált teljes CSC-koncentrációk értéke 30, 200, 500 és 2500 nmol/l volt. Az *in vivo* kompetíciós vizsgálat eredményét a mért jelzett ligandum két perc eltelte utáni felhalmozódásból határoztuk meg. A nyert adatokat a 3.5. ábrán mutatjuk be. Az agyban mért radioaktivitás mértéke az inaktív CSC-koncentráció növekedésével fokozatosan csökken.



3.5. ábra Nyúlágban mért [^{11}C]CSC-akkumuláció mértéke az inaktív CSC koncentrációjának függvényében

3.4.2 A receptor-ligandum kötődés szervezeten belüli eloszlásának vizsgálata

A 3.6. ábrán egéragyból készített metszetek [^{11}C]CSC-kötődésének eloszlását mutatjuk be.



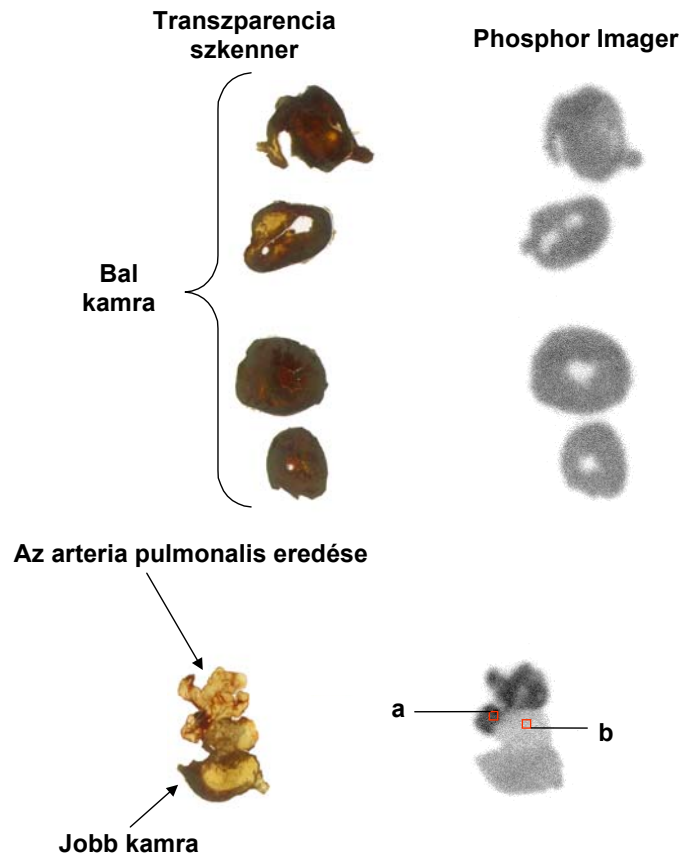
3.6. ábra: [^{11}C]CSC kötődése egéragyban.

(az állatokat in vivo injektáltuk a jelzett ligandummal. 10 perces expozíciót követően a koronális agyszeletek radioaktív eloszlását Phosphorimager technikával detektáltuk)

Az állatok intravénásan 200 μCi [^{11}C]CSC-t kaptak. Az injektálást követően 10 perccel leöltük az állatokat és a szerveket kipeparáltuk. Az ábrán az egéragy három koronális metszete mentén mutatjuk be a CSC-tracernak a Molecular Dynamics Phosphorimager berendezés segítségével meghatározott eloszlását. A legfelső szelet a nyúltvelő szintjében készült, az alatta levő metszeten a kisagy és a híd látható, a legalsó szelet centrális része a középgagyat, az azt körülölelő régiók pedig az okcipitális lebeny egy részletét tartalmazzák. A középső oszlopban az előbbi metszetekről transzparencia szkennel készített képeiket mutatjuk be. Nem alkalmaztunk semmiféle festési eljárást, a natív mintákon a piros foltok vérrel való postmortem színeződéssel kapcsolatosak. A

harmadik oszlopban az emissziós és transzparencia képek szuperpozícióját mutatjuk be. Az A_{2A} -adenozinreceptorok topológiáját demonstráló, intenzív halmozódás a nyúltvelő és a híd ventrális részére, valamint a kisagy és az okcipitális lebeny kortexének egy körülírt részére lokalizálható.

A szívről készített metszeteken (3.7. ábra) a $[^{11}C]$ CSC-akkumulációnak a farmakon intravénás injektálását 20 perccel követő eloszlását mutatjuk be.



3.7. ábra A $[^{11}C]$ CSC kötődése egérszívben (bal kamra tengelyére merőleges szeletek)

A jobboldali oszlopban a CSC szívben való eloszlásának emissziós képeit láthatjuk, míg a baloldali oszlopban ugyanezen szeletek transzparencia-képei láthatóak. Az ábra alsó részén bemutatott metszeten látható az artéria pulmonális eredése, melyet nagy A_{2A} -receptorszám-denzitás jellemez. Az itt mért CSC akkumuláció mértéke több, mint háromszorosa a jobb kamra szívizomszövetének. A két ROI által jelölt terület radioaktív koncentrációjának aránya $a/b = 3,1$.

A szervi megoszlásos vizsgálatunk eredményeit a 3.9. táblázatban foglaltuk össze.

3.9. táblázat [^{11}C]CSC szervezeten belüli megoszlása [DAR (differential absorption ratios) érték] egérben

Szerv	10 perc	20 perc	40 perc	60 perc
Vér	0,18±0,06	0,19±0,06	0,36±0,20	0,26±0,06
Agy	0,83±0,42	0,70±0,44	0,41±0,18	0,18±0,06
Szív	0,76±0,05	0,76±0,15	0,89±0,18	0,46±0,15
Tüdő	28±3,60	21±13,07	16±8,71	3,33±1,53
Máj	2,88±1,46	1,22±0,16	3,2±0,72	1,1±0,35
Hasnyálmirigy	0,46±0,20	0,56±0,31	0,67±0,32	0,47±0,21
Lép	0,63±0,21	0,21±0,08	0,37±0,06	0,6±0,35
Gyomor	0,71±0,51	0,34±0,16	0,45±0,08	0,3±0,1
Vese	1,33±0,25	0,8±0,005	0,87±0,23	0,6±0,17
Izom	0,30±0,05	0,12±0,01	0,32±0,05	0,12±0,07
Csont	0,52±0,27	0,14±0,06	0,28±0,16	0,12±0,07

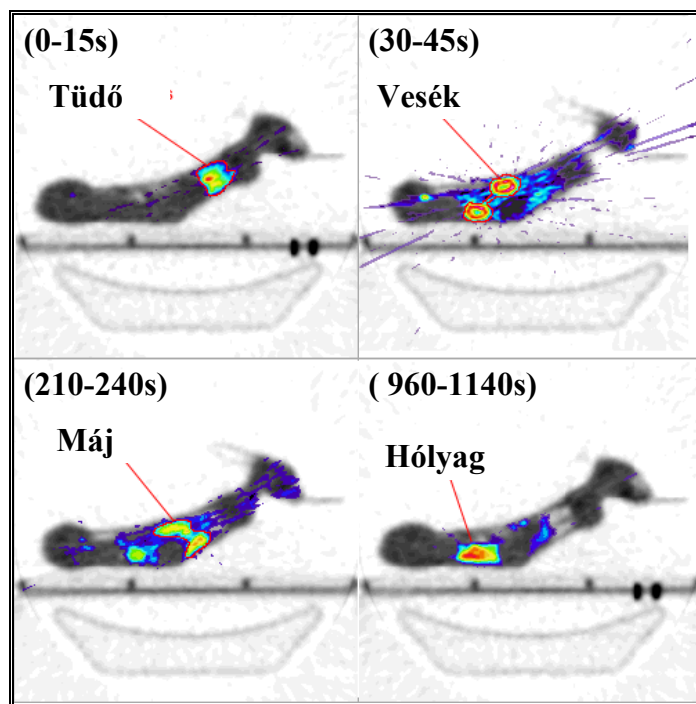
n= 3 (átlag ±S.D.)

A táblázatból jól látható, hogy a különböző szervek/szövetek DAR-értékei között jelentős különbségek vannak az A_{2A} -receptortartalmuknak megfelelően, és a szervi megoszlás időben is

változik. Magas felvételt mértünk a tüdőben, a májban, a vesében, a szívben és az agyban. A tüdő kiugróan magas aktivitása a radiofarmakon intravénás bejuttatásával és a tüdőerek nagy A_{2A} -receptortartalmával magyarázható. A vér alacsony aktivitásszintje lehetővé teszi a jelzett ligandum akkumulációs kinetikájának képalkotó eljárásokkal történő, *in vivo* vizsgálatát.

3.4.3 [^{11}C]CSC *in vivo* kötődésének vizsgálata PET-el

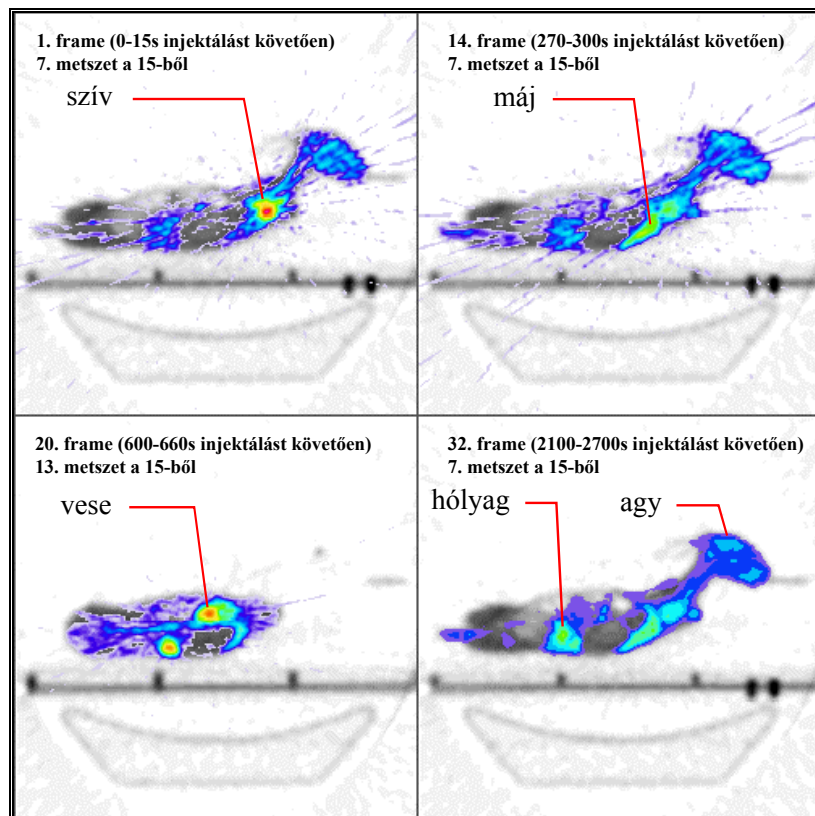
A [^{11}C]CSC-ligandum-receptor kötődésének kinetikáját dinamikus PET-vizsgálattal követtük nyomon nyúlban. A 3.8. ábrán négy (különböző helyzetű) szagittális metszetet látunk (az állat az oldalán feküdt).



3.8. ábra Receptorligandum aktivitás-eloszlásának változása dinamikus PET-vizsgálat alatt, nyúlban (szagittális síkok, transzmissziós vizsgálatra helyezett emissziós kép)

Az első kép az injektálást követő 15 másodperc alatti [¹¹C]CSC-eloszlást mutatja. A radioaktivitás legelőször a tüdőben jelenik meg, itt még a vértérfogatból ered az aktivitás nagy része. A 30. és 45. másodpercek közötti időintervallumban már a vesékben is erős receptor-ligandum kötődést észleltünk. A 6. perc körül készített, harmadik képen a máj [¹¹C]CSC-aktivitáseloszlása dominál, de a kiválasztás eredményeképpen már megjelenik a hólyagban is az aktivitás, ami a 15. perc után szinte kizárólagossá válik.

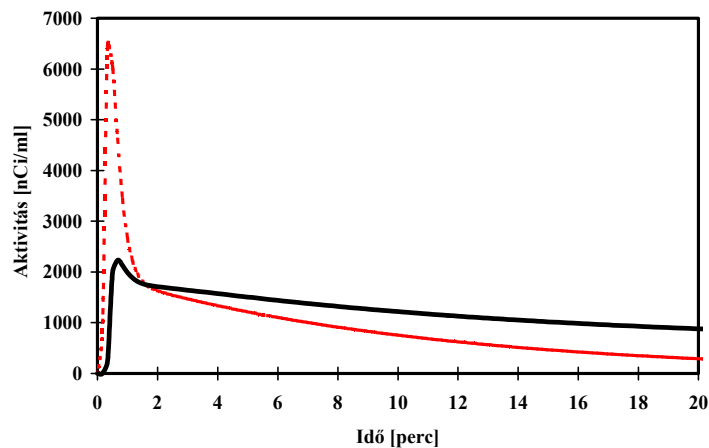
Hasonló képeket készítettünk a nyúlról [¹⁸F]FDG-vel történő dinamikus PET-vizsgálattal is (3.9. ábra).



3.9. ábra FDG-aktivitás-eloszlás változása dinamikus PET-vizsgálat alatt, nyúlban (szagittális síkok, transzmissziós vizsgálatra helyezett emissziós kép)

Ezekon a képeken látható az egyes szervekben az injektálást követően, különböző időintervallumokban mért glukóz-akkumuláció mértéke. A [^{18}F]FDG eloszlása a nyúl különböző szerveiben időben változik. A radiofarmakon vizelettel történő kiválasztásának megfelelően az idő előrehaladtával nő a hólyag területén észlelhető aktivitás-koncentráció. A [^{18}F]FDG-képek segítségével az egyes szervek azonosítását ellenőriztük.

A dinamikus PET-vizsgálatok során a [^{11}C]CSC-radiofarmakon beadását követő pillanattól monitoroztuk a receptorligandum szöveti felhalmozódását az egész állatban. A szöveti eloszlás dinamikáját egy 40 perces időskálán vizsgáltuk. Az egymást követő expozíciókból meghatároztuk a ligandum akkumulációs kinetikáját a különböző régiókban. Meghatározott időközönként artériás vérmintákat vettünk és meghatároztuk a vérben lévő ligandumkoncentráció időbeli változását. A kísérletekhez a nyulakba 2 mCi (30 nmol CSC/állat) jelzett ligandumot injektáltunk intravénásan.

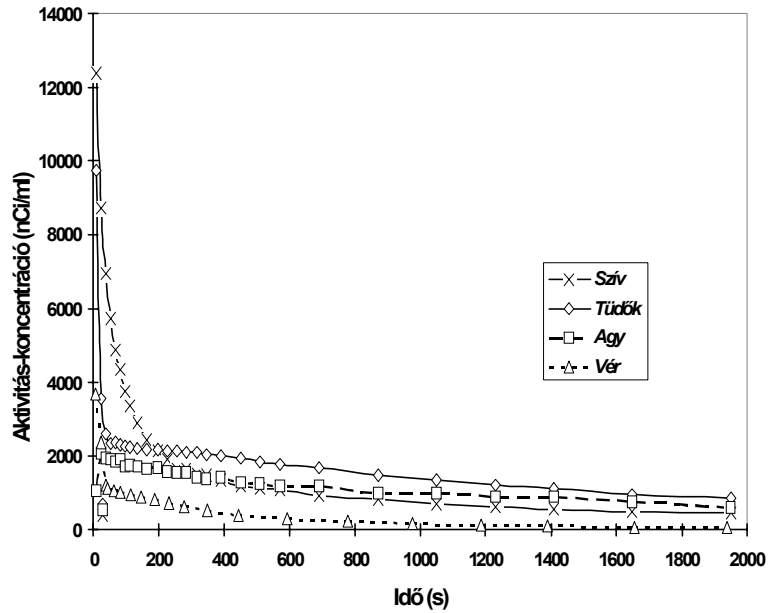


3.10. ábra: Az agy (folytonos vonal) és a vér (szaggatott vonal) CSC-aktivitásának időbeli változása, nyúlban (illesztett görbék)

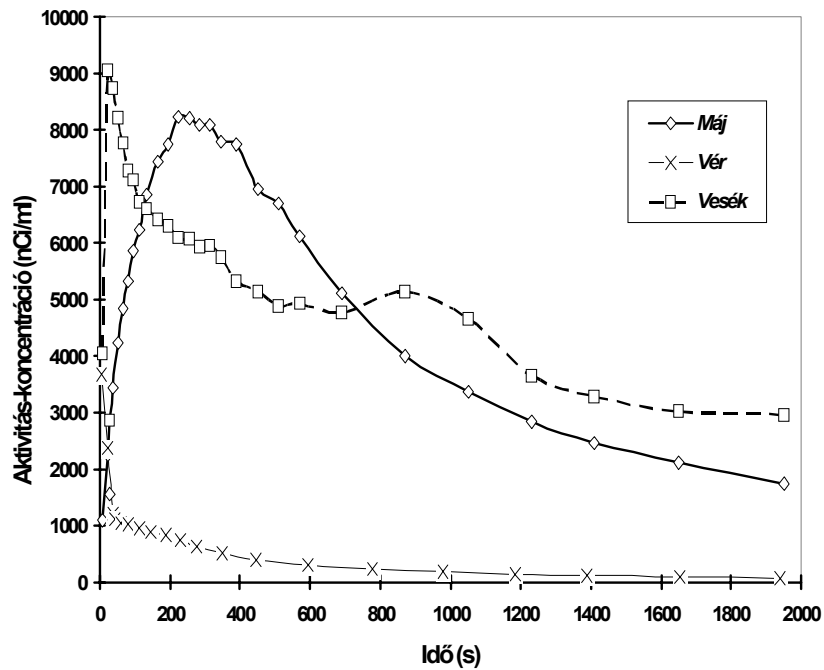
A 3.10. ábrán az agy és a vér aktivitásának időbeli változását mutatjuk be nyúlban. Az agy kezdeti radiofarmakon-felvétele gyors volt, a radioaktivitás szintje az injektálást követően kevesebb, mint két

perc alatt érte el a maximumot és ezt követően folyamatosan csökkent a vizsgált 40 perces időskálán. A 3.10. ábrán látható, hogy az agyban akkumulálódott radiofarmakon-koncentrációja jóval lassúbb ütemben csökkent, mint a vér radioaktivitás-koncentrációja.

A 3.11. ábrán az agy és a vér mellett, a szív és a tüdő [¹¹C]CSC-akkumulációs kinetikáját mutatjuk be, a 3.12. ábrán pedig a máj és a vese [¹¹C]CSC időfüggő aktivitás-koncentrációjának változásait ábrázoltuk.



3.11. ábra A szív, a tüdők, az agy és a vér aktivitás-koncentrációjának változása dinamikus PET-vizsgálattal, nyúlban



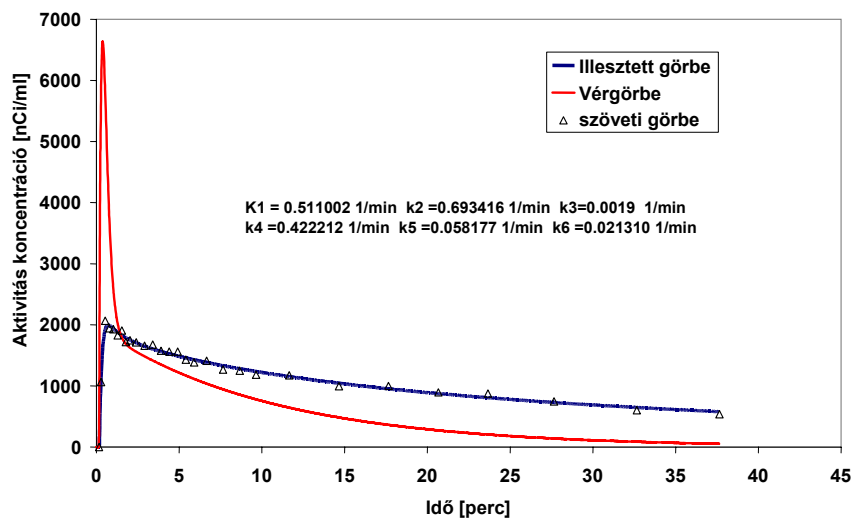
3.12. ábra: A máj, a vér és a vesék $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -akkumulációs kinetikájának vizsgálata PET-technikával, nyúlban

3.4.4. A $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -receptor-ligandum kötődés kinetikáját leíró állandók meghatározása négykompartmentes modell alapján nyúlgyban PET-vizsgálattal

A PET-vizsgálathoz a nyulat a kísérleti részben leírtak szerint előkészítettük. Az altatott állatot egy speciális tartóba helyeztük a PET-kamera látómezejébe. A radiofarmakon beadása előtt transzmissziós felvételt készítettünk a nyúlról. A transzmissziós felvétel 40 percig készült, sugárforrásként 7 mCi ^{68}Ge -izotóp vonalforrást használtunk. A transzmissziós scan elvégzése után intravénásan 2 ml 2 mCi, 100 mCi/ μmol specifikus aktivitású $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ ligandumot adtunk be a kísérleti állatnak.

A vizsgálat során a nyúl artéria femoralisából meghatározott időközönként 0,5 ml vért vettünk. Az adatgyűjtés 40 percig tartott, ez idő alatt 28 frame-et készítettünk.

A kompartment analízis során az időfüggő véraktivitás görbét, valamint az agy szöveti (TACT) görbét használtuk fel. A számítások során a kinetikai és egyéb állandók numerikus értékeinek számítása egy speciális iteratív, nem-lineáris regresszió-számítás alapján történt. A 3.13. ábrán a [¹¹C]CSC kötődését reprezentáló PET-mérésből származó szöveti görbét (TACT görbe), a vérvételi mérésekből származó véraktivitás görbét, és a 4 kompartmentes analízis eredményeként kapott illesztett szöveti görbét mutatjuk be a vizsgálati idő függvényében.



3.13. ábra. A [¹¹C]CSC-receptor-ligandum kötődés kinetikáját leíró állandók meghatározása négykompartmentes modell alapján nyúlagyban PET-vizsgálattal

A négykompartmentes modell alapján elvégzett kinetikai számítások eredményeként meghatároztuk a modellt leíró kinetikai állandók numerikus értékeit (K_1 - k_6 , 1/min). Ezek alapján a CSC A_{2A} adenzinreceptor antagonist transzportját és a kötődését az agyban

az alábbi paraméterek határozzák meg a négykompartmentes modell alapján:

- K_1 : a receptorligandum vérpoolból a receptor kötőhelyhez való transzportjának a sebességi állandója;
- k_2 : a ligandumnak a receptortól a vérbe történő transzport sebességi állandója;
- k_3 : a receptor-ligandum kötődési állandó (asszociációs állandó);
- k_4 : a receptor-ligandum kötődés disszociációs állandója;
- k_5 : a nonspecifikus ligandum kötődési állandója;
- k_6 : a nonspecifikus ligandum kötődés disszociációs állandója;

Ezen sebességi és kötődési állandók numerikus értékei az ábráról leolvashatók.

Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a ^{11}C -jelzett xantinszármazékok csoportja jól használható radiofarmakon az élő szövetek és szervek P1-típusú adenosinreceptor-kötőhelyeinek a feltérképezésére. A PET-módszerrel, jelzett receptor-ligandumok segítségével in vivo tanulmányozható, többek között, a receptor – ligandum-kötődés kinetikája, illetve a receptor-expresszió mértékének (denzitásának) változása is.

4. Anyagok és módszerek

A kémiai szintézisekhez használt oldószereket és kiindulási anyagokat a Merck (Darmstadt, Németország) vagy Sigma-Aldrich (Gillingham, Nagy-Britannia) cégektől szereztük be. A $^1\text{H-NMR}$ -spektrumokat Bruker WP 200 spektrofotométerrel (200 MHz) vettük fel, belső standardként tetrametilszilánt (TMS, $\delta = 0,00$ Hz), oldószerként DMSO- d_6 használva. A kémiai eltolódást δ egységekkel (ppm) jellemeztük. A sávok felhasadását a következőképpen jelöltük: s (szingulett), d (dublett), t (triplett), m (multiplett).

A vegyületek TLC-vizsgálatát szilikagél rétegen (Kieselgel 60 F₂₅₆, 5X10 cm, 0,25 mm rétegvastagságú lemezek, gyártó cég: Merck, Darmstadt, Németország) végeztük el. A komponens foltok előhívásához ultraibolya (UV) fény és kémiai előhívás kombinációját alkalmaztuk (a lemezeket pár percig jódgőzben tartottuk). Az analitikai HPLC-rendszerben – amennyiben másképp nem jelezzük - LiChrosphere RP 18 (250-4), fordított fázisú oszlopot (gyártó cég: Merck, Darmstadt, Németország), a preparatív HPLC-rendszerben LiChrosphere RP 18 (250-10) fordított fázisú oszlopot (gyártó cég: Merck) használtunk. A kromatográfiás elválasztások során futtatószerként különböző, a szövegben megadott összetételű víz:acetonitril oldószerkeletet és lineáris gradienst alkalmaztunk. A csúcsokat 290 nm hullámhosszra beállított, UV-detektorral (gyártó cég: Waters Co., USA) azonosítottuk, amelyet az aktív anyag azonosítására egy radioaktivitás detektorral kötöttünk sorba.

A specifikus aktivitást kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, amelyet az inaktív vegyület különböző koncentrációjú oldatainak HPLC-futtatásaiból származtatott csúcs alatti terület-koncentráció összefüggés definiált. Az egyes HPLC-frakciók (radioaktív anyag) UV-jelének csúcs alatti területéből meghatároztuk az aktív anyag koncentrációját, így kiszámoltuk annak

összmenyiségét. Az összaktivitás és az összmenyiség hányadosaként nyertük a termék specifikus aktivitását.

A szintézis közben keletkező gázok, folyadékok felgyülemelésének monitorozására kisméretű, flexibilis GM-csőveket használtunk, amelyek megfelelő ólomárnyékolással egymáshoz viszonylag közel is elhelyezhetők. A termék HPLC-analíziséhez szcintillációs detektort használtunk.

Szerves kémiai előállítások

Xantinszármazékok

1,3-Dimetil-5,6-diaminouracil. Ezt a molekulát a szakirodalomban ismert eljárással állítjuk elő a következő módon [77]. 8,81 g *N,N*-dimetil-karbamid 12,5 ml ecetsavanhidriddel készített oldatát 8,5 g ciánecetsavval 3 órán át 60°C hőmérsékleten reagáltatjuk. A reakció befejezése után a maradék ecetsavat rotációs desztilláló készülékben eltávolítjuk, majd az 5°C-ra hűtött maradékhoz 70 ml 5%-os NaOH-oldatot adagolva kicsapódik a sárga színű 1,3-dimetil-6-aminouracil. Az 5°C-os reakcióelegyhez adagoljuk 8,3 g NaNO₂ 50 ml vízzel készített oldatát és 1 óra alatt, cseppenként, 15 ml ecetsavat. Ezután a reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd szűrjük, vízzel, etanollal és éterrel mossuk, így 15,5 g, lila színű 1,3-dimetil-5-nitrozo-6-aminouracilt kapunk, amelyet további tisztítás nélkül használhatunk a következő lépésben.

A fentiek szerint előállított 8,1 g uracilszármazékhoz 40 ml tömény NH₄OH-oldatot adagolunk, majd a reakcióelegyet 1 órán keresztül 70°C-on tartjuk. Ezt követően ugyanezen a hőmérsékleten hozzáadagoljuk 22 g Na₂S₂O₄ 100 ml vízzel készített oldatát, majd 20 percig 70°C-on keverjük. Hűtés és szűrés után 8 g barna színű cím szerinti terméket (op.: 202-204°C) kapunk (reakcióhozam: 78,3%).

Azonos módon eljárva, *N,N*-dipropilkarbamidból kiindulva, 1,3-dipropil-5,6-diaminouracilt állítunk elő (reakcióhozam: 77,6%).

1,3-Dimetil-8-(3-klórsztiril)xantin (CSX). A molekulát a szakirodalomban ismert eljárással állítjuk elő [7, 90]. 1,5 mmol 1,3-dimetil-5,6-diaminouracil 20 ml DMF-fel készített oldatához hozzáadagolunk 1 mmol 3-klórfahéjsavat, 1 mmol *N,N*-dimetilkarbodiimidX₂HCl-dot, valamint katalitikus mennyiségű (0,04 g) imidazolt és (0,06 g) *N,N*-dimetilpiridint. A reakcióelegyet 4 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd 50 ml telített sóoldatra öntjük. A képződött szuszpenziót szűrjük, a 100 ml metanolban oldott csapadékot 75 ml, 4 mol/l-es NaOH-oldattal keverjük össze. A reakcióelegyet 3 órán át 60°C-on keverjük. A lehűtés után képződött csapadékot szűrjük, metanollal mossuk és szárítjuk, így fehér színű cím szerinti terméket (op. 348-349°C) kapunk (reakcióhozam: 54,8%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,2 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,45 (s, 3 H, N₁-CH₃), 7,05 (d, 1 H, J=16 MHz), 7,2-7,8 (m, 5 H) 13,70 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-sztirilxantin (SX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként fahéjsavat használva, fehér színű, cím szerinti terméket (op. >360°C) kapunk (reakcióhozam: 46,9%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,22 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,48 (s, 3 H, N₁-CH₃), 7,05 (d, 1 H, J=15 MHz), 7,3-7,5 (m, 3 H), 7,53-7,7 (m, 3 H), 13,62 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-(3-jódsztiril)xantin (ISX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3-jódfahéjsavat használva, fehér színű, cím szerinti terméket (op. >360°C) kapunk (reakcióhozam: 34,4%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,25 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,48 (s, 3 H, N₁-CH₃), 7,05 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,2 (t, 1 H, J=6 Hz), 7,55 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,60-7,88 (m, 2 H), 8,00 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-(3-nitrosztiril)xantin (NSX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3-nitrofahéjsavat használva, sárga színű, cím szerinti terméket (op. >360°C) kapunk (reakcióhozam: 49,1%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,26 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,50 (s, 3 H, N₁-

CH₃), 7,21 (d, 1 H, J=15 Hz), 7,66-7,83 (m, 2 H) 8,02-8,26 (m, 2 H), 8,40 (s, 1 H), 13,75 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-(3,4-dimetoxisztiril)xantin (3,4-DMSX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3,4-dimetoxifahéjsavat használva, élénksárga színű, cím szerinti terméket (op. 314-316°C) kapunk (reakcióhozam: 49,4%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,22 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,44 (s, 3 H, N₁-CH₃), 3,78 (s, 3 H, OCH₃), 3,80 (s, 3 H, OCH₃), 6,90 (d, 1 H, J=15 Hz), 6,98 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,11 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,21 (s, 1 H), 7,58 (d, 1 H, J=15 Hz), 13,42 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-(3,5-dimetoxisztiril)xantin (3,5-DMSX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3,5-dimetoxifahéjsavat használva, halványsárga színű, cím szerinti terméket (op. 338-340°C) kapunk (reakcióhozam: 46,8%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,28 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,48 (s, 3 H, N₁-CH₃), 3,81 (s, 3 H, OCH₃), 3,89 (s, 3 H, OCH₃), 6,56-6,70 (m, 2 H), 7,94 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,54 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,80 (d, 1 H, J=16 Hz), 13,44 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dimetil-8-(3,4,5-trimetoxisztiril)xantin (3,4,5-TMSX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3,4,5-trimetoxifahéjsavat használva, sárga színű, cím szerinti terméket (op. 348-351°C) kapunk (reakcióhozam: 34,9%). ¹H-NMR adatok: δ = 3,26 (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,48 (s, 3 H, N₁-CH₃), 3,68 (s, 3 H, OCH₃), 3,82 (s, 6 H, OCH₃), 6,90 (s, 2 H), 7,04 (d, 1 H, J=15 Hz), 7,62 (d, 1 H, J=15 Hz), 13,53 (s, 1 H, N₇-H).

1,3-Dipropil-8-(3-nitrosztiril)xantin (NDPrSX). A fenti eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 1,3-dipropil-5,6-diaminouracilt és 3-nitro-fahéjsavat használva, barna színű, cím szerinti terméket (op. 256-258°C) kapunk (reakcióhozam: 48,4%). ¹H-NMR adatok: δ = 0,76-1,02 (m, 6 H), 1,44-1,86 (m, 4 H), 3,70 (t, 2 H, J=5 Hz), 4,00 (t, 2 H, J=5 Hz), 6,68 (d, 1 H, J=7 Hz), 6,78-7,00 (m, 3 H), 7,06-7,22 (m, 1 H), 7,52 (d, 1 H, J=16 Hz), 13,60 (s, 1 H).

8-(3,4-Dimetoxisztiril)-1,3-dipropilxantin (3,4-DMDPrSX). Az előző eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3,4-dimetoxifahéjsavat használva, halványbarna színű, cím szerinti terméket (op. 274-275°C) kapunk (reakcióhozam: 43,4%). ¹H-NMR adatok: $\delta = 0,70-0,96$ (m, 6 H), 1,44-1,84 (m, 4 H), 3,70 (s, 3 H, OCH₃), 3,72 (s, 3 H, OCH₃), 3,78-3,90 (m, 2 H), 3,98 (t, 2 H, J=7 Hz), 6,94-7,28 (m, 3 H), 7,28 (s, 1 H), 7,60 (d, 1 H, J=16 Hz), 13,46 (s, 1 H).

8-(3,5-Dimetoxisztiril)-1,3-dipropilxantin (3,5-DMDPrSX). Az előző eljárás szerint eljárva, kiindulási anyagként 3,5-dimetoxifahéjsavat használva, halványsárga színű, cím szerinti terméket (op. 246-248°C) kapunk (reakcióhozam: 37,2%). ¹H-NMR adatok: $\delta = 0,80-1,00$ (m, 6 H), 1,48-1,80 (m, 4 H), 3,81 (s, 3 H, OCH₃), 3,88 (s, 3 H, OCH₃), 3,74-3,90 (m, 2 H), 3,98 (t, 2 H, J=7 Hz), 6,52-6,68 (m, 2 H), 6,94 (d 1 H, J=16 Hz), 7,58 (d 1 H, J=7Hz), 7,78 (d, 1 H, J=16 Hz), 13,46 (s, 1H).

7-Metil-xantinszármazékok

8-(3-Klórsztiril)-1,3,7-trimetilxantin [3-klór-sztirilkoffein (CSC)]. 0,5 g CSX 40 ml dimetilformamiddal készített oldatához 1 g K₂CO₃-t és 1 ml metiljodidot adagolunk. A szuszpenziót 40 percig, 60°C-on refluxáljuk. Lehűtés után 5 ml ammóniát és 10 ml vizet adunk hozzá, így a cím szerinti, fehér színű vegyületet (op. 206-208°C) kapjuk (reakcióhozam: 95,8%). ¹H-NMR adatok: $\delta = 3,18$ (s, 3 H, N₃-CH₃), 3,42 (s, 3 H, N₁-CH₃), 4,00 (s, 3 H, N₇-CH₃), 7,25-7,77 (m, 5 H), 7,9 (s, 1 H).

Azonos módon eljárva a megfelelő sztirilxantin-származék metilezésével állítjuk elő a többi 7-metil-sztirilxantin-származékot. A 4.2. táblázatban az előállított vegyületek fizikai azonosító adatait mutatjuk be.

4.2. táblázat 7-Metil-sztilixantin-származékok

Vegyület	Op. °C	¹ H-NMR adatok
SC	218- 220	3,18 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,52 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 4,00 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,28 (d, 1 H, J=15 MHz), 7,3-7,47 (m, 3 H), 7,62 (d, 1 H), 7,75 (d, 2 H)
ISC	226- 227	3,22 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 4,04 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,14-7,32 (m, 1 H) 7,41 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,56 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,72 (t, 2 H, J=6 Hz), 8,26 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N ₇ -H)
NSC	305- 306	3,24 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 4,08 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,58-7,90 (m, 3 H), 8,12-8,30 (m, 2 H), 8,70 (s, 1 H)
3,4-DMSC	234- 236	3,20 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,44 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 3,80 (s, 3 H, OCH ₃), 3,81 (s, 3 H, OCH ₃), 4,02 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 6,99 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,20 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,28 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,40 (s, 1 H), 7,61 (d, 1 H, J=15 Hz)
3,5-DMSC	238- 240	3,22 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 3,82 (s, 3 H, OCH ₃), 3,90 (s, 3 H, OCH ₃), 4,00 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 6,54-6,68 (m, 2 H), 7,14 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,80 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,89 (d, 1 H, J=16 Hz)
3,4,5-TMSC	245- 247	3,21 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,45 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 3,68 (s, 3 H, OCH ₃), 3,75 (s, 3 H, OCH ₃), 4,02 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,01 (s, 2 H), 7,28 (d, 1 H, J=15 Hz), 7,62 (d, 1 H, J=15 Hz)
NDPrSC	212- 214	0,76-1,02 (m, 6 H), 1,58 (q, 2 H, J=7 Hz), 1,62 (q, 2 H, J=7 Hz), 3,82 (t, 2 H, J=5 Hz), 4,00 (t, 2 H, J=5 Hz), 4,09 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,54-7,76 (m, 3 H), 8,16-8,30 (m, 2 H), 8,70 (s, 1 H)
3,4-DMDPrSC	160- 161	0,80-1,04 (m, 6 H), 1,46-1,76 (m, 4 H), 3,80 (s, 3 H, OCH ₃), 3,84 (s, 3 H, OCH ₃), 3,78-3,90 (m, 2 H), 3,82-4,11 (m, 2 H), 4,04 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,00 (d, 1 H, J=8 Hz), 7,16-7,46 (m, 2 H), 7,42 (s, 1 H), 7,52 (m, 1 H, J=16 Hz)
3,5-DMDPrSC	161- 162	0,80-0,98 (m, 6 H), 1,48-1,84 (m, 4 H), 3,80 (s, 3 H, OCH ₃), 3,86 (s, 3 H, OCH ₃), 3,76-3,86 (m, 2 H), 3,94-4,09 (m, 2 H), 4,00 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 6,54-6,64 (m, 2 H), 7,14 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,72-7,94 (m, 2 H)

3-Jódfahéjsav. A molekulát az irodalomban ismert [79] eljárással állítottuk elő. Ennek megfelelően 3,86 g (0,02 mol) m-nitrofahéjsavhoz úgy adagoljuk 13,8 g (0,073 mol) ón-klorid 21 ml sósavval készített oldatát, hogy a reakcióelegy hőmérséklete 60°C alatt maradjon. A redukálás befejezése után (TLC-vizsgálat) a

reakcióelegyet lehűtjük, majd nátrium-nitrit-oldat fokozatos adagolásával – a reakcióelegy hőmérséklete 0°C alatt marad – diazotáljuk. Ezután a reakcióelegyhez vizes kálium-jodid oldatot adagolunk, majd a reakcióelegyet mindaddig óvatosan, gőzfürdőn melegítjük ameddig a nitrogéngáz-képződés befejeződik. A reakció során képződött jódot kénsavoldattal redukáljuk, majd a nyers jódfahéjsavat gőzdesztillációval választjuk el. A termék a gyűjtő edénybe kicsapódik, amit meleg, híg lúgos (NaOH) oldattal újra feloldunk, ezután hűtéssel hagyjuk kikristályosodni. A terméket etanolban átkristályosítjuk, így 3,24 g 3-jódfahéjsavat (op.: 181-182°C) kapunk (reakcióhozam: 59,1%). ¹H-NMR adatok: δ = 6,6 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,20 (t, 1 H, J=6 Hz), 7,5 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,7 (s, 1 H), 7,78 (s, 1 H), 8,12 (s, 1H) 12,5 (s, 1 H, OH).

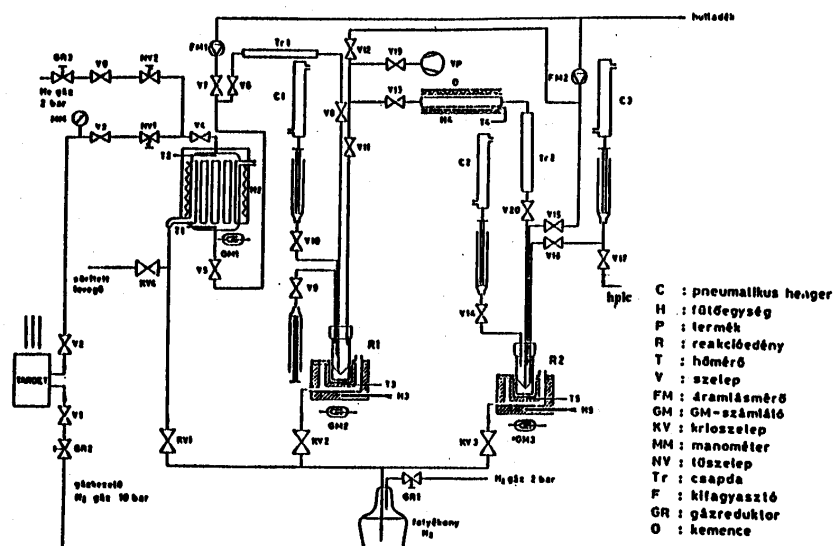
7-Metil-sztilixantin-származékok *DMSO-oldhatóság vizsgálata.* Az oldhatósági vizsgálatokhoz a vegyületből telített DMSO-oldatokat készítettünk, oly módon, hogy 2 mg vegyülethez 20 µl-nyi DMSO-adagokat adagoltunk mindaddig, ameddig áttetsző oldatot kaptunk. Az elegyet egymást követően rázógéppel 60 másodpercig, ultrahanggal 60 másodpercig, rázógéppel 180 másodpercig, ultrahanggal 60 másodpercig és végül rázógéppel 5 percig kevertük.

Radiokémiai szintézisek

[¹¹C]Széndioxid: a Debreceni Atommagkutató Intézet MGC 20E ciklotronjában [36], a ¹⁴N(p,α)¹¹C (¹¹C+O₂→¹¹CO₂) magreakcióval, 14,5 MeV energiájú protonnyalábbal és 1,3x10⁶ Pa nyomású targetgázból állítjuk elő (hozam 1,6-2,2 GBq/mA). Targetgázként „CO-mentes” nitrogéngázt (gyártó cég: Linde AG, Düsseldorf, Németország) használunk.

[¹¹C]Metiljodid. A kapott [¹¹C]CO₂-ot ismert módszerrel [88], LiAlH₄-gyel, [¹¹C]CH₃OH-lá redukáljuk, amit HI-dal reagáltatva [¹¹C]CH₃I képződik. Az így előállított [¹¹C]metiljodidot metilezési reakcióban használjuk tovább.

A radiokémiai szintézist teljesen automatizált rendszerben végezzük. Az Atommagkutató Intézetben működő automatizált [^{11}C]-metilező panel folyamatábrája a 4.1. ábrán látható [87].



4.1. ábra [^{11}C]-metilező panel folyamatábrája

Az automatizált rendszer két főegységből áll:

- az automatizált céltárgy (target) és gázkezelő rendszer; és
- az automatizált kémiai szintézisrendszer.

Az automatizált céltárgy és gázkezelő rendszer:

A targetfeltöltés a kémiai laboratóriumból történik távvezérléssel. A nyomásmérő mutatja a gázáramlás elindulását, illetve a feltöltés mértékét. A targetgáz-palack reduktorával történik a nyomás beállítása, mágneses szelepek biztosítják (a target ki- és bemenetén), hogy a felmelegedés miatt kitágult aktív gáz ne áramoljon ki besugárzás közben az összekötő csőrendszer felé. A target besugárzása a ciklotron egyik automatikus működtetésű

nyalábvégén történik, ahol a target hélium- és vízhűtése biztosítva van [51]. A besugárzás végén a szelepek nyitásával történik a radioaktivitás elvezetése a kémiai szintézis panelhez (35 m).

Az automatizált kémiai szintézisrendszer:

A targetból a [^{11}C]CO₂-gáz a kifagyasztóba áramlik 1000 ml/perc sebességgel (az áramlási sebesség állandó, mivel a N₂-vivőgáz állandóan pótlódik a N₂-gázpalackból). A [^{11}C]CO₂-gáz -160°C-on kifagy a vékony rozsdamentes acélkapillárisokon (20 db., 10 cm hosszú, 0,9 mm belső átmérőjű). Az aktivitás teljes kifagyasztása (3 perc) után a kifagyasztót felmelegítjük (40°C) és a [^{11}C]CO₂-gázt az R1-reakcióedénybe, előre beadagolt tetrahidrofurános LiAlH₄-oldatban nyeletjük el [86]. A radioaktív gázokat hélium vivőgázzal áramoltatjuk.

Az elnyeletés hatásfokának növelésére az R1-reakcióedényt -10°C-ra hűtjük. Elnyeletés után az R1-reakcióedényt felmelegítjük, így a felesleges oldószert elpárologtatjuk. A foszforsav injektálása után a desztillálás biztosítására az R1 hőmérsékletét 160°C-ra emeljük. A keletkezett [^{11}C]CH₃OH-t 160°C-os HI/alumínium-oxid oszlopon [^{11}C]CH₃I-dá alakítjuk, majd átdestilláljuk a lehűtött (-20 °C) prekursor-oldattal töltött R2-reakcióedénybe. A lúgos oldat beinjektálása után az R2-reakcióedényt a megfelelő reakcióhőmérsékletre melegítjük. A készterméket pneumatika segítségével átvezetjük a tisztító preparatív HPLC-rendszerbe.

A szintézis hossza a besugárzás befejezésétől körülbelül 40 perc. Az előírt hőmérsékleteket hőmérsékletszabályozók (OMRON ESA) biztosítják. A kifagyasztóban, a reakcióedényekben valamint a termékgyűjtő edényben az aktivitás változását GM-csövek mérik, ami a számítógép monitorán folyamatosan megjelenik. Az adott oldószerek és reakciókomponensek beadagolása vezérelt pneumatikával történik.

Gázfázisú [^{11}C]CO₂ szintézis

A Debreceni PET Centrumban jelenleg a C11-metiljodid előállítására a fentiekben ismertetett módszer mellett egy másik módszert is kifejlesztettünk, melynek a kezdeti feladataiban én is részt vettem.

Intézetünk beszerzett egy GE gyártmányú (General Electric, USA) [^{11}C]metiljodid előállító berendezést, amely a hagyományos eljárás helyett gázfázisban állítja elő a metiljodidot, [^{11}C]metán és jód gőzök között magas hőmérsékleten lejátszódó reakcióban. Ezzel az eljárással egy előkészítés mellett több adag nagy specifikus aktivitású (1-50 Ci/ μmol) [^{11}C]metiljodid állítható elő. Az elérhető specifikus aktivitást a targetgáz széndioxid tartalma szabja meg. A nagy specifikus aktivitású [^{11}C]metiljodiddal a metilezési reakciók nagyobb hozammal játszódhatnak le, és - ami receptor ligandumoknál nagyon fontos - nagy specifikus aktivitású radiofarmakonokat lehet előállítani [68, 69].

(E)-8-(3-Klórsztiril)-1,3,7-[7- ^{11}C]trimetilxantin ([^{11}C]CSC). 1 mg CSX 0,4 ml dimetilformamiddal készített oldatához hozzáadagolunk 10 mg kálium-karbonátot. A kapott elegyet az automatizált metilező panelre helyezzük. A [^{11}C]metiljodid szintézise előtt a reakcióelegyet -20°C hőmérsékletre hűtjük, majd a kész [^{11}C]metiljodidot a hideg reakcióelegybe buborékolatjuk. Miután a radioaktivitás-detektor a maximális értéket mutatja, a reakcióedényt lezárjuk és a reakcióelegyet 60°C hőmérsékletre melegítjük, majd a kívánt hőmérséklet elérése után a reakcióelegyet 10 percen át hagyjuk reagálni. A kevertetést a [^{11}C]metiljodid reflux biztosítja. A reakció befejezése után a reakcióelegyet szobahőmérsékletre hűtjük, 25 μl , 4 mol/l-es sósavoldattal semlegesítjük, majd a végterméket preparatív HPLC-módszerrel elválasztjuk. Futtatószerként acetonitril : víz 70:30 térfogatarányú oldószerkeletet használunk. A futtatószer áramlási sebessége 4 ml/min. Az oszlopról az *(E)-8-(3-klórsztiril)-1,3-dimetilxantin* az 5,5-6,5 perc közötti frakcióban, míg a [^{11}C]CSC 8,5-9,5 perc közötti frakcióban távozik.

A [^{11}C]CSC-t tartalmazó frakciót rotációs desztilláló készülékben szárazra pároljuk. A terméket 200 μl dimetilszulfoxiddal felvesszük, majd 1 ml-re izotóniás oldattal (amely 10 % DMSO-t és 10 % etanolt tartalmazó izotóniás sóoldat) kiegészítjük. A kapott oldatot 0,22 μm szűrőn keresztül szűrjük, majd analitikai HPLC-vizsgálatra mintát veszünk. Az analitikai HPLC-módszerben futtatásként acetonitril:víz 7:3 arányú oldószerkeletet használunk, melynek áramlási sebessége 1 ml/min.

1,3-Dialkil-7-[^{11}C]metil-sztirilxantin-származékok. 1 mg prekuzort oldunk 0,4 - 1 ml dimetilformamidban. Az *E-Z* izomerizáció elkerülésére a műveleteket fénymentes körülmények között végezzük el. Az oldathoz 10 mg káliumkarbonátot mérünk, majd az így kapott elegyet a [^{11}C]metiljodid szintézis előtt az automatizált radiokémiai panelba helyezzük. A hőmérséklet-szabályzó segítségével a fenti reakcióelegyet -20°C -ra hűtjük, majd a kész [^{11}C]metiljodidot belebuborékolatjuk. Ezután a lezárt reakcióedényt 70°C -ra melegítjük. Miután a reakcióelegy elérte a kívánt hőmérsékletet, a reakcióelegyet 10 percen át hagyjuk reagálni. A kevertetést a [^{11}C]metiljodid reflux biztosítja. A szintézis végén a reakcióelegyet 25 μl , 4 mol/l-es sósavoldattal semlegesítjük, majd a terméket a fenti analitikai HPLC-rendszerrel azonosítjuk. A radioaktív vegyület R_t -értékét az előzőekben meghatározott inaktív anyagok R_t -értékeinek segítségével azonosítjuk.

[^{18}F]Fluoridion. A [^{18}F]-izotópot $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ nukleáris reakció útján, 14,5 MeV energiájú, 10 μA intenzitású protonnyalábbal, [^{18}F]fluoridion formájában állítjuk elő. Az optimális besugárzási idő 60 perc. A ciklotronban targetanyagként [^{18}O]-izotópra 98%-ig dúsított vizet (gyártó cég: Campro Scientific, Hollandia) alkalmazunk. A saját fejlesztésű kónuszos targetkamrát KO36 rozsdamentes acélból alakítottuk ki. A vákuum és a hűtő hélium között 11 μm -es Duratherm, a targetanyag és a hűtő hélium között 18 μm -es titán fóliát alkalmazunk. A targetkamra teljes térfogata 2,2 ml [70].

A vizes közegben keletkező fluoridion vízmentesítését a módosított Hamacher-féle módszer [28] szerint hajtjuk végre [96]. A targetanyagot DOWEX 1X8 (gyártó cég: Biorad, USA) anioncserélő gyantán keresztül áramoltatjuk, így a gyantán megkötődő [^{18}F]fluoridiont elválasztjuk a [^{18}O]víztől, amelyet desztillálás után újrahasznosítunk. A teljes aktivitás megkötése után a [^{18}F]fluoridiont K_2CO_3 -oldattal lemossuk a gyantáról, és az oldatot a Kryptofix2.2.2. acetitrilrel készített oldatát tartalmazó reakcióedénybe vezetjük. Az így képződött [(Kryptofix2.2.2.) K^+ - ^{18}F] F^- komplexet azeotróp desztillációval (80°C) szárazra pároljuk. Az azeotróp desztillációt, háromszor 3 ml acetitril adagolása után háromszor megismételjük. Az így komplexben lévő [^{18}F]fluoridion készen áll a nukleofil szubsztitúcióra. Az anyagokat hélium vivógázzal áramoltatjuk.

[^{18}F]FDG előállítására prekurzorként 1,3,4,6-O-tetraacetyl-2-trifluorometánszulfonsav-mannózt (TATM) használunk. A TATM vízmentes acetitrilrel készített oldatát bevezetjük a reakcióedénybe. A reakcióedényt lezárjuk és a reakcióelegyet 80°C hőmérsékleten, 10 percig refluxáljuk. A reakció befejezése után a 2- ^{18}F fluor-1,3,4,6-O-tetraacetyl-2-dezoxi- β -glukózt tartalmazó reakcióelegyet C-18 töltésű SepPak (gyártó cég: Millipore, USA) tisztítóoszlopokra visszük, ahol a terméket desztillált vízzel történő mosással elválasztjuk a maradék kiindulási anyagoktól (így a mérgező Kryptofix2.2.2.-től is). Az acetilezett ^{18}F -jelzett glükóz-származékot tetrahidrofuránnal visszamoszuk a reakcióedénybe, a THF-et elpárologtatjuk, majd 2 mol/l-es sósav adagolásával az acetyl-védőcsoportokat 120°C -on történő refluxálással lehasítjuk. Ezután a képződött [^{18}F]FDG-terméket tartalmazó reakcióelegyet AG11-A8 (gyártó cég: Biorad, USA) ioncserélő gyantán semlegesítjük, majd egy C-18-as és egy Al_2O_3 töltésű SepPak (gyártó cég: Millipore, USA) oszloprendszeren tisztítjuk. A neutralizáló oszlopról lefolyó, 7-es pH-jú oldatból az apoláros melléktermékek (részlegesen hidrolizált termékek) a C-18-as tölteten, míg a szabad [^{18}F] ionok az Al_2O_3 tölteten kötődnek meg. Amikor a SepPak oszloprendszer melletti detektor elérte a megfelelő értéket a három utas szelep átvált és a terméket a $0,22\ \mu\text{m}$ -es szűrőn

(gyártó cég: Millipore, USA) keresztül átengedi az előkészített, izotonicitás biztosítására megfelelő mennyiségű NaCl-dot tartalmazó steril ampullába. A termék tisztaságát radio-HPLC-, valamint radio-TLC-módszerekkel ellenőrizzük.

Biológiai vizsgálatok

A sejtenyésztés során és a kísérletekben alkalmazott vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich (Gillingham, Nagy-Britannia) cégtől szereztük be. Az adozinreceptor-ligandumokat (ZM 241385, CGS 21680, CPA, DPCPX) a TOCRIS (USA) cégtől rendeltük. A receptorligandumokból etanolban vagy dimetilszulfoxidban készítettünk törzsoldatokat. A kezelések során az oldószerként adott etanol vagy dimetilszulfoxid koncentrációja 1% alatt maradt, és minden esetben ellenőriztük, hogy az oldószer nem befolyásolja-e a vizsgált paramétert. A vegyszerek analitikai és spektroszkópiai tisztaságúak voltak. A fiziológiás sóoldat (PBS) összetétele: 140 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 8 mmol/l Na_2HPO_4 , 3 mmol/l NaH_2PO_4 ; pH=7,3.

Kontraktilitási paraméterek meghatározása elektromosan ingerelt szívizom-preparátumokon

A szívizom kontraktilitás vizsgálatot 310-470 g testtömegű hím, illetve nőstény tengerimalacokból nyert, bal pitvari preparátumokon végeztük el. Az állatokat tarkócsapással tettük eszméletlenné, majd a mellkas feltárása után a szíveket gyorsan eltávolítottuk és szobahőmérsékletű Krebs-oldatba helyeztük. A preparálókádban oxigénezett Krebs-oldatban a bal pitvarokat leválasztottuk a környező szövetekről, végeikre kapillaritásmentes vékony fonalat rögzítettünk, majd a preparátumokat nagyérzékenységű termosztálási kontroll mellett (THSZ-01, Experimetria, Budapest) 20 ml űrtartalmú, vertikális kiképzésű szervfürdő rendszerben (TSZ-01, Experimetria, Budapest) függesztettük fel. Szervfürdőként 37°C-os normál Krebs-oldatot alkalmaztunk, amelynek összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl

(118), KCl (4,7), CaCl₂ (2,5), NaH₂PO₄ (1,0), MgCl₂ (1,3), NaHCO₃ (24,9) és glukóz (11,5). A tápoldatot 95% O₂ és 5% CO₂ elegyével oxigéneztük az ekvilibrációs periódus folyamán, ezáltal az oldat pH-ja 7,4-re állt be. A preparátumok egyik végét rozsdamentes acélhoroghoz, a másik végét izometriás mechanoelektromos átalakító (SG-01 D, Experimetria, Budapest) érzékelőjéhez rögzítettük. A nyugalmi tenziót mikromanipulátor segítségével úgy állítottuk be, hogy maximális kontrakciót kapjunk. Az ingerlést pontszerűen kiképzett platina elektródokon keresztül programozható elektrostimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) végeztük. Az ingerlési alapfrekvencia 3 Hz volt. Az ingerlést 1 ms impulzusszélesség mellett kétszeres küszöb feszültséggel végeztük. A kontrakciókkal arányos elektromos jeleket kétsugaras oszcilloszkóp (EMG-1555, Type TR-465, Budapest; EMG-1533, Type TR-4657, EMG, Budapest, EO 213, RFT, Dresden) bemeneteire vittük rá, illetve azokat 6 csatornás poligráfon (BR-61, Medicor, Budapest) rögzítettük.

A preparátumokat 40-60 percen keresztül inkubáltuk normál Krebs-oldatban, mialatt a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A vegyületeket ebben az egyensúlyi állapotban alkalmaztuk. A dózishatás görbék felvételét Van Rossum kumulatív módszere szerint végeztük.

A myocardiális A₁-adenozinreceptor-antagonista hatás vizsgálatára mindenekelőtt specifikus A₁-adenozinreceptor-agonistával, a CPA-val, kumulatív dózishatásgörbét vettünk fel, majd a vegyület kimosása után a dózishatásgörbe felvételét megismételtük a feltételezett antagonist vegyületek (CSC, ISC, stb.) jelenlétében. Az antagonist vegyületekkel 45 percig inkubáltuk a pitvarkészítményeket.

Az antagonist hatásra jellemző pA₂-értékeket Arunlakshana és Schild [2] módszerével határoztuk meg.

Izolált tengerimalac pulmonális artéria preparátumok

A tengerimalacok mellkasát tarkócsapás, és az egyik oldali artéria carotis átvágása után megnyitottuk, majd a szívet az aortaívvel és a tüdőgyökkel együtt gondosan kimetszettük és oxigénezett, szobahőmérsékletű Krebs-oldatba helyeztük. A tüdőartéria fő törzsének leválasztását szobahőmérsékletű Krebs-oldatban, speciálisan kiképzett, oxigénező preparálókádban végeztük. Az endothelréteg sérülésének elkerülése érdekében a tengerimalacok esetén a preparálást a lehető legnagyobb gondossággal végeztük. Az pulmonális artériából kb. 2 mm széles gyűrűpreparátumot készítettünk, amelyet kettévágtunk, két végére kapillaritásmentes fonalat rögzítettünk és 20 ml űrtartalmú, kettősfalú, vertikális elrendezésű, 37°C-on termosztált szervkádban függesztettük fel. A szervfürdőként használt, hagyományos összetételű Krebs-oldatot 0,1 mmol/l aszkorbinsavval és 30 μ mol/l Na₂-EDTA-val egészítettük ki. A tápoldatot 95% O₂ és 5% CO₂ gázkeverékkel oxigénezettük, ezáltal az oldat átlagosan 7,4 pH értéket vett fel. A preparátum egyik végét rozsdamentes acélhoroghoz, a másik végét izometriás mechanoelektromos átalakító (SG-O1D, Experimetria, Budapest) érzékelőjéhez rögzítettük. A nyugalmi tenziót mikromanipulátor segítségével állítottuk be (10 mN előfeszítés). A mechanikai változások elektromos megfelelőit egycsatornás kompenzográfyon regisztráltuk (OH-850, Radelkis, Budapest).

Tengerimalacok pulmonális artériáján 1 μ mol/l noradrenalin (a maximális noradrenalin-hatás 40-70%-át létrehozó koncentráció) aktív tónust váltottunk ki, és a tenzió stabilizálódása után alkalmaztuk a megfelelő adozin-származékokat. Az A_{2B}-adenozinreceptor-hatás vizsgálatára a preparátumokat 0,3 μ mol/l DPCPX-szel kezeltük elő, ami után a NECA (nem-szelektív A₁/A₂-adenozinreceptor-agonista) A_{2B}-receptor-mediált gyors relaxációt hozott létre. A NECA-val a tengerimalac ereken úgynevezett non-kumulatív dózishatásgörbéket vettünk fel, azaz a purinhatás lezajlása után a preparátumokat többször átmostuk, majd a "steady state" állapot beállása után adtuk be a következő adagot.

A non-kumulatív dózishatásgörbe felvétele után a preparátumokat a 7-metil-sztilirixantinvegyületek megfelelő koncentrációja mellett inkubáltuk, majd ismételten non-kumulatív NECA-koncentráció-hatásgörbéket vettünk fel. A meghatározott anti-CSC, anti-ISC, stb. pA₂-értékek a pitvari myocardiumon leírtakkal voltak megegyezők.

Patkány pulmonális artéria

A kísérletek menete az előbbiekkal volt megegyező, azzal a különbséggel, hogy itt lehetőségünk volt a kumulatív dózishatásgörbe felvételére. A dózishatásgörbe felvételéhez szelektív A_{2A}-adenozinreceptor-agonista CGS 21680-at használtunk, majd a hatás kimosása után a 7-metil-sztilirixantinszármazékok valamelyikével megfelelő koncentráció mellett 45 perces inkubációt végeztünk, és a dózishatásgörbét ennek jelenlétében ismételten felvettük.

Statisztikai értékelés

A dózishatásgörbéket non-lineáris regressziós analízis segítségével elemeztük az alábbi képlet alapján:

$$E = E_{\max} [A]^s / [EC_{50}]^s + [A]^s, \text{ ahol}$$

az E_{\max} a maximális hatást, az EC_{50} (tíztes alapú negatív logaritmusa: pD_2) az $[A]$ félmaksimalis, effektív koncentrációját, az s pedig a görbe meredekségét jelenti ("midpoint slope parameter").

A számszerű eredmények közlésekor mindig a számtani átlagot és a középérték standard hibáját vagy az átlagot és a 95%-os konfidencia limitet adtuk meg. Az észlelt változások statisztikai szignifikanciáját Student-féle kétmintás, illetve önkontrollos kísérletek esetén a páros t-próbával vizsgáltuk. Az antagonistahatás erősségét meghatározó pA₂-értékeket a különböző antagonistakonzentrációk jelenlétében és anélkül felvett dózishatásgörbék EC₅₀-értékeinek felhasználásával Arunlakshana és Schild [2] klasszikus módszerével

határoztuk meg. A pA₂-érték annak az antagonistakonzentrációnak a negatív logaritmus, amelynek jelenlétében ugyanolyan mértékű funkcionális válasz eléréséhez kétszer nagyobb agonista-konzentráció szükséges.

Autoradiográfiás (ARG) vizsgálat

Az állatkísérleteket a DE OEC Állatkíméleti Tudományetikai Bizottsága által engedélyezett protokoll szerint végeztük. Az in situ vizsgálatokhoz az egereket (Swiss) i.v. injektáltuk 200-400 μCi fiziológiás sóban oldott, jelzett farmakonnal egyedül (0,5-5 nmol), illetve jelzetlen ligandummal együtt (1 μmol). 30 perces expozíciós idő után az állatokat leöltük, a szívet és az agyat fagyasztómikrotommal megmetsztük (200 mikronos szeletek), és a szeletek radioaktivitás-eloszlásának térképét Phosphor Imager scannerrel (Molecular Dynamics) értékeltük ki. A metszett szeletekről elkészítettük a transzparencia scanner képeket is, így a transzmissziós és emissziós képek egymásravezítése az anatómiai lokalizálást nagymértékben elősegítette [64, 65].

Az in vitro ARG-vizsgálatokhoz egér agyszeletet használtunk és a metszeteket a felhasználásig -20°C -on tároltuk. A specifikus kötődést kompetíciós kísérletekben bizonyítottuk. A kontroll jelöléseknél a metszett agyszeleteket fiziológiás oldatban (pH = 7,2) inkubáltuk 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{11}C -el jelzett CSC-el. A párhuzamosan végzett, leszorításos kísérletekben az inkubáló oldat a jelzett CSC mellett 10 $\mu\text{mol/l}$ inaktív CSC-t is tartalmazott. Az inkubálási idő mindkét esetben 20 perc volt. Ezt követően a tárgylemezeket hideg fiziológiás oldattal háromszor mostuk. A metszeteket fosporimager lemezekre helyeztük és a ^{11}C -aktivitás-eloszlást 1 órás inkubálás után értékeltük a Phosphor Imager scannerrel.

^{11}C CSC specifikus kötődése DDT1 MF2 sejtvonalon:

A DDT1 MF2 simaizom transzformált sejtvonalat CO_2 -termosztátban 37°C -on tenyésztettük 5% CO_2 és 95% O_2

atmoszférában, Dulbecco tenyésztőoldatban, amelyet 2 mmol/l L-glutamin és 10 % borjúsérummal komplettáltunk.

A letapadt sejteket sejtkaparóval felszedtük, és PBS-ben mostuk. A sejteket 1 millió/ml koncentrációban 10 percig előinkubáltuk a receptorligandumokkal szobahőmérsékleten, majd 20 $\mu\text{Ci/ml}$ koncentrációban mindegyik mintához hozzáadtuk a $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -et és további 20 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket sejtseparálón (SKATRON Cell Harvester, 11019) elválasztottuk, és a $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ akkumulációját hitelesített gammaszámlálóval mértük (Canberra-Packard). A radioaktivitás-koncentrációt cps (count/second) egységekben adtuk meg 1 millió sejtre vonatkoztatva.

A jelzett ligandum szervezetben belüli megoszlásának vizsgálata

A CSC szervezetben belüli megoszlását Swiss-egereken vizsgáltuk. Az elaltatott állatokba 120-200 $\mu\text{Ci/}$ 1,2-8 nmol (4,44-7,4 MBq) mennyiségű jelzett $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -radioligandumot injektáltunk intravénásan. Ezt követően az állatokat 10, 20, 40 és 60 perc inkubációs idő eltelté után leöltük, és a szerveket, szöveteket kireparáltuk. A minták tömegét és radioaktivitását megmértük. A vért eppendorf centrifugában 2 percig, 3000g sebességgel centrifugáltuk. A szöveti felvétel mértékét az úgynevezett DAR értékkel jellemeztük.

DAR=**Hiba!**

Dinamikus PET-vizsgálat

A nyulakat elaltattuk urethane (0,5 g/testtömeg kg) és alfa-chloralose (50 mg/testtömeg kg) i.p. injektálásával. Az egyik femorális artériát és femorális vénát kireparáltuk. Ezt követően az alvó nyulat egy speciális tartóeszközre helyeztük, ami lehetővé tette a nyúl fejének függőleges irányú rögzítését. A PET-vizsgálatokhoz 1-2 mCi/30-60 nmol $[^{11}\text{C}]\text{CSC}$ -farmakont injektáltunk intravénásan 2ml fiziológiás oldatban. A dinamikus PET-felvételeket GE 4096 típusú,

egésztest PET-kamerával végeztük. A dinamikus adatgyűjtés 40 percig tartott, ez idő alatt 28 frame-t készítettünk.

Az adatgyűjtési ciklusok időtartama

Frame N°	Idő (mp)	Frame N°	Idő (mp)	Frame N°	Idő (mp)	Frame N°	Idő (mp)
1	15	8	15	15	30	22	180
2	15	9	30	16	30	23	180
3	15	10	30	17	60	24	180
4	15	11	30	18	60	25	180
5	15	12	30	19	60	26	300
6	15	13	30	20	60	27	300
7	15	14	30	21	180	28	300

Az állatot úgy helyeztük a PET-kamera látómezőjébe (detektorgyűrűjébe), hogy az állat testének hossz tengelye párhuzamos volt a detektorgyűrűk síkjával. Az így készített, 15 db szagittális szelet nagyjából magában foglalta a nyúl egész tömegét. A PET-felvétel ideje alatt heparinozott fecskendővel mintegy 20 artériás vérmintát gyűjtöttünk. A vért eppendorf centrifugában 3 percen át 2000 g sebességgel centrifugáltuk és kalibrált gammaszámlálóval meghatároztuk a plazmában, illetve az üledékben (sejtes közeg) lévő, radioaktív koncentrációt (gyártó cég: Canberra-Packard). A szöveti elnyelődés korigálására ⁶⁸Ge-izotópot tartalmazó, külső sugárforrással transzmissziós felvételt készítettünk. A szervekre helyezett ROI-k alapján kijelölt térfogatokban meghatároztuk az egyes szervek [¹¹C]CSC-t akkumuláló kinetikáját (TACT-görbék, time activity curve).

Az [¹⁸F]FDG-PET-vizsgálatoknál a nyulakat az előbbieken ismertett eljárások szerint készítettük elő. Az állatokba 1-3 mCi jelzett [¹⁸F]FDG-et injektáltunk intravénásan, és az injektálás pillanatától monitoroztuk az [¹⁸F]FDG szervezeten belüli eloszlását a PET-kamera alatt, 60 percig.

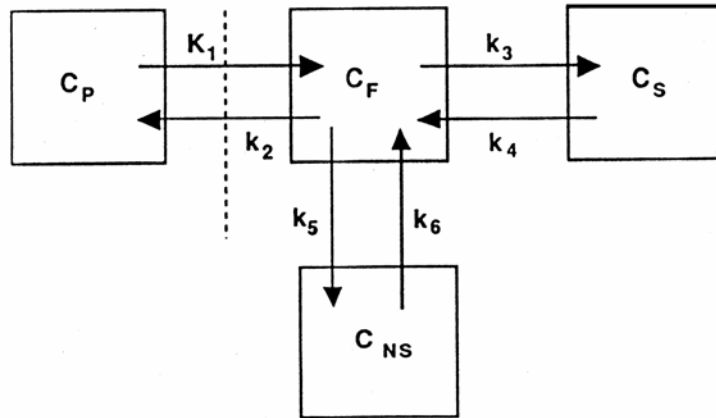
Adatfeldolgozás

Az adatfeldolgozás során a vérminták alapján úgynevezett véraktivitás-időgörbét, az elsődleges PET-adatokból rekonstruált képeket, a rekonstruált képekből az analízishez szükséges adatokat nyertük.

A kamera által gyűjtött, elsődleges PET-adatokból a megfelelő képeket számítógépes program segítségével rekonstruáltuk. A rekonstrukció eredménye 28, egyenként 15 (8 direkt, 7 indirekt) képsíkot (slice) tartalmazó adathalmaz (frame). A rekonstrukció folyamán korrekciót végeztünk a szöveti gyengítésre, a véletlen koincidenziákra, a szóródásra és a kamera holtidejéből származó adatvesztésekre. Egy framen belül, a különböző képsíkokban kijelölhetők a vizsgálat szempontjából kitüntetett területek. Így úgynevezett ROI-ok jelölhetőek ki az egyes szervekre (szív, tüdő, agy, vese, máj, stb). Az azonos szervekhez tartozó, különböző képsíkokban definiált ROI-ok összekapcsolhatók, ezáltal úgy nevezett VOI-okhoz jutunk. Az így létrehozott VOI-ok egy olyan térbeli struktúrát jelölnek, amelynek az aktivitása az alkalmazott radiofarmakonnak egy-egy adott szervben való felhalmozódását jellemzi. Az egyes VOI-ok radioaktivitás-koncentrációja megfelelő programokkal kiszámolható. A különböző frame-ekben az azonos VOI-ok radioaktivitás-koncentrációjának idő szerinti változása a tracer molekulának az egyes szöveti régiókban való felhalmozódásának kinetikáját szemlélteti. Ezeket a görbéket úgynevezett (time activity curve) TACT-görbéknek hívják, és azokat a további analízisek (például kompartmentanalízis) során használjuk.

Négykompartmentes farmakokinetikai modell

A receptor-ligandumok szervezeten belüli egyensúlyi megoszlásának tanulmányozására alkalmazott legáltalánosabb modell a négykompartmentes modell, melynek vázlatát a 4.2. ábrán mutatjuk be [52].



4.2. ábra A négykompartmentes modell vázlata

A modell kompartmentjei: a vérplazma (itt a ligandum szabad, kötetlen formában van jelen, koncentrációja C_P), illetve három szöveti kompartment. E három szöveti kompartmentben a ligandum szabad (C_F), specifikus (C_S), illetve nonspecifikus (C_{NS}) módon kötött formában van jelen. Itt a C_P , C_F , C_S illetve C_{NS} a megfelelő kompartmentekre utalnak, ugyanakkor ezen kompartmentekben mért ligandumkoncentrációt is jelölik. A $k_1 \dots k_6$ paraméterek a radiofarmakonok a kompartmentek közötti transzportjára vonatkozó sebességi állandókat jelölik.

A kompartment-analízis során az időfüggő véraktivitás-görbét, valamint a szöveti (TACT) görbét használjuk fel. Utóbbiakat akár adott anatómiai struktúráknak megfelelő szöveti régiókra, akár a PET-kép minden képelemére meg lehet határozni. A számítások során a kinetikai és egyéb állandók numerikus értékének számítása egy speciális iteratív, nemlineáris regresszió-számítás alapján történik. Kiindulásként kezdő értékeket rendelünk a keresett állandókhöz. Ezeknek a segítségével a kísérletileg nyert vérgörbéből a modell működését leíró reakció-kinetikai egyenletek felhasználásával kiszámítjuk a kezdő értékekhez tartozó szöveti aktivitás-görbe alakját. Az így kapott és a kísérletileg nyert TACT-görbék eltérését (hibafüggvény) kell egy iterációs algoritmus ismételt

alkalmazásával minimalizálni ahhoz, hogy a modell-paramétereknek a valós helyzetet legjobban leíró értékeit meg lehessen határozni. A számítások során leggyakrabban χ^2 típusú vagy a $\Sigma(Y_{mért} - Y_{számolt})^2$ úgynevezett RSS (residual sum of squares) hibafüggvényt szokás választani. Az igen nagy volumenű számítások kivitelezéséhez legáltalánosabban használt, nagyteljesítményű program a MATLAB szoftvercsomag.

5. Összefoglalás

Dolgozatomban tíz, ^{13}C -jelzett A_2 -antagonista típusú adenzinreceptor specificitással rendelkező koffeinszármazék szintéziséről, valamint ezek egyikével elvégzett biológiai kísérletek eredményeiről számolok be.

A megfelelő sztirilxantin-prekurzorokat és az inaktív 7-metilsztirilxantin-származékokat az irodalomból ismert módszerekkel állítottuk elő. A szintézis első lépésében a kiindulási karbamidszármazékot ciánecetsavval kondenzáltuk, a köztiterméket alkális közegben ciklizáltuk, nitrozáltuk, majd a nitrozocsoportot redukáltuk, így előállítottuk az 1,3-dialkil-5,6-diamino-uracil vázat. Ezután a kapott uracilszármazékot különböző transz-fahéjsavakkal acileztük, majd a kapott amidouracilt bázikus körülmények között ciklizáltuk, így előállítottuk a megfelelő prekurzormolekulákat. Ezek után megvalósítottuk a megfelelő koffein-származékká történő metilezésüket is. Az előállított vegyületek szerkezetét NMR- és MS-vizsgálatokkal igazoltuk és a tisztaságukat olvadáspont mérésekkel, HPLC- és TLC-eljárásokkal ellenőriztük. Az előállított prekurzorok, valamint inaktív teszt vegyületek között két új vegyületet, nevezetesen az (*E*)-1,3-dimetil-8-(3-jódsztiril)-xantint (ISX) és (*E*)-8-(3-jódsztiril)-1,3,7-trimetilxantint (ISC) is előállítottunk.

Az új jódsztirilkoffein előállításához alkalmazott 3-jódfahéjsavat az irodalomban ismert eljárással, m-nitrofahéjsavból állítottuk elő. A kapott jódfahéjsavat a fenti módszer szerint 5,6-diamino-uracillal reagáltattuk.

A 7-dezmetil-aminbázisok (prekurzorok) ^{13}C -izotóppal történő N-metilezése automatizált panelen történt. A jelölő izotópot hordozó [^{13}C]metilcsoport beépítésének módszerét a CSC molekulára dolgoztuk ki, amely irodalmi adatok alapján a legígéretesebb receptorligandumnak tűnt. A reakcióhozamot a megfelelő savmegkötő kiválasztásával, valamint a hőmérséklet és a reakcióidő

megfelelő beállításával optimalizáltuk. A szintézis rendszert teszteltük, a hibaforrásokat kiszűrtük. A termék azonosítására és elválasztására analitikai és preparatív HPLC-módszereket dolgoztunk ki.

A [^{13}C]CSC előállítását DMF-ben, kálium- vagy cézium-karbonát jelenlétében, 60°C-on és 10 perces reakció idő mellett valósítottuk meg. A reakció jó hozamokkal ment végbe. A végterméket saját kifejlesztésű preparatív HPLC-módszerrel (fordított fázisú preparatív oszlop, futtatószer víz:acetonitril 7:3 oldószerkelet) választottuk el. A kiindulási [^{13}C]CO₂-ra számolva az átlagos, bomlásra korrigált hozam 30 % volt, így a szintézis végén átlagosan 904 MBq (24,5 mCi) [^{13}C]-CSC-t termeltünk. A legjobb fajlagos aktivitás 9,1 TBq/μmol (246 mCi/μmol) volt. A szintézis hossza körülbelül 30 perc. Az analitikai HPLC-vizsgálat (fordított fázisú oszlop, futtatószer víz:acetonitril 7:3 oldószerkelet) után a végtermék tisztasága legalább 99% volt. A termékben nem találtunk prekuzort, a lehetséges szennyezés az *E-Z* izomerizációból származhat. A szintézis végén a tiszta [^{13}C]CSC-termék izotóniás oldatban van és a termék analitikai analízise után farmakológiai vizsgálatokra felhasználható.

A xantinszármazékok [^{13}C]metilezése kálium-karbonát jelenlétében, 70°C hőmérsékleten 10 perc reakcióidő alatt nagyon jó hozamokkal ment végbe: A [^{13}C]metilezés termékeit az előkalibrált, analitikai HPLC-rendszerbe épített radioaktivitás detektor segítségével azonosítottuk. Az elért specifikus aktivitás 1,85 és 5,55 MBq/μmol (50-150 mCi/μmol) között volt. A fénymentes körülményeknek köszönhetően a reakcióelegyben a fény hatására végbemenő [^{13}C]sztiril koffein-származékok *E-Z* izomerizációja minimális.

A kidolgozott automatikus rendszerrel 24 alkalommal [^{13}C]CSC és 27 alkalommal egyéb ^{13}C -jelzett koffein-származék előállítás történt. Az alábbi táblázatban a 7- ^{13}C metil-sztirilxantinok

előállításának radiokémiai hozamait mutatjuk be. A bemutatott eredmények 3-5, egymástól független szintézis átlagértékei.

Prekurzor	Termék	Radiokémiai hozam* %
SX	SC	62±3
CSX	CSC	67±4
ISX	ISC	90±4
NSX	NSC	51±5
3,4-DMSX	3,4-DMSC	93±4
3,5-DMSX	3,5-DMSC	89±5
TMSX	TMSC	68±5
NSPrX	NSPrC	35±4
3,4-DMDPrSX	3,4-DMDPrSC	72±5
3,5-DMDPrSX	3,5-DMDPrSC	89±5

*a szintézis végén, a kiindulási [¹¹C]metiljodidra számolva

Farmakológiai vizsgálatokat végeztünk pitvari myocardium, tengerimalac pulmonális artéria és patkány pulmonális artéria preparátumokon CSC-vel, 3,5-DMSC-vel, 3,4,5-TMSC-vel, valamint az új ISC-vel. A Schild-féle regressziós analízissel kapott pA₂-értékek szerint a CSC esetében az A_{2A}-szelektivitás, főleg az A_{2A}/A_{2B}-szelektivitás mutatkozott jelentősnek. A 3,5-DMSC és a 3,4,5-TMSC szintén szelektívek, de nem érik el a CSC hatását. Az ISC figyelemre méltó, igen erős A_{2A}-szelektivitással rendelkezik és nagyon gyengén hat az A_{2B}- és A₁-receptorokra.

A kiválasztott [¹¹C]CSC molekula biológiai hatását PET-mérésekkel, szervmegoszlás és autoradiográfiás vizsgálatokkal tanulmányoztuk egereken és nyulakon. A ligandumkötődés specificitását kompetíciós, vagy leszorításos módszerekkel teszteltük. Egéragy szeleteken, *in vitro* autoradiográfiás módszerrel kimutattuk a jelzett és az inaktív CSC közötti kompetíciót. A DDT1 MF2 sejteken végzett, kompetíciós kísérletek szerint a [¹¹C]CSC jelenlétében mért ligandumkötődés csökkent, ha az inkubációs elegyben inaktív CSC is volt. A nyulakon végzett, dinamikus, *in vivo* PET-vizsgálataink szerint az agyhoz kötődő [¹¹C]CSC mértéke fokozatosan csökkent,

amennyiben az állatokba párhuzamosan növekvő koncentrációban inaktív CSC-t injektáltunk.

Az egér agyszeletekről és szívseletekről készített autoradiográfias képek alátámasztják az A_{2A} -adenozinreceptorok feltételezett specifikus térbeli eloszlását. Az egér szervmegoszlás vizsgálatok azt mutatták, hogy az intravénás injekciót követően 10 perccel az akkumuláció a tüdőben a legmagasabb, majd ezt követi a máj, vese, szív és az agy.

Dinamikus PET-vizsgálattal követtük nyomon a [^{11}C]CSC-ligandum-receptor kötődésének kinetikáját. A PET-felvételeknek megfelelően, a farmakon injektálást követő első 15 másodperc alatt a radioaktivitás először a tüdőben jelenik meg, 1-2 perccel később a ligandum a vesékben, majd a májban halmozódik fel, és végül a hólyagban dúsul fel. A dinamikus PET-vizsgálatok során monitoroztuk a radiofarmakon szöveti felhalmozódását az egész állatban, továbbá artériás vérminták segítségével meghatároztuk a vérben lévő ligandumkoncentráció időbeli változását. A kapott eredményekkel meghatároztuk az egyes szervek és a vér [^{11}C]CSC-akkumuláció kinetikáját (aktivitás-koncentráció időbeli változása). Az így kapott eredményeket, négykompartmentes modell alkalmazásával felhasználtuk a receptor-ligandum kötődés kinetikáját leíró állandók numerikus értékeinek meghatározására.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a [^{11}C]CSC alkalmas radiofarmakon az élő szövetek és szervek P1 típusú adenzin-receptorok feltérképezésére és segítségével *in vivo* tanulmányozhatók a receptor-regulációs folyamatok.

A PhD. programban elért eredmények is hozzájárultak ahhoz, hogy a DEOEC PET Centrum Radiobiológiai munkacsoportjában az *in vivo* receptorkutatás alapjait megteremthettük. Az alkalmazott automatizált metilező technika, valamint a jelölt ligandumok vizsgálatára alkalmas biológiai modellek kialakítása és validálása alapját képezik a PET-el végzett *in vivo* receptorkutatás hazai alkalmazásának.

Production of some [¹¹C]-labelled caffeine derivatives as possible tracers for mapping adenosine A_{2A} receptors by PET

Summary

The role of adenosine in modulating the function of the cardiovascular, endocrine, and nervous system has been known for several decades [15]. Recently the adenosine/P₁ purinoceptors were classified into four subtypes: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors [46]. The subtype A_{2A} receptors are localised mainly in brain, their highest expression was found in the striatum, nucleus accumbens and tuberculum olfactorium, whereas the A_{2A} receptors showed wide distribution, with high expression in the gastrointestinal tract. Ligands having antagonist receptor effect are especially beneficial in promoting a more complete understanding of the role of different subtypes of receptors in physiological responses.

In vitro autoradiographic data indicate that some 8-styryl-caffeine derivatives are high affinity antagonists specific to A_{2a} type of adenosine receptors.

The goal of this work was to evaluate the reaction conditions in the synthesis of different (E)-8-styryl-7-[¹¹C]methyl-xanthine derivatives ([¹¹C]-caffeines) as possible tracers for adenosine receptor research using PET technique. An obvious route for radiolabelling of these compounds seems to be the N-methylation of the corresponding (E)-8-styryl-xanthine derivative using [¹¹C]-methyl iodide. Ten A_{2a} adenosine receptor specific (E)-8-styryl-7-[¹¹C]methyl-xanthine derivatives ([¹¹C]-caffeines) were synthesised by N-methylation of the corresponding (E)-8-styryl-xanthine derivatives using [¹¹C]-methyl iodide.

In vivo data indicate that 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) is a high affinity antagonist specific to A_{2a} type of adenosine receptors. The CSC is a selective ligand having higher affinity for A₂ receptors

($K_i=54$ nM) than for A_1 receptors ($K_i=28200$ nM). We chose (*E*)-8-(3-chloro-styryl)-1,3-dimethyl-7- $[^{11}\text{C}]$ methyl-xanthine ($[^{11}\text{C}]$ -CSC) for biological studies and present an evaluation of its potential as a tracer for mapping adenosine A_{2a} receptors by positron emission tomography (PET).

Materials

The inactive standard compounds, (*E*)-8-styryl-1,3,7-trimethylxanthine (SC); (*E*)-8-(3-chlorostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (CSC); (*E*)-8-(3-iodostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (ISC); (*E*)-8-(3-nitrostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (NSC); (*E*)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (3,4-DMSC); (*E*)-8-(3,5-dimethoxystyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (3,5-DMSC); (*E*)-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (TMSC); (*E*)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-methylxanthine (3,4-DMDPrSC); (*E*)-8-(3,5-dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-methylxanthine (3,5-DMPPrSC) and the corresponding precursor compounds: (*E*)-8-styryl-1,3-dimethylxanthine (SX); (*E*)-8-(3-chlorostyryl)-1,3-dimethylxanthine (CSX); (*E*)-8-(3-iodostyryl)-1,3-dimethylxanthine (ISX); (*E*)-8-(3-nitrostyryl)-1,3-dimethylxanthine (NSX); (*E*)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dimethylxanthine (3,4-DMSX); (*E*)-8-(3,5-dimethoxystyryl)-1,3-dimethylxanthine (3,5-DMSX); (*E*)-8-(3,4,5-trimethoxystyryl)-1,3-dimethylxanthine (TMSX); (*E*)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropylxanthine (3,4-DMDPrSX); (*E*)-8-(3,5-dimethoxystyryl)-1,3-dipropylxanthine (3,5-DMPPrSX) were prepared following a previously described general procedure [46], and were characterised by their physical data (mp., $^1\text{H-NMR}$, HPLC). Nuclear magnetic resonance spectra were taken on a Bruker WP 200 spectrometer (200 MHz) using Me_4Si as internal standard.

Being new compounds the structures of (*E*)-8-(3-iodostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (ISC) (mp. 226-227°C) and (*E*)-8-(3-iodostyryl)-1,3-dimethylxanthine (ISX) (mp. >360°C) were proved by their $^1\text{H-NMR}$ spectra:

Compound	¹ H-NMR data's
ISX	3,25 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 7,05 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,2 (t, 1 H, J=6 Hz), 7,55 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,60-7,88 (m, 2 H), 8,00 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N ₇ -H).
ISC	3,22 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 4,04 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,14-7,32 (m, 1 H) 7,41 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,56 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,72 (t, 2 H, J=6 Hz), 8,26 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N ₇ -H)

The 3-iodocinammic acid, used as intermediate in the above general procedure for synthesis of ISX, was prepared by reduction, diazotization, followed by iodination of m-nitrocinnamic acid [79].

[¹¹C]Methyl iodide

[¹¹C]CO₂ was produced on the MGC 20E cyclotron at the Institute of Nuclear Research, Debrecen by the ¹⁴N(p,α)¹¹C (¹¹C+O₂→¹¹CO₂) nuclear reaction, with 14.5 MeV proton beam and 1.3x10⁶ Pa target gas pressure (the yield was 1.6-2.2 GBq/μA). [¹¹C]-Methyl iodide was prepared using an automated synthesis system. The specific activity of a typical 100 mCi [¹¹C]CH₃I batch was in the range of 1-1.5 Ci/μmol at 20 min after EOB.

General procedure of [¹¹C]-methylation

To prevent *E*-to-*Z* isomerization of the (*E*)-xanthines during the radiosynthesis all procedures were carried out in amber glassware. The xanthine precursors dissolved in DMF (1 mg / 0.4 ml-1 ml) were methylated in the presence of 10 mg potassium carbonate at 70°C for 10 minutes. Afterwards the reaction mixture was neutralized with 25 μl 4M HCl, then was analysed by analytical HPLC on a LiChrosphere RP 18 (250-4) column (Merck Co., Darmstadt), using different aqueous acetonitrile mobile phase systems. The flow rate of the eluent was 1 ml/min, and the peaks were detected using UV detector (Waters Co., USA) at 290 nm, coupled in series with a radioactivity detector.

Results

The [¹¹C]methylation reaction proceeds with high radiochemical yield in the presence of potassium carbonate in 10 minutes at 70°C. Under these conditions only the desired N-[¹¹C]-methylation of the xanthine derivatives was observed. The components of the [¹¹C]-methylation reaction mixtures were identified by their Rt values, which were calibrated by the Rt value of the corresponding inactive standard taken prior to the measurement.

Precursor	Product	Radiochemical Yield* %
SX	SC	62±3
CSX	CSC	67±4
ISX	ISC	90±4
NSX	NSC	51±5
3,4-DMSX	3,4-DMSC	93±4
3,5-DMSX	3,5-DMSC	89±5
TMSX	TMSC	68±5
NSPrX	NSPrC	35±4
3,4-DMDPrSX	3,4-DMDPrSC	72±5
3,5-DMDPrSX	3,5-DMDPrSC	89±5

*EOS, calculated based on [¹¹C]methyl iodide

The process can be conducted with good (35-93%) radiochemical yield, calculated based on [¹¹C]methyl iodide. The specific activity was 1.85-5.55 GBq/μmol (50-150 mCi/μmol).

Synthesis of [¹¹C]CSC

Radiosynthesis of [¹¹C]CSC was carried out by the before mentioned method. (*E*)-8-(3-Chlorostyryl)-1,3,-dimethylxanthine in DMF (1mg/0.4 ml) was methylated in the presence of potassium carbonate or caesium carbonate at 60°C for 10 minutes. Afterwards the reaction mixture was neutralised with 25 ml 4mol/l HCl, and the solution was purified by preparative HPLC on a LiChrosphere RP 18 (250-10) column (Merck Co., Darmstadt), with CH₃CN:water 7:3 at a flow rate 4 ml/min and detected at 290 nm by UV detector (Waters Co., USA), coupled in series with a radioactivity detector. (*E*)-8-(3-

chlorostyryl)-1,3,-dimethylxanthine and [^{11}C]CSC were eluted in the range of 5.5-6.5min and 8.5-9.5 min, respectively. After vacuum distillation the end product was dissolved in 0.2 ml DMSO and diluted with 10% DMSO in isotonic saline which contains 10% ethanol (pH=5).

The final solution was identified by analytical HPLC system on a LiChrosphere RP 18 (250-4) column (Merck Co., Darmstadt), with 70% acetonitrile as eluent at a flow rate 1 ml/min detected on UV detector (Waters Co., USA) at 290 nm, coupled in series with a radioactivity detector. The retention times of (*E*)-8-(3-chlorostyryl)-1,3,-dimethylxanthine and [^{11}C]CSC were 3.0-3.5 and 4.9-5.6 min, respectively.

The decay-corrected radiochemical yield was 30% based on [^{11}C]methyl iodide. The best specific activity was 9.1 TBq/ μmol (246 mCi/ μmol). No precursor was observed in the end product, and radiochemical purity was >99%. The *E*-to-*Z* isomerization of [^{11}C]CSC in the final solution was not observed.

Pharmacological characterisation of the prepared caffeine

Contractility assays have been done with CSC, 3,5-DMSC, 3,4,5-TMSC and ISC by using ZM 241385 as standard non-xanthine A_{2A} receptor antagonist. The compounds were characterised, by the pA_2 Schild plot slope parameter, calculated using electrically driven guinea pig atrial myocardium (reported to possess both A_1 receptors), guinea pig pulmonary artery (reported to possess A_1 and A_{2B} receptors) and rat pulmonary artery (reported to possess A_{2A} receptors) tissues.

CSC showed a remarkable A_{2A} ($pA_2=6.49$), especially A_{2A}/A_{2B} (56) selectivity. Although 3,5-DMSC (6.58) and 3,4,5-TMSC (6.59) are A_{2A} selective compounds, their selectivity did not achieved the above effect of the CSC. A significant A_{2A}/A_1 (468) selectivity was showed by the ISC (7,67), which pA_2 value showed nearly the same

A_{2A} affinity like the nowadays known strongest A_{2A} inhibitor: ZM compound (pA₂=7,91).

Biological assay of [¹¹C]CSC

Competition experiments on DDT1 MF2 cells

Prepared, transformed (1 million/l) DDT1 MF2 muscular tissue cell lines were incubated at 37°C for 20 minutes with 20 µCi/ml [¹¹C]CSC. For displacement assays a 10 minute preincubation was performed with inactive CSC or ZM 241385 (known competitive antagonist). The cells were separated (SKATRON Cell Harvester, 11019), and the [¹¹C]CSC accumulation was registered by a calibrated gamma-counter (Canberra Packard). The radioactivity concentrations were expressed as cps (count per second)/ 1 million cell.

Autoradiography

In the autoradiography (ARG) studies storage phosphor screens (Molecular Dynamics) were used in combination with the PhosphorImager® scanner. The average thickness of the fresh brain and heart sections was 500 µm. The exposure times fell between 15-60 minutes. The resolution of the scanned ARG images was 200 µm/pixel.

For anatomic correspondence a transparency scanner (HP ScanJet 4c/T) was used to obtain the colour images of the sections. ARG and TS images were registered to fuse functional and anatomical information.

Biodistribution

Biodistribution of [¹¹C]CSC was studied on Swiss mice after i.v. injection of the ligand. Male Swiss mice were injected by [¹¹C]CSC [120-200 µCi (4.44 - 7.4 MBq) / 1.2-8 nmol] intravenously as a bolus. The animals were killed by cervical dislocation, dissected and various organs/tissues were removed at 10, 20, 40 and 60 minutes after the injection.

The radioactivity of the samples was measured, after precise weighting, by a calibrated gamma-counter. Plasma was obtained from blood by centrifugation (2min/3000g). Uptake values were expressed as Differential Absorption Ratios (DAR = cpm recovered/g tissue/cpm injected/body weight).

PET scanning

Rabbits were anaesthetised with i.p. urethane (0.5g / kg) and alpha-chloralose (50 mg/kg). One femoral artery and one femoral vein were cannulated. Serial arterial blood sampling was performed in all cases to allow kinetic analyses of [¹¹C]CSC accumulation.

Dynamic PET scans were carried out using GE 4096 whole body PET camera. The animals got 1-2 mCi/30-60 nmol [¹¹C]CSC in 2 ml physiologic salt solution intravenously as a 20-30 sec bolus. Transmission scans have been used to correct for tissue attenuation.

Based on the results of PET investigations and performing defined mathematical transformation we have modelled the kinetics of the [¹¹C]CSC accumulation. The methods demands the follow up of the [¹¹C]CSC concentration in the blood by taking blood samples and acquiring a dynamic set of images. These data allows to calculate the time course of blood activity (blood curve) and tissue activity within a defined region of interest (ROI TACT) as the two input functions of the kinetic tracer model calculation. The calculation results in a set of numerical data for kinetic constants $K_1, k_2, k_3, \dots, k_6$ which belong to the chosen ROI(s). For our calculations four compartment method [52], and "MATLAB" mathematical program was used.

Results

Competition experiments with the unlabeled ligand proved [¹¹C]CSC to bind specifically to the appropriate receptor. The measured bound [¹¹C]CSC decreased in the presence of inactive CSC or ZM 241385.

Foci of high CSC accumulation were clearly localised on the brain autoradiograms in several cases, with 15 minute post injection

slicing, and were in accord with previous findings on specific spatial distribution of A_{2a} adenosine receptors in the CNS.

The results of tissue distribution of [¹¹C]CSC in mice shows, that the highest uptake at 10 min after the injection was found in the lung followed by the liver, kidney, heart and brain. The kinetics of the accumulation of radioactive CSC was different in the various tissues. The very high uptake in the mice lung observed at 10 minutes after the injection gradually decreased in time. The brain uptake was almost the same as the heart uptake, and both showed a gradual decrease at later times (20, 40, and 60 min after the injection). The lowest radioactivity level was detected in the blood.

Dynamic PET studies on rabbits showed a fast brain uptake of CSC, reaching a maximum in less than 2 minutes.

Based on the four compartment method, using the blood curve and brain TACT curve obtained by dynamic PET images a set of numerical data for kinetic constants of the transport and binding of CSC in brain have been calculated.

Conclusion

Ten ¹¹C-labelled caffeine derivatives were prepared using [¹¹C]methyl iodide. Two new compounds, namely *E*-8-(3-iodostyryl)-1,3,7-trimethylxanthine (ISC) and (*E*)-8-(3-iodostyryl)-1,3-dimethylxanthine (ISX) were prepared. The [¹¹C]methylations can be conducted with high radiochemical yields, using an automated synthesis procedure. The radiochemical synthesis was optimised by choosing the best catalyst, and the adequate reaction time and temperature. New, automated separation (preparative HPLC) and identification (analytical HPLC) methods were developed.

The newly prepared ISC adenosine antagonist seems to possess remarkable A_{2A}/A₁ selectivity.

The described [¹¹C]-caffeines seem to be potential subjects of future biological characterisation in order to evaluate their affinity and

sensitivity for adenosine receptors of type A_{2a} in various tissues using PET-technique.

The ^{11}C -labeled selective adenosine A_{2a} antagonist [^{11}C]CSC was prepared using the above method. Based on the results of the animal studies, the [^{11}C]CSC seems to be a very promising radiopharmacone for mapping adenosine receptors of type A_{2a} in various tissues, especially in the CNS. It is also suitable to perform investigations concerning time-dependent receptor expression changes (up- and down-regulation).

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Joó Ferenc Professzor Úrnak, aki Debreceni Egyetem TTK Kémia doktori iskolájának Reakciókinetika és katalízis program vezetőjeként lehetővé tette számomra a PhD. kurzusban való részvételt és segítette a hároméves graduális képzésemet.

Köszönet illeti a DE Orvos és Egészségtudományi Centrum vezetőségét, hogy biztosította számomra a kutatási lehetőséget a PET Centrum radiokémiai laboratóriumában. Megköszönöm Dr. Trón Lajos Professzor Úrnak, aki a PET Centrum igazgatójaként lehetővé tette, hogy a PET Centrum kutatási programjába részt vehessek és biztosította számomra a mindennapi munkámhoz szükséges feltételeket.

Külön köszönöm témavezetőmnek, Dr. Márián Teréznek tudományos főmunkatársnak, hogy a kutatási programjában részt vehettem. A kísérleti munkáim során sok hasznos tanáccsal, tapasztalattal és információval látott el. Irányításával sikerült nemzetközileg is elfogadott eredményeket kapni.

Megköszönöm a PET Centrum és az ATOMKI munkatársainak az együttműködést a közös kísérletekben, a tanácsokat és az önzetlen segítséget. Külön köszönöm Dr. Horváth Gézának a szerves kémiában nyújtott segítséget, tanácsokat. Köszönöm az ATOMKI Radiokémia Laboratórium dolgozóinak, elsősorban Dr. Kovács Zoltánnak és Dr. Sarkadi Lászlónak, hogy lehetővé tették az automatizált panelen történő kísérleteket.

Köszönöm a PET Centrum és az ATOMKI asszisztenseinek, technikusainak és műszaki szakembereinek a szerves- és radiokémiai, biológiai, számítástechnikai segítségeiket. Köszönettel tartozom a Radiobiológiai munkacsoporttal együttműködő partnereinknek a hasznos együttműködésért, és tanácsaikért.

Irodalomjegyzék

1. Armstrong, S., Ganote, C., Cardiovascular Research, 1994, 28, 1049-1056.
2. Arunlakshana O., Schild, H. O., British J. Pharmacol, 1959, 14, 48-58.
3. Balkay L., Molnár T., Boros I., Lehel Sz., Galambos T., Quantification of FDG uptake using kinetic models. In Positron Emission Tomography: A Critical Assessment of Recent Trends, edited by Gulyás, B. and Müller-Gärtner, H.W., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 153-162, 1998.
4. Balwierczak J. L., Krulan C. M., Wang Z. C., Chen J., Jeng A. Z., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1989, 251(1), 279-87.
5. Biber K., Klotz K. N., Berger M., Gebicke-Harter P. J., van-Calker D., J. Neurosci., 1997, 17, 4956-64.
6. Blay J., White T. D., Hoskin D. W., Cancer Res., 1997, 57(13), 2602-2605.
7. Blicke F. F., Godt H. C., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2798-2800.
8. Bruns R. F., Lu G. H., Pugsley T. A., Mol. Pharmacol., 1986, 29, 331.
9. Buck A., Mulholland G. K., Papadopoulos S. M., Koeppe R. A., Frey K., J. Cereb. Blood. Flow Metab., 1996 16, 1280-1287.
10. Burnstock G., Overview (purinergic receptors). In role of adenosine and adenine nucleotides in biological system, edited by S. Imai and M. Nakazawa, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1991, 3-16.
11. Cai H., Batuman G., Puschett D., Puschett J., Life Sciences, 1994, 55(10), 839-845.
12. Collis M. G., Br. J. Pharmacol., 1983, 78, 207-212.
13. Comar D., Maziere M., Radiopharm. Lab. Comp., vol. 1 IAEA, Vienna 1974.

14. Crimi N., Polosa R., Mistretta A., *Allergy.*, 1997, 52(34 Suppl), 48-54.
15. Daly J. W., *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 197.
16. Drury A. N., Szent-Györgyi A., *J. Physiol. (London)* 1929, 68, 213.
17. Eckelman W. C., The testing of putative receptor binding radiotracers in vivo. In Diksic M., Reba R. C. editors. *Radiopharmaceuticals and brain pathology studied with PET and SPECT*. Boca raton, FL. CRC Press, 1991, 41-68.
18. Eckelman W. C., *Nucl.Med. Biol.*, 1994, 21, 759-769.
19. Feng D., Huang S. C., Wang X., *Int. J. Biomed. Comput.*, 1993, 32(2), 95-110.
20. Ferkany J. W., Valentine H. L., Stone G. A., Williams M., *Drug Dev. Res.*, 1986, 9, 85-93.
21. Ferrieri R. A., Wolf A. P., *Radiochimica Acta*, 1983, 34, 69.
22. Fishman A., Alpert N. M., Babich J., Rubin R., *Drug Metab. Rev.*, 1997, 29, 923-956.
23. Fredholm B. B., Abbracchio M. P., Burnstock G., Daly J. W., Harden T. K., Jacobson K. A., Leff P., Williams M., *Pharmacol. Rev.*, 1994, 46, 143-156.
24. Freissmuth M., Selzer E., Schutz W., *Biochem. J.*, 1991, 275, 651-656.
25. Gerwins P., Nordstedt C., Fredholm B. B., *Molec. Pharmacol.*, 1997, 38, 660-666.
26. Gulyás B., Müller-Gärtner H. W. (eds.), *Positron Emission Tomography: A Critical Assessment of Recent Trends*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
27. Halldin C., Farde L., Lundkvist L., Ito H., Ginovart N., Hall H., Nyberg S., Swahn C. G., Sedvall G., McCarron J.A., Pike V. W, Development of PET radioligands for the quantitation of serotonin receptors in the human brain. In *Positron Emission Tomography: A Critical Assessment of Recent Trends*, edited by

- Gulyás, B. and Müller-Gärtner, H.W., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 91-98, 1998.
28. Hamacher K., Coenen H. H., Stöcklin G., J. Nucl. Med., 1986, 27, 235.
 29. Herrero P., Markham, J., Shelton, M. E., Bergmann S. R., Circ. Res., 1992, 70(3), 496-507.
 30. Hirani E., Gillies J., Karasawa A., Shimada J., Kase H., Opacka-Juffry J., Osman S., Luthra S. K., Hume S. P., Brooks D. J., Synapse. 2001, 42(3), 164-76.
 31. Holschbach M., Schüller M., Appl. Radiat. Isot., 1993, 44, 779.
 32. Holschbach M., Schüller M., Appl. Radiat. Isot., 1993, 44, 897.
 33. Holschbach M., N.c.a. radiolabeled A1 adenosine receptor antagonists for PET and SPET, Forschungszentrum Jülich, 1997.
 34. Holschbach M. H., Fein T., Krummeich C., Lewis R. G., Wutz W., Schwabe U., Unterlugauer D., Olsson R. A., J. Med. Chem., 1998, 41, 555-563.
 35. Horváth G., szóbeli közlés, 1998.
 36. http://www.pet.dote.hu/Local_Information/Tech__Background/Cyclotron/cyclotron.html
 37. http://www.pet.dote.hu/Local_Information/Tech__Background/PET_Camera/pet_camera.html
 38. Ishiwata K., Furuta R., Shimada J., Ishii S., Endo K., Suzuki F., Senda M., Appl. Radiat. Isot., 1995, 46, 1009.
 39. Ishiwata K., Noguchi J., Toyama H., Sakiyama Y., Koike N., Ishii S., Oda K., Endo K., Suzuki F., Senda M. Appl. Radiat. Isot., 1996, 47, 507.
 40. Ishiwata K., Sakiyama Y., Sakiyama T., Shimada J., Toyama H., Oda K., Suzuki F., Senda M., Ann Nucl Med., 1997, 11(3), 219-25.

41. Ishiwata K., Noguchi J., Wakabayashi S., Shimada J., Ogi N., Nariai T., Tanaka A., Endo K., Suzuki F., Senda M., *J Nucl Med.*, 2000, 41(2), 345-54.
42. Ishiwata K., Ogi N., Shimada J., Nonaka H., Tanaka A., Suzuki F., Senda M., *Ann Nucl Med.* 2000, 14(2), 81-9.
43. Ishiwata K., Shimada J., Wang W. F., Harakawa H., Ishii S., Kiyosawa M., Suzuki F., Senda M., *Ann Nucl Med.*, 2000, 14(4), 247-53.
44. Jacobson K. A., Van Galen P. J., Williams M., *J. Med Chem.* 1992, 35, 407.
45. Jacobson K. A., Nikodijevic O., Padgett W. L., Gallo-Rodriguez C., Maillard M., Daly J. W., *FEBS-Lett.*, 1993, 323(1-2), 141-4.
46. Jacobson K. A., Gallo-Rodriguez C., Melman N., Fischer B., Maillard M., Van Bergen A., Van Galen P. J., Karton Y., *J. Med Chem.*, 1993, 36, 1333.
47. Jarvis M. F., Williams M., *Eur. J. Pharmacol.*, 1989, 168, 243.
48. Kafka S. H., Corbett R., *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 295(2-3), 147-154.
49. Klotz K-N., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2000 362, 382-391.
50. Koeppe R. A., Holthoff V. A., Frey, K. A., Kilbourn M. R., Kuhl D. E., *J. Cereb. Blood. Flow Metab.*, 1991, 11(5), 735-44.
51. Kovács Z., Sarkadi É, Andó L., *ATOMKI, Annual Report*, 1993 148.
52. Landaw E. M., Di Stefano J. J., *Am. J. Physiol.*, 1984, 246, R665-R667.
53. Langström B., Lundqvist H., *Appl. Radiat. Isot.*, 1976, 27. 357.
54. Lasley R., Mentzer Jr. R., *Cardiovascular Research*, 1993, 27, 96-101.
55. Lehel Sz., Horváth G., Boros I., Mikecz P., Márián T., Trón L., *J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2000, 245(2), 399-401.

56. Lehel Sz., Horváth G., Boros I., Mikecz P., Márián T., Szentmiklósi A. J., Trón L., J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2000, 43, 807-815.
57. Lehel Sz., Horváth G., Boros I., Trón L., J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2002, 251(3), 413-416.
58. Linden J., FASEB J., 1991a, 5, 2668-2676.
59. Linden J., Tucker A. L., Lynch K. R., Trends Pharmacol. Sci., 1991b, 12, 326.
60. Linden J., Taylor H. E., Robeva A. S., Tucker A. L., Stehille, J. H., Rivkees S. A., Fink J. S., Reppert S. M., Mol Pharmacol, 1993, 44, 524.
61. Lohse M. J., Brenner A. S., Jackisch R., J. Neurochem., 1987, 49(1), 189-194.
62. Lohse M. J., Elger B., Lindenborn-Fontios J., Klotz K. N., Schwabe U., Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1988, 337, 64-68.
63. Londos C., Cooper D. M. F., Wolff J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 2551-2554.
64. Márián T., Boros I., Lengyel Zs., Balkay L., Horváth G., Emri M., Sarkadi É., Szentmiklósi A. J., Fekete I., Trón L., Appl. Radiation Isotopes, 1999, 50, 887.
65. Márián T., Lehel Sz., Balkay L., Horváth G., Lengyel Zs., Mikecz P., Szentmiklósi A. J., Trón L., Eur. J. Nucl. Med., 2000, 27(8), 1223.
66. Maziere B., Cantineau R., Coenen H., et al. PET radiopharmaceutical metabolism-plasma metabolite analyses. In Stöcklin G., Pike V. W., editors. Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodological Aspects. Dordrecht, Kluwer academic Publishers, 1993, 151-178.
67. Meyer G-J., Coenen H., Waters S. L., Lanngström B., Cantineau R., et al. Quality assurance and quality control of short-lived radiopharmaceuticals for PET. In Stöcklin G., Pike V. W., editors. Radiopharmaceuticals for Positron Emission

- Tomography, Methodological Aspects. Dordrecht, Kluwer academic Publishers, 1993, 151-178.
68. Mikecz P., Horváth G., Miklovicz T., Lehel S., Márián T., Trón L., Magyar Radiológia Suppl. 2001, 9.
 69. Mikecz P., Tóth Gy., Horváth G., Lehel S., Kovács Z., Priboczki É., Boros I., Miklovicz T., Márián T., Orvosi Hetilap. 143/21, Suppl. 2002, 2, 12-14.
 70. Molnár T., Tóth Gyula, Gál I., Trón L., Izotóptechnika, Diagnosztika, 1992, 35, 47.
 71. Munshi R., Pang I. H., Sternweis P. C., Linden J., J. Biol. Chem., 1991, 266, 22285-9.
 72. Noguchi J, Ishiwata K, Wakabayashi S., Nariai T., Shumiya S., Ishii S., Toyama H., Endo K., Suzuki F., Senda M., J Nucl Med., 1998, 39(3), 498-503.
 73. Nonaka Y., Shimada J., Nonaka H., Koike N., Aoki N., Kobayashi H., Kase H., Yamaguchi K., Suzuki F., J. Med Chem., 1993, 36, 3731.
 74. OGYI-engedély, Butanol Ri 218, 1998.
 75. OGYI-engedély, FDG Ri 157, 1994.
 76. OGYI-engedély, Metionin Ri 188, 1996.
 77. Papesch V., Schroeder E. F., J. Org. Chem., 1951, 16, 1879-1890.
 78. Parkinson F. E., Fredholm B. B., Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol., 1990, 342, 85.
 79. Patterson T. S., J. Chem. Soc., 1896, LXV., 1002-1009.
 80. Phelps, M.E., Positron Emission Tomography. In Mazziotta, J. and Gilman, S., Eds., Clinical Brain Imaging: Principles and Applications, F.A. Davis Company, 1992, 71-107.
 81. Pouchet S. M., Keddie J. R., Singh P., Stoggall S. M., Caulkett P. W. R., Jones G., Collis M. G., Br. J. Pharmacol., 1995, 115, 1096-1102.

82. Qaim S. M., Clark J. C., Crouzel C., Guillaume H. J., Helmeke H. J., Nebeling B., Stöcklin G., Pike V. W., PET radionuclide production. In Stöcklin G., Pike V. W., editors. Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodological Aspects. Dordrecht, Kluwer academic Publishers, 1993, 1-42.
83. Ram S., Spicer L. D., Synth Commun., 1987, 17(4), 415-418.
84. Ramkumar, V., Barrington, W. W., Jacobson, K. A., Stiles G. L., Molec. Pharmacol., 1990, 37, 149-156.
85. Rota Kops E., Herzog H., Schmid, A., J. Comput. Assist. Tomogr., 1990, 14, 437-445.
86. Sarkadi É, Kovács Z., Andó L., ATOMKI, Annual Report, 1994, 78.
87. Sarkadi É, Kovács Z., Andó L., Szelecsényi F., ATOMKI, Annual Report, 1995, 87.
88. Sarkadi É., Kovács Z, Andó L., Szelecsényi F., Radiochimica Acta, 1997, 76, 197-200.
89. Scatchard G., Ann NY Acad. Sci., 1949, 51, 660-672.
90. Speer J. H., Raymond A. L., J. Am. Chem. Soc., 1953, 5, 114-115.
91. Stone G. A., Jarvis M. F., Sillis M. A., Weeks B., Snowhill E. W., Williams M., Drug Dev. Res., 1988, 15, 31-46.
92. Stone-Elander S., Thorell J., Eriksson L., Fredholm B., Ingvar M., Nucl. Med. Biol., 1997, 24, 187-191.
93. Sylven C., Eriksson B., Sheps D. S., Maixner B., Neuroreport., 1996, 7(12), 1982-1984.
94. Szentmiklósi A. J., Újfalusi A., Cseppentő Á., Nosztray K., Kovács P., Szabó J. Zs., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1995, 351, 417-425.
95. Szentmiklósi A. J., Cseppentő Á., Újfalusi A., Szabó J. Zs., Kovács P., Olsson R. A., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1997, 356 Suppl. 1, R7.

96. Tóth Gy., Mikecz P., Molnár T., Trón L., *Izotóptechnika, Diagnosztika*, 1992, 35, 65.
97. Trón L., *Fizikai Szemle*, 2001, 5-6, 178-181.
98. Trussell L. O., Jackson M. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 4857-4861.
99. Ueno M., Brookins J., Beckman B., Fisher J. W., *Life Sci.*, 1988, 43, 229-237.
100. Van Calker D., Muller M., Hamprecht B., *Nature*, 1978, 276 839-841.
101. Wang W. F., Ishiwata K., Nonaka H., Ishii S., Kiyosawa M., Shimada J., Suzuki F., Senda M., *Nucl Med Biol.*, 2000, 27(6), 541-6.
102. Zhou Q-Y., Li C., Olah M. E., Johnson R. A., Stiles G. L., Civelli O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 7432-7436.

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Boros I.**, Lengyel Zs., Balkay L., Horváth G., Szentmiklósi A.J., Fekete I., Márián T. Az A_{2A}-adenozin-receptor-eloszlás in vivo tanulmányozása ¹¹C-CSC-radioligandummal. Orvosi Hetilap. 143/21, Suppl. 2, 89-91,2002.
2. **Boros I.**, Horváth G., Lehel S., Márián T., Kovács Z., Szentmiklósi J., Tóth G., Trón L. [¹¹C]-labelling of some caffeine derivatives for mapping Adenosine A_{2A} receptors by PET technique. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 242, 309-313, 1999. Impact factor: 0.605
3. Márián T., **Boros I.**, Lengyel Z., Balkay L., Horvath G., Emri M., Sarkadi E., Szentmiklósi J., Fekete I., Tron L.: Preparation and evaluation of [¹¹C]CSC as a possible tracer mapping adenosine A_{2A} receptors by PET. Appl. Rad. Isot. 50/5, 887-893, 1999. Impact factor: 0.716
4. Lengyel, Zs., **Boros I.**, Márián, T., Sarkadi, E., Horváth, G., Kovács, Z., Trón,L.: Possible use of ¹¹C-labelled 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC) mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. In Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research XXIII . Eds: Bergmann H, Köhn H, Sinzinger H. Birkhauser Verlag 387-391, 1999.
5. Balkay L, Molnár T, **Boros I.**, Lehel Sz, Galambos T: Quantification of FDG uptake using kinetics models. In Positron Emission Tomography: A Critical Assesment of Recent Trends, edited by Gulyás, B. and Müller-Gärtner, H. W., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 153-162, 1998.
6. Trón L, Ésik O, Borbély K, ...Boros I, ...: Első hazai tapasztalatok pozitron emissziós tomográfiás (PET) vizsgálatokkal. Orvosi Hetilap, 138 (5), 259-271, 1997.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények

1. Márián T., Rubovszky B., Szentmiklósi A. J., Tron L., Balkay L., **Boros I.**, Székely A., Krasznai Z.: A₁ and A₂ adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane

- potential in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. 2002. Jpn. J. Pharmacol. 89, 366-372. 2002. Impact factor: 1.21
2. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Trón L.: Investigation for the nucleophilic substitution reaction of [¹⁸F]fluoride ion on the series of N⁶-benzoyl-2',3'-isopropylidene-adenosine-5'-sulfonates. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 251, 309-312, 2002. Impact factor: 0.605
 3. Mikecz P., Tóth Gy., Horváth G., Lehel S., Kovács Z., Priboczki É., **Boros I.**, Miklovicz T., Márián T., Radiológyszerek előállítására pozitronemissziós tomográfiai vizsgálatokhoz, Pozitronemissziós tomográfia Magyarországon: Eredmények a klinikumban és a kutatásban. Orvosi Hetilap. 143/21, Suppl. 2, 12-14, 2002.
 4. Gulyás B., Csiba L., ...**Boros I.**, ...: Egyszeri vinpocetin (cavinton) infúzió agyi anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálata pozitron emissziós tomográfiával (PET) krónikus stroke betegekben. Orvosi Hetilap, 142(9), 443-447, 2001.
 5. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Mikecz P., Márián T., Szentmiklósi J., Trón L.: Synthesis of 5-N-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-carboxamidoadenosine: a promising tracer for investigation of adenosine receptor system by PET technique. J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 43, 807-815, 2000. Impact factor: 0.941
 6. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Mikecz P., Márián T., Trón L., Production of 5'-deoxy-5'-[¹⁸F]fluoro-adenosine in the nucleophilic radiofluorination reactions of 5'-deoxy-5'-haloadenosine derivatives. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 245, 399-401, 2000. Impact factor: 0.605
 7. Szakáll S., **Boros I.**, Balkay L., Emri M., Fekete I., Kerényi L., Lehel S., Márián T., Molnar T., Varga J., Bereczki D., Csiba L., Gulyas B.: Cerebral effects of a single dose of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: a PET study. J. Neuroimaging, 8(4): 197-204, 1998. Impact factor: 1.044
 8. Trón L., Balkay L., **Boros I.**, Emri M., Márián T., Molnár T., Tóth Gy., Gulyás B.: Positron Emission Tomography (PET)- One of the most advanced imaging techniques, Neurobiology 3 (2), pp. 205-206, 1995.

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

1. Márián T., Lehel S., Balkay L., **Boros I.**, Horváth G., Fekete I., Szentmiklósi J., Trón L., Adenozin-receptorok és PET-izotóppal jelölt ligandumjaik kölcsönhatásának in vivo és in vitro vizsgálata. Ötéves a Magyar PET Program, Tudományos Ülés, 1999. szeptember 22., Debrecen.

2. Márián T., **Boros I.**, Lengyel Zs., Szentmiklósi J., Fekete I., Balkay L., In vivo és in vitro vizsgálatok PET radiofarmakonokkal. DOTE PET Centrum Tudományos Ülés 1999. február 22., Debrecen.
3. Szentmiklósi J., **Boros I.**, Horváth G., Márián T.: Halogénezett sztirilkoffein származékok, mint potenciális PET tracerek: az A_{2a} adenosin receptor szelektivitás farmakológiai elemzése. DOTE PET Centrum, Tudományos Ülés 1999. február 22., Debrecen.
4. Lengyel Zs., **Boros I.**, Márián T., Sarkadi E., Horváth G., Kovács Z., Trón L., Possible use of ¹¹C-labelled 8-(3-chlorostyryl) caffein (CSC) mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. Eur. J. Nucl. Med. 1998, 24(1), S20 (Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research, 23rd Int.Symposium, Badgastein, Austria, Januar 13-16, 1998.)
5. Lengyel Zs., **Boros I.**, Márián T., Sarkadi É., Szentmiklósi J., Horváth G., Trón L. (1997): In vivo and in vitro investigations with ¹¹C-labeled 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) as a possible PET tracer for mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. Fifth Symposium of International Society for Neuroimaging in Psychiatry, Groningen, November 27-29, 1997, pp. 29.
6. Horváth G., Márián T., **Boros I.**, Lengyel Zs., Lehel S., Kovács Z., Szentmiklósi J., Trón L., [¹¹C]-labeled 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) as a possible PET tracer for mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. Conference on Achievements and Prospects of new Radiotracers, 13-14 November, 1997, Jülich, Germany, pp: 17-18.
7. **Boros I.**, Horváth G., Lehel Sz., Kovács Z., Márián T., Sarkadi L-né., Trón L., A₂ szelektív adenosin receptorligandum antagonisták előállítása a DOTE PET Centrumban. Konferenciaposzter és előadás, MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia Supplement 1997(1), 12.
8. **Boros I.**, Horváth G., Lehel S., Trón L., Radiokémiai fejlesztési programok a debreceni PET Centrumban, Konferenciaposzter és előadás , MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia, 1997(1) 12.
9. Lehel S., Horváth G., **Boros I.**, Trón L., Adenosin receptorok vizsgálatára alkalmas ¹⁸F-jelzett vegyületek előállítása, Konferenciaposzter és előadás, MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia, 1997(1), 12.
10. Balkay L., Emri M., Molnár T., Márián T., **Boros I.**, Lehel Sz., Trón L. (1997) Kvantitatív szöveti glukóz anyagcsere térképek előállítása PET mérések tracer kinetikai analízisével. Poszter, Sejt- és fejlődésbiológiai napok, Debrecen, 1997. jan.19-22.pp. 23.
11. **Boros I.**, Lehel S., Tóth Gy., Trón L. [¹⁸F]Fluoride production at the Debrecen PET Centre, conference poster, XXI-st World Conference of the International Society for Fluoride Research, Budapest, Hungary, August 1996 (conference book p54).
12. Lehel S., **Boros I.**, Tóth Gy., Trón L. 2,3-O-isopropylidene 5-triflic-adenosine: a promising precursor for the synthesis of [¹⁸F]-labelled adenosine derivatives, conference poster, XXI-st World Conference of the

International Society for Fluoride Research, Budapest, Hungary, August 1996 (conference book p53).

13. Illés A., Márián T., **Boros I.**: PET studies on Hodgkin's lymphoma patients "PET in Eastern and Central Europe", International Workshop, Debrecen, Hungary, 23-25 May 1996.