

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 14 jula 2016 godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata specijalista farmaceuta Marija Darkovska Serafimovska, pod naslovom

„Tirofiban kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolijskih poremećaja: animalni model “

Komisija u sastavu:

1. **Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor, mentor**
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Dr Emilija Janević Ivanovska, redovni profesor, mentor**
Fakultet za medicinske nauke, Univerziteta u Štipu
3. **Dr Miroslav Savić, redovni profesor**
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija specijalista farmaceuta Marija Darkovska Serafimovska, pod nazivom: „**Tirofiban kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolijskih poremećaja: animalni model**“, napisana je na 106 strana sa 1,5 proredom i obuhvata 7 sledećih celina: Uvod (24 strana), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijal i metode (13 strana), Rezultati (43 strana), Diskusija (8 strana), Zaključak (2 strane), Literatura (15 strana). Rad sadrži 23 tabele, 42 grafička prikaza i 185 literaturnih navoda. Tekst disertacije pisan je jasnim stilom.

UVOD

Uvod rada obuhvata celine: fiziologija hemostaze, trombociti, trombocitni glikoproteinski recetori, uloga trombocita u procesu koagulacije, trombotična oboljenja, dijagnoza dubokih venskih tromboza i plućnog embolizma, inhibitori GPIIb/IIIa receptora, Tirofiban (mehanizam delovanja, farmakodinamski efekti, farmakokinetički podaci, predklinički podaci o bezbednosti leka i klinička efikasnost i bezbednost).

Vaskularna oboljenja su jedan od vodećih razloga za povećani morbiditet i mortalitet kod ljudi koji žive u visoko razvijenim sredinama. Duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija su veoma ozbiljne komplikacije, koje nose visoki rizik po zdravlje pacijenata. DVT je produkt hiperkoagulabilnog stanja, pri čemu dolazi do formiranja tromba, koji je bogat sa fibrinom,

trombocitima i eritrocitima. Tromboza može biti rezultat i na ceo niz poremećaja u procesu koagulacije, kao rezultat naslednih poremećaja ili pak kao rezultat prisutnih malignih promena. I mnogo drugi faktori mogu doprineti za pojavu ili potenciranje venske tromboze kao: oštećenje venskog endotela pri kateterizaciji, oralna kontracepcija, postoperativne staze, varikozni tromboflebiti, srceva oboljenja, infarkt, trauma.

Detekcija akutne i rane DVT je veoma bitna, pre svega zbog posledica koje ona nosi sa sobom (rizik od plućne embolije, hronična venska insuficijencija). Kod ovih patoloških stanja uloga trombocita je veoma važna, zbog njihove sposobnosti da formiraju agregate, koji nastaju kao posledica oštećenja krvnog suda.

Akutna DVT teško može da se dijagnosticira na bazi kliničkih parametara, zbog toga što u preko 50% pacijenata odsutuju simptomi. Kod ostalih 20-50% pacijenata postoje venografski dokazana oboljenja. Često asimpomska manifestacija akutne DVT zahteva dopunska ispitivanja da bi se potvrdile kliničke pretpostavke. Kliničkoj dilemi ide u prilog i činjenica da preko 90% plućnih embolija nastaju kao rezultat DVT kao i da su u 70% slučajeva dijagnostikovane tek nakon autopsije, a bez prethodne kliničke slike.

Postoji više tehnika i metoda za vizuelizaciju DVT: kompresivni ultrazvuk (neinvazivna tehnika sa senzitivnosti od 95-99%), intravaskularni ultrazvuk (invazivna metoda, najčešće korišćena za vreme koronarne angiografije), Duplex ultrasonografija, agresivna kontrastna venografija (injektiranje kontrastnog sredstva u dorzalnu venu stapala predstavlja veoma invazivan i bolan metod), venografija i venska ultrasonografija, magnetno rezonantna angiografija (ne spada u često primenjivane rutinske dijagnostičke metode), vizuelizacija pomoću radioaktivno-obeležanog fibrinogena sa radioaktivnim jodom¹³¹, perfuziona scintigrafija, radionuklidna venografija (veoma eksploatirana metoda u nuklearnoj medicini, gde se kao radiofarmaceutik koristi makroagregiran serum albumin obeležen sa tehnecijumom (^{99m}Tc)).

U vreme pojave GPIIb/IIIa antagonista postojao je interes da se oni i njima sličnih koriste kao potencijalni radiofarmaceutici i zamene metodu korišćenja radioaktivno obeležanih autolognih trombocita. Pojavili su se radioaktivni peptidi obeležavani sa tehnecijumom (^{99m}Tc) kao apticide – Diatide, pokušaji obeležavanja c7E3 Fab antitela (Abciximab), kao i malih peptidomimetika koji prepoznaju specifično mesto vezivanja fibrinogena preko RGD sekvence (Arg-Gly-Asp) kao tirofiban i eptifibatide. Jedini komercijalni preparat – apticide nije mogao da pruži željene rezultate u detekciju tromboemboličnih promena verovatno zbog svog hemiskog sastava i poteskoče stvaranja stabilnog radioaktivnog kompleksa.

Trombocitni glikoproteinski IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptor predstavlja ključnu komponentu u procesu trombocitne agregacije, a time i ciljno mesto za terapijsku intervenciju. Tirofiban (N-(butilsulfonil)-4-O-(4-(4-piperidil)-L-tirozin) je nepeptidni tirozinski derivat, visoko selektivan, kratkodelujući inhibitor fibrinogenog vezivanja za trombocitni glikoproteinski receptor IIb/IIIa. Kao molekul sa malom molarnom masom tirofiban ima veliku prednost kako u postupke za njegovo obeležavanje radioaktivnim izotopima, tako i pri njegovoj aplikaciji u organizam, bez opasnosti od pojave imunoloških reakcija nakon primene. Takođe, bitan parametar je i njegova brza eliminacija iz organizma. Tirofiban se vezuje za GPIIb/IIIa receptore na isti način kao što se vezuje i fibrinogen, a može se videti samo u aktivnom ugrušku. Ovaj fenomen pokazuje razliku između akutnog i hroničnog ugruška, pri upotrebi radiofarmaceutika. Obeležavanjem tirofibana sa radioaktivnim izotopom tehnecijuma (^{99m}Tc), kako idealni gama emiter podoban za

dijagnosticku upotrebu, mogu se detektovati patološke promene krvnih sudova, identifikovati lokalizaciju tromba i odrediti morfološke karakteristike tromba.

CILJEVI:

- Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana sa tehnecijumom (^{99m}Tc) kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolicnih promena
- Određivanje limita detekcije, odnosno najmanju koncentraciju tirofibana koja nema terapijsku efikasnost za začuvanim afinitetom za GPIIb/IIIa receptore koristeći in vitro agregacione studije na trombocitima
- Postavljanje eksperimentalnog animalnog modela duboke venske tromboze za eksperimentalni deo studije
- Praćenje farmakokinetike ^{99m}Tc -tirofibana nakon aplikacije, biodistribucione i vizuelizacione studije za njegovu potvrdu kao radiofarmaceutik za detekciju tromboemboličnih promena

METODE ISTRAŽIVANJA:

1. Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana sa tehnecijumom (^{99m}Tc);
2. In vitro agregacione studije na trombocitima;
3. Postavljanje eksperimentalnog modela DVT;
4. Biološko ponasanje ^{99m}Tc -tirofibana; (praćenje koncentracije radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u plazmi)
5. Vizuelizacione studije na eksperimentalnim životinjama i
6. Biodistribucione studije na eksperimentalnim životinjama nakon aplikacije obeleženog ^{99m}Tc -tirofibana.

1. Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana sa tehnecijumom (^{99m}Tc)

Obeležavanje tirofibana je rađeno u prisustvu kalaj hlorida kao sredstvo za redukciju tehnecijuma (^{99m}Tc), pri čemu se tirofiban kompleksira korišćenjem dietilen-triamin-pentasilicetne kiseline (DTPA) i stabilno ugradi u molekulu. Obeležavanje se izvodilo dodatkom tehnecijuma (^{99m}Tc) u obliku eluata (natrium pertehnetat - NaTcO_4^-) na prethodno napravljen i liofilizirani kompleks (24 časovni protokol liofilizacije- Labconco FreeZone Freeze Dry Systems). Radioaktivno obeležani ^{99m}Tc - tirofiban ispitivan je na radiohemisku čistoću (TLC metodom u 25% acetonu, pomoću cyclona (PerkinElmer's Cyclone® Plus Storage Phosphor System) i određivana je radionuklidna čistoća pomoću doze kalibratora (Dose Calibratora – Comcer), kao osnovni parametri obaveznih postupka za kontrolu kvaliteta.

2. In vitro agregacione studije na trombocitima

In vitro agregacione studije rađene su na trombocitima koristeći neradioaktivni tirofiban adenosin diphosphat (ADP). Upotrebljene su različite koncentracije ADP-a i tirofibana. Na ovaj način određena je najmanja koncentracija ADP-a koja uzrokuje maksimalnu agregaciju trombocita i najmanja koncentracija tirofibana koja neće imati terapijski efekat (antiagregacijska svojstva), a u isto vreme zadržaće afinitet da se veže za GPIIb/IIIa receptore. U daljim ispitivanjima korišćena je koncentracija tirofibana od 10nM.

3. Postavljanje eksperimentalnog modela DVT

Eksperimentalni model DVT je izvođen na zdravim mužjacima pacova Wistar soja. Sve planirane procedure odobrene su od strane Etičke komisije Prirodno matematičkog fakulteta, pri Univerzitetu „Sv.Kiril i Metodij“ u Skoplju za rad sa oglednim životinjama, a u saglasnosti Zakona o zaštiti i blagostanje životinja i Zakona za ratifikaciju Evropske Konvencije o zaštiti kičmenjaka koji se koriste za eksperimentalne i druge naučne svrhe. Korišćen je „međugrupni“ dizajn, odnosno, različiti tretmani primenjivani su različitim, nezavisnim grupama od po 6 životinja. U toku celokupnog istraživanja upotrebljeno je oko 50 pacova.

Eksperimentalni model DVT postavljen je ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta, uz prethodnu intravensku aplikaciju trombina u dorzalnoj veni repa muških Wistar pacova, težine 180-230 g. Aplikacija radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana rađena je i.v. bolus injekcijom u volumen od 0.1-0.2 ml i radioaktivnost od 2×10^6 imp/min. Uzimanje uzorka krvi rađeno je kardijalnom punkcijom, pomoću hepariniziranog sprica od 1 ml, 5, 15, 30, 45, 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije.

Studije koje su rađene na eksperimentalnog modela su: praćenje koncentracije radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u plazmi nakon aplikacije koristeći HPLC metod. Vizuelizacije studije su napravljene posle aplikacije radioaktivnog ^{99m}Tc -Tirofibana, a nakon toga i biodistribucione studije na eksperimentalnim modelima. Pacovi su žrtvovani i na izoliranih kritičnih organa merena je prisutna radioaktivnost pretstavljena kao procenat injektovane doze na gram tkiva datog organa (%ID/g).

4. Biolosko ponasanje ^{99m}Tc -tirofibana; (praćenje koncentracije radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u plazmi

Određivanje koncentracije tirofibana u plazmi, rađeno je HPLC metodom sa UV detekcijom. Za tu svrhu postavljena je i validirana HPLC metoda sa UV detekcijom. Uslovi: aparat Perkin Elmer Series 200, UV / VIS detektor i auto sampler, sa separacijom na sobnoj temperaturi. Korišćena je reverzo-fazna kolona LiChrospher® 100 RP-18 4.0 mm \times 250 mm, velicina pora 5 μm . Detekcija je na 274 nm. Mobilna faza je smeša od 0,1 M KH_2PO_4 (pH = 5.0, sa 1.0 N NaOH) i acetonitrila u volumenskom odnosu 80:20 % v/v.

5. Vizuelizacije studije na eksperimentalne životinje

Vizuelizacije studije rađene su na eksperimentalnom modelu, posle aplikacije radioaktivnog ^{99m}Tc -Tirofibana, pomoću gama camera (Mediso SPECT).

6. Biodistribucione studije na eksperimentalnih životinjama nakon aplikacije obeleženog ^{99m}Tc -tirofibana

Biodistribucione studije rađene su posle žrtvovanja eksperimentalne životinje, izoliranjem kritičnih organa i merenjem radioaktivnosti, pomoću doze calibratora (Dose Calibrator – Comcer). Prisutna radioaktivnost pretstavljena kao procenat injektovane doze na gram tkiva datog organa (%ID/g).

Statistička obrada podataka:

Za obradu rezultata korišćeni su statistički kompjuterski programi i to:

- za obradu rezultata in vitro agregacionih ispitivanja korišćen je program "Microsoft Excel". Dobijeni podaci iz ispitivanja ubačena su u kompjutersku bazu podataka, a zatim su statistički obrađeni pomoću sledećih statističkih metoda:

- svi podaci od posebnog interesa za ovaj rad su prikazani i tabelarno i grafički;
- u serijama sa numeričkim oznakama, distribucija podataka je testirana sa Testom normalnost (Test for normality): Kolmogorov-Smirnov test , Lilliefors - test i Shapiro-Wilks W test;
- opis kvantitativnih podataka je urađen sa merama centralne tendencije (aritmetička sredina / prosek) i merama disperzije (standardna devijacija), a kod kvalitativnih podataka sa merama odnosa i proporcija;
- značajnost razlika između tri ili više aritmetičkih sredina kod zavisnih podataka određena je korišćenjem Friedmanove ANOVA;
- značajnost razlika između dve aritmetičke sredine kod zavisnih podataka određena je korišćenjem t-testa zavisnih podataka za pravilnu distribuciju i Wilcoxon Matched Pairs-ov test za nepravilnu distribuciju podataka;
- značajnost razlika između tri i više aritmetičkih sredina kod nezavisnih primeraka određena je korišćenjem jednofaktorijalnu analizu varijanse - One way ANOVA i Tukey (HSD) Test;
- značajnost razlika između dve aritmetičke sredine nezavisnih podataka određena je korišćenjem t-testa za nezavisnih primeraka pri pravilnoj distribuciji i Mann-Whitney U Test kod nepravilne distribucije podataka;
- analiza odnosa (korelacija) između numeričke statističke serije urađena je koristeći Pearson-ov koeficijent korelacije (r);
- za značajne smatraju se rezultati gde je vrednost $p < 0,05$.
- slike dobijene iz vizualizacionih studija obrađene su kompjuterskim programom "Sopha Medical", koji je u sklopu gama kamere na kojoj su rađene slike eksperimentalnih životinja.
- za tumačenje rezultata biodistribucionih studija, gde je merena radioaktivnost organa žrtvovanih životinja, koja je bila različita zbog specifičnosti distribucije, kao rezultat trombotičnih promena, korišćen je kompjuterski program "Image-Pro Plus" i "Image-Pro Express", firme Media Cybernetisc.

REZULTATI ispitivanja prikazani su tabelarno i grafički, u sedam celina:

Deo ***Određivanje radionuklidne čistoće, radiohemijske čistoće i stabilnost obeležanog preparata*** prikazuje: postupak obeležavanja tirofibana dodavanjem tehnećijuma-99m u obliku pertehnetata [$^{99m}\text{TcO}_4^-$], kvalitet i uspešnost obeležavanja kroz određivanja radionuklidne čistoće, radiohemijske čistoće i stabilnost obeležanog preparata.

Deo ***Obeležavanje trombocita radioaktivnim preparatom - humani trombociti i trombociti pacova*** prikazuje: *in vitro* agregacione studije sa neradioaktivnim tirofibanom na humanim trombocitima i trombocitima pacova, pri različite koncentracije ADP-a i različite koncentracije tirofibana.

Deo ***Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću ADP i inhibitornog efekta tirofibana*** prikazuje: efekat ADP-a na agregaciju trombocita i efekat tirofibana na agregaciju trombocita.

Deo **Određivanje optimalne koncentracije radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku** prikazuje: optimalnu koncentraciju radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta.

Deo **Eksperimentalni animalni model duboke venske tromboze** prikazuje: model DVT eksperimentalno postavljen ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta kod mužjaka Wistar pacova, težine 180-230 g.

Deo **Validacija analitičkog postupka** prikazuje: postupak validacije analitičke metode za praćenje koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi.

Deo **Vizuelizacije i biodistribucione studije na eksperimentalnim životinjama** prikazuje: vizuelizaciju DVT na eksperimentalnom modelu sa indukovanom DVT pomoću gama kamere sa visokom rezolucijom, u vremenskim intervalima od 30 i 60 minuta nakon injektiranja radioaktivnog ^{99m}Tc-tirofibana i biodistribuciju obeleženog tirofibana u kritičnih organa merenjem radioaktivnosti, pomoću doznog kalibratora.

DISKUSIJA – u ovom delu dobijeni rezultati su protumačeni uz korišćenje relevantne naučne literature koja se odnosi na detekciju tromboembolijskih poremećaja.

ZAKLJUČCI su izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i njihove analize.

Prilog obuhvata saglasnost: Etičke komisije Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta „Sv. Kiril i Metodije“ u Skoplju za rad sa oglednim životinjama, a u saglasnosti sa Zakonom o zaštiti i blagostanju životinja (Sl. Glasnik RM, broj 149 od 13.10.2014) i Zakonom za ratifikaciju Evropske konvencije o zaštiti kičmenjaka koji se koriste za eksperimentalne i druge naučne svrhe (“Službeni glasnik RS – Međunarodni ugovori”, br. 1/2010 ili EEC Directive of 1986; 86/609/EEC).

B. OPIS REZULTATA

Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana sa tehnecijumom-99m, kao potencijalnog radiofarmaceutika za detekciju tromboembolijskih promena:

Liofiliziran oblik tirofibana obeležen je dodavanjem tehnecijuma-99m u obliku pertehnetata [^{99m}TcO₄-] sa aktivnošću od 10-15 mCi (370-555MBq). Inkubacija preparata je trajala 15 minuta na sobnoj temperaturi sa povremenim mešanjem. Kvalitet i uspešnost obeležavanja praćen je kroz određivanja radionuklidne čistoće (prisustvo neželjenih radionuklida - ^{99m}Mo, kao prethodnik tehnecijuma-99m) i radiohemijske čistoće (prisustvo neželjenih, propratnih kompleksa nastalih tokom obeležavanja).

Na osnovu rezultata, može se zaključiti da:

- svi eluati su imali minimalno prisustvo molibdena, saglasno Evropskoj Farmakopeji, ne veće od 0.1% od aktivnosti ^{99m}Tc-technecijuma
- preparati dobijeni ovim načinom obeležavanja imaju visoku radiohemijsku čistoću (98,5%). RSD je 0.73%, ukazuje na to da je postupak obeležavanja reproducibilan
- preparati obeleženi na ovaj način su stabilni i kao takvi mogu se koristiti i u periodu posle 6 sati nakon obeležavanja

Analiza određivanje limita detekcije, odnosno najmanje koncentracije tirofibana koja nema terapijsku efikasnost, uz očuvani afinitet za GP IIb/IIIa receptore, koristeći in vitro agregacione studije na trombocitima:

Efekat tirofibana (10 μM) na indukovanu trombocitnu agregaciju je određen koristeći različite koncentracije ADP-a (1, 10 i 100 μM). Od dobijenih rezultata, očigledno je da nema značajnijih razlika u agregaciji u odnosu na prisustvo različitih koncentracija ADP-a, odnosno korelacije dobijene sa koncentracijom od 1 μM i 10 μM su skoro jednake (Pearson-ov koeficijent korelacije – $r = -0,98$ kod koncentracije ADP-a od 1 μM i Pearson-ov koeficijent korelacije je – $r = -0,96$ kod iste koncentracije tirofibana u prisustvu 10 μM ADP-a). Sa povećanjem koncentracije ADP-a na 100 μM , tirofiban opet dovodi do smanjenja agregacije za kratko vreme, tako da i ovde dolazi do visoko negativne korelacije između vremena datog u sekundama i agregacije humanih trombocita. U sva tri slučaja nema značajne razlike u agregaciji u odnosu na prisustvo različitih koncentracija ADP-a i efekta iste koncentracije tirofibana.

Efekat različitih koncentracija tirofibana na agregaciju indukovanu istom koncentracijom ADP-a, je određen dodavanjem različite koncentracije rastvora tirofibana (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 i 2000 nM). Postoji visoka negativna korelacija između vremena i agregacije humanih trombocita (Pearson-ov koeficijent korelacije – $r = -0,93$) kad je korišćen tirofiban koncentracije od 10 nM u prisustvu indukovane agregacije koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μmol . U svim ostalim analizama, u kojima je korišćena ista koncentracija ADP-a za indukciju agregacije (10 μmol) i rasteće koncentracije tirofibana, vidi se da postoji visoka korelacija između vremena i agregacije trombocita, odnosno da je Pearson-ov koeficijent korelacije približno isti.

Na osnovu rezultata može se zaključiti da je optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta, manja od 10 nM.

Postavljanje eksperimentalnog animalnog modela duboke venske tromboze:

Eksperimentalni model DVT je postavljen ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta uz prethodnu intravensku aplikaciju 0,2 ml trombina u dorzalnu venu repa mužjaka Wistar pacova, težine 180-230 g. Na ovako postavljenom eksperimentalnom modelu injektovan je radioaktivni (obeležen sa $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tehnecijumom) i neradioaktivni tirofiban putem i.v. bolus injekcije u volumenu od 0.1-0.2 ml i radioaktivnošću 2×10^6 imp/min. Uzorke krvi uzimani su kardijalnom punkcijom, pomoću hepariniziranog šprica od 1 ml, na 5, 15, 30, 45 i 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije.

Na eksperimentalnom modelu određena je:

- koncentracija neradioaktivnog i radioaktivnog tirofibana u plazmi
- vizuelizacija posle aplikacije radioaktivnog $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tirofibana i
- biodistribucione studije posle žrtvovanja eksperimentalne životinje.

Praćenje koncentracija neradioaktivnog i radioaktivnog tirofibana u plazmi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tirofibana nakon aplikacije, biodistribucione i vizuelizacione studije za njegovu potvrdu kao radiofarmaceutika za detekciju tromboembolijskih promena:

Koncentracija neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije u dorzalnu venu repa (koncentracija tirofibana 0.6, 0.8 i 1 mg/ml, volumen injektovanja 0.2 ml) praćena je koristeći HPLC metod sa UV detekcijom. Studije izvedene na leku, odnosno na neradioaktivnom obliku tirofibana, sa poznatim farmakokinetičkim svojstvima, pokazuju kratki poluživot u organizmu i brzu eliminaciju. Praćenje distribucije i eliminacije radioaktivno obeleženog ^{99m}Tc-tirofibana, uzimanje direktnih uzoraka od istog pacova u periodu od 24 sata preko kanile fiksirane u karotidnoj veni i direktno merenje radioaktivnosti originalnih uzoraka omogućilo je da se sagleda dali pomena molekule nakon obeležavanja i prisustvo vezanog ^{99m}Tc-tehnecijuma dovodi do promene farmakokinetičkih parametara. Dobijene vrednosti pokazuju da je preko 70% radioaktivnosti eliminisano iz cirkulacije u periodu prvog sata, što je bio dovoljan dokaz da radioaktivno obeležavanje ne menja farmakokinetički profil tirofibana.

Vizuelizacione studije rađene su na normalnom pacovima i na eksperimentalnom modelu sa indukovanom DVT, a posle aplikovanja radioaktivnog ^{99m}Tc-tirofibana, pomoću gama kamere sa visokom rezolucijom, u vremenskim intervalima od 30 i 60 minuta nakon injektiranja. Nakon 30 minuta od aplikovanja postoji jedno mesto visoke kumulacije radioaktivnost u kompleksu u kom se superponiraju jetra, slezena i bubrezi, a to su organi odgovorni za metabolizam i eliminaciju tirofibana. Nazire se mala radioaktivnost u mokraćnoj bešiki, a što je rezultat brze eliminacije tirofibana. Nakon 60 minuta distribucija radioaktivnosti nije izmenjena, osim u mokraćnoj bešiki gde se uočava povećanu radioaktivnost, koja je posledica brze eliminacije nevezanog radioaktivnog tirofibana u prvom satu nakon aplikacije.

Biodistribucione studije obeleženog tirofibana su rađene na istim eksperimentalnim životinjama (Wistar pacovi) koje su bile korišćene za vizuelizacione studije, posle njihovog žrtvovanja, izolovanjem kritičnih organa i merenjem radioaktivnosti, pomoću doznog kalibratora (Dose Calibrator – Comcer). Aktivnost je izražena kao relativna, imp/min, 30 i 60 minuta nakon injektiranja i žrtvovanja pacova. Nakon 30 minuta, najveća vrednost biodistribucije ^{99m}Tc-tirofibana registrovana je u bubrezima ($5577,50 \pm 331,28$) i slezini ($3179,00 \pm 101,15$), a najmanje u srcu ($754,17 \pm 60,07$). Ovo je rezultat brzog klirensa radioaktivno obeleženog tirofibana koji se nije vezao za trombotično tkivo i koji se zbog male molarne mase brzo eliminiše. Prisustvo radioaktivnosti u slezini, koja je slična vrednostima u jetri, ali i u trombotičnom tkivu, je dokaz da se oštećeni trombociti koji su radioaktivni, odmah akumuliraju u svom kritičnom organu. U studijama nakon 60 minuta, najveće vrednosti su zabeležene u trombotičnom tkivu ($8083,83 \pm 94,59$) i bubrezima ($4269,00 \pm 75,03$), a najmanje u srcu ($416,33 \pm 44,43$). Ove vrednosti odgovaraju realnoj distribuciji nakon uravnotežavanja kinetike radioaktivno obeleženog tirofibana. Najmanje vrednosti i ovde, kao i nakon 30 minuta, nalaze su u srcu, što je dokaz da se radioaktivni tirofiban zadržava jako kratko u cirkulaciji. Visoke vrednosti u bubrezima pokazuju da se radioaktivni tirofiban brzo eliminiše iz organizma.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Detekcija rane DVT, ide u pravcu uvođenja preparata koji po svom sastavu pripadaju grupi peptida ili peptidomimetika i imaju specifični afinitet za vezivanje za trombocitne receptore. Trombocitni glikoproteinski (GPIIb/IIIa) receptor predstavlja ključnu komponentu u procesu trombocitne agregacije, a time i ciljno mesto za terapijsku intervenciju. Ispitivanja su pokazala

da GPIIb/IIIa receptori posreduju, takozvani finalni put trombocitne agregacije, što predstavlja i uslov za pojavu i razvoj GPIIb/IIIa antagonista, kao supstanci za prevenciju i lečenje patoloških stanja ovog tipa.

Postoji više klasa inhibitora GPIIb/IIIa receptora (Fintel, 2001; Hirsh, 2001; Joel, 2001; Hirsh i Lee, 2002), koji inhibiraju trombocitnu funkciju u fazi njihove agregacije preko okupacije fibrinogenih mesta za vezivanje (Cook i sar., 1997; Chadderdon i Cappello, 1999; Abumiya i sar., 2000; Schneider, 2011).

U vreme pojave GPIIb/IIIa antagonista pojavili su se i monoklonska antitela (himerna ili mišija), kao abciksimab (Jordan i sar., 1997; Mousa i sar., 1997; Peterson i sar., 1998; Nurden i sar., 1999; Quinn i sar., 1999 i 2001), RGD peptidi, integrilin, kao i grupa pseudopeptida ili peptidomimetika, tirofiban (Thiagarajan i Benedict, 1997; Cook i sar., 1999; Ali i sar., 2000; Cho, 2000; Abulancia i sar., 2001; Tanaka i sar., 2004). Kasnije su se pojavili prvi radioaktivni peptidi obeleženi sa tehnecijumom (^{99m}Tc) kao apticid – Diatide, pokušaji obeležavanja c7E3 Fab antitela (abciksimab), kao i malih peptidomimetika koji prepoznaju specifično mesto vezivanja fibrinogena preko RGD sekvence (Arg-Gly-Asp) kao tirofiban i eptifibatid (Mahmud i sar., 2007; Serebruanu i sar., 2007; van Rensburg i sar., 2012; Yeung i Holinstat, 2012).

Prvi komercijalni radiofarmaceutik koji je upotrebljen za direktnu scintigrafsku vizuelizaciju aktiviranog trombocitnog kompleksa je $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ apcitid (Taillefer i sar., 1999; Thakur i sar., 2000). On je po strukturi mali peptid sa visokim afinitetom za GPIIb/IIIa receptore. U radioaktivno obeleženom obliku preparat daje scintigrafsku sliku akutnog tromba. Odatle se i ovaj novi dijagnostički modalitet generalno naziva trombosintigrafija. Za razliku od ostalih konvencionalnih metoda za procenu DVT, ova metoda potencira biološke karakteristike akutnog ugruška, na samom početku nastajanja tromba, odnosno pre definisanja njegovih morfoloških osobina. Međutim, ovaj jedini komercijalni preparat – apcitid nije pružio željene rezultate u detekciji tromboembolijskih promena.

U ovoj studiji, preko uvođenja radioaktivno obeleženog tirofibana sa $^{99\text{m}}\text{Tc}$, za vizuelizaciju akutne DVT na eksperimentalnom životinjskom modelu, potvrđene su pretpostavke koje postoje za ovaj tip potencijalnih radiofarmaceutika.

Eksperimentalni model je tako postavljen da može dati optimalne uslove koje bi mogli da se iskoriste za dalje kliničke studije (Lewis i Westwick, 1978; Barrett i sar., 2008). Ligatura femoralne vene, a ne jugularne ili donje šuplje vene je odabrana iz razloga što femoralna vena je najdostupnija za prepariranje, predstavlja najčešće mesto gde nastaje DVT kod ljudi i u okolini femoralne vene nema drugih organa koji bi mogli vezati radiofarmaceutik i time uticati na pravilno tumačenje rezultata.

Na ovako postavljenom eksperimentalnom modelu injektovano je radioaktivni (obeležen sa $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tehnecijumom) i neradioaktivni tirofiban putem i.v. bolus injekcije određena je koncentraciju neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije u dorzalnu venu repa (koncentracija tirofibana 0.6, 0.8 i 1mg/ml, volumen injektovanja 0.2 ml) koristeći HPLC metod sa UV detekcijom, krvna distribucija i eliminacija radioaktivnog tirofibana u krvi u period od 24 sata merenjem krvnih uzoraka uzetih preko kanile u karotidnoj veni, vizuelizacija 30 i 60 minuta posle aplikacije radioaktivnog $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tirofibana, upotrebom gama kamere i biodistribucione studije 30 i 60 minuta posle aplikacije radioaktivnog $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tirofibana i nakon žrtvovanja eksperimentalne životinje, preko izolovanja kritičnih organa i merenja radioaktivnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da je odabrani model, iako je na eksperimentalnom pacovu, adekvatan i validan za potencijalne kliničke studije. Ovo je posebno potvrđeno praćenjem koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi pacova i na isti način u plazmi čoveka. Adekvatnost sistema je proverena preko praćenja različitih parametara (vreme zadržavanja-retencije, faktor razvlačenja pika - tailing, faktor kapaciteta, rezolucija i seletivnost). Serumske koncentracije tirofibana merene 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon aplikacije kod eksperimentalne grupe pacova sa DVT su niže u odnosu na serumske koncentracije tirofibana kod kontrolne grupe pacova, što se može objasniti vezivanjem tirofibana za GPIIb/IIIa receptore (Herbert i sar., 1992). Na taj način je potvrđeni eksperimentalni životinjski model DVT.

Radioaktivno obeleženi tirofiban ima skoro identično ponašanje kao i neradioaktivni, što je potvrđeno eliminacijom preko 70% radioaktivno obeleženog tirofibana iz cirkulacije u periodu prvog sata. Time je potvrđeno i da radioaktivno obeležavanje ne menja farmakokinetički profil tirofibana.

Što se tiče eliminacije leka, rezultati su pokazali sličnost kod oba modela (eksperimentalni model DVT i kontrolna grupa). 15% injektovane doze prisutne u krvi 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije kod kontrolne grupe pacova i vrednosti između 11.25-12% kod eksperimentalnog modela pacova sa DVT, pokazuju kratko T1/2 (brza eliminacija) tirofibana iz krvi (Oertel i sar., 2004).

Rezultate dobijene iz agregacionih studija na humanim trombocitima i trombocitima pacova, preko afiniteta vezivanja, pokazuju da nema statistički značajnih razlika između dva entiteta. Najniža efektivna koncentracija tirofibana (optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta), je manja od 10 nM.

U svim in vitro studijama, korišćena je ista koncentracija i ista aktivnost radioobeleženog tirofibana i time pokazano je da procenat vezivanja radioobeleženog tirofibana za humane trombocite i trombocite pacova ne pokazuje značajnu razliku (69% kod humanih trombocita / 68.7% kod trombocita dobijenih od pacova). Vezivanje je bilo stabilno i nakon dvojnog ispiranja, što je bio značajan pokazatelj za stabilnost kompleksa (58.6% kod humanih trombocita / 57.5% kod trombocita dobijenih od pacova). Ovo je potvrdilo pretpostavku da rezultati dobijeni u eksperimentalnom modelu DVT pacova, mogu biti validni i očekivani kod ljudi sa DVT.

Niske koncentracije tirofibana, na mestu gde postoje patološke promene, ne utiču na mogućnost fibrinogena da se veže za GPIIb/IIIa receptore, ali u isto vreme tirofiban je prisutan u dovoljnoj koncentraciji koja omogućava vizuelizaciju patoloških promena u cirkulaciji (Gibaldi i Perrier, 1982).

Tehnecijum - 99m, kao izotop od izbora i jedan od najčešće korišćenih gama emitera u nuklearnoj medicini, povoljan je za dijagnostiku i vizuelizacione studije. Ugrađen je u molekulu tirofibana, posredstvom kalaj-hlorida, kao sredstva za redukciju. Dobijeni kompleks pokazuje visoki procenat vezivanja (iznad 98.5%) i daje mogućnost dobijanja slike u kraćim vremenskim intervalima. Slike koje su dobijene vizuelizacijom normalnih pacova i eksperimentalnog modela DVT, kao i biodistribucione studije nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, potvrđuju predviđanja in vitro analize.

Na mestu oko ligature akumulacija radioaktivnosti je izrazita i u potpunosti odgovara procesu tromboze. Normalno tkivo (skeletni mišić kontralateralnog ekstremiteta) pokazuje

nespecifično vezivanje, odnosno prisutnost radioaktivnosti u cirkulaciji nakon određenog vremena.

Na osnovu upoređivanja odnosa različitih organa evidentna je razlika između trombotičnog i normalnog tkiva.

Distribuciju radioobeleženog tirofibana u razmacima od 30 i 60 minuta, pokazala je da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji 99m-tirofibana u različitim organima/tkivima posle 30 i posle 60 minuta. U srcu, plućima, jetri, slezini, bubrezima i mišićima, vrednosti su značajno veće nakon 30 minuta. U trombotičnom tkivu vrednosti 99m-tirofibana nakon 60 minuta su značajno veće u odnosu na one dobijene nakon 30 minuta.

Literatura:

1. Abulencia JP, Tien N, McCarty OJT, Plymire D, Mousa ShA. Comparative Antiplatelet Efficacy of a Novel, Nonpeptide GPIIb/IIIa Antagonist (XV454) and Abciximab (c7E3) in Flow Models of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 149-56.
2. Abumiya T, Fitrige R, Mazur C, Copeland BR. Integrin allbb3 Inhibitor Preserves Microvascular Patency in Experimental Acute Focal Cerebral Ischemia, *Stroke* 2000; 31: 1402-10.
3. Ali A, Patil S, Grady KJ, Schreiber TL. Diffuse Alveolar Hemorrhage Following Administration of Tirofiban or Abciximab: A nemesis of Platelet Glycoprotein IIB/IIIa Inhibitors. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2000; 49: 181-4.
4. Barret NE, Jones L, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, et al. (2008) Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* 154:918–39
5. Chadderdon RC, Cappello M. The Hookworm Platelet Inhibitor: Functional Blockade of Integrins GPIIb/IIIa (allbb3) and GPIa/IIa (a2b1) Inhibits Platelet Aggregation and Adhesion In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179: 1235-41.
6. Cho L. Clinical benefit of glycoprotein IIB/IIIa blockade with abciximab is independent of gender. Pooled analysis from EPIC, EPILOG and APISSENT trials. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 381-6.
7. Cook JJ, Bednar B, Lynch JJ, Gould RJ, Ebbertson MS, Halczenko W, et al. Tirofiban (Aggrastat™). *Cardiovascular Drug Reviews* 1999; 17: 199-224.
8. Cook JJ, Gardell SJ, Holahan MA, Sitko GR, Stump GL, Wallace AA, et al. Antithrombotic efficacy of thrombin inhibitor L-374,087: Intravenous activity in a primate model of venous thrombus extension and oral activity in a canine model of primary venous and coronary artery thrombosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 289:503-10.
9. Cook JJ, Sitko GR, Holahan MA, Stranieri MT, Glass JD, Asked BC, et al. Nonpeptide Glycoprotein IIB/IIIa Inhibitors. Antithrombotic Efficacy of L-738,167, a Long-Acting GPIIb/IIIa Antagonist, Correlates with Inhibition of Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Aggregation but not with Bleeding Time Prolongation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 281: 677-89.
10. Fintel DJ. From bench to bedside: GPIIb/IIIa inhibitors. *Neurology* 2001; 57: 12-19.
11. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. 2nd ed, Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 1982.
12. Herbert JM, Bernat A, Maffrand JP. Importance of Platelets in Experimental Venous Thrombosis in Rat. *Blood* 1992; 80: 2281-6.

13. Hirsh J, Lee AYY. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood* 2002; 99: 3102–10.
14. Hirsh J. New Anticoagulants. *Am Heart J.* 2001; 142: 3-8.
15. Joel S. Novel Platelet Inhibitors. *Annu Rev Med.* 2001; 52: 161-84.
16. Jordan RE, Mascelli MA, Nakada MT, Weisman HF. Pharmacology and Clinical Development of Abciximab (c7E3 Fab, ReoPro): A Monoclonal Antibody Inhibitor of GPIIb/IIIa and $\alpha v\beta 3$. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis.* Sasahara AA, Loscalzo JL eds, 1997; 291-313.
17. Lewis GP, Westwick J. An in vivo model for studying arterial thrombosis. In: *Thromboembolism – A New Approach to Therapy.* ed Mitchell JRA, Domenet JG, 1978; 40-54.
18. Mousa SA, Mu D-X, Lucchesi BR. Prevention of Carotid Artery Thrombosis by Oral Platelet GPIIb/IIIa Antagonist in Dog. *Stroke* 1997; 28: 830-6.
19. Nurden P, Poujol Ch, Durrieu-Jais C, Winckler J, Combrie R, Macchi L, et al. Labeling of the Internal Pool of GPIIb/IIIa in Platelets by c7E3 Fab Fragments (abciximab): Flow and Endocytic Mechanism Contribute to the Transport. *Blood* 1999; 93: 1622-33.
20. Oertel R, Köhler A, Koster A, Kirch W, Determination of Tirofiban in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 805(1):181-5.
21. Peterson BJA, Visentin GP, Newman PJ, Aster RH. A Recombinant Soluble Form of the Integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb-IIIa) Assumes an Active, Ligand-Binding Conformation and Is Recognised by GPIIb-IIIa-Specific Monoclonal, Allo-, Auto-, and Drug-Dependent Platelet Antibodies. *Blood* 1998; 92:2053-63.
22. Quinn M, Deering A, Steward M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GPIIb/IIIa Receptor Binding Using 2 Monoclonal Antibodies. Discriminating Abciximab and Small Molecular Weight Antagonists. *Circulation* 1999; 99: 2231-8.
23. Quinn MJ, Murphy RT, Dooley M, Foley JB, Fitzgerald DJ. Occupancy of the Internal and External Pools of Glycoprotein IIb/IIIa following Abciximab Bolus and Infusion. *J Pharm Exp Ther.* 2001; 297: 496-500.
24. Schneider DJ. Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):672- 682.
25. Serebruany V, Malinin A, Pokov A, Arora U, Atar D, Angiolillo D. Effects of escalating doses of tirofiban on platelet aggregation and major receptor expression in diabetic patients: hitting the TARGET in the TENACITY trial? *Thromb Res.* 2007;119:175-81.
26. Taillefer R, Therasse E, Turpin S, Lambert R, Robillard P, Soulez G. Comparison of Early and Delayed Scintigraphy with ^{99m}Tc -Apticide and Correlation with Contrast-Enhanced Venography in Detection of Acute Deep Vein Thrombosis. *J Nucl Med.* 1999; 40: 2029-35.
27. Tanaka KA, Katori N, Szlam F, Sato N, Kelly AB, Levy JH. Effects of tirofiban on haemostatic activation in vitro. *Br J Anaesth.* 2004; 93: 263-9.
28. Thakur ML, Pallela VR, Consigny PM, Rao PS, Vessileva-Belnikolovska D, Shi R. Imaging vascular thrombosis with ^{99m}Tc -labeled fibrin alpha-chain peptide. *J Nucl Med.* 2000; 41: 161-8.
29. Thiagarajan P, Benedict C.R. Platelet Procoagulant Activity. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis.* eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 419-34.

30. van Rensburg WJ, Roodt JP, Lamprecht S, Meiring SM, Badenhorst PN. Tirofiban versus abciximab: tirofiban is administered at suboptimal dosages when evaluated in an arterial thrombosis model in non-human primates. *Clin Exp Med.* 2012; 12: 257-63.
31. Yeung J, Holinstat M. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *J Blood Med.* 2012; 3: 33-42.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

RADOVI U MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA

Darkovska Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Ugresic N, Djorgoski I. Imaging of deep venous thrombosis using radioactive-labeled tirofiban. **Bratisl Med J** 2015; 116 (10) – **M 23**

Marija Darkovska Serafimovska, Emilija Janevik-Ivanovska, Trajan Balkanov, Nenad Ugresic, Developmet of Alternative HPLC Method for Determination of Tirofiban in Rat Serum, **MJCCE**, (2016), accepted (DOI broj 10.20450/mjcce.2016.936) - **M 23**

Darkovska Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Djorgoski I, Ugresic N. Imaging of Deep Venous Thrombosis using Radioactive Labeled Tirofiban: Animal Model Evaluation. **International Journal of Innovative and Applied Research.** 2 (11), 9- 19 (2014).

M. Darkovska Serafimovska, E. Janevik-Ivanovska, Z. Arsova-Saradinovska, I. Djorgoski, N. Ugresic, Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of tirofiban in serum, **Int J Pharm**, 4(4), 115-120 (2014).

SAOPŠTENJA SA MEĐUNARODNOG SKUPA ŠTAMPANA U IZVODU

Darkovska-Serafimovska, Marija and Arsova-Saradinovska, Zorica and Balkanov, Trajan and Gjorgoski, Icko and Ugresic, Nenad and Janevik-Ivanovska, Emilija. *Determination of tirofiban in serum using liquid chromatography with UV detection.* **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 09/2013; 50 (Supplement 1):117 (2013).

D. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Vaskularna oboljenja su jedan od vodećih razloga za povećani morbiditet i mortalitet kod ljudi koji žive u visoko razvijenim zemaljama. Duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija su veoma ozbiljne komplikacije, koje nose visoki rizik po zdravlje pacijenata.

Detekcija akutne i rane DVT je veoma bitna, pre svega zbog posledica koje ona nosi sa sobom (rizik od plućne embolije, hronična venska insuficijencija). Kod ovih patoloških stanja uloga trombocita je veoma važna, zbog njihove sposobnosti da formiraju agregate, koji nastaju kao posledica oštećenja krvnog suda. Akutna DVT teško može da se dijagnosticira na bazi kliničkih parametara, zbog toga što u preko 50% pacijenata otsusutvuju simptomi. Kod ostalih 20-50%

pacijenata postoje venografski dokazana oboljenja. Često asimpomska manifestacija akutne DVT zahteva dopunska ispitivanja da bi se potvrdile kliničke pretpostavke. Kliničkoj dilemi ide u prilog i činjenica da preko 90% plućnih embolija nastaju kao rezultat DVT kao i da su u 70% slučajeva dijagnostikovane tek nakon autopsije, a bez prethodne kliničke slike.

Postoji više tehnika i metoda za vizuelizaciju DVT: kompresivni ultrazvuk (neinvazivna tehnika sa senzitivnosti od 95-99%), intravaskularni ultrazvuk (invazivna metoda, najčešće korišćena za vreme koronarne angiografije), Duplex ultrasonografija, agresivna kontrastna venografija (injektiranje kontrastnog sredstva u dorzalnu venu stapala predstavlja veoma invazivan i bolan metod), venografija i venska ultrasonografija, magnetno rezonantna angiografija (ne spada u često primenjivane rutinske dijagnostičke metode), vizuelizacija pomoću radioaktivno-obeležanog fibrinogena sa radioaktivnim jodom¹³¹, perfuziona scintigrafija, radionuklidna venografija (veoma eksploatirana metoda u nuklearnoj medicine, gde se kao radiofarmaceutik koristi makroagregiran serum albumin obeležen sa tehnecijumom (99mTc).

U vreme pojave GPIIb/IIIa antagonista postojao je interes da se oni i njima slični koriste kao potencijalni radiofarmaceutici i zamene metodu korišćenja radioaktivno obeležanih autolognih trombocita. Pojavili su se radioaktivni peptidi obeležavani sa tehnecijumom (99mTc) kao apticide – Diatide, pokušaji obeležavanja c7E3 Fab antitela (Abciximab), kao i malih peptidomimetika koji prepoznaju specifično mesto vezivanja fibrinogena preko RGD sekvence (Arg-Gly-Asp) kao tirofiban i eptifibatide. Jedini komercijalni preparat – apticide nije mogao da pruži željene rezultate u detekciju tromboemboličnih promena verovatno zbog svog hemiskog sastava i poteskoče stvaranja stabilnog radioaktivnog kompleksa.

Trombocitni glikoproteinski IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptor predstavlja ključnu komponentu u procesu trombocitne agregacije, a time i ciljno mesto za terapijsku intervenciju. Tirofiban (N-(butilsulfonil)-4-O-(4-(4-piperidil)-L-tirozin) je nepeptidni tirozinski derivat, visoko selektivan, kratkodelujući inhibitor fibrinogenskog vezivanja za trombocitni glikoproteinski receptor IIb/IIIa. Obeležen radioaktivnim izotopom tehnecijum-99m predstavlja potencijalni radiofarmaceutik za ranu detekciju duboke venske tromboze (DVT). U prilog tome ide osobina tirofibana da se lako može obeležiti tehnecijumom-99m, koji je, kao izotop izbora, jedan od najčešće korišćenih gama emitera u nuklearnoj medicini, povoljan za dijagnostiku i vizuelizaciju trombotičnih promena. Upotreba tehnecijuma-99m za radioaktivno obeležavanje daje mogućnost dobijanja slike u kratkom vremenskom intervalu.

Radioaktivno obeleženi tirofiban ima gotovo identičan kinetički profil kao i neradioaktivni, što je utvrđeno praćenjem koncentracije neradioaktivnog i radioaktivno obeleženog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije. Uvođenjem tehnecijuma i promenom strukture molekule, ne menja se već poznati farmakokinetički profil leka.

Postavljeni eksperimentalni model DVT je pogodan za predklička ispitivanja. Niža koncentracija tirofibana u serumu kod eksperimentalnog modela ukazuje na postojanje DVT i potvrđuje adekvatnost modela. Slike dobijene nakon vizuelizacije gama kamerom prikazuju akumulaciju tirofibana u trombotičnoj femoralnoj veni pacova.

In vitro, procenat vezivanja radioobeleženog tirofibana za humane i animalne trombocite ne pokazuje značajnu razliku. Ovaj nalaz ide u prilog adekvatnosti animalnog modela DVT, kao i mogućnosti translacije naših rezultata na humanu populaciju.

Optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku DVT, bez terapijskog efekta, je manja od 10 nM. Niske koncentracije tirofibana na mestu gde postoje

patološke promene ne utiču na sposobnost fibrinogena da se veže za GPIIb/IIIa receptore. Istovremeno, visoki afinitet vezivanja tirofibana za GPIIb/IIIa receptore omogućava vizuelizaciju patoloških promena u cirkulaciji.

Biodistribucione studije pokazale su da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji Tc99m-tirofibana u različitim organima/tkivima, 30 i 60 minuta posle aplikovanja radiomarkera. U srcu, plućima, jetri, slezini, bubrezima i mišićnom tkivu, vrednosti su značajno veće nakon 30 minuta. Obrnuto, u trombotičnom tkivu vrednosti Tc99m-tirofibana su značajno veće nakon 60 minuta, što ukazuje na kumuliranje radioaktivno obeleženog tirofibana na mestu tromboembolijske promene.

Smatramo da je tirofiban, obeležen radioaktivnim izotopom 99m-tehnecijuma, primenjiv u humanim studijama, te da, kao potencijalni radiofarmaceutik, može da bude predložen za klinička ispitivanja u definisanim grupama pacijenata sa ranim stadijumom DVT.

ZAKLJUČNO MIŠLJENJE

Pregledom završene disertacije pod nazivom „**Tirofiban kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolijskih poremećaja: animalni model**” može se konstatovati da je kandidat mr.spec. Marija Darkovska Serafimovska uspešno ostvario postavljene ciljeve istraživanja, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u dva ugledna međunarodna časopisa (*Bratislava Medical Journal* i *Macedonia Journal of Chemistry and Chemical Engeneering*).

Stoga, predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati Izveštaj i omogući Mariji Darkovskoj Serafimovskoj da odbrani doktorsku disertaciju pod nazivom „Tirofiban kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolijskih poremećaja: animalni model”.

Beograd, 26.08.2016

Članovi Komisije:

Dr sci. Nenad Ugrešić, redovni profesor
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu
Mentor

Dr sci. Emilija Janević Ivanovska, redovni profesor
Fakultet za medicinskih nauka, Univerziteta u Štipu
Mentor

Dr sci. Miroslav Savić, redovni profesor
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu