

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

DISERTAČNÍ PRÁCE

Příprava a *in vitro* studie nosičů ^{223}Ra a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na bázi nanočástic TiO_2

Bibliografický záznam

- Autor:* Ing. Petra Suchánková
České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
Katedra jaderné chemie
- Název práce:* Příprava a *in vitro* studie nosičů ^{223}Ra a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na bázi nanočástic TiO_2
- Studijní program:* Aplikace přírodních věd
- Studijní obor:* Jaderná chemie
- Školitel:* doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.
České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
Katedra jaderné chemie
- Akademický rok:* 2019/2020
- Počet stran:* 118
- Klíčová slova:* oxid titaničitý, nanočástice, sorpce, kinetika, ^{223}Ra , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *in vitro* studie

Bibliographic Entry

Author: Ing. Petra Suchánková
Czech Technical University in Prague
Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering
Department of Nuclear Chemistry

Title of Dissertation: Preparation and *in vitro* Studies of Radium-223 and Technetium-99m Carriers Based on TiO₂ Nanoparticles

Degree Programme: Application of Natural Sciences

Field of Study: Nuclear Chemistry

Supervisor: Doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.
Czech Technical University in Prague
Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering
Department of Nuclear Chemistry

Academic Year: 2019/2020

Number of Pages: 118

Keywords: titanium dioxide, nanoparticles, sorption, kinetics, ²²³Ra, ^{99m}Tc, *in vitro* study.

Abstrakt

Příprava nosičů radionuklidů pro nukleární medicínu, zejména pro cílenou alfa terapii, je jedním z nejdůležitějších kroků potřebných k nalezení nových a účinných radiofarmak. Cílem této práce bylo připravit a otestovat vhodný nosič pro alfa terapeutické radionuklidy. Slibným kandidátem pro tento účel jsou anorganické nanočástice na bázi oxidu titaničitého. Byla zvolena a optimalizována jednoduchá a rychlá metoda přípravy těchto nanočástic. Pomocí řady metod – jako jsou infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, rentgenová prášková difrakce, transmisní elektronový mikroskop, Brunauer–Emmett–Teller metoda a potenciometrická, acido-bazická titrace – byly nanočástice charakterizovány, přičemž byl stanoven vysoký měrný povrch – $330 \pm 10 \text{ m}^2/\text{g}$ a parametry povrchových skupin, velikost částic byla $< 20 \text{ nm}$. Pro výzkum bylo zvoleno ^{223}Ra , které je v nukleární medicíně využíváno jako tzv. *in vivo* generátor. Byl zkoumán mechanismus sorpce ^{223}Ra nanočásticemi v závislosti na pH v rozmezí 2 – 12. Výzkumem bylo zjištěno, že i při nízkých hodnotách pH dochází ke značnému zachytu radionuklidu a procento navázaného ^{223}Ra se pohybuje nad 90 %. Se zvyšujícím se pH rostlo i procento sorpce. Na základě dat ze sorpčních experimentů bylo zvoleno vhodné pH pro kinetické experimenty a to pH 6, při kterém byla následně sledována závislost sorpčního výtěžku na čase i typ řídicího děje. Během prvních pár minut bylo vycytáno více než 90 % vstupní aktivity ^{223}Ra . Pozornost byla věnována také *in vitro* experimentům, kde kromě ^{223}Ra byly provedeny experimenty s nejběžněji používaným diagnostickým radionuklidem – $^{99\text{m}}\text{Tc}$, aby byla prozkoumána možnost využití nosiče v rámci teranostického přístupu. Nejprve bylo důležité zvolit vhodnou metodu navázání radionuklidů na nosič, při které je dosaženo vysokých výtěžků značení. Byly zkoumány dva přístupy značení: jednak povrchová sorpce radionuklidů na již připravené nanočástice a dále inkorporace radionuklidů přímo do struktury nanočástic při jejich syntéze. Pro oba způsoby značení i oba radionuklidy byly výtěžky značení vyšší než 97 %. Dále bylo sledováno chování značených nanočástic v biologicky relevantních matricích a bylo sledováno uvolňování aktivity v čase. Experimenty byly rozděleny na krátkodobé do 59 hodin od značení a dlouhodobé po dobu přibližně 5 poločasů. U experimentů s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se uvolněná aktivita pohybovala pod 15 %, v případě ^{223}Ra se uvolnilo méně než 6 %. Závěrem lze říci, že nanočástice oxidu titaničitého jsou slibným kandidátem pro preklinické testování *in vivo* a vhodným nosičem terapeutických radionuklidů, zejména pak těch s kaskádou alfa a beta přeměn.

Abstract

The preparation of radionuclide carriers for nuclear medicine, especially for targeted alpha therapy, is one of the most important steps needed to find new and effective radiopharmaceuticals. The main aim of this thesis was to prepare and test a suitable carrier for alpha therapeutic radionuclides. Inorganic nanoparticles based on titanium dioxide are promising candidate for this purpose. A simple and fast preparation method for these nanoparticles was chosen and optimized. Nanoparticles were characterized using several methods such as Fourier transform infrared spectrometry, X-ray powder diffraction, Transmission electron microscopy, Brunauer–Emmett–Teller method and potentiometric, acid-based titration, whereas following was determined high specific surface area – $300 \pm 10 \text{ m}^2/\text{g}$ and parameters of surface functional groups, particle size was $< 20 \text{ nm}$. Radium-223 was chosen for the research, which is used in nuclear medicine as a so-called *in vivo* generator. The sorption mechanism of ^{223}Ra by nanoparticles depending on pH was investigated in the pH range 2 – 12. The research showed that even at low pH values there is a significant capture of the radionuclide and the percentage of sorbed ^{223}Ra is above 90%. With increasing pH, the percentage of sorption was increasing. Based on the data from sorption experiments, a suitable pH was chosen for kinetics experiments, namely pH 6, at which the dependence of sorption yield on time and the type of control process were subsequently monitored. During the first few minutes, more than 90 % of ^{223}Ra initial activity was captured. Attention was also dedicated to *in vitro* experiments, where in addition to ^{223}Ra , experiments with the most commonly used diagnostic radionuclide – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – were performed to investigate the possibility of using the whole system for the theranostic approach. Firstly, it was necessary to select a suitable method for radionuclide binding on a carrier, in which high radiolabelling yields are achieved. Two radiolabelling approaches were studied: on the one hand the surface sorption of radionuclide on ready-made nanoparticles and on the other hand radionuclide incorporation directly into the nanoparticle structure during their synthesis. The radiolabelling yields were higher than 97 % for both radiolabelling types and both radionuclides. Secondly, the behaviour of radiolabelled nanoparticles in biologically relevant media and to study the activity releasing over time were studied. The experiments were divided into short-term up to 59 minutes from radiolabelling and long-term for 5 half-lives. The released activity in the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ experiments was below 15 %, in the case of ^{223}Ra less than 6 % was released. In conclusion, titanium dioxide nanoparticles are promising candidate for preclinical testing *in vivo* and a suitable carrier for therapeutic radionuclides, especially those with a cascade of alpha and beta decays.

Disertační práce byla vypracována v laboratořích Katedry jaderné chemie, Fakulty jaderné a fyzikálně inženýrské, Českého vysokého učení technického v Praze (dále jen KJCh FJFI ČVUT v Praze), pod vedením školitele doc. RNDr. Jána Kozempela, Ph.D., v letech 2014–2020. Tuto práci jsem vypracovala samostatně s použitím publikací, které jsou uvedeny v seznamu literatury. Tato práce je koncipována jako komentář k souboru publikací, u kterých je vždy uveden jednak můj autorský podíl na dané publikaci a dále i autorské podíly všech spoluautorů.

V Praze, 9. 7. 2020

Petra Suchánková

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi věnovali čas a se kterými jsem mohla v průběhu celého studia spolupracovat. Největší oporou a pomocí mi byla má kolegyně a kamarádka, Ing. Ekaterina Kukleva, které patří největší poděkování. Dále patří mé poděkování všem kolegům ze skupiny Radiofarmaceutické chemie KJCH FJFI ČVUT v Praze – především RNDr. Martinu Vlkovi, Ph.D., za jeho cenné rady a podporu, kolegům, kteří mi byli oporou či se podíleli na provedení některých experimentů, a školiteli doc. RNDr. Jánů Kozempelovi, Ph.D. Mé poděkování také patří Ing. Janu Bártovi, Ph.D., za jeho ochotu a pomoc při měření měrných povrchů a analýze pomocí XRPD. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat doc. Ing. Karlu Štambergovi, CSc., který mi byl průvodcem ve světě modelování. A nakonec mé poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mi pomáhali, podporovali mě a trpělivě chápali můj občasný nedostatek času.

Obsah

1. Úvod	17
2. Současný stav poznání	19
2.1 Nanočástice.....	19
2.2 Cílení nanočástic v organismu.....	20
2.3 Cílená radionuklidová terapie.....	23
2.3.1 Cílená alfa terapie.....	25
2.3.2 Radium-223.....	27
2.4 Nosiče radionuklidů pro cílenou radionuklidovou terapii.....	29
2.4.1 Nosiče alfa radionuklidů	30
2.4.2 Oxid titaničitý.....	32
3. Cíle disertační práce	35
4. Komentář k souboru publikovaných prací	36
4.1 Syntéza nanočástic a jejich charakterizace	36
4.2 Sorpční experimenty	40
4.3 Kinetické experimenty.....	42
4.4 Značení připraveného materiálu	44
4.5 Stabilitní studie <i>in vitro</i>	46
5. Závěry.....	51
Literatura	53
Přílohy	60
Prohlášení spoluautorů	60
Soubor předložených publikovaných prací	63

Seznam zkratk a symbolů

ALB	roztok albuminu
ALSYMPCA	Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer Patients
B.E.T.	Brunauer-Emmett-Teller
CEM	model chemické rovnováhy, angl. chemical equilibrium model
EMA	Evropská léková agentura – angl. European Medicines Agency
EPR	Enhanced Permeation and Retention
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv – angl. U.S. Food and drug administration)
FR	fyzilogický roztok
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací – angl. Fourier transform infrared (spectroscopy)
(<i>n</i>)HAp	hydroxyapatit, resp. nanočástice hydroxyapatitu
HKP	hovězí krevní plasma
HKS	hovězí krevní sérum
ID	model difúze inertní vrstvou, angl. diffusion in an inert layer
IE _x M	model iontové výměny, angl. ion Exchange model
LET	lineární přenos energie – angl. linear energy transfer
LD ₅₀	střední letální dávka
MRI	magnetická rezonance – angl. magnetic resonance imaging
NPs	nanočástice, angl. nanoparticles
<i>n</i> TiO ₂	nanočástice oxidu titaničitého
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PET	pozitronová emisní tomografie – angl. positron emission tomography
PRAC	Farmakovigilanční výbor pro posuzování rizik léčiv – angl. Pharmacovigilance Risk Assessment Committee
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RLD	model difúze zreagovanou vrstvou, angl. diffusion in a reacted layer
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní terapie – angl. single-photon emission computed tomography
SPIONs	super-paramagnetické nanočástice oxidů železa – angl. super-paramagnetic iron oxide nanoparticles
<i>t</i> _{1/2}	poločas sorpce
TAT	cílená alfa terapie- angl. targeted alpha therapy
TBOT	tetrabutyl <i>orthotitanát</i>
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TRT	cílená radionuklidová terapie – angl. targeted radionuclide therapy
XRPD	rentgenová prášková difrakce – angl. X-Ray Powder Diffraction

1. Úvod

Radionuklidová terapie je jednou z cest léčby především onkologických onemocnění, v rámci které je využíváno biologických účinků ionizujícího záření emitovaného radionuklidu. Dochází při ní k uvolnění vysoké energie v malém objemu hmoty v závislosti na typu použitého radionuklidu (Jackson et al. 2013). Předností této metody je, za předpokladu dodržení určitých podmínek, výrazná minimalizace poškození zdravé tkáně. Jednou z těchto podmínek je spolehlivý transport radionuklidu do cílového objemu, aniž by došlo k jeho uvolnění mimo požadovanou tkáň. Toho lze docílit volbou vhodného nosiče.

Zajímavými radionuklidy vhodnými právě pro terapeutické účely jsou ty, které emitují α částice (Welch & Redvanly 2003). V posledních letech je jím i ^{223}Ra , které se přeměňuje kaskádou α a β^- přeměn, díky čemuž v organismu slouží jako tzv. ‘*in vivo*’ generátor (Allen 2013). V dnešní době je pozornost také věnována teranostickému konceptu diagnostiky a terapie, kde je využíván buď radionuklid emitující částicové i γ záření, nebo se jedná o dva různé radioizotopy jednoho prvku či o dva radioizotopy odlišných prvků (Denoyer & Pouliot 2013).

Studovaná problematika zapadá do širokého okruhu studia nových nosičů vhodných pro teranostická léčiva zaměřená na cílenou alfa terapii a diagnostiku, což představuje jeden z možných nových směrů, kterým se ubírá nukleární medicína. V rámci pracovní skupiny Radiofarmaceutické chemie KJCh FJFI ČVUT v Praze jsou jako možné nosiče pro α radionuklidy studovány magnetické částice, hydroxyapatity a oxid titaničitý. Tato disertační práce je zaměřena na přípravu anorganického nanočásticového nosiče na bázi oxidu titaničitého a studium jeho vlastností. To bylo provedeno jednak pomocí několika analytických metod a dále studiem sorpce ^{223}Ra v závislosti na pH na připravený nosič a následných kinetických experimentů. Kromě samotné přípravy a charakterizace nosiče je tato práce zaměřena na již zmíněný teranostický koncept pomocí dvou odlišných radionuklidů. Byla tedy hledána vhodná metoda značení získaného materiálu diagnostickým – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – a terapeutickým radionuklidem – ^{223}Ra .

Aby bylo možné uvažovat o aplikaci nového radiofarmaka do těla pacienta a provádět klinické studie či preklinické studie *in vivo* na zvířatech, je důležité nejprve zjistit, jak je dané radiofarmakum ovlivňováno biologicky relevantními matricemi *in vitro*. Z těchto důvodů byla část této disertační práce věnována právě *in vitro* stabilitním studiím, tedy sledování uvolněné aktivity v čase.

Pro dosažení komplexnějších výsledků byla navázána spolupráce jednak s doc. RNDr. Miroslavem Šloufem, Ph.D., z Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd

České republiky, který pomohl s charakterizací a následnou analýzou připraveného materiálu pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Dále byla spolupráce navázána s doc. Ing. Karlem Štambergem, CSc., z KJCh FJFI ČVUT v Praze, který pomocí modelování podpořil a doplnil získaná experimentální data.

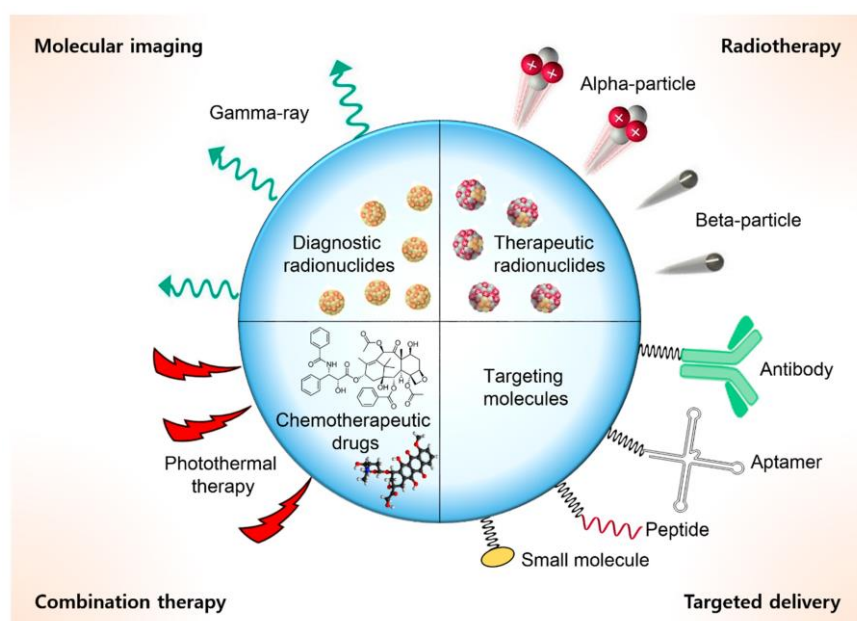
Tato práce byla součástí několika výzkumných grantů, ve kterých jsem se účastnila jako řešitelka či členka řešitelského týmu. Práce byla podporována *Českým vysokým učením technickým v Praze* granty: Nosiče radionuklidů pro cílenou terapii a diagnostiku (SGS15/094/OHK4/1T/14), Příprava nosičů teranostických radionuklidů pro nukleární medicínu (SGS16/251/OHK4/3T/14) a Příprava a hodnocení nanonosičů radionuklidů pro nukleární medicínu (SGS19/194/OHK4/3T/14). Dále byla financována *Technologickou agenturou ČR* grantem – Recyklace Ra-226 a nové technologie využívající Ac-227 (TA03010027), *Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR* grantem - Studium transmutace a separace produktů ozařování Ra-226 (LK21310) a *Ministerstvem zdravotnictví ČR* grantem - Nová vícefázová nanodiagnostika pro zobrazování nádorových onemocnění a predikci efektivity antiangiogenní terapie (16-30544A).

2. Současný stav poznání

2.1 Nanočástice

V několika posledních desetiletích je pozornost věnována materiálům a technologiím, u nichž alespoň jeden z rozměrů je v řádu nanometrů (< 100 nm). Objev a největší rozmach tohoto oboru je připisován 20. století. Ovšem v oblasti umění lze pozorovat používání nanočástic v podobě různých anorganických a organických barviv již v dávné historii (Padeletti & Fermo 2003). První vědecký popis přinesl Michael Faraday, který v roce 1857 publikoval studii týkající se optických vlastností koloidního zlata v roztoku (Faraday 1857). Koncept nanotechnologií a nanosvět je však spojován až s přednáškou Richarda P. Feynmana nesoucí název „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ (Feynman 1959).

V dnešní době je nanosvět studován a uplatňován v celé šíři oborů. I v medicíně lze nalézt řadu oblastí, kde jsou nanomateriály či nanočástice (NPs, angl. nanoparticles) používány. Je jím např. zdravotnický materiál s nanokompozitní vrstvou. Jedná se třeba o obvazy s filmem stříbrných nanočástic nazývané jako tzv. chytré obvazy a mají v důsledku této vrstvy zvýšenou antimikrobiální účinnost dané bandáže (Juknius et al. 2016, Farrah & Erdos 1991). Dále jsou v rámci nanomedicíny studovány různé druhy nanočástic pro potřeby vývoje nových či úpravy stávajících léčiv. Jak je patrné z **Obr. 1**, nanočástice mají v medicíně široké možnosti využití od molekulárního zobrazování, přes radioterapii až po cílení, transport a řízené uvolňování léčiv a řadu dalších. Se správně navrženým nanočásticovým systémem lze tyto metody i různými způsoby kombinovat (Jeon 2019).



Obr. 1: Možnosti využití nanočástic v medicíně (Jeon 2019).

Výzkum nanočástic v medicíně je zaměřen na transportní systémy vhodné jak pro terapeutické účely, tak pro metody zobrazovací. Snahou je získat účinnější a bezpečnější léčivo, které bude v důsledku využití nanočástic méně toxické či bude dosaženo menší míry vedlejších účinků daného léku. Dalším důvodem, proč je pozornost zaměřena právě na nanočástice jako nosiče, je jejich velký měrný povrch, který umožňuje rychlou kinetiku sorpce a umožňuje vysokou sorpční kapacitu (De Jong & Borm 2008, Bahrami et al. 2017).

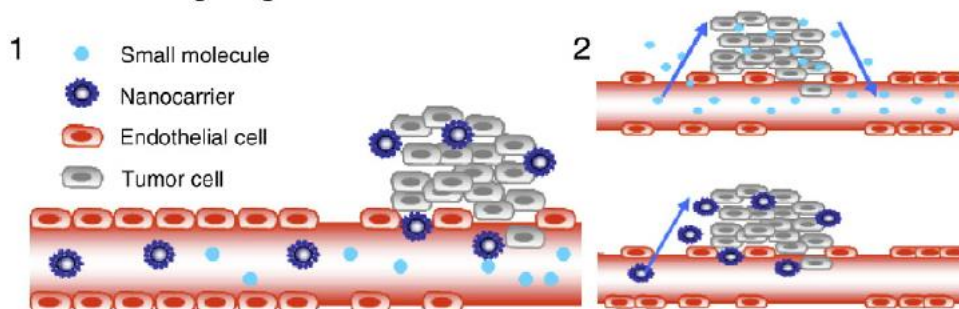
Pro potřeby nukleární medicíny jsou nanočástice již řadu let široce studovány a dokonce i používány v běžné praxi. Jedny z nich jsou např. koloidní částice lidského albuminu, které z více jak 95 % mají menší průměr než 80 nm. Jsou připravovány z krve dárce, která je následně testována (na nepřítomnost protilátek proti viru imunodeficiency apod.) a zpracována (SPC – Nanocoll). Značený nanokoloid ^{99m}Tc je využíván pro scintigrafii kostní dřene, zobrazení zánětů, sentinelových uzlin či lymfoscintigrafii (SPC – Nanocoll, Gommans et al. 2009).

2.2 Cílení nanočástic v organismu

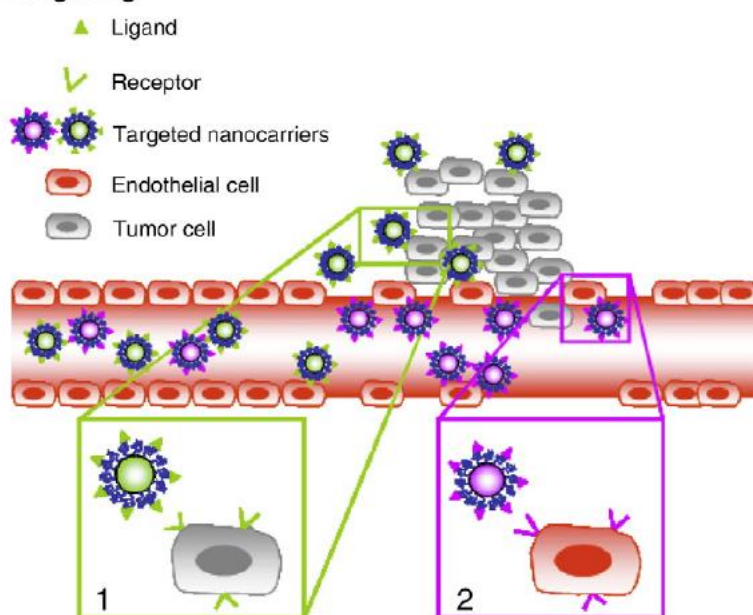
Výzkum nanočástic je v medicíně uplatňován i ve vývoji nových léčiv. Na ně jsou kladeny následující požadavky: dobře definovaná velikost a tvar, povrchové složení, a hlavně reprodukovatelná syntéza a vlastnosti. Zejména jejich velikost a tvar hrají hlavní roli při průchodu léčiva organismem. Společně s nimi je důležitý i povrch nanočástic, který interaguje s okolím, a na jeho základě dochází např. k navázání na krevní proteiny či vychytání v určité tkáni a dále jejich farmakologické a farmakokinetické charakteristiky (Khan et al. 2017, Bahrami et al. 2017).

Pohyb částic v organismu a cílení samotného systému do požadované tkáně probíhá několika způsoby. Jedním z nich je průchod částic organismem na základě jejich velikosti tzv. pasivní cílení (Bazak et al. 2014). Další možností vychytání léčiva v požadované tkáni je tzv. aktivní cílení, kdy dochází k interakci navázaného ligandu či antigenu na nosiči s receptorem přítomným v požadované tkáni (Marcucci & Lefoulon 2004). Oba způsoby cílení jsou uvedeny na **Obr. 2**.

A. Passive targeting



B. Active targeting



Obr. 2: Rozdíly mezi pasivním (A) a aktivním (B) cílením nanočástic v organismu (Danhier et al. 2010).

Velikost částic hraje také významnou roli v exkrecních mechanismech. Částice menší než 6 nm mohou volně procházet skrz stěny lymfatických cév (Barrett et al. 2006). Nejžádanější cestou exkrece nanočástic z organismu je vylučování ledvinami. Fyziologická velikost pórů v ledvinách je okolo 5 nm. Částice menší než 6 nm mohou být tedy volně filtrovány. Glomerulární filtrace částic o velikosti 6-8 nm pak závisí na jejich náboji. Vzhledem k negativnímu náboji samotné membrány mohou tedy snadněji procházet kladně nabitě částice. Částice větší než 8 nm pak nejsou ledvinami filtrovány a podléhají exkreci játry, čímž setrvávají v organismu déle (Deen et al. 2001). I z těchto důvodů je důležité věnovat pozornost velikosti a charakteru nanočástic, aby došlo k minimalizaci jejich toxicity a zkrácení doby expozice organismu těmito částicemi jen na dobu potřebnou pro diagnostiku či terapii.

S velikostí částic souvisí i tzv. EPR efekt (Enhanced Permeation and Retention), který je spojován právě s pasivním cílením částic do tkání, kde velikost použitého systému určuje, v jakém místě dojde k jeho hromadění (**Obr. 2A**) (Matsumura & Maeda 1986). Důležitým faktorem pro využití tohoto efektu k terapeutickým účelům je neoangiogeneze nádorové tkáně. Jedná se o vznik nových cév při tvorbě a růstu nové tkáně. Jelikož ale nádorová tkáň roste

výrazně rychleji, není tvorba nových cév v této tkáni dostatečně precizní, a tím se nádorová tkáň stává přístupnější pro různé velké částice. Zároveň není plně funkční ani odtok lymfy, a tím dochází k zadržování nahromaděných částic v dané tkáni. Další možností využití tohoto efektu je aplikace léčiva přímo do cévy, která zásobuje příslušnou tkáň. Na základě velikosti cévy a daného léčiva dojde k jeho vychytání (Bahrami et al. 2017, Bazak et al. 2014, Torchilin 2011). Z pohledu nukleární medicíny je jedním z příkladů tohoto využití TheraSphere™. Jedná se o možnost léčby hepatocelulárního karcinomu pomocí skleněných mikrokuliček s ⁹⁰Y, které jsou aplikovány katetrem přímo do cévy vyživující játra. Následně dojde k embolizaci jaterních cév a tedy k terapii požadované tkáně. Používá se však především pro léčbu pacientů, u kterých nelze postiženou část chirurgicky odstranit (TheraSphere).

Avšak než se dostanou nanočástice do nádorové tkáně, mohou být dříve organismem eliminovány. Tomu lze předejít povrchovou modifikací, čímž jsou upraveny vlastnosti použitých nanočástic. Jednou z používaných metod pro zlepšení farmakokinetického chování částic je tzv. PEGylace, tedy proces navázání polyethylenglykolů (PEG) o různých molekulárních hmotnostech na povrch nanočástic. Jedná se o změny v distribuci částic do tkání a jejich následnou eliminaci. Tuto modifikaci povrchu nanočástic lze také uplatnit při stabilizaci nanočástic v roztoku a tím zabránit jejich agregaci (Hamidi et al. 2006).

Problémem pasivního cílení je hlavně náhodnost zacílení do tkáně, a ne všechny nádorové tkáně vykazují EPR efekt. Těmto komplikacím lze předejít aktivním cílením na konkrétní tkáň (Bae & Park 2011, Marcucci & Lefoulon 2004). Pomocí specifického ligandu nebo antigenu nádorově specifického biomarkeru navázaného na nanonosiči dochází k aktivnímu cílení dané látky přímo do nádorové tkáně (**Obr. 2B**). Je využívána celá řada cílicích skupin jako monoklonální protilátky a jejich fragmenty, peptidy, aptamery, vitamíny či sacharidy (Danhier et al. 2010).

Předpokladem aktivního cílení je, že vazbou ligandu či antigenu na receptory nádorové tkáně dojde k selektivnímu vychytání léčiva v cílovém místě. Je důležité zvolit takový ligand, který bude vázán na významně exprimované receptory nádorové tkáně, a ne na zdravou tkáň, u které je počet receptorů podstatně nižší nebo zcela chybí. V ideálním případě by měly být receptory rozprostřeny na povrchu nádorových buněk homogenně. Spojením selektivního ligandu a léčiva, či v případě nukleární medicíny radionuklidu, je možné docílit jejich transportu a vychytání přímo v nádorové tkáni a tím snížit zátěž zdravé tkáně. Pokud je ligand navázaný na nanočástici, musí být vazba zprostředkována kovalentní vazbou přes tzv. spacer, aniž by nějakým způsobem ovlivňovala specifickou vazbu ligand-receptor (Van Butsele et al. 2007, Danhier et al. 2010, Marcucci & Lefoulon 2004).

2.3 Cílená radionuklidová terapie

Právě cílení léčiva v organismu, ať již pasivního či aktivního, využívá cílená radionuklidová terapie (TRT – angl. targeted radionuclide therapy). Touto metodou lze doručit terapeutický radionuklid do požadované tkáně a zároveň i do metastáz či buněčných shluků léčeného onemocnění. Na základě tohoto cílení je dosaženo systémové terapie onemocnění. Nejčastěji je využíván pro terapii leukémie či lymfomů, jelikož se jedná o vysoce radiosenzitivní tkáň (Ersahin et al. 2011). Hlavním cílem TRT je doručit radionuklid do nádorové tkáně, aniž by došlo k přílišnému vychytání ve tkáni zdravé. Ta v důsledku toho není vystavena ionizujícímu záření a zůstává nepoškozena.

Důležitým parametrem je výběr vhodného radionuklidu. V běžné klinické praxi jsou pro terapii používány především β^- radionuklidy. Ve výzkumu a klinických studiích jsou hojně zkoumány α radionuklidy, výjimku tvoří Xofigo[®], kterému je pozornost věnována později. Oba typy zářičů vykazují vysokou terapeutickou účinnost na základě jejich vysoké relativní biologické účinnosti, tj. poskytují silnou destrukci biologickému systému (Jackson et al. 2013). Vhodným parametrem pro jejich porovnání je především lineární přenos energie (LET – angl. linear energy transfer), tedy kolik energie předají na jednotkové dráze. Pro α částice je LET ~ 80 keV/ μ m a pro β^- částice 0,2–2,0 keV/ μ m. Je patrné, že u zářičů β^- volba vhodného radionuklidu závisí především na jeho energii (Kassis & Adelstein 2005). S ní souvisí i dosah částic v tkáni. Pro terapii větších nádorových ložisek je vhodné použít radionuklid s vyšší energií β^- záření např. ⁹⁰Y s maximální energií β^- částic 2,3 MeV, což představuje dosah okolo 215 buněčných průměrů (při definici buněčného průměru 20 μ m). Beta-emitory jsou schopny zničit i takové nádorové buňky, které nejsou v přímém kontaktu s radionuklidem. Pro menší objemy nádorových ložisek je vhodné využít radionuklidů s měkčím zářením např. ¹⁷⁷Lu, které má v tkáni menší dosah. Výhodou α zářičů oproti β^- zářičům je vyšší LET a tím i vyšší radiobiologická účinnost s menším dosahem, např. pro ²¹¹At bude dosah α částic pouze 3 buněčné průměry. Bylo vypočítáno, že frakce energie, která bude uvolněna v nádorové tkáni o průměru 200 μ m, bude pouze 1,5 % pro ⁹⁰Y avšak 50 % pro ²¹¹At. Ve srovnání s ²¹¹At je potřeba 1 000krát více přeměn ⁹⁰Y pro dosažení stejného efektu (Humm 1986).

Při porovnání α a β^- zářičů v terapii lze dospět k následujícím rozdílům: hmotnost α částic je přibližně 7 000× vyšší než hmotnost β^- částic a LET je cca 100× vyšší pro α částice, jejichž dosah v tkáni je pouze několik buněčných průměrů. Poškození DNA α částicemi, např. dvojitě zlomy, je pro buněčné reparační mechanismy mnohem hůře opravitelné než poškození způsobené β^- částicemi, které většinou vyvolávají jednoduché zlomy DNA. To souvisí především s hustotou ionizací, kterou tyto částice v průběhu své dráhy způsobí. Z těchto důvodů jsou α částice vhodnější pro malá nádorová ložiska s nižší radiační zátěží okolních zdravých buněk. Největší výhodou α zářičů je tedy velká depozice energie

v minimálním objemu, a tedy možnost přesného zacílení terapeutické dávky, čehož využívá cílená alfa terapie (TAT – angl. targeted alpha therapy) (Welch & Redvanly 2003).

Dalším důležitým parametrem pro výběr vhodného radionuklidu je jeho poločas přeměny. Ten by měl být dostatečně dlouhý, aby bylo možné zajistit přípravu zvoleného radionuklidu, jeho navázání na nosič, transport na kliniku a po jeho aplikaci pacientovi jeho lokalizaci v cílové tkáni, kam by měla doputovat potřebná dávka pro likvidaci nádorové tkáně. Zároveň by ale neměl být příliš dlouhý, aby zbytečně nezatěžoval organismus. Optimální poločas přeměny používaných radionuklidů v TRT se pohybuje od šesti hodin do sedmi dnů, např. ^{211}At ($T_{1/2} = 7.2$ h), ^{67}Cu ($T_{1/2} = 2,6$ d), ^{177}Lu ($T_{1/2} = 6,7$ d), ^{90}Y ($T_{1/2} = 2,7$ d) (Qaim 2001, Dash et al. 2013).

Důležitým kritériem vhodnosti daného radionuklidu je i způsob jeho přípravy. Aby bylo možné radionuklid navázat na cílicí molekulu a získat použitelný produkt z pohledu nukleární medicíny, musí být vybrán radionuklid s dostatečnou specifickou aktivitou i radionuklidovou a radiochemickou čistotou. Cílicí molekula by měla vykazovat vysokou afinitu pro vazbu s daným radionuklidem a být v dostatečné chemické čistotě. Výsledné radiofarmakum pak musí vykazovat vysokou radiochemickou čistotu. V případě nesplnění některého z dříve uvedených požadavků může dojít ke znečištění či znehodnocení výsledného produktu a tím ke snížení jeho účinnosti (Dash et al. 2013).

Pro systematický a ucelený průběh terapie je vhodné zvolený systém pro TRT rozšířit i pro diagnostiku a vytvořit tak teranostický koncept vhodný pro personalizovanou medicínu. Jednak z důvodu lokalizace nádorové tkáně před terapií a dále pro sledování úspěšnosti terapie a správnosti vychytávání terapeutického radionuklidu. Existuje několik možností, jak k tomuto konceptu přistoupit:

- Nejjednodušším způsobem je zvolit terapeutický radionuklid, který zároveň emituje i gama záření. Vhodná energie záření gama se pohybuje v rozmezí 70 – 300 keV, ideálně pak kolem 100 – 140 keV. Při těchto energiích dochází k maximální účinnosti detekce záření systémy používanými v nukleární medicíně, konkrétně jednofotonovou emisní výpočetní tomografií (SPECT, angl. single-photon emission computed tomography), což vede ke snížení minimální dávky potřebné pro kvalitní zobrazování a tím i minimalizaci radiační zátěže pacienta (Kraeber-Bodere et al. 2015, Dash et al. 2013). Nejběžněji a nejdéle používaným teranostickým modelem je ^{131}I , kterým je prováděna terapie diferencovaných karcinomů štítné žlázy pomocí β^- záření. Emitované γ záření tohoto radionuklidu je využíváno pro diagnostické účely či kontrolu průběhu terapie (Beierwaltes 1978).
- Alternativou je využití dvou radioizotopů téhož prvku. Příkladem může být již dříve zmíněný ^{131}I , avšak pro diagnostické účely je vhodnější použít ^{123}I . Této dvojice

navázané na noradrenalinový analog – *m*-jodbenzylguanidin – je v klinické praxi běžně využíváno k terapii neuroendokrinních karcinomů (Feine et al. 1987).

- Další možností je využití stejného cílicího systému ale s diagnostickým radionuklidem jiného prvku než je radionuklid terapeutický. Zde se pak nabízí využití nejběžněji používaných diagnostických radionuklidů v nukleární medicíně jako je ^{99m}Tc pro jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT, angl. single-photon emission computed tomography) nebo ^{18}F pro pozitronovou emisní tomografii (PET, angl. positron emission tomography) (Qaim 2015).

2.3.1 Cílená alfa terapie

Tato kapitola vychází z publikace A, která je zaměřena na přehled využívaných radionuklidů a jejich nosičů v cílené alfa terapii.

Alfa radionuklidy pro TRT jsou voleny především z důvodu jejich vysoké relativní biologické účinnosti a vysokému LET. Jejich další výhodou je vysoká energie emitované α částice. Prvním α radionuklidem použitým pro terapii bylo ^{226}Ra , které v minulosti sloužilo k terapii. Na základě dat získaných z těchto terapií bylo rozvinuto studium účinků záření na organismus. Prvními α radionuklidy studovanými pro TAT byly atomy přeměňující se pouze jednou α přeměnou, např. ^{211}At (Zalutsky et al. 2007, 2008). Následně byla pozornost věnována tzv. *in vivo* generátorům, kde dochází ke kaskádě α přeměn, např. ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th nebo ^{213}Bi . Během ní dojde k uvolnění značné energie v tkáni a tím lze snížit potřebnou aplikovanou aktivitu terapeutického radionuklidu (Allen 2013, Sgouros et al. 1999, Nilsson et al. 2005).

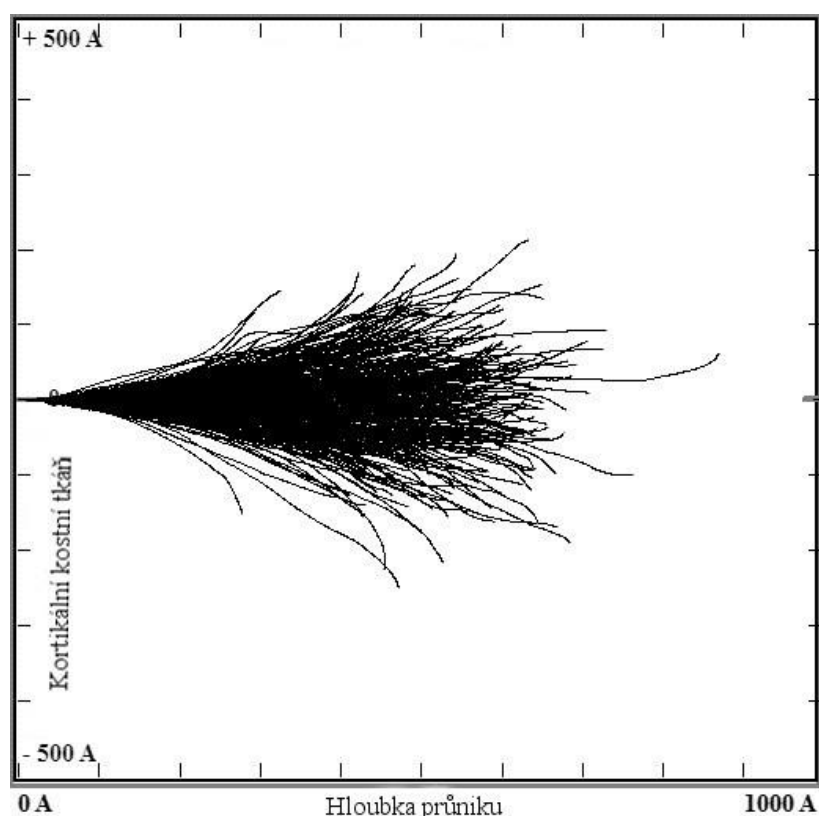
Použití α radionuklidů má však i přes nespornou řadu výhod, spoustu úskalí. Jedním z největších problémů je přítomnost β^- zářičů jakožto dceřiných radionuklidů, obzvláště těch s delším poločasem přeměny. Tyto dceřiné produkty mohou způsobit významné radiační poškození okolní tkáně. S tím souvisí i již zmiňovaná vysoká uvolněná energie, která je výhodou pro terapii, avšak je velkou komplikací z důvodu vyšší radiolýzy radiofarmaka. Obzvláště důležité je to při použití kaskádovitě se přeměňujících α radionuklidů (Allen 2013, De Kruijff et al. 2015).

Dalším úskalím je chování dceřiných jader. V případě, že dceřiný nuklid je již stabilní nebo má značně dlouhý poločas přeměny, nedochází tak k výraznému zatížení zdravé tkáně ze záření pocházejícího právě z dceřiných jader. Problém nastává v případě '*in vivo*' generátorů, kde může dojít k uvolnění dceřiných radionuklidů, které mohou být kvůli odlišným chemickým i biologickým vlastnostem distribuovány po celém organismu a následně poškodit zdravou tkáň (Allen 2013, De Kruijff et al. 2015, Dekempeneer et al. 2016).

S tím souvisí i výběr vhodného nosiče pro α radionuklidy. Energie chemické vazby se pohybuje okolo 4 – 7 eV. Kinetická energie odraženého dceřiného atomu dosahuje přibližně 100 keV,

což představuje několika řádový rozdíl. (Thijssen et al. 2012). U většiny využívaných léčiv jsou nosičem radionuklidů organické molekuly. Ty však nemohou sloužit jako nosiče kaskádovitě přeměňujících se α radionuklidů, jelikož s vysokou pravděpodobností dojde k přerušení vazby při přeměně radionuklidu, a tedy k uvolnění produktů přeměny do oběhu. Stabilizací dceřiných jader v místě jejich vzniku je pak možné docílit přesného cílení a uvolnění energie v požadované tkáni, aniž by docházelo k přílišné zátěži okolní tkáně. Jednou z možných cest vývoje nosičů pro α radionuklidy jsou právě anorganické materiály ve formě nanočástic, které jsou radiačně stabilnější než organické látky (Liong et al. 2008, Dekempeneer et al. 2016).

Příklad simulace stopy uvolněného odraženého dceřiného atomu je uveden na **Obr. 3**. Simulace byla provedena pro radionuklid ^{219}Rn pocházející z přeměny ^{223}Ra v kortikální kostní tkáni. Předpokladem bylo centrální umístění mateřského radionuklidu v nanočástici o poloměru 50 nm (500 Å). V uvedeném případě dochází k uvolnění více než 5 MeV, kde tato energie je rozdělena mezi α částici odnášející převážnou část energie a dceřiný atom, který odnáší energii cca 100 keV. Z **Obr. 3** je patrné, že odražený atom může uniknout z nanočástice, avšak pokud se odražený atom nachází v blízkosti jejího povrchu, může dojít k jeho zpětné sorpci (Kozempel & Vlk 2014).



Obr. 3: Simulace stopy uvolněného odraženého dceřiného atomu ^{219}Rn o energii 100 keV z bodového zdroje (500 opakování) v materiálu představujícím kortikální kostní tkáň ($\rho = 1,92 \text{ g/cm}^3$) (Kozempel & Vlk 2014).

Také byly vypočítány hodnoty dosahů odraženého atomu ^{219}Rn v různých materiálech, které jsou uvedeny v **Tab. 1**. (Kozempel & Vlk 2014). Hodnoty byly získány využitím metody

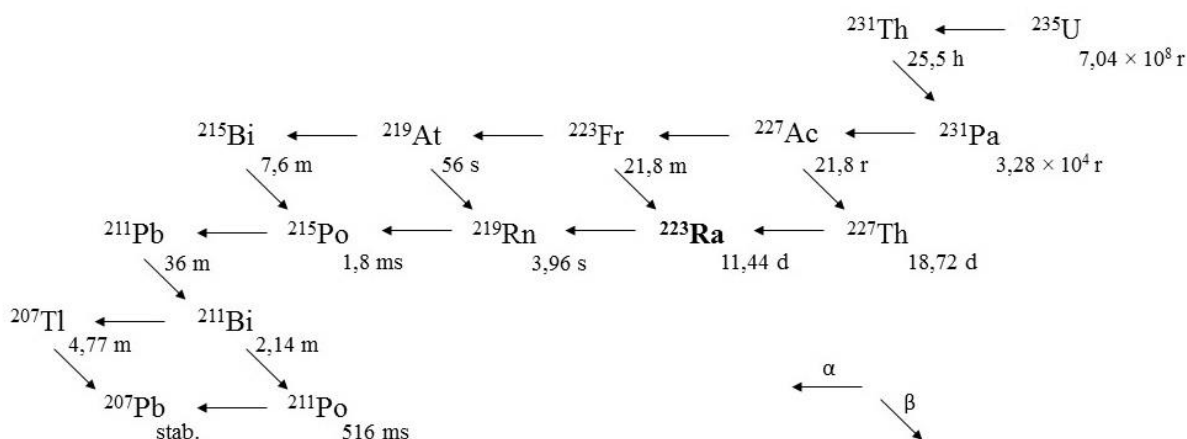
Monte-Carlo v programu SRIM-2013 (Ziegler 2013). Z **Tab.1** je patrné, že dolet odraženého atomu v kortikální kosti či TiO_2 je okolo 50 nm, avšak např. ve zlatě pouze okolo 10 nm.

Tab. 1: Vypočítané hodnoty dosahu uvolněného odraženého dceřiného atomu ^{219}Rn s energií 100 keV v různých materiálech (Kozempel & Vlk 2014).

Materiál	Dosah [nm]
Au	11
Ag	15
$\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ $\rho = 3,98 \text{ g/cm}^3$	25
SiO_2	43
TiO_2	45
kortikální kost $\rho = 1,92 \text{ g/cm}^3$	50
voda	86
poly(methyl metakrylát) $\rho = 0,95 \text{ g/cm}^3$	87

2.3.2 Radium-223

Pro potřeby TAT je studována celá řada α radionuklidů. V rámci této práce byla pozornost zaměřena především na ^{223}Ra . Tento radionuklid má poločas přeměny 11,4 dne a přeměňuje se kaskádou α a β^- přeměn na stabilní ^{207}Pb (**Obr. 4**). Dceřiné radionuklidy mají krátké poločasy přeměny, přičemž nejdelší, 36 minut, má ^{211}Pb . Jedná se o kritickou část kaskády vzhledem k jeho poločasu a druh přeměny, jelikož se jedná o β^- zářič. Jednou z výhod ^{223}Ra , oproti jiným radioizotopům radia, je kratší poločas přeměny dceřiného radonu (^{219}Rn – 3,96 sekund, např. oproti ^{220}Rn – 55,5 sekund – z přeměnové řady ^{224}Ra), a tedy pravděpodobnost jeho emanace z cílené tkáně je výrazně nižší (Nuclear Data).



Obr. 4: Přeměnová řada ^{235}U .

Jako zdroj ^{223}Ra je využíván radionuklidový generátor $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$. Poločas přeměny mateřského radionuklidu – ^{227}Ac , je 21,8 let a je tedy vhodný jako dlouhodobý zdroj ^{223}Ra . Pro přípravu (Kozempel et al. 2015, Guseva et al. 2004) generátoru lze použít ^{227}Ac v rovnováze se svými přeměnovými produkty, které je nasorbováno na iontoměnič (silně bazický anex, DOWEX-1×8) ve skleněné či plastové kolonce. Eluce je následně prováděna směsí 0,7 M HNO_3 a 80% methanolu.

V důsledku analogie radia s kovy alkalických zemin lze využít cílení samotného radionuklidu pomocí stejných metabolických procesů či k přípravě různých sloučenin na základě preference těchto iontů. Radium-223 bude tedy v organismu sledovat metabolismus vápníku a na základě toho bude selektivně cíleno do kostní tkáně. Konkrétně je vychytáváno v místě zvýšené metabolické aktivity, což jsou i kostní metastázy, a tvoří zde komplexy s hydroxyapatitem. Tohoto způsobu cílení využívá právě léčivý přípravek Xofigo[®]. Jedná se o $^{223}\text{RaCl}_2$, který je schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, angl. U.S. Food and drug administration). Dodává se v podobě injekčního roztoku o objemové aktivitě 1 100 kBq/ml. Indikace pro použití přípravku je kastročně rezistentní karcinom prostaty se symptomatickými metastázami v kostech, bez známých viscerálních metastáz. Intravenózně podávaná aktivita je 55 kBq/kg tělesné váhy každé 4 týdny. Celkem je podáváno 6 injekcí přípravku (SPC - Xofigo).

První klinická studie s ^{223}Ra pro paliativní léčbu kostních metastáz byla provedena v roce 2005 (Nilsson et al. 2005). Bylo zjištěno, že ^{223}Ra je velmi dobře tolerováno a vzhledem k jeho slabým vedlejším účinkům by mohlo představovat alternativu k běžně používaným postupům paliativní léčby. Dále následovala první fáze klinického hodnocení, kde byla sledována farmakokinetika, farmakodynamika a biodistribuce $^{223}\text{RaCl}_2$. Bylo zjištěno rychlé vyloučení z cév a biodistribuce ukázala časný přechod do tenkého střeva a vylučování převážně stolicí oproti exkreci močí. Nebyla pozorována žádná toxicita omezující dávku (Carrasquillo et al. 2013).

Druhá fáze klinické studie byla provedena z důvodu hledání vztahu mezi dávkou a účinkem a zmírněním bolestivosti pomocí ^{223}Ra (Nilsson et al. 2012). Ve třetí fázi klinické studie byla získána informace o vlivu $^{223}\text{RaCl}_2$ na přežití pacientů - ALSYMPCA (angl. Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer Patients). Jednalo se o hodnocení klinické bezpečnosti a účinnosti přípravku ve dvojitě zaslepené studii s náhodným výběrem (Parker et al 2013). Další klinická studie týkající se $^{223}\text{RaCl}_2$ byla zaměřena na retrospektivní zkoumání pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty, kteří byli léčeni ^{223}Ra . Bylo zjištěno, že pacienti dobře tolerují chemoterapii a sekundární hormonální terapii doprovázenou ^{223}Ra . Na druhé straně ale vzrostlo riziko selhání kostní dřeně se současným externím ozařováním (Etchebere et al. 2016).

V současné době byla aplikace Xofigo[®] výrazně omezena z důvodu vedlejších účinků zjištěných v průběhu probíhajících rozšiřujících klinických studií již schváleného radiofarmaka, např. z důvodu rozšíření indikací. Nyní je přípravek používán za důsledného dodržování specifických indikací na základě doporučení od Farmakovigilančního výboru pro posuzování rizik léčiv (PRAC, angl. Pharmacovigilance Risk Assessment Committee) Evropské lékové agentury (EMA, angl. European Medicines Agency) (EMA: PRAC recommendation). Toto doporučení bylo zavedeno na základě přehodnocení přínosů a rizik léčby přípravkem Xofigo[®]. Bylo zjištěno, že z prozatím nezjištěných příčin dochází k dřívějšímu úmrtí oproti skupině pacientů, které bylo podáváno placebo, a dále mají pacienti vyšší výskyt zlomenin v důsledku oslabení kostí. Na základě těchto poznatků a dalších kombinací s léčivými byly vymezeny konkrétní indikace, pro které je léčba přípravkem Xofigo[®] vhodná.

Nyní je ²²³Ra využíváno pouze jako paliativní léčba a to jen pro velice konkrétní indikace z důvodu možných vedlejších účinků. S tím souvisí i výše rozebíraný únik odražených dceřiných jader. Jedním z možných řešení je nalezení vhodného nosiče pro přesné zacílení léčiva a jeho zadržení v tkáni, aby se zabránilo jeho nekontrolovatelnému šíření v organismu a tím nedocházelo ke zvýšené radiační zátěži. Pozornost výzkumu TAT je v dnešní době upřena především právě na přípravu a charakterizaci vhodných materiálů pro transport radionuklidů.

2.4 Nosiče radionuklidů pro cílenou radionuklidovou terapii

Kromě vhodného terapeutického radionuklidu je důležité zvolit i vhodný nosič. V ideálním případě by měl splňovat následující požadavky (Gudkov et al. 2015).

- Cílicí molekula či určitá část cílicího systému musí vykazovat vysokou afinitu a specificitu pro cílenou tkáň.
- Celý cílicí systém by měl být pro organismus minimálně toxický, jednoduše odbouratelný a snadno vylučitelný z organismu.
- Systém by měl být stabilní v čase, aby nedocházelo k degradaci při skladování, ale také při kontaktu s biologickými matricemi. Nosič by měl být i dostatečně radiačně stabilní.
- Nosič by měl mít dostatečnou chemickou čistotu, aby nedocházelo k interferencím při značení a následně pak při vychytávání v organismu. Jeho příprava by měla být nákladově efektivní.
- Na nosič by mělo být možné navázat širokou škálu radionuklidů.

Dříve byly zmíněny také nevýhody TAT, kde nejpálčivější z nich je únik dceřiných radionuklidů ze systému. Existuje několik přístupů, jak tento problém řešit, a ty byly shrnuty kolektivem autorů Kruijff et al. (2015).

- Jedním z nich je využití aktivního cílení v kombinaci s rychlým vyloučením léčiva z organismu. Jedná se tedy o rychlé vychytávání α zářičů v nádorových buňkách pomocí peptidů či protilátek, přičemž jejich v tkáni nevychytaná část je rychle odstraněna.
- Další možnost je lokální podávání jako je např. intratumorální injekce přímo do nádoru či do jeho blízkosti.
- Pozornost je také věnována enkapsulaci mateřského radionuklidu v nanonosiči. Tento nosič by měl být z takového materiálu, který je schopen zvládnout odraz dceřiného radionuklidu. Pro tyto účely byly zkoumány zeolity, liposomy, polymeromy a částice na bázi kovu či jejich oxidů. Kvantitativní určení zpětného rázu u těchto systémů není vždy jednoduché, jelikož může docházet k opětovnému vychytání nosičem.

V následující podkapitole 2.4.1 Nosiče alfa radionuklidů jsou uvedeny vybrané nanočásticové systémy studované pro potřeby TAT. Pozornost je zaměřena na polymerní nanočástice a anorganické materiály.

2.4.1 Nosiče alfa radionuklidů

Jedním ze studovaných nanonosičů pro TAT jsou polymery, kterým je věnována např. studie zabývající se možnostmi využití blokových kopolymerů. Ty jsou složeny z hydrofilního a hydrofobního bloku a byly studovány jako nosiče ^{225}Ac . Na základě experimentálních dat porovnávaných s výsledky modelování pomocí Monte Carlo metody byl studován únik dceřiných jader. Bylo zjištěno, že nejvýhodnějším modelem je dvouvrstvý váček, kdy radionuklid je zapouzdřen uvnitř (Thijssen et al. 2012). Studovány byly také lipidové váčky modifikované buď lidskou protilátkou PSMA (prostatický specifický membránový antigen) či nízkomolekulárním agens na bázi močoviny. Uvnitř váčku bylo opět zapouzdřeno ^{225}Ac . Jako kontrolní systém byla zvolena samotná protilátka PSMA značená radionuklidem. Oproti tomuto kontrolnímu systému vykazoval modifikovaný systém vyšší účinnost pro likvidaci nádorových buněk (Zhu et al. 2015).

Zajímavou možností systému pro TAT představují uhlíkové nanotrubičky. Jedná se o 20-50 nm dlouhé nosiče, které mají přibližně 1 nm v průměru, které byly značeny ^{211}At . Byla studována stabilita *in vitro* ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku a krevním séru s příznivými výsledky, avšak kvůli vysoké toxicitě uhlíkové nanotrubičky nejsou vhodné pro využití v TAT (Hartman et al. 2007).

Mezi studované nanočástice pro TAT patří také zeolity, což jsou biokompatibilní krystalické hlinitokřemičité materiály. Jejich zajímavost tkví v prostorovém uspořádání, kdy je struktura tvořena kanálky a dutinkami, které mají konstantní rozměry. V intersticiálních polohách jsou zachyceny ionty alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Toho bylo využito pro syntézu nanozeolitů značených radioizotopy Ra (Piotrowska et al. 2013).

Studovány byly také core-shell nanočástice fosforečnanu lanthanitého, LaPO_4 , kde bylo uvnitř enkapsulováno ^{223}Ra nebo $^{225}\text{Ra}/^{225}\text{Ac}$. Radioaktivně značené jádro bylo obaleno jednou či dvěma vrstvami LaPO_4 . Se zvyšujícím se počtem těchto vrstev se snižovalo uvolňování mateřských a následně dceřiných radionuklidů (Rojas et al. 2015).

V neposlední řadě jsou prováděny studie i s hydroxyapatity (HAp), což jsou minerální látky přirozeně se nacházející v kostní tkáni či zubech. Z důvodu jejich biokompatibility jsou běžně používány ve formě bločků či prášku k náhradě kosti a jsou schváleny FDA a EMA. Pro TAT jsou vhodné i kvůli jejich radiační stabilitě. Již bylo studováno jejich značení ^{223}Ra , které na základě analogie s vápníkem může při inkorporaci radionuklidu do struktury hydroxyapatitu nahradit jeho místo (chemický vzorec HAp je $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$). Uvolněné aktivity byly studovány ve fyziologickém roztoku a po 24 hodinách bylo uvolněno méně než 5 % celkové aktivity (Kozempel et al. 2014). Další studie zaměřené na nanočástice hydroxyapatitu (*nHAp*) značený ^{223}Ra jsou součástí této disertační práce, jelikož jsou publikovány společně s výzkumem oxidu titaničitého značeného ^{223}Ra .

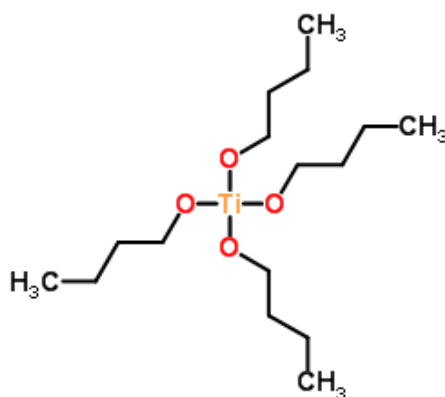
Z kovových materiálů byly v rámci TAT připraveny nanočástice stříbra obalené polyethylen oxidem (PEO), které odpuzují plazmatické proteiny a spolu se správnou velikostí částic mohou chránit před pohlcením makrofágy. Takto modifikované nanočástice byly značeny ^{211}At (Kučka et al. 2006). Také byly studovány nanočástice zlata, které vytvářely silné kovalentní vazby na jejich povrchu právě s halogeny a tedy i s ^{211}At . Zlaté nanočástice byly modifikovány Substancí P a následně byly značeny. Byla zjištěna vysoká stabilita *in vitro* a vysoká cytotoxicita pro gliomové buňky (Dziawer et al. 2017).

Perspektivním typem studovaného materiálu jsou magnetické částice, které se již po dlouhá léta využívají k terapii např. pro léčbu chudokrevnosti z nedostatku železa (Kumpf & Holland 1990). Super-paramagnetické nanočástice oxidů železa (SPIONs – angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles) bývají obklopeny biokompatibilním materiálem jako je např. dextran nebo polyethylen glykol. Kontrastní látky založené na těchto nanočásticích vykazují vysokou relaxaci v rámci magnetické rezonance (MRI – angl. magnetic resonance imaging). V nukleární medicíně jsou studovány především pro potřeby diagnostiky. Pro zobrazování SPECT/MRI byly tyto nanočástice značeny $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Madru et al. 2012). Pro zobrazování PET/CT byly dextranem obalené nanočástice značeny ^{18}F (Devaraj et al. 2009). Jejich využití s terapeutickými radionuklidy je také studováno, např. s ^{223}Ra , přičemž je vykazována dobrá stabilita *in vitro*. Bylo zjištěno, že proces záchytu ^{223}Ra nanočásticemi odpovídá sorpci a povrchové komplexaci spíše než mechanismu srážení. Počáteční vychytávání ^{223}Ra na povrchu je následováno pomalejším procesem zabudování ^{223}Ra do intersticiálních poloh (Mokhdoeva et al. 2016).

2.4.2 Oxid titaničitý

Jedním z vhodných anorganických nosičů pro α radionuklidy je právě TiO_2 . Jedná se o nejstabilnější sloučeninu titanu, která se v přírodě nachází ve třech modifikacích – čtverečný rutil a anatas, a kosočtverečný brookit. Jeho celosvětově nejznámější použití je v práškové formě jako tzv. titanová běloba, což je kvalitní bílý neprůhledný pigment. Ročně je ho vyrobeno přes 4 miliony tun. Je používán v potravinářství při výrobě žvýkaček, cukrovinek, omáček nebo sýrů, kde je znám pod kódem E171 (Státní zdravotní ústav). Dále ho nalezneme v papírenství a keramice jako bělicí složku barev a nátěrů. Na základě svých optických vlastností, tj. vysoké absorpci ultrafialového záření, je využíván i jako aktivní složka opalovacích krémů (Salvador et al. 2000). V neposlední řadě je pak používán jako plnicí materiál v léčivých přípravcích či kosmetice a zubních pastách a to na základě jeho biokompatibility a nízké toxicity (Toxicology Data Network). Jeho použití je povoleno v celé Evropské Unii s výjimkou dětské výživy.

Oxid titaničitý je hojně využíván především pro jeho rychlou, levnou a snadnou produkci i ve velkém měřítku. Má velký měrný povrch, je vysoce stabilní, a to i radiačně a lze připravit částice různých velikostí. V provozní praxi se využívá přírodních zdrojů, které jsou následně zpracovávány tzv. sulfátovým nebo chloridovým procesem (Integrated Pollution Prevention and Control). Dalšími metodami pro přípravu TiO_2 jsou využívány např. metody sol-gelové, hydrotermální či obecněji solvotermální, oxidace nebo hydrolýzy. Sol-gel metoda je často používána pro přípravu různých keramických materiálů. Oxid titaničitý lze touto metodou připravit s průměrnou velikostí částic okolo 30 nm (Kanna & Wongnawa 2008). Solvotermální metody jsou vhodné pro přípravu sloučenin s různou morfologií. Jsou používána organická rozpouštědla jako ethanol, aceton nebo ethylenglykol. Pokud je jako rozpouštědlo použita voda, jedná se o metodu hydrotermální. V závislosti na teplotě byly získány nanočástice o velikosti 8-17 nm (Cheng Wang et al. 2002). Jednoduchou a rychlou metodou pro přípravu TiO_2 je hydrolýza tetrabutyl *orthotitanátu* (TBOT, **Obr. 5**) v alkoholu (např. propan-2-ol). Velikost připravených nanočástic se pohybovala mezi 7 až 28 nm (Zhang et al. 2000).



Obr. 5: Tetrabutyl *orthotitanát*.

Ačkoliv je TiO_2 používán v celé škále aplikací, jeho potenciál není zdaleka vyčerpán. Jedna ze zajímavých studií je výzkum TiO_2 jakožto sorbentu využívaného pro dekontaminaci především vod kontaminovaných např. barvivy (Maruszewaka & Podsiadly 2016), či anorganickými ionty jako Zn^{2+} (Li et al. 2008), As^{3+} a As^{5+} (Pena et al. 2005; Jagadeesan et al. 2010), Fe^{2+} (Nano & Strathmann 2006) apod. Z uvedených studií vyplývá, že kinetika sorpce na TiO_2 je velmi rychlá. Pohybuje se od pár minut do několika hodin v závislosti na typu kontaminantu. Důležitým parametrem pro popis daného sorbentu je i hustota povrchových funkčních skupin obecně označovaných SOH nebo edge site či povrchových funkčních skupin vznikajících izomorfní substitucí kationtů, což vede k trvalému negativnímu náboji na povrchu nanočástic neboli layer site (Filipská & Štamberg 2005, SÚRAO 2002). Z databáze vyplývá předpoklad pro vhodnost TiO_2 jakožto nosiče, jelikož hustota funkčních skupin typu edge site TiO_2 je 0,3 mol/kg (RES3T). Dalším zajímavým parametrem popisujícím sorpci na daný materiál je jeho sorpční kapacita, která se u TiO_2 pro většinu anorganických iontů pohybuje okolo 5 mg/g (Vasileva et al. 1996). V případě zaměření se na sorpci radionuklidů na TiO_2 jakožto dekontaminačního činidla, je jeho použití omezeno především na vychytávání izotopů uranu a uranylových solí pro potřeby úložiště jaderného odpadu (Comarmond et al. 2011, Tits et al. 2015). V nukleární medicíně je již používán jako jeden z možných sorbentů mateřského radionuklidu v radionuklidovém generátoru $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Dceřiný radionuklid je následně eluován sterilní ultračistou 0,1 mol/L kyselinou chlorovodíkovou (SPC - GalliaPharm).

Jak bylo zmíněno výše, TiO_2 je používán a studován jako sorbent. Z důvodu jeho biokompatibility a nízké toxicity je studován i jako nosič radionuklidů. To je i podpořeno jeho vysokou hodnotou střední letální dávky - LD_{50} - při orálním podání krysám, která byla vyšší než 10 g/kg, a to především z důvodu jeho možného dlouhodobějšího setrvání v organismu (Toxicology Data Network). Oxid titaničitý značený radionuklidy je především využíván pro studium jeho biodistribuce v tkáních a orgánech. K tomu byl použit ^{48}V , který je vzhledem k jeho poločasů přeměny vhodným stopovačem pro studium dlouhodobého chování v organismu (Nuclear Data). Lze využít jaderné reakce $^{48}\text{Ti}(p,n)^{48}\text{V}$, pomocí které lze získat přímo značený TiO_2 na cyklotronu. Bylo zjištěno, že jadernou reakcí nedochází ke strukturálním změnám a lze tedy takto značené nanočástice využít ke studiu jejich distribuce. Pomocí nich byl studován *in vivo* transport průmyslově vyráběných nanočástic v tkáni plic (Abbas et al. 2010). Stejným způsobem značený TiO_2 byl využit i pro toxikologickou studii kinetiky a jeho vylučování u potkanů. Po intravenózní aplikaci byla nejvyšší akumulace po 24 hodinách zjištěna v játrech a nadále zůstávala konstantní (Kreyling et al. 2017 - Part 1). Po 1 hodině od orální aplikace prošlo přes gastrointestinální bariéru 0,6 % podané dávky a po 7 dnech bylo distribuováno v těle 0,05 % podané dávky (Kreyling et al. 2017 - Part 2). Posledním studovaným způsobem podání značených nanočástic byla intratracheální aplikace, při které prošla přes bariéru 4 % podané dávky (Kreyling et al. 2017 - Part 3). Na základě těchto distribučních studií lze potvrdit radiační odolnost TiO_2 , jelikož nedošlo ke strukturálním

změnám ani po jeho ozařování na cyklotronu. Předpokládané dávky při jeho použití jako nosiče terapeutických radionuklidů budou nižší než při již zmíněném ozařování.

Pro krátkodobější sledování chování TiO_2 v organismu je vhodné použít radionuklidy s kratším poločasem přeměny jako je např. ^{18}F . Byl připraven ^{18}O -obohacený TiO_2 a ten byl následně ozářen protonovým svazkem za vzniku ^{18}F značeného TiO_2 . Po intravenózní aplikaci byly nanočástice také nalezeny v největší míře v játrech (Pérez-Campaña et al. 2014). Dalším diagnostickým radionuklidem využitým pro značení TiO_2 bylo ^{68}Ga . To bylo zvoleno z důvodu vyzařování Čerenkovova záření jakožto vnitřního světelného zdroje pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění (Duan et al. 2018).

Bez využití cyklotronu lze připravit značený TiO_2 také pomocí radioizotopů titanu - $^{44,45}\text{Ti}$ - s poločasy přeměny 63 let a 185 minut pro dlouhodobé a krátkodobé distribuční studie (Nuclear Data). Pomocí nízko-teplotní difúze lze docílit značení beze změny fyzikálních a chemických vlastností značeného materiálu (Hildebrand et al. 2015). Pro potřeby TAT byl studován TiO_2 značený ^{225}Ac . Byly připraveny funkcionalizované nanočástice, kde byla na povrch nanočástice navázána Substance P a následně byly značeny iontově výměnnou reakcí ^{225}Ac na povrchových funkčních skupinách nanočástice. Stabilita *in vitro* ukázala uvolnění okolo 10 % pro dceřinné produkty po 10 dnech od značení. S ohledem na vysoký cytotoxický účinek *in vitro* v glionových buňkách se jedná o slibný radiokonjugát pro terapii nádorů mozku (Cedrowska et al. 2018). Dalším studovaným radionuklidem pro TAT byl ^{211}At . Z důvodu slabé vazby mezi astatem a atomy uhlíku v biomolekulách a s ohledem na radiační stabilitu těchto molekul byl navržen nosič skládající se z nanočástic oxidu titaničitého ($n\text{TiO}_2$) modifikovaného atomy stříbra adsorbovanými na povrchu nanočástic. Značené nanočástice vykazovaly vysokou stabilitu *in vitro* v různých matricích (Cedrowska et al. 2016).

Jak je patrné z výše uvedených studií, oxid titaničitý je zajímavým materiálem, již studovaným a používaným jako sorbent. Několik studií je zaměřeno i na jeho značení pomocí radionuklidů, avšak jeho využití jakožto nosiče radionuklidů pro cílenou radionuklidovou terapii je prostudováno minimálně. Jeho vlastnosti ho předurčují k tomu být perspektivním kandidátem vhodným pro nukleární medicínu a na toto téma je zaměřena právě tato disertační práce.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem této disertační práce byla příprava nosiče vhodného pro cílenou alfa terapii v nukleární medicíně. Zvláštní pozornost byla věnována terapeutickému radionuklidu ^{223}Ra . Druhým studovaným radionuklidem bylo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pro potřeby diagnostiky. Zvoleným studovaným materiálem byly nanočástice oxidu titaničitého.

Postup prací vedoucích k dosažení hlavního cíle disertační práce byl rozdělen na následující dílčí části:

1. Syntéza nanočástic a jejich charakterizace

Připravit dostatečné množství $n\text{TiO}_2$ metodou hydrolyzy tetrabutyl *orthotitanátu*. Následně provést její optimalizaci a charakterizovat připravené nanočástice pomocí analytických metod.

2. Sorpční experimenty

Provést sorpční experimenty připraveného materiálu s ^{223}Ra v závislosti na pH po dobu 24 hodin. Získaná data použít pro modelování a stanovit pravděpodobný typ sorpčního mechanismu.

3. Kinetické experimenty

S ohledem na výsledky sorpčních experimentů popsat kinetiku sorpce ^{223}Ra při zvoleném pH po dobu 24 h. Experimentálně získaná data opět použít pro modelování a najít nejpravděpodobnější typ řídicího děje.

4. Značení připraveného materiálu

Označit připravené nanočástice radionuklidy ^{223}Ra a $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Pro značení použít následující dvě metody: povrchovou sorpci na již připravený nosič a inkorporaci radionuklidu přímo do struktury nosiče.

5. Stabilitní studie *in vitro*

Prozkoumat *in vitro* stabilitu značených nosičů ve fyziologickém roztoku a biologických matricích (hovězí krevní plasma a sérum, roztoky albuminu). Sledovat uvolnění aktivity v čase.

4. Komentář k souboru publikovaných prací

Publikace A je rešeršní prací předkládající podstatu TAT a byla popsána v kapitole 2.3.1 Cílená alfa terapie. V rámci tohoto oddílu jsou komentovány výsledky uvedené v *publikacích B - E*. Z kompletních výsledků uvedených v předkládaných publikacích jsou vybrány ty, které se týkají této disertační práce. Oddíl je rozdělen na jednotlivé kapitoly podle dílčích cílů disertační práce. Na začátku každé kapitoly je pak uvedena publikace, ve které byly výsledky publikovány.

4.1 Syntéza nanočástic a jejich charakterizace

V rámci této kapitoly je pozornost věnována metodě přípravy nanočástic oxidu titaničitého, její optimalizaci a následné charakterizaci připravených nanočástic. Předkládané výsledky byly uvedeny v publikaci B.

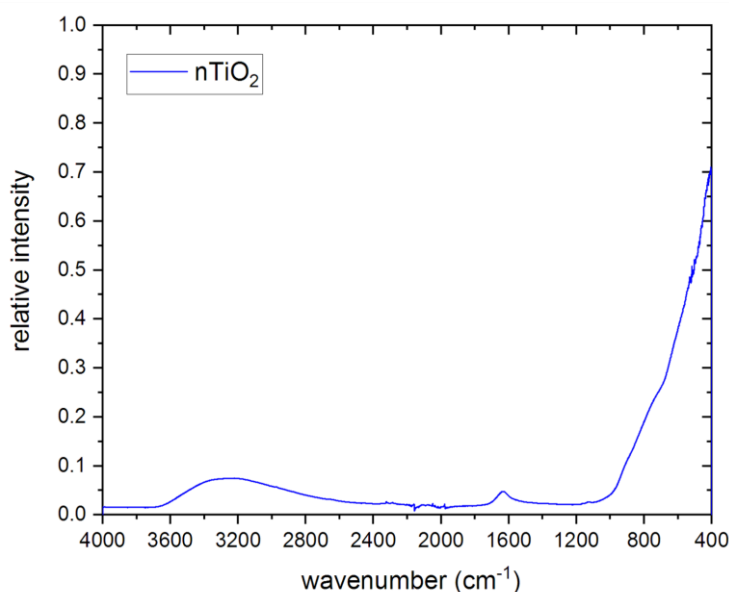
Pro potřeby vývoje nových radiofarmak je důležité nejprve najít materiál nosiče radionuklidů s vhodnými vlastnostmi pro jejich finální použití. Jako slibný kandidát pro transport α radionuklidů byly zvoleny anorganické nanočástice na bázi TiO_2 . Následně byla nalezena a optimalizována rychlá a jednoduchá metoda jejich syntézy. Pro tyto účely byla vybrána hydrolyza tetrabutyl *orthotitanátu* za laboratorních podmínek.

Postup přípravy $n\text{TiO}_2$ byl následující: směs TBOT s propan-2-olem byla pomalu přikapávána do demineralizované vody v ultrazvukovém generátoru, aby bylo docíleno homogenizaci reakční směsi. Jedná se o rychlou reakci, která probíhá i za přítomnosti vzdušné vlhkosti. Získané nanočástice bylo nutné promýt demineralizovanou vodou a poté propan-2-olem, a nakonec byly podtlakově sušeny vakuem. Získaný prášek byl charakterizován pomocí několika metod.

Optimalizace podmínek přípravy $n\text{TiO}_2$ spočívala především v nalezení vhodného poměru mezi TBOT a propan-2-olu. Byly testovány poměry 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 a 1:9. Vyšší zředění již uvažováno nebylo, jelikož by docházelo k výraznému navýšení reakčního objemu, což by činilo problém např. při značení nanočástic inkorporací radionuklidu při jejich syntéze. Z tohoto důvodu byl následně vyřazen i poměr 1:9. Poměry 1:1 a 1:2 byly naopak vyřazeny kvůli náročnější manipulaci se směsí, jelikož docházelo k vysokým ztrátám při přípravě nanočástic. Během přikapávání směsi do demineralizované vody vznikala oxid titaničitý přímo ve špičce pipety vzdušnou vlhkostí. Tím docházelo jednak k ucpávání pipety a dále ke snížení množství připraveného materiálu. Navíc byly při těchto poměrech v roztoku viditelné částice pouhým

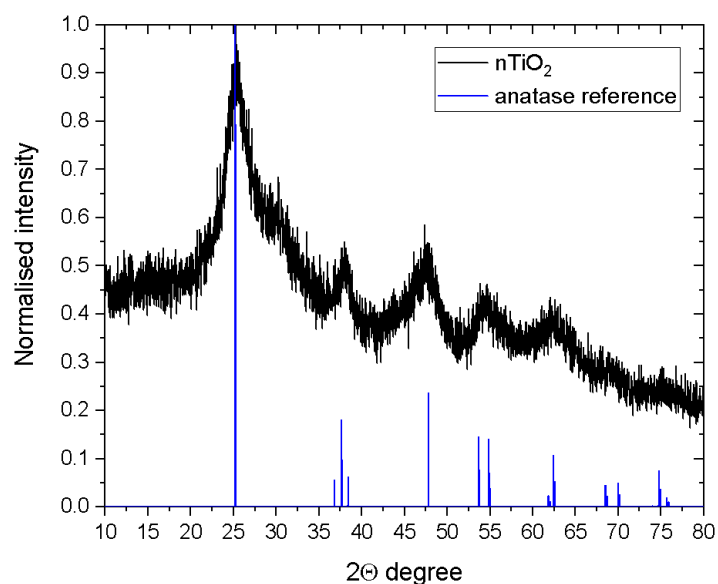
okem, což bylo také přikládáno nedostatečnému zředění TBOT. Jako nejvhodnější byl nakonec zvolen poměr 1:4, jelikož práce s tímto poměrem byla z předcházejících důvodů nejpříznivější.

Pro charakterizaci nanočástic byly použity následující metody. Jednou z nich byla infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR, angl. Fourier transform infrared) pro určení charakteristických pásů $n\text{TiO}_2$. Získané spektrum je uvedeno na **Obr. 6**. V rozmezí $3\,500 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$ je viditelný valenční vibrační pás OH skupiny spojený s deformačním vibračním pásem OH vazeb při $1\,632\text{ cm}^{-1}$ na povrchu $n\text{TiO}_2$. Hlavním charakteristickým pásem pro TiO_2 je $1\,000 - 400\text{ cm}^{-1}$, na němž jsou viditelná ramena odpovídající vibracím Ti – O a Ti – O – Ti. Získané FTIR spektrum je ve shodě se spektrem TiO_2 z databáze, konkrétně se záznamem # 216 (HR Inorganics).



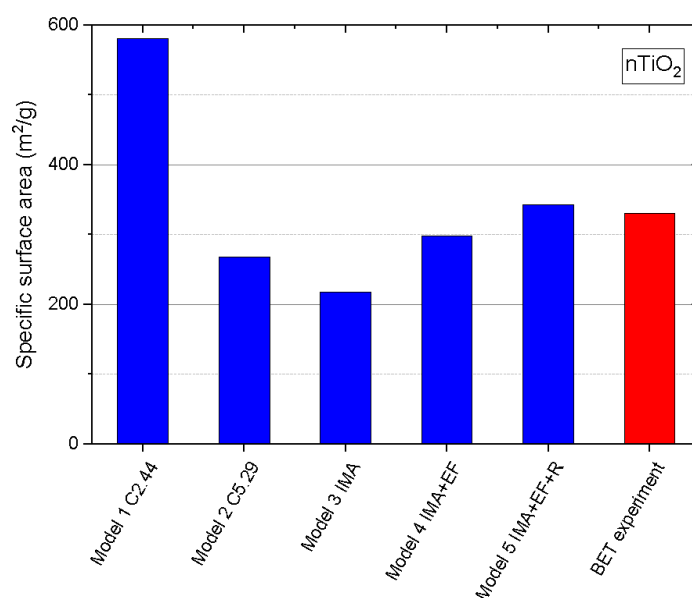
Obr. 6: FTIR spektrum $n\text{TiO}_2$.

Další metodou použitou pro charakterizaci $n\text{TiO}_2$ byla rentgenová prášková difrakce (XRPD, angl. X-Ray Powder Diffraction). Z analýzy bylo zjištěno, že se jedná o jednofázový vzorek, který má strukturu anatasu. Získané spektrum bylo porovnáno s databází – # 01-084-1285 (ICPP PDF-2 Database). Jejich shoda je uvedena na **Obr. 7**, ze kterého je však patrné, že intenzita jednotlivých píků je malá. To může být způsobeno jednak malou velikostí jednotlivých částic nebo částečnou tvorbou amorfnní fáze.



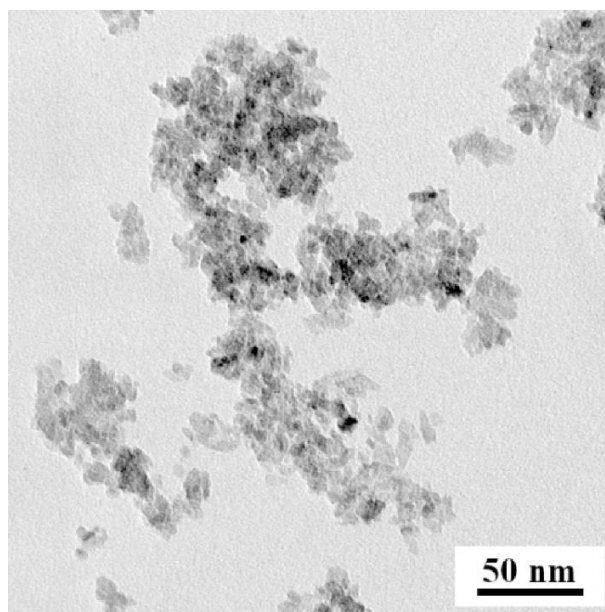
Obr. 7: Difraktogram $n\text{TiO}_2$ porovnaný s referenčním vzorkem (ICDD PDF-2 Database).

Dále byl stanoven měrný povrch nanočástic pomocí B.E.T. metody (Brunauer–Emmett–Teller) na $330 \pm 10 \text{ m}^2/\text{g}$, který byl porovnán s teoreticky vypočtenými hodnotami měrného povrchu. Ty byly získány matematickým modelováním v programu MDISTR využívající data z analýzy získaných obrázků z transmisního elektronového mikroskopu. Z **Obr. 8** je patrné, že experimentální data a teoretické výpočty, zejména porovnání s modely 2 – 5, byly ve velmi dobré shodě.



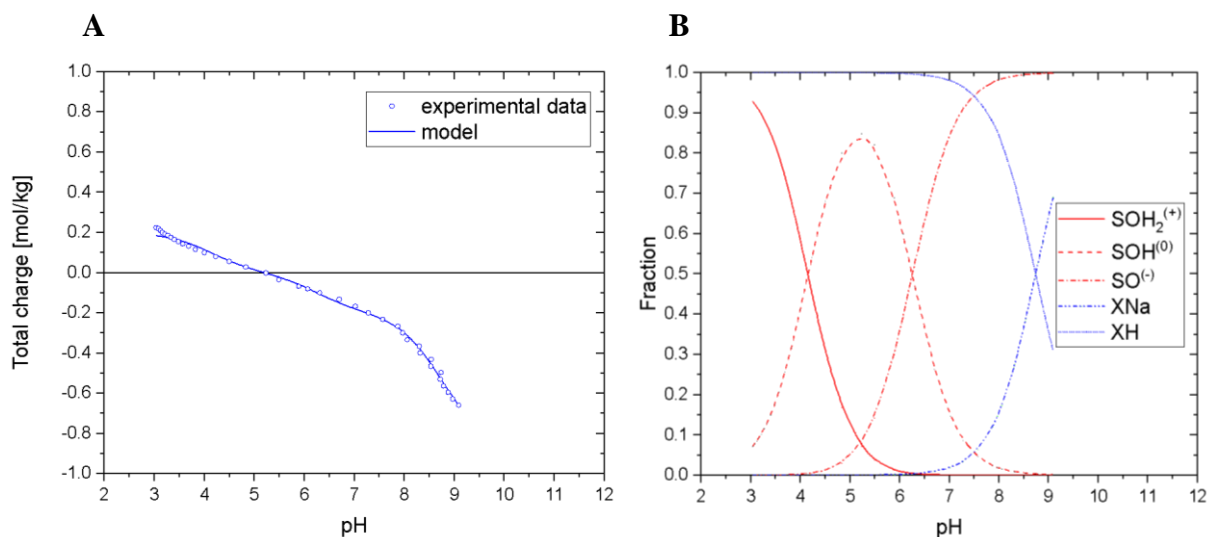
Obr. 8: Porovnání experimentálních dat (červený sloupec) s hodnotami měrného povrchu vypočítanými pomocí MDISTR softwaru (modré sloupce).

Z analýzy připraveného materiálu na transmisním elektronovém mikroskopu bylo dále patrné, že se opravdu jedná o nanočástice, přičemž jejich velikost byla menší než 20 nm (**Obr. 9**). Podrobný popis TEM/BF analýzy je uveden v publikaci **B**.



Obr. 9: TEM analýza – snímek TEM / BF ukazující velikost a tvar $n\text{TiO}_2$.

Pro potřeby vyhodnocení rovnovážných sorpčních experimentů s ^{223}Ra , které jsou popsány níže, byly provedeny titrační, acido-bazické, experimenty a výsledné parametry byly použity pro následné modelování. Titrační experimenty byly provedeny v prostředí 0,1 M NaNO_3 z důvodu zajištění konstantní iontové síly. Jako titrační činidlo byl v alkalické oblasti titrační křivky použit 0,1 M NaOH a v kyselé oblasti 0,1 M HNO_3 . Studované pH bylo v rozmezí 2,5 – 10 (detailně popsáno v publikaci **B**). Získaná experimentální data jsou uvedena na **Obr. 10**.



Obr. 10: **A:** Experimentálně získaná a modelovaná titrační křivka $n\text{TiO}_2$, **B:** frakce individuálních forem povrchových skupin $n\text{TiO}_2$ (CEM+IExM).

Na základě výsledků modelování získaných experimentálních dat byla vyhodnocena jako nejvhodnější kombinace neelektrostatického modelu chemické rovnováhy (CEM, angl. Chemical Equilibrium Model), který bere do úvahy procesy protonizace a sorpce na funkčních

skupinách typu edge site, a modelu iontové výměny (IExM, angl. Ion Exchange Model), který popisuje procesy probíhající na funkčních skupinách typu layer site. Byly stanoveny celkové koncentrace povrchových funkčních skupin edge site – $\Sigma\text{SOH} = 0,20$ mol/kg, a layer site – $\Sigma\text{X} = 0,67$ mol/kg. Rovněž byly stanoveny hodnoty odpovídajících protonizačních – $K_1 = 2,31 \times 10^6$ L/mol a $K_2 = 1,84 \times 10^4$ L/mol – a iontové výměnných konstant – $K_{\text{ex}} = 5,67 \times 10^7$ (hodnoty konstant byly extrapolovány na hodnotu iontové síly $I = 0$). Tyto výsledky podporují použitelnost $n\text{TiO}_2$ v mnoha ohledech, jednak z důvodu možnosti jeho použití v širokém rozsahu pH a dále také na základě jeho dostupných povrchových míst.

4.2 Sorpční experimenty

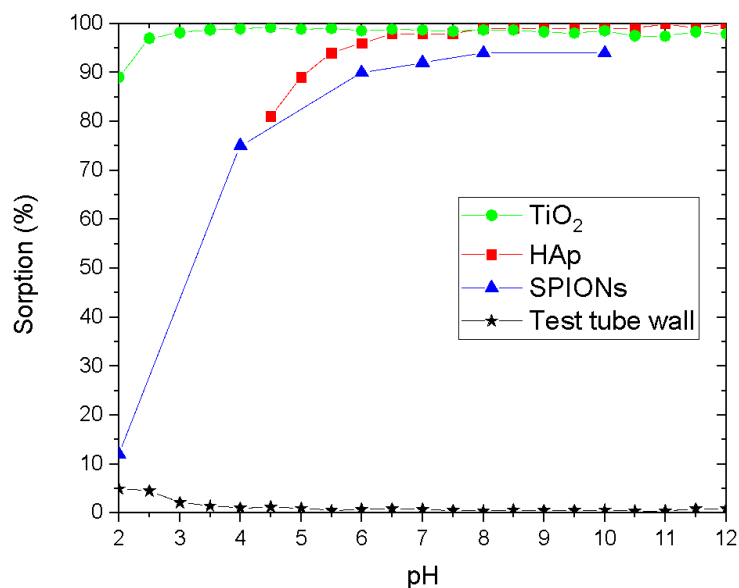
V rámci této kapitoly je pozornost zaměřena na sorpční experimenty nanočástic oxidu titaničitého, konkrétně na sorpci ^{223}Ra v závislosti na pH, jejichž detailní popis je uveden v publikaci C.

Používané ^{223}Ra pro veškeré experimenty bylo získáváno z radionuklidového generátoru $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$, který byl připraven na pracovišti KJCh FJFI ČVUT v Praze. Sorpční experimenty s $n\text{TiO}_2$ byly prováděny v rozmezí pH 2 – 12 po krocích 0,5, jelikož je TiO_2 , na rozdíl od jiných používaných materiálů, stabilní materiál i v krajních hodnotách pH. S ohledem na předpokládané využití v nukleární medicíně byla nejzajímavější oblast okolo rozmezí hodnot pH 6-8 z důvodu aplikace radiofarmaka do organismu. Experimenty byly vždy prováděny v několika opakováních za laboratorních podmínek a za volného přístupu vzduchu.

Sorpční vlastnosti $n\text{TiO}_2$ byly studovány v Britton-Robinsonově pufru. Ten sestává ze směsi hydroxidu sodného, kyseliny fosforečné, borité a octové. Tyto ionty následně hrály důležitou roli při modelování, jelikož jsou ve vzorcích obsaženy ve významných koncentracích oproti např. koncentraci ^{223}Ra . Následně byl ke vzorkům přidán $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ a vzorky byly míchány pomocí vibrační míchačky po dobu 24 hodin. Dále byla stanovena sorpce ^{223}Ra za stejných podmínek na stěny zkumavek bez přítomnosti nanočástic. Stejná geometrie vzorků byla zajištěna dodržáním konstantního objemu supernatantu a vzorku nanočástic, které byly opět rozdispergovány v demineralizované vodě. Výťažky značení ($Y\%$) byly vypočítány na základě rovnice (1) a pro celou škálu pH jsou uvedeny na **Obr. 11**.

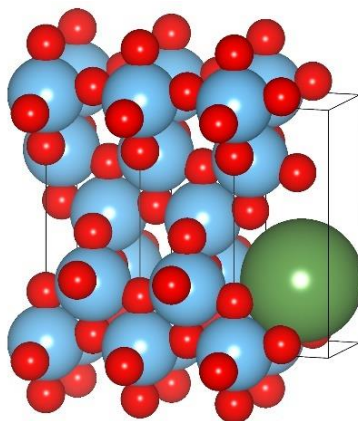
$$Y\% = \frac{A_{\text{NPs}}}{A_{\text{NPs}} + A_{\text{sup}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

kde A_{NPs} je aktivita značených nanočástic znovu rozdispergovaných v demineralizované vodě a A_{sup} je aktivita odebraného supernatantu po značení. Byl měřen radionuklid s nejdelším poločasem z přeměnové řady, tedy ^{223}Ra . Dceřiné radionuklidy nebyly samostatně studovány.



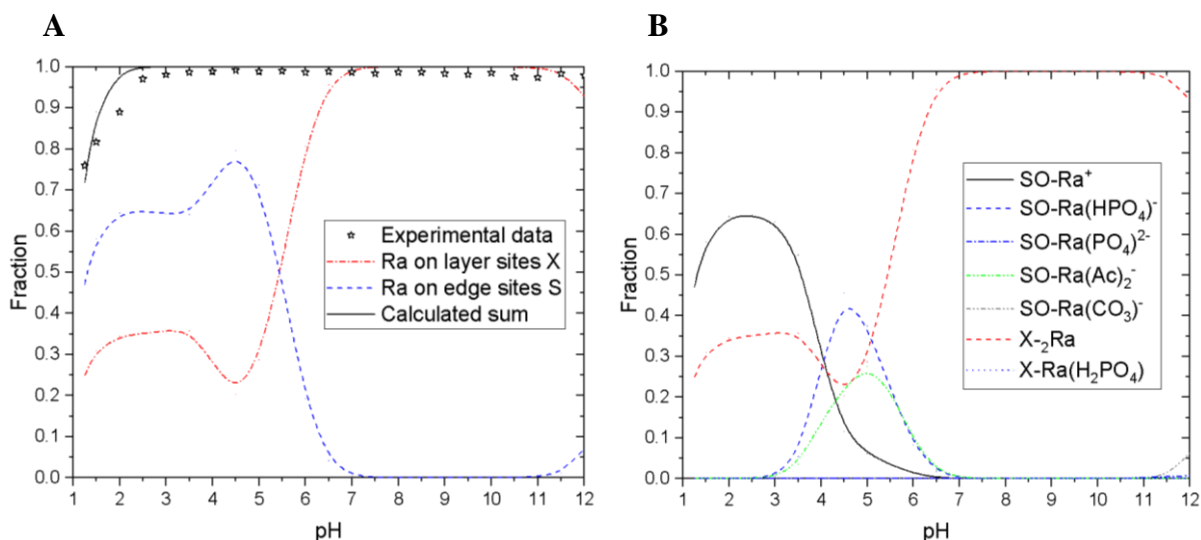
Obr. 11: Porovnání výtěžků sorpce ²²³Ra na *n*TiO₂, *n*HAp, SPIONs a stěnu vialky.

Z **Obr. 11** je patrné, že sorpce na stěnu vialky probíhá minimálně. Nejvyšších hodnot dosahuje jen při velmi nízkém pH a i tak se pohybuje pod 5 %. Z tohoto důvodu není třeba uvažovat ztráty aktivity způsobené sorpcí na stěnu. Získané výsledky byly následně zahrnuty do modelování. Procentuální vyjádření nasorbované aktivity na *n*TiO₂ bylo porovnáno s nasorbovanou aktivitou na *n*HAp a SPIONs (Mokhodoeva et al. 2016), které jsou také studovány v rámci skupiny Radiofarmaceutické chemie na KJCh FJFI ČVUT v Praze. Pro všechny materiály je procento sorpce vysoké a pohybuje se u většiny vzorků nad 80 %. Jak již bylo zmíněno výše, nejzajímavější je oblast okolo pH 6-8 s ohledem na plánovanou aplikaci materiálů. V této oblasti se procento nasorbovaného ²²³Ra pohybuje dokonce nad 90 %. Všechny materiály vykazují relativně vysokou sorpční afinitu k ²²³Ra a lze je tedy z tohoto pohledu považovat za vhodné pro jejich předpokládané použití jakožto nosiče. Avšak je důležité brát v potaz nízkou koncentraci radia (řádově 10⁻¹² M) ku relativně vyšší koncentraci nanočástic (5 mg/ml). Schématické zobrazení vychytání radia TiO₂ bylo vytvořeno pomocí softwaru VESTA a je uvedeno na **Obr. 12** (Vesta).



Obr. 12: Schéma vychytání radia oxidem titaničitým; zelená – radium, modrá – titan, červená – kyslík (Vesta).

Experimentálně získaná data byla ještě podpořena výsledky modelování (detailně popsáno v publikaci C). Nejprve byl proveden výpočet zastoupení forem radia v roztoku, tzv. sorpčního diagramu. Na jeho základě byly zvoleny nejpravděpodobnější sorpční reakce probíhající na obou výše zmíněných typech povrchových skupin. Poté byl konstruován program, kterým byly hledány hodnoty rovnovážných konstant vybraných reakcí za současné minimalizace sumy čtverců odchylek experimentálních a vypočítaných hodnot procenta sorpce jako funkce pH (metodou nelineární regrese). Porovnání sumárních dat je uvedeno na **Obr. 13A**. Závislost sorpce na pH jednotlivých forem je vyhodnocena na **Obr. 13B**. Experimentální data jsou v dobré shodě s vypočítanými daty sorpce radia na funkční skupiny typu edge a layer site. Na základě získaných výsledků z modelování lze konstatovat, že sorpce ^{223}Ra na nanočástice může být popsána modelem CEM a že do sorpčního mechanismu jsou zapojeny oba typy funkčních skupin – edge i layer site. Lze tedy konstatovat, že mechanismus záchytu radia odpovídá spíše sorpci než spolusrážení.



Obr. 13: **A** - Porovnání experimentálně získaných na $n\text{TiO}_2$ a vypočítaných dat na funkčních skupinách typu edge a layer site, **B** - Vyhodnocení výpočtu sorpce na $n\text{TiO}_2$ jednotlivých forem (specií) ^{223}Ra na pH.

4.3 Kinetické experimenty

Komentované výsledky kinetických experimentů sorpce ^{223}Ra na nanočástice oxidu titaničitého jsou uvedeny v publikaci D.

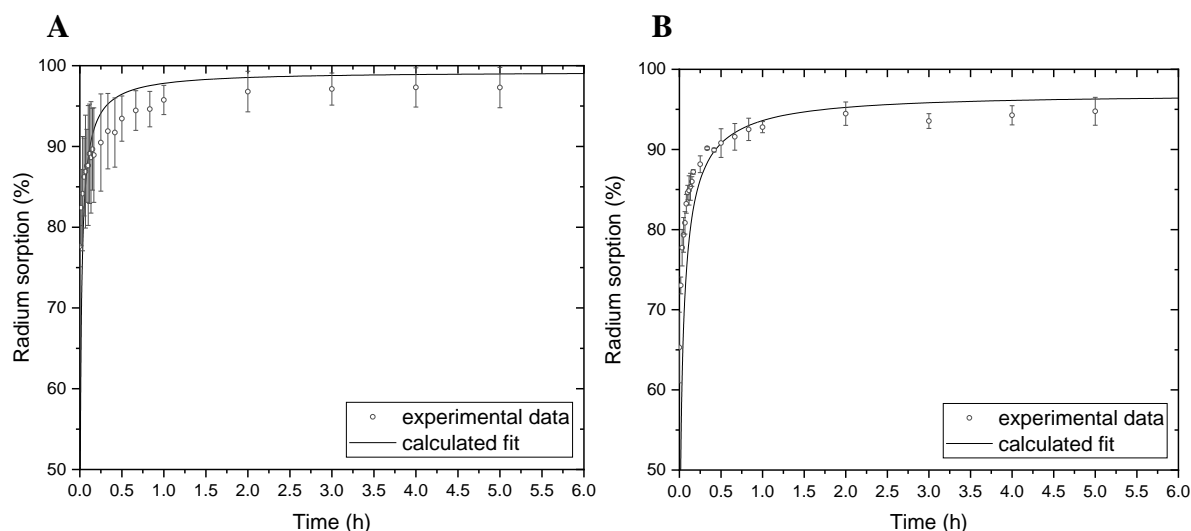
Sorpční experimenty byly studovány i v čase, a to po dobu 24 hodin. S ohledem na předchozí výsledky sorpce ^{223}Ra na nanočástice v závislosti na pH a s ohledem na předpokládanou aplikaci značeného materiálu *in vivo*, bylo zvoleno pH 6 jako vhodné pro studium kinetiky. Experimenty byly vždy prováděny v několika opakováních za laboratorních podmínek a volného přístupu vzduchu. V případě pH 6 vykazuje atmosférický CO_2 minimální absorpci kapalnou fází. Riziko tvorby karbonátových, event. hydrogenkarbonátových komplexů Ra je tedy v tomto případě minimální.

Připravené nanočástice byly rozdispergovány opět v Britton-Robinsonově pufru (výsledná koncentrace 1 g/L). Následně byl přidán $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$. Vzorek byl po celou dobu experimentu nepřetržitě míchán a byly odebrány alikvóty. Nedocházelo tedy ke změnám poměru kapalné a pevné fáze. Vzorky byly odebrány nejprve po minutách, následně v pěti a deseti minutových intervalech a dále v hodinových rozestupech (**Obr. 14A, B**). Nultý alikvót byl odebrán ihned po přidání aktivity. Pro zachování stejné geometrie měření nasorbované aktivity byly vzorky po odebrání supernatantu opět rozdispergovány v demineralizované vodě. Výtěžky značení ($Y\%$) byly vypočítány podle vztahu (1) a pro celou škálu pH jsou uvedeny na **Obr. 14A** pro $n\text{TiO}_2$ a na **Obr. 14B** pro $n\text{HAp}$. Z výsledků kinetických experimentů je patrné, že během první hodiny je dosaženo téměř rovnovážné hodnoty sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ a v případě $n\text{HAp}$ po 3 hodinách.

Pro výpočet koncentrace ^{223}Ra ve vzorku byla využita jeho naměřená aktivita a byla vypočítána podle vztahu (2):

$$c = \frac{A \cdot T_{1/2}}{\ln 2 \cdot V_{aq} \cdot N_A} [\text{mol/L}], \quad (2)$$

kde A je absolutní aktivita ^{223}Ra , $T_{1/2}$ je poločas přeměny ^{223}Ra , V_{aq} je objem vzorku a N_A je Avogadrova konstanta.



Obr. 14: Kinetika sorpce ^{223}Ra na nanočástice v průběhu první hodiny: **A** – $n\text{TiO}_2$; **B** – $n\text{HAp}$.

Kinetika sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ byla porovnána s kinetikou sorpce ^{223}Ra na $n\text{HAp}$. Průměrná vstupní aktivita ^{223}Ra byla pro $n\text{TiO}_2$ $1,01 \times 10^{-11} \pm 0,03 \times 10^{-11}$ mol/L a pro $n\text{HAp}$ $1,02 \times 10^{-11} \pm 0,07 \times 10^{-11}$ mol/L. Chybové úsečky se zdají být značně velké, avšak je třeba brát v úvahu rychlou kinetiku sorpce ^{223}Ra , časté odebrání vzorků obzvláště v prvních minutách experimentu a velmi nízkou koncentraci radionuklidu.

K vyhodnocení experimentálních dat bylo použito celkem šest kinetických modelů konstruovaných pro heterogenní systém sestávající z kapalně a pevně fáze, za předpokladu různých řídicích dějů, např. model difúze inertní vrstvou (ID, angl. diffusion in an inert layer) či model difúze zreagovanou vrstvou (RLD, angl. diffusion in a reacted layer). Obdobným způsobem jako v případě sorpčních experimentů byly konstruovány výpočetní programy (na základě metody nelineární regrese) pro nalezení nejvhodnějšího typu kinetického modelu, resp. nalezení nejpravděpodobnějšího typu řídicího děje (detailně popsáno v publikaci **D**).

Z vyhodnocení kinetických dat pomocí dříve zmíněných modelů vyplývá, že nejvhodnějšími modely pro stanovení řídicího děje kinetiky sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ jsou RLD a ID. Rozdíl mezi těmito modely je malý, avšak s ohledem na charakter a reaktivitu povrchu $n\text{TiO}_2$ resp. k významné koncentraci funkčních skupin typu edge a layer site, lze považovat RLD z fyzikálně-chemického hlediska za lépe korespondující s charakterem sorbentu.

Jedním z parametrů použitelných pro porovnání obou sorbentů je poločas sorpce, $t_{1/2}$. Jedná se o čas potřebný k dosažení poloviční sorpce ve srovnání s rovnovážnou hodnotou pro daný kinetický experiment. Pro $n\text{TiO}_2$ je průměrná hodnota poločasu sorpce rovna $0,51 \pm 0,32$ min a pro $n\text{HAp}$ $0,75 \pm 0,18$ min, z čehož je patrné, že kinetika probíhá obdobnou rychlostí pro oba materiály, nicméně záchyt na $n\text{TiO}_2$ je v průměru rychlejší, což koresponduje s jeho vyšším měrným povrchem i menší velikostí částic.

4.4 Značení připraveného materiálu

*V rámci této kapitoly jsou diskutovány způsoby a výsledky značení nanočástic oxidu titaničitého diagnostickým radionuklidem ^{99m}Tc a terapeutickým radionuklidem ^{223}Ra , které jsou uvedeny v publikaci **E**.*

Pro potřeby nukleární medicíny a využití připraveného materiálu jakožto nosiče diagnostických a terapeutických radionuklidů, a tedy vytvoření teranostického systému, je nutné připravit značené nanočástice. Je důležité nejprve najít jednoduchou a rychlou metodu značení, která bude poskytovat vysoké výtěžky značení. Byly zvoleny dva způsoby značení. Prvním z nich byla povrchová sorpce zvoleného radionuklidu na již připravené $n\text{TiO}_2$. Druhou z nich byla inkorporace zvoleného radionuklidu přímo do struktury $n\text{TiO}_2$. Toho bylo docíleno přítomností daného radionuklidu v roztoku, ve kterém byla prováděna syntéza $n\text{TiO}_2$. Experimenty byly prováděny v několika opakováních.

Jako zdroj diagnostického radionuklidu ^{99m}Tc byl používán komerční radionuklidový generátor $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ DRYTECTM (GE Healthcare LTD). Eluce byla prováděna fyziologickým roztokem a k redukci ^{99m}Tc do požadovaného oxidačního stavu byl používán chlorid cínatý (2,1 mmol/l). Jak již bylo zmíněno výše, pro získ terapeutického radionuklidu ^{223}Ra byl využíván radionuklidový generátor $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$. V době sepsání této disertační práce nebyla

nalezena žádná publikovaná data zabývající se značením nanočástic oxidu titaničitého ^{99m}Tc a ^{223}Ra .

Prvním způsobem značení $n\text{TiO}_2$ byla studována sorpce radionuklidu na již připravené $n\text{TiO}_2$, které byly nejprve rozdispergovány v roztoku chloridu cínatého – při značení ^{99m}Tc – nebo ve fyziologickém roztoku – při značení ^{223}Ra . Následně byl přidán studovaný radionuklid. Vzorky byly třepány po dobu 1 hodiny za laboratorních podmínek. Tato hodnota byla zvolena na základě kinetiky sorpce ^{223}Ra na nanočástice. Následně byly vzorky promyty fyziologickým roztokem, aby byly vymyty nenasorbované radionuklidy.

Druhým způsobem přípravy značených $n\text{TiO}_2$ byla zkoumána inkorporace radionuklidu přímo do struktury $n\text{TiO}_2$. Toho bylo dosaženo syntézou přímo v roztoku radionuklidu. Tetrabutyl *orthotitanát* v propa-2-olu v poměru 1:4 byl nakapán do roztoku chloridu cínatého s již přidáním ^{99m}Tc nebo do fyziologického roztoku s přidáním ^{223}Ra . Vzorky byl opět třepány po dobu 1 hodiny za laboratorních podmínek a následně promyty fyziologickým roztokem.

Výtěžky značení ($Y\%$) byly stanoveny podle vztahu (3):

$$Y\% = \frac{A_{NPS}}{A_{init}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

kde A_{NPS} je výsledná aktivita nasorbovaná na nanočásticích a A_{init} je vstupní aktivita přidaná na začátku experimentu. V případě ^{99m}Tc byla A_{init} korigována s ohledem na dobu trvání experimentu z důvodu jeho krátkého poločasu přeměny. Získané výsledky jsou uvedeny v **Tab. 2**.

Tab. 2: Výtěžky značení $n\text{TiO}_2$ ^{99m}Tc a ^{223}Ra ($n = 6$).

	^{99m}Tc [%]	^{223}Ra [%]
Povrchové značení	$98,4 \pm 0,5$	$98,7 \pm 0,5$
Inkorporace radionuklidu	$97,6 \pm 0,7$	$99,1 \pm 0,3$

Z **Tab. 2** je patrné, že výsledky korespondují s dříve zmíněnými sorpčními a kinetickými experimenty (*publikace C a D*). Pro oba radionuklidy a oba způsoby přípravy značených $n\text{TiO}_2$ je vidět, že v případě inkorporace radionuklidu do struktury $n\text{TiO}_2$ jsou výtěžky značení nepatrně vyšší, avšak v obou případech se pohybují nad 97 %. S ohledem na statistickou chybu a malé rozdíly mezi jednotlivými výsledky nelze jednoznačně určit, která metoda je vhodnější pro použití v nukleární medicíně. Vzhledem k využití nanočástic v klinické praxi lze vyvstávat následující výhody povrchového značení – často připravované jednotlivé dávky radiofarmaka, standardizovaná velikost nanočástic, jejich dodání formou standardizovaného kitu běžně používaného při přípravě radiofarmak, snadné skladování nanočástic v laboratorních

podmínkách, značení modifikovaných nanočástic. V případě inkorporace radionuklidů přicházejí v úvahu výhody rychlé přípravy značených nanočástic bez předcházejících kroků přípravy samotných nanočástic, jelikož jejich příprava je součástí samotné metody značení, což může být výhodou při přípravách značených nanočástic s delšími časovými rozestupy aplikace či v případě modifikace již značených nanočástic.

4.5 Stabilitní studie *in vitro*

Uvedené výsledky týkající se stabilitních studií značených nanočástic oxidu titaničitého in vitro jsou uvedeny v publikaci E.

Stabilitní studie *in vitro* jsou důležitým předstupněm pro preklinické testování. Na základě těchto experimentů lze predikovat, jak se bude připravené radiofarmakum chovat v různém prostředí, které ho může po aplikaci do organismu ovlivňovat. Stabilitní studie *in vitro* v různých biologických maticích umožňují zjistit, zda je tedy nesorbovaná radioaktivita zadržována na nosiči či je uvolňována do okolního prostředí a tím může dojít k nadměrnému ozáření zdravé tkáně. Tyto experimenty byly navrženy jako pseudo-otevřený systém, ve kterém byla biologicky relevantní matrice vyměňována v předem definovaných intervalech za přístupu vzduchu a laboratorních podmínek. V době sepsání této disertační práce nebyla publikována žádná data zabývající se stabilitou *in vitro* značených nanočástic oxidu titaničitého ^{99m}Tc a ^{223}Ra .

Z různých důvodů bylo vybráno celkem 5 biologicky relevantní matic, ve kterých byly provedeny stabilitní studie *in vitro* radioaktivně značených $n\text{TiO}_2$. Jednalo se o fyziologický roztok (FR), hovězí krevní plazmu (HKP) a hovězí krevní sérum (HKS) a 1% a 5% roztok albuminu (ALB). Fyziologický roztok jakožto jeden z nejpoužívanějších roztoků v medicíně byl zvolen především z toho důvodu, že se předpokládá aplikace značených nanočástic do organismu rozdispergovaných právě ve FR a dále také jako standardu pro porovnávání chování v dalších maticích. Nepředpokládá se totiž, že by měly ionty obsažené ve FR měly nějak významně interagovat se značeným $n\text{TiO}_2$. Dále se předpokládá, že aplikace radiofarmaka bude prováděna intravenózně. Z tohoto důvodu je nutné věnovat pozornost chování značených $n\text{TiO}_2$ v krevní plazmě a séru. Abychom s těmito materiály mohli pracovat v daných laboratorních podmínkách, tak byla zvolena hovězí plazma a sérum od dodavatele. Plazma se skládá především z vody, bílkovin jako jsou albuminy, globuliny a fibrinogen, dále pak z různých iontů a sacharidů. Rozdíl mezi krevní plazmou a sérem je v přítomnosti fibrinogenu a srážecích faktorů krve. Krevní proteiny slouží jako transportní molekuly pro různé druhy sloučenin, z tohoto důvodu mohou mít značný vliv na značené nanočástice, a proto byly do stabilitních studií *in vitro* zahrnuty dva různě koncentrované roztoky albuminu. (Benjamin & McLaughlin 2012)

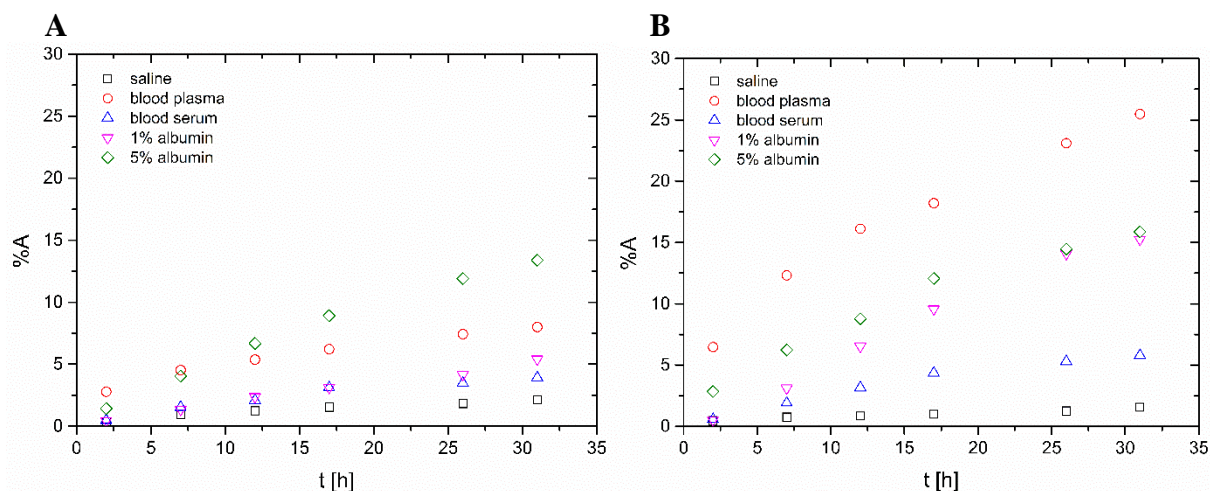
Značené nanočástice připravené jedním ze způsobů značení zmíněných dříve byly rozdispergovány v jednom ze studovaných biologicky relevantních matric. Vzorky byly následně třepány za laboratorních podmínek. V rámci těchto experimentů bylo sledováno uvolněné aktivity ze značeného $n\text{TiO}_2$ v čase. V rámci krátkodobých *in vitro* stabilitních studií byly vzorky odebírány po 2 – 7 – 12 – 17 – 26 – 35 – 59 hodinách od značení. V případě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $n\text{TiO}_2$ byl poslední odběr vynechán a jako poslední byl odebírán vzorek po 31 místo 35 hodinách z důvodu krátkého poločasu přeměny tohoto radionuklidu. V případě ^{223}Ra byly ještě prováděny dlouhodobé *in vitro* stabilitní studie po dobu 55 dní, v 11denních intervalech ($T_{1/2}$ (^{223}Ra) = 11,4 dne) poločasů tohoto radionuklidu. Všechny experimenty byly prováděny opakovaně.

Po odebrání supernatantu byly značené $n\text{TiO}_2$ rozdispergovány v nové matrici, aby mohl experiment dále pokračovat a na základě toho byla zachována stejná geometrie pro značení. Výhodou tohoto systému je, že se nejedná o uzavřený statický systém, ale spíše jde o pseudo-otevřený systém, kde hraje roli iontová výměna, o které je v případě intravenózní aplikace důležité uvažovat. Procento uvolněné aktivity (%A) bylo vypočítáno podle vztahu (4):

$$\%A = \frac{A_{sup}}{A_{sup} + A_{NPs}} \cdot 100 \%, \quad (4)$$

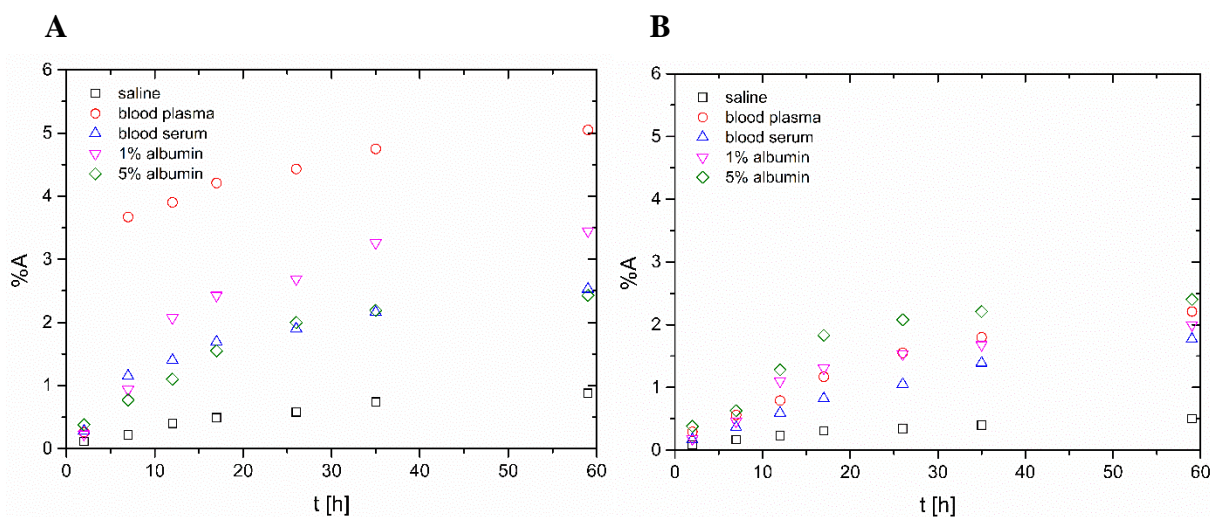
kde A_{sup} představuje aktivitu odebraného supernatantu a A_{NPs} je aktivita značených nanočástic. Procenta uvolněné aktivity v závislosti na čase pro jednotlivé radionuklidy a způsoby značení jsou uvedeny na následujících obrázcích: **Obr. 15** – stabilitní studie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $n\text{TiO}_2$, **Obr. 16** – krátkodobá stabilitní studie ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$ a **Obr. 17** – dlouhodobá stabilitní studie ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$. Část obrázků - **A** - připadá vždy povrchovému značení a část obrázků - **B** - odpovídá inkorporaci radionuklidu. V grafech nejsou uvedeny chybové úsečky, jelikož se pohybují pod 0,5 % a znepřehlednily by orientaci v zobrazení výsledků.

Uvolněná aktivita u většiny vzorků během stabilitní studie *in vitro* $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $n\text{TiO}_2$ se pohybuje pod 15 %. Nejvyšší uvolněnou aktivitu vykazují vzorky značené inkorporací radionuklidu do struktury nanočástice v HKP. Komerčně dodávaná hovězí krevní plazma byla stabilizována citrátem sodným, který by mohl mít vliv na vyšší uvolňování aktivity do roztoku. Bohužel však koncentrace citrátu sodného v používané HKP není výrobcem přesně definována. Z tohoto důvodu byly provedeny experimenty se samotným 1% roztokem citrátu sodného, ale nedocházelo k výraznějšímu uvolnění aktivity v čase. V případě povrchového značení vykazuje nejvyšší uvolněné aktivity 5% roztok ALB pohybující se pod 14 %. I přes to, jsou získané výsledky velice příznivé, jelikož během prvních 24 hodin dochází k uvolnění aktivity okolo 10 %. Jak již bylo řečeno, předpokládá se, že k nejnižšímu uvolnění aktivity bude docházet v případě FR, což bylo v případě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $n\text{TiO}_2$ potvrzeno. Procento uvolněné aktivity se ve FR pohybovalo pod 2,5 %. V obou případech značení docházelo k nízkému uvolňování aktivity i v HKS, kde se uvolňovala aktivita do 5 % po 31 hodinách od značení.



Obr. 15: *In vitro* stabilitní studie ^{99m}Tc - $n\text{TiO}_2$: A – povrchové značení; B – inkorporace radionuklidu.

V případě ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$ byla uvolněná aktivita nižší než u ^{99m}Tc - $n\text{TiO}_2$. To je pravděpodobně způsobenou odlišností obou radionuklidů jako je např. jejich valence a umístění v periodické soustavě prvků. V případě krátkodobé stabilitní studie *in vitro* se uvolněná aktivita pohybovala pod 6 %. Nejvyšší uvolněné aktivity byly u ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$ opět v HKP, ale tentokrát u povrchově značených nanočástic. V případě inkorporace radionuklidu do $n\text{TiO}_2$ byla nejvyšší uvolněná aktivita v 5% roztoku ALB, která se pohybovala pod 2,5 %. Nejnižší uvolněné aktivity i v tomto případě byly ve FR a to v rozmezí 0,5 – 1 % po 59 hodinách od značení. V HKS byly také pozorovány nízké uvolněné aktivity jako v případě ^{99m}Tc - $n\text{TiO}_2$, avšak u povrchového značení bylo podobných hodnot dosaženo u 5% ALB. Je zde však patrný trend, kdy v případě značení inkorporací ^{223}Ra do struktury $n\text{TiO}_2$ dochází k nižšímu uvolňování aktivity než v případě povrchového značení.

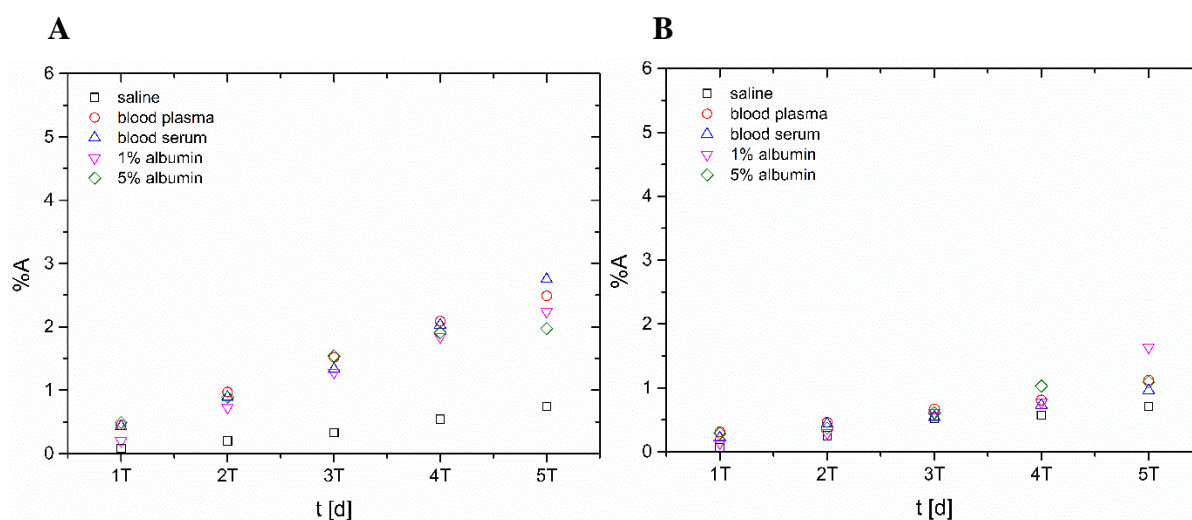


Obr. 16: Krátkodobá *in vitro* stabilitní studie ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$: A – povrchové značení; B – inkorporace radionuklidu.

U dlouhodobé stabilitní studie *in vitro* ^{223}Ra - $n\text{TiO}_2$ byla pozorována celkově nejnižší uvolněná aktivita a pohybovala se pod 3 %. Uvolněné aktivity jsou oproti krátkodobé stabilitě nižší. To je

pravděpodobně způsobeno delším setrváním nanočástic v jednotlivých matricích v průběhu 11 dní oproti hodinovým intervalům v rámci krátkodobých stabilitních studií. Je zde vyšší pravděpodobnost zpětné resorpce na přítomné nanočástice. Dále bude mít vliv distribuční koeficient a kinetika značení, kdy při dlouhodobých experimentech dojde k ustavení rovnováhy před výměnou matrice za novou.

V případě povrchového značení se nejvíce aktivity uvolnilo v HKS, což je významný rozdíl oproti předcházejícím studiím, avšak procento uvolněné aktivity je podobné jako v případě krátkodobé stabilitní studie. U způsobu značení inkorporací radionuklidu do struktury nanočástice byla nejvyšší uvolněná aktivita pozorována u 1% roztoku ALB a pohybovala se pod 1,8 %. Nejnižší uvolněná aktivita byla stanovena opět pro oba způsoby značení ve FR.



Obr. 17: Dlouhodobá *in vitro* stabilitní studie ^{223}Ra -*nTiO*₂: A – povrchové značení; B – inkorporace radionuklidu.

Souhrnně lze říct, že byl potvrzen předpoklad chování značených nanočástic ve fyziologickém roztoku, který byl zvolen i jako standard pro porovnávání uvolňování aktivity v ostatních matricích. Pro oba způsoby značení a oba radionuklidy se uvolněné aktivity pohybovaly na nejnižších hodnotách, konkrétně maximální hodnoty dosáhla uvolněná aktivita u povrchově značeného $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -*nTiO*₂ a to 2,1 % po 31 hodinách od značení. U stabilitních studií sledujících vliv biologicky relevantních matric na ^{223}Ra -*nTiO*₂ bylo v průběhu experimentů uvolňování na stabilní úrovni. Při porovnání krátkodobé a dlouhodobé stabilitní studie lze pozorovat vliv iontové výměny a zpětnou resorpci radionuklidů na nanočástice. V případě např. krevního řečiště, kde je obměna okolního prostředí rychlá a je zde menší objemová koncentrace nanočástic, je pravděpodobnější, že bude uvolňování aktivity vyšší a bude se spíše řídit trendem krátkodobé stabilitní studie. Naopak zpětné resorpce lze pravděpodobně využít ke zlepšení chování nanočástic *in vivo* např. při nahromadění nanočástic v tkáni, kde bude docházet k jejich zpětnému vychytání na povrch nanočástic a tím dojde k zadržení radionuklidů v požadované

tkáni. Uvolňování aktivity se v tomto případě bude spíše řídit trendem dlouhodobé stabilitní studie.

Na základě získaných výsledků pro oba radionuklidy a oba způsoby značení lze konstatovat, že $n\text{TiO}_2$ je vhodný kandidát jako nosič radionuklidů pro potřeby nukleární medicíny především pro systémovou aplikaci radiofarmaka do organismu, vzhledem k jeho stabilitě *in vitro* v dlouhodobém horizontu.

5. Závěry

Disertační práce byla věnována přípravě nanočástic na bázi oxidu titaničitého a jejich charakterizaci. Dále byla pozornost zaměřena na sorpční a kinetické experimenty s ^{223}Ra a nakonec na značení nanočástic radionuklidu – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{223}Ra – a jejich stabilitu *in vitro* v biologicky relevantních matricích. Tato práce je důležitá pro výzkum nových radiofarmak především pro α terapeutické radionuklidy, pro které jsou vhodnými nosiči právě anorganické nanočástice. Zvolené radionuklidy pak představují vhodný teranostický systém pro personalizovanou medicínu. Popsaný výzkum byl již publikován v mezinárodních impaktovaných časopisech (*publikace B – E*) a je doplněn o rešeršní práci publikovanou v národním recenzovaném časopise (*publikace A*).

V úvodní části je shrnut současný stav poznání zabývající se nanočásticemi v medicíně, cílenou radionuklidovou terapií, resp. cílenou alfa terapií, vhodnými nosiči pro tyto radionuklidy se zaměřením na anorganické nosiče. Na závěr je pozornost zaměřena na oxid titaničitý a jeho využití, přípravu a značení.

Pro potřeby nukleární medicíny byly nejprve připraveny nanočástice na bázi oxidu titaničitého. Byla zvolena metoda hydrolyzy tetrabutyl *orthotitanátu* v propan-2-olu, která byla nejprve optimalizována z pohledu vzájemného poměru těchto dvou sloučenin. Ten byl následně stanoven na 1:4. Připravené nanočástice byly charakterizovány pomocí následujících metod FT-IR, XRPD, B.E.T, TEM/BF a acido-alkalickou titrací. Byl stanoven vysoký měrný povrch $330 \pm 10 \text{ m}^2/\text{g}$, který byl v dobré shodě se stanovenými hodnotami z analýzy z TEM/BF. Dále bylo potvrzeno, že se jedná o nanočástice, kdy jejich velikost byla $< 20 \text{ nm}$. Pomocí acido-bazické titrace byly stanoveny celkové koncentrace povrchových funkčních skupin typu edge – $\Sigma\text{SOH} = 0,20 \text{ mol/kg}$ – a layer site – $\Sigma\text{X} = 0,67 \text{ mol/kg}$ – a hodnoty protonizačních – $K_1 = 2,31 \times 10^6 \text{ L/mol}$ a $K_2 = 1,84 \times 10^4 \text{ L/mol}$ – a iontově výměnných konstant – $K_{\text{ex}} = 5,67 \times 10^7$.

Sorpční experimenty s ^{223}Ra byly prováděny v rozmezí pH 2 – 12 v Britton-Robinsonově pufru. Byl sledován výtěžek sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ pro jednotlivé hodnoty pH. Dále byla sledována sorpce na stěnu vialky. Bylo zjištěno, že v tomto případě probíhá sorpce minimálně a není tedy nutné uvažovat ztráty aktivity při sorpci ^{223}Ra na nanočástice. Pro potřeby nukleární medicíny je nejzajímavější oblast okolo pH 6-8, ve které se procento sorpce pohybuje na 90 %. Získaná data byla následně podpořena i výsledky získanými z modelování. Bylo zjištěno, že nejlépe lze sorpci ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ popsat modelem CEM a do sorpčního mechanismu jsou zapojeny funkční skupiny typu edge i layer site.

Následně byly prováděny kinetické experimenty sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$ v Britton-Robinsonově pufru po dobu 24 hodin při pH 6 s ohledem na předpokládanou aplikaci *in vivo*. Ze získaných výtěžků sorpce bylo zjištěno, že během první hodiny bylo dosaženo téměř rovnovážné hodnoty sorpce ^{223}Ra na $n\text{TiO}_2$. Průměrná vstupní aktivita ^{223}Ra byla $1,01 \times 10^{-11}$ mol/L. Získaná experimentální data byla doplněna o výsledky modelování, kde bylo uvažováno celkem 6 kinetických modelů pro heterogenní systém. Byl hledán nejpravděpodobnější typ řídicího děje. Z výsledků vyplývá, že se nejpravděpodobněji jedná o model RLD, který koresponduje i s fyzikálně chemickým charakterem sorbentu. Dále byl stanoven poločas sorpce, který, za daných podmínek, je pro $n\text{TiO}_2$ roven $0,51 \pm 0,32$ min.

Důležitým krokem pro nalezení nového radiofarmaka je nalezení vhodné a rychlé metody značení s vysokými výtěžky značení. Byly studovány dva způsoby značení: povrchová sorpce radionuklidu na již připravený $n\text{TiO}_2$ a inkorporace radionuklidu přímo do struktury $n\text{TiO}_2$. Byly zvoleny dva radionuklidy, jednak diagnostický radionuklid – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a dále terapeutický radionuklid – ^{223}Ra , aby byla studována možnost teranostického přístupu pro personalizovanou medicínu. Výtěžky značení se v obou způsobech značení i radionuklidů pohybovaly nad 97 %, což koresponduje s dříve sledovanými výtěžky značení u sorpčních experimentů s ^{223}Ra , avšak nelze jednoznačně určit, která metoda je vhodnější, jelikož rozdíly jsou minimální.

Dále byl pro výzkum nového radiofarmaka důležité provést stabilitní studie *in vitro*. Bylo třeba zjistit, zda nedochází k uvolňování aktivity z nosiče vlivem biologicky relevantních matric. Do stabilitních studií bylo zvoleno celkem 5 matric: fyziologický roztok, hovězí krevní plazma a sérum a 1% a 5% roztoky albuminu. Bylo sledováno uvolňování aktivity v čase, jednak v krátkodobém horizontu, který byl v případě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ještě zkrácen z důvodu jeho krátkého poločasu přeměny, dále v dlouhodobém horizontu po dobu přibližně 5 poločasů ^{223}Ra . Uvolněná aktivita byla nejvyšší u $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NPs, avšak i zde se pohybovala pod 15 % po 31 hodinách od značení u vzorků značených inkorporací radionuklidu v HKP. V případě krátkodobé stabilitní studie s ^{223}Ra se uvolněná aktivita pohybovala maximálně okolo 6 % po 59 hodinách od značení. Nejvyšší uvolněná aktivita sledována opět v HKP ale tentokrát u povrchového značení. V případě dlouhodobé stabilitní studie byla nejvyšší uvolněná aktivita v HKS, avšak i tak se pohybovala okolo 3 % po přibližně 5 poločasech přeměny ^{223}Ra . Nejnižší uvolněné aktivity byly, jak bylo předpokládáno, sledovány vždy ve FR.

Závěrem lze shrnout, že byla zvolena vhodná metoda pro přípravu nanočástic oxidu titaničitého, který byly řadou metod charakterizovány. Pro obě metody značení i oba studované radionuklidy lze konstatovat, že uvolňování aktivity z nanočástic v čase bylo nízké a připravený materiál je tedy vhodným kandidátem jako nosič radionuklidů pro nukleární medicínu. Pro vznik nového radiofarmaka je to teprve jeden z prvních kroků. Je třeba provést povrchovou modifikaci nosiče pro potřeby aktivního cílení do požadované tkáně a následně pokračovat v preklinickém testování.

Literatura

Abbas K, Cydzik I, Del Torchio R, Farina M, Forti E, Gibson N, Holzwarth U, Simonelli F, Kreyling W (2010). Radiolabelling of TiO₂ nanoparticles for radiotracer studies, *J. Nanopart. Res.* 12, 2435-2443. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9806-8>

Allen B (2013). Systemic targeted alpha radiotherapy for cancer. *J. Biomed. Phys. Eng.* 3, 67–80. <https://doi.org/10.3329/bjimp.v6i1.19755>

Bae YH, & Park K (2011). Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J Control Release* 153, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.001>

Bahrami B, Hojjat-Farsangi M, Mohammadi H, Anvari E, Ghalamfarsa G, Yousefi M, Jadidi-Niaragh F (2017). Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol Lett.* 190, 64–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>

Barrett T, Choyke PL, Kobayashi H. (2006). Imaging of the lymphatic system: new horizons. *Contrast Media Mol Imaging.* 1, 230–45. <https://doi.org/10.1002/cmml.116>

Bazak R, Hourri M, Achy SE, Hussein W, Refaat T (2014). Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol.* 2, 904–908. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.356>

Beierwaltes WH (1978). The treatment of thyroid carcinoma with radioactive iodine. *Seminars in Nuclear Medicine* 8, 79-94. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(78\)80009-9](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(78)80009-9)

Benjamin, R.J.; McLaughlin, L.S. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion* 2012, 52, 9S–19S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x>

Carrasquillo JA, O'Donoghue JA, Pandit-Taskar N, Humm JL, Rathkopf DE, Slovin SF, Williamson MJ, Lacuna K, Aksnes AK, Larson SM, Scher HI, Morris MJ (2013). Phase I pharmacokinetic and biodistribution study with escalating doses of ²²³Ra-dichloride in men with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 40, 1384-1393. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2427-6>

Cedrowska E, Łyczko M, Piotrowska A, Bilewicz A, Stolarz A, Trzcńska A, Szkliniarz K, Wąs B (2016) Silver impregnated nanoparticles of titanium dioxide as carriers for ²¹¹At. *Radiochim. Acta* 104, 267–275. <https://doi.org/10.1515/ract-2014-2373>

Cedrowska E, Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Męczyńska-Wielgosz S, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bilewicz A (2018) Functionalized TiO₂ nanoparticles labelled with ²²⁵Ac for targeted alpha radionuclide therapy. *J Nanopart Res.* 20, 83. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4181-y>

Comarmond MJ, Payne TE, Harrison JJ, Thiruvoth S, Wong HK, Aughterson RD, Lumpkin GR, Müller K, Foerstendorf H (2011) Uranium Sorption on Various Forms of Titanium Dioxide—Influence of Surface Area, Surface Charge, and Impurities. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5536–5542. <https://doi.org/10.1021/es201046x>

- Danhier F, Feron O, Pr at V (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 148, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>
- Dash A, Knapp FF Pillai MR (2013). Targeted Radionuclide Therapy - An Overview, *Curr Radiopharm*, 6, 152-180. <https://doi.org/10.2174/18744710113066660023>
- Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD (2001). Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281, F579–96. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.4.F579>
- De Jong WH & Borm PJ (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 3, 133–149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>
- Dekempeneer Y, Keyaerts M, Krasniqi A, Puttemans J, Muyldermans S, Lahoutte T, D’huyvetter M, Devoogdt N (2016). Targeted alpha therapy using short-lived alpha-particles and the promise of nanobodies as targeting vehicle. *Expert Opin Biol Ther*. 16, 1035–1047. <https://doi.org/10.1080/14712598.2016.1185412>
- De Kruijff R, Wolterbeek H, Denkova A (2015). A Critical Review of Alpha Radionuclide Therapy—How to Deal with Recoiling Daughters? *Pharmaceuticals*, 8, 321–336. <https://doi.org/10.3390/ph8020321>
- Denoyer D & Pouliot N (2013) Radionuclide Theranostics in Cancer. *J Mol Imaging Dynam* 4, 1. <https://doi.org/10.4172/2155-9937.1000e104>
- Devaraj NK, Keliher EJ, Thurber GM, Nahrendorf M, Weissleder R (2009). ¹⁸F Labeled Nanoparticles for *in vivo* PET-CT Imaging. *Bioconjugate Chem*. 20, 397-401. <https://doi.org/10.1021/bc8004649>
- Duan D, Liu H, Xu Y, Han Y, Xu M, Zhang Z, Liu Z (2018) Activating TiO₂ Nanoparticle: Gallium-68 Serves As A High-Yielded Photon Emitter for Cerenkov Induced Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10, 5278-5286. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17902>
- Dziawer L, Koźmiński P, Męczyńska-Wielgosz S, Pruszyński M, Łyczko M, Wąs B, Celichowski G, Grobelny J, Jastrzębski J, Bilewicz A (2017). Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ²¹¹At for targeted alpha therapy. *RSC Advances*, 7, 41024–41032. <https://doi.org/10.1039/C7RA06376H>
- EMA: PRAC recommendation (2018). [20. 12. 2019], dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/xofigo-article-20-procedure-prac-recommends-restricting-use-prostate-cancer-medicine-xofigo_en.pdf
- Ersahin D, Doddamane I, Cheng D. (2011) Targeted radionuclide therapy. *Cancers*. 3, 3838-3855. <https://doi.org/10.3390/cancers3043838>
- Etchebehere EC, Milton DR, Araujo JC, Swanston NM, Macapinlac HA, Rohren EM (2016). Factors affecting ²²³Ra therapy: clinical experience after 532 cycles from a single institution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 43, 8-20. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3185-4>
- Faraday M (1857). X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc.* 147, 145–181. <http://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>

Farrah SR & Erdos GW (1991) The production of antibacterial tubing, sutures, and bandages by *in situ* precipitation of metallic salts. *Can J Microbiol.* 37, 445-449. <https://doi.org/10.1139/m91-073>

Feine U, Müller-Schauenburg W, Treuner J, Klingebiel T (1987). Metaiodobenzylguanidine (MIBG) labeled with $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$ in neuroblastoma diagnosis and follow-up treatment with a review of the diagnostic results of the International Workshop of Pediatric Oncology held in Rome. *Med Pediatr Oncol.* 15, 181-187. <https://doi.org/10.1002/mpo.2950150408>

Feymann RP (1959). There's Plenty of Room at the Bottom. [25. 3. 2020], dostupné z: <http://www.phy.pku.edu.cn/~qhcao/resources/class/QM/Feynman's-Talk.pdf>

Filipská H & Štamberg K (2005) Mathematical Modeling of a Cs(I)-Sr(II)-Bentonite—Magnetite Sorption System, Simulating the Processes Taking Place in a Deep Geological Repository. *Acta Polytech. J. Adv. Eng.* 45, 11–18.

Gommans GM, Gommans E, van der Zant FM, Teule GJ, van der Schors TG, de Waard JW (2009). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Nanocoll: A radiopharmaceutical for sentinel node localisation in breast cancer — *In vitro* and *in vivo* results. *Appl Radiat Isot.* 67, 1550–1558. <http://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.02.091>

Gudkov S, Shilyagina N, Vodeneev V, Zvyagin A (2015). Targeted Radionuclide Therapy of Human Tumors. *Int J Mol Sci.* 17, 33. <https://doi.org/10.3390/ijms17010033>

Guseva LI, Tikhomirova GS, Dogadkin NN (2004) Anion-Exchange Separation of Radium from Alkaline-Earth Metals and Actinides in Aqueous-Methanol Solutions of HNO_3 . ^{227}Ac - ^{223}Ra Generator. *Radiochemistry.* 46, 58-62. <https://doi.org/10.1023/B:RACH.0000024637.39523.e4>

Hamidi M, Azadi A, Rafiei P (2006) Pharmacokinetic consequences of pegylation. *Drug Deliv.* 13, 399–409. <https://doi.org/10.1080/10717540600814402>

Hartman KB, Hamlin DK, Wilbur DS, Wilson LJ (2007) $^{211}\text{AtCl}$ @US-Tube Nanocapsules: A New Concept in Radiotherapeutic-Agent Design. *Small* 3, 1496-1499. <https://doi.org/10.1002/sml.200700153>

Hildebrand H, Schymura S, Holzwarth U, Gibson N, Dalmiglio M, Franke K (2015) Strategies for radiolabeling of commercial TiO_2 nanopowder as a tool for sensitive nanoparticle detection in complex matrices. *J Nanopart Res.* 17, 278. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3080-8>

HR Inorganics I. – Minerals database – FTIR, Thermo Scientific™ OMNIC™, USA.

Humm JL (1986). Dosimetric Aspect of Radiolabeled Antibodies for Tumor Therapy. *J Nucl Med.* 27, 1490-1497.

Cheng Wang Ch, Deng ZX, Zhang G, Fan S, Li Y (2002). Synthesis of nanocrystalline TiO_2 in alcohols. *Powder Tech.* 125, 39-44.

ICDD PDF-2 Database - version 2013, ISDD, USA

Integrated Pollution Prevention and Control. (2007). Best Available Techniques for the Manufacture of Large Volume Inorganic chemicals – Solid and Other Industry. [20. 2. 2020], dostupné z: https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/sites/default/files/2019-11/lvic-s_bref_0907.pdf

- Jackson MR, Falzone N, Vallis KA (2013) Advances in anticancer radiopharmaceuticals. *Clin. Oncol.* 25, 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.004>
- Jegadeesan G, Al-Abed SR, Sundaram V, Choi H, Scheckel KG, Dionysiou DD (2010). Arsenic sorption on TiO₂ nanoparticles: size and crystallinity effects. *Water Res.* 44, 965-973. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.047>
- Jeon J (2019). Review of Therapeutic Applications of Radiolabeled Functional Nanomaterials. *Int J Mol Sci.* 20, 2323. <https://doi.org/10.3390/ijms20092323>
- Juknius T, Ružauskas M, Tamulevičius T, Šiugždinienė R, Juknienė I, Vasiliauskas A, Jurkevičiūtė A, Tamulevičius S (2016) Antimicrobial Properties of Diamond-Like Carbon/Silver Nanocomposite Thin Films Deposited on Textiles: Towards Smart Bandages. *Materials* 9, 371. <https://doi.org/10.3390/ma9050371>
- Kanna M & Wongnawa S (2008). Mixed amorphous and nanocrystalline TiO₂ powders prepared by sol–gel method: Characterization and photocatalytic study. *Materials Chemistry and Physics.* 110, 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.01.037>
- Kassis AI & Adelstein SJ (2005). Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.* 46, 4S–12S.
- Khan I, Saeed K, Khan I (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry.* 12, 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kozempel J & Vlk M (2014) Nanoconstructs in Targeted Alpha-Therapy. *Recent Pat. Nanomed.* 4, 71–76. <https://doi.org/10.2174/1877912305666150102000549>
- Kozempel J, Vlk M, Málková E, Bajžíková A, Bárta J, Santos-Oliveira R, Rossi AM (2014). Prospective carriers of Ra-223 for targeted alpha particle therapy. *J Radioanal Nucl Chem.* 34, 443-447. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3615-y>
- Kraeber-Bodere F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Frampas E, Faivre-Chauvet A, Rauscher A, Sharkey RM, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J (2015) A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. *Front. Pharmacol.* 6, 54. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00054>
- Kreyling WG, Holzwarth U, Haberl N, Kozempel J, Hirn S, Wenk A, Schleh C, Schäffler M, Lipka J, Semmler-Behnke M, Gibson N (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1. *Nanotoxicology*, 11, 434-442. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306892>
- Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, Kozempel J, Wenk A, Haberl N, Hirn S, Schäffler M, Lipka J, Semmler-Behnke M, Gibson N (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology*, 11, 443-453. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306893>
- Kreyling WG, Holzwarth U, Haberl N, Kozempel J, Wenk A, Hirn S, Schleh C, Schäffler M, Lipka J, Semmler-Behnke M, Gibson N (2017) Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3. *Nanotoxicology*, 11, 454-464. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306894>
- Kumpf VJ & Holland EG (1990). Parenteral Iron Dextran Therapy. *Ann Pharmacother.* 24, 162-166. <https://doi.org/10.1177/106002809002400210>

Kučka J, Hrubý M, Konák C, Kozempel J, Lebeda O (2006) Astatination of nanoparticles containing silver as possible carriers of ^{211}At . *Appl Radiat Isot.* 64, 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2005.07.021>

Li W, Pan G, Zhang M, Zhao D, Yang Y, Chen H, He G (2008) EXAFS studies on adsorption irreversibility of Zn(II) on TiO_2 : temperature dependence. *J Colloid Interface Sci.* 319, 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.11.028>

Liong M, Lu J, Kovochich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, Tamanoi F, Zink JI (2008) Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano.* 2, 889-896. <https://doi.org/10.1021/nn800072t>

Madru R, Kjellman P, Olsson F, Wingårdh K, Ingvar Ch, Ståhlberg F, Olsrud J, Lätt J, Fredriksson S, Knutsson L, Strand SE (2012). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for multimodality SPECT/MRI of sentinel lymph nodes. *J Nucl Med.* 53, 459-463. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.092437>

Marcucci F & Lefoulon F (2004). Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov Today*, 9, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02988-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02988-X)

Maruszevska A & Podsiadly R (2016). Dyes based on the azo- ^1H -pyrrole moiety - synthesis, spectroscopic and electrochemical properties, and adsorption on TiO_2 . *Colora Technol.* 132, 92-97. <https://doi.org/10.1111/cote.12192>

Matsumura Y & Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387-6392.

Mokhodoeva O, Vlk M, Málková E, Kukleva E, Mičolová P, Štamberg K, Šlouf M, Dzhenloda R, Kozempel J (2016) Study of ^{223}Ra uptake mechanism by Fe_3O_4 nanoparticles: Towards new prospective theranostic SPIONs. *J. Nanopart. Res.* 18, 301. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3615-7>

Nano GV & Strathmann TJ (2006), Ferrous Iron Sorption by Hydrous Metal Oxides. *J Colloid Interface Sci.* 297, 443-454. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.11.030>

Nilsson S, Larsen RH, Fosså SD, Balteskard L, Borch KW, Westlin JE, Salberg G, Bruland ØS (2005). First Clinical Experiences with α -Emitting Radium-223 in the Treatment of Skeletal Metastases. *Clin Cancer Res.* 11, 4451-4459. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2244>

Nilsson S, Srang P, Aksnes AK, Franzén L, Olivier P, Pecking A, Staffurth J, Vasanthan S, Andersson C, Bruland ØS (2012). A randomized, dose-response, multicenter phase II study of radium-223 chloride for the palliation of painful bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer.* 48, 678-686. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.023>

Nuclear Data Search: Table of Radioactive Isotopes, [17. 1. 2020], dostupné z: <http://nucldata.nuclear.lu.se/toi/index.asp>.

Padeletti G & Fermo P (2003) How the masters in Umbria, Italy, generated and used nanoparticles in art fabrication during the Renaissance period. *Appl Phys A* 76, 515–525. <https://doi.org/10.1007/s00339-002-1935-1>

Parker C, Nilsson S, Heinrich D. et al (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Eng J Med.* 369, 213-223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213755>

Pena ME, Korfiatis GP, Patel M, Lippincott L, Meng X (2005). Adsorption of As(V) and As(III) by nanocrystalline titanium dioxide. *Water Res.* 39, 2327-2337. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.006>

Pérez-Campaña C, Sansaloni F, Gómez-Vallejo V, Baz Z, Martín A, Moya SE, Lagares JI, Ziolo RF, Llop J (2014) Production of ¹⁸F-Labeled Titanium Dioxide Nanoparticles by Proton Irradiation for Biodistribution and Biological Fate Studies in Rats. *Part. Part. Syst. Charact.* 31, 134-142. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300302>

Piotrowska A, Leszczuk E, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bilewicz A (2013). Functionalized NaA nanozeolites labeled with ^{224,225}Ra for targeted alpha therapy. *J Nanopart Res.* 15, 2082-2092. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2082-7>

Qaim SM (2001) Therapeutic radionuclides and nuclear data. *Radiochim. Acta* 89, 297–302. <https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.4-5.297>

Qaim SM (2015) Nuclear data for medical radionuclides. *J Radioanal Nucl Chem* 305, 233–245. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3923-2>

RES3T/Rosendorf Expert System for Surface and Sorption Thermodynamics. [19. 1. 2018], dostupné z: <https://www.hzdr.de/db/res3t.login>

Rojas JV, Woodward JD, Chen N, Rondinone AJ, Castano CH, Mirzadeh S (2015). Synthesis and characterization of lanthanum phosphate nanoparticles as carriers for ²²³Ra and ²²⁵Ra for targeted alpha therapy. *Nucl Med Biol.* 42, 614-620. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.03.007>

Salvador A, Pascual-Martí MC, Adell JR, Requeni A, March JG (2000) Analytical methodologies for atomic spectrometric determination of metallic oxides in UV sunscreen creams. *J Pharm Biomed Anal.* 22, 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00286-1)

Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi EY, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA (1999). Pharmacokinetics and Dosimetry of an α -Particle Emitter Labeled Antibody: ²¹³Bi-HuM195 (Anti-CD33) in Patients with Leukemia. *J Nucl Med.* 40, 1935-1946.

SPC – GalliaPharm (2014) Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH. Summary of product characteristic: GalliaPharm – radionuclide generator [3. 4. 2018], dostupné z: http://mri.medagencies.org/download/DK_H_2294_001_FinalPI.pdf. Accessed 17 January 2019

SPC – Nanocoll (1988) GE Healthcare S.r.l. Summary of product characteristic [23. 2. 2020], dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0093948&tab=texts>

SPC – Xofigo (2013) EMA (radium Ra-223 dichloride) [20. 1. 2016], dostupné z: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002653/human_med_001692.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

Státní zdravotní ústav. [5. 2. 2016], dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/e-kody-1>.

SÚRAO (2002). Vývoj metod hodnocení účinnosti inženýrských bariér. Průběžná zpráva. [17. 4. 2020], dostupné z: <https://adoc.tips/vyvoj-metod-hodnoceni-ucinnosti-inenyrskych-barier.html>

TheraSphere®. [21. 1. 2016], dostupné z: <http://www.therasphere.com/>.

Thijssen L, Schaart DR, de Vries D, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Denkova AG (2012). Polymersomes as nano-carriers to retain harmful recoil nuclides in alpha radionuclide therapy: A feasibility study. *Radiochim. Acta* 100, 473. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1935>

Tits J, Walther C, Stumpf T, Macé N, Wielanda E (2015). A luminescence line-narrowing spectroscopic study of the uranium(VI) interaction with cementitious materials and titanium dioxide. *Dalton Trans.* 44, 966-976. <https://doi.org/10.1039/c4dt02172j>

Torchilin V (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 63, 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>

Toxicology Data Network, U.S. National Library of Medicine. [17. 11. 2019], dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/index.html>

Van Butsele K, Jérôme R, Jérôme C (2007). Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *Polymer.* 48, 7431-7443. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.048>

Vasileva E, Proinova I, Hadjiivanov K (1996). Solid-phase extraction of heavy metal ions on a high surface area titanium dioxide (anatase). *Analyst*, 121, 607-612. <https://doi.org/10.1039/AN9962100607>

Vesta - K. Momma. [13. 8. 2019], dostupné z: <https://jpmminerals.org/vesta/en/>

Welch MJ & Redvanly CS (2003) Handbook of radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications. New York: J. Wiley, xiv, 848 p. ISBN 0471495603.

Zalutsky MR, Reardon DA, Pozzi OR, Vaidyanathan G, Bigner DD (2007). Targeted α -Particle Radiotherapy with ^{211}At -labeled Monoclonal Antibodies. *Nucl Med Biol.* 34, 779-785. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.03.007>

Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Wong TZ, Bigner DD (2008). Clinical Experience with α -Particle-Emitting ^{211}At : Treatment of Recurrent Brain Tumor Patients with ^{211}At -Labeled Chimeric Antitnascin Monoclonal Antibody 81C6. *J Nucl Med.* 49, 30-38. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.046938>

Zhang WF, He YL, Zhang MS, Yin Z, Chen Q (2000). Raman scattering study on anatase TiO_2 nanocrystals. *J Phys D: Appl Phys.* 33, 912-916. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/33/8/305>

Zhu C, Bandekar A, Sempkowski M, Banerjee SR, Pomper MG, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Sofou S (2015). Nanoconjugation of PSMA-Targeting Ligands Enhances Perinuclear Localization and Improves Efficacy of Delivered Alpha-Particle Emitters against Tumor Endothelial Analogues. *Mol Cancer Ther.* 15, 106-113. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0207>

Ziegler JF. SRIM-2013 code. [28. 10. 2014], dostupné z: <http://www.srim.org>

Přílohy

Prohlášení spoluautorů

V této podkapitole je uveden souhlas spoluautorů předkládaných publikací ohledně využití publikovaných výsledků v rámci této disertační práce. Jako zástupce za spoluautory je zvolen korespondenční autor doc. RNDr. Ján Kozempel, PhD. Dále je zde uvedeno přispění Petry Suchánkové k dané publikaci vyjádřené slovním vyjádřením i v procentech.



Prohlášení korespondenčního autora

Prohlašuji, že souhlasím s využitím publikovaných výsledků z následujících publikací (Jméno a podíl spoluautorství Petry Suchánkové (Mičolové) v rámci jednotlivých publikací je uvedeno tučně.):

Suchánková P (40 %), Červenák J (20 %), Kozempel J (15 %), Vlk M (15 %) (2018) Cílená alfa terapie a její místo v moderní nukleární medicíně. *NuklMed.* 7, 7-12.

Jedná se o rešeršní práci, o jejichž vypracování byla Petra Suchánková požádána prim. Langem pro časopis Nukleární medicína na základě příspěvku, který připravila ve spolupráci s Jaroslavem Červenákem pro Dny nukleární medicíny. Provedla část rešerše týkající se historie, používanými materiály a jejich značením vybraným radionuklidy.

Kukleva E (35 %), **Suchánková P (15 %)**, Štamberg K (15 %), Vlk M (10 %), Šlouf M (15 %) Kozempel J (10 %) (2019) Surface protolytic property characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *RSC Advances*, 9, 21989-21995. DOI: 10.1039/c9ra03698a.

Suchánková P (25 %), Kukleva E (25 %), Štamberg K (15 %), Nykl P (15 %), Vlk M (10 %) Kozempel J (10 %) (2020) Study of ^{223}Ra uptake mechanism by hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles as a function of pH. *RSC Advances*, 10, 3659–3666. DOI: 10.1039/c9ra08953e.

Suchánková P (20 %), Kukleva E (20 %), Štamberg K (15 %), Nykl P (15 %), Sakmár M (10 %), Vlk M (10 %) Kozempel J (10 %) (2020) Determination, modelling and evaluation of kinetics of ^{223}Ra sorption on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *Materials*, 13, 1915-1924. DOI: 10.3390/ma13081915.

Její příspěvek k těmto publikacím bylo především plánování a příprava experimentů, provádění samotné experimentální práce, částečně charakterizovala získaný materiál, vyhodnocovala získané výsledky na jejichž základě navrhovala následující postup prací a částečně se podílela i na psaní těchto publikací. Vše výše zmíněné se týkalo především materiálu oxidu titaničitého.

Suchánková P (35 %), Kukleva E (15 %), Málková E (10 %), Nykl P (10 %), Sakmár M (10 %), Vlk M (10 %) Kozempel J (10 %) (2020) Radiolabelled hydroxyapatite and titanium



Břehová 7, 115 19, Praha 1

dioxide nanoparticles: preparation and stability *in vitro* of prospective theranostic nanocarriers for ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Podáno do *Nanomaterials*, ref. označení Manuscript No. nanomaterials-876253.

Na této publikaci se Petra Suchánková podílela přípravou experimentů, prováděním samotné experimentální práce, vyhodnocovala získané výsledky na jejichž základě navrhovala následující postup prací. Ze značné části tuto publikaci napsala. Vše výše zmíněné se týkalo materiálu oxidu titaničitého.

Za kolektiv autorů:

doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.

V Praze, 8. 7. 2020

Publikace A:

Suchánková P, Červenák J, Kozempel J, Vlk M (2018) Cílená alfa terapie a její místo v moderní nukleární medicíně. *NuklMed.* 7, 7-12.

Cílená alfa terapie a její místo v moderní nukleární medicíně

Targeted alpha therapy and its role in a modern nuclear medicine

Petra Suchánková¹, Jaroslav Červenák^{2,3}, Ján Kozempel¹, Martin Vlk¹

¹ *Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra jaderné chemie, České vysoké učení technické v Praze, ČR*

² *Ústav jaderné fyziky Akademie věd České republiky, v.v.i., Husinec-Řež, ČR*

³ *Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, ČR*

jan.kozempel@jfifi.cvut.cz

ABSTRAKT:

Cíl: Shrnutí vývoje terapie pomocí radionuklidů a potenciálu alfa radionuklidů v cílené terapii.

Úvod: Zájem o radionuklidy emitující alfa částice v nukleární medicíně vzrůstá. V rámci cílené alfa terapie jsou využívány nejen samotné radionuklidy podléhající jedné nebo několika alfa přeměnám, ale dochází především k vývoji nosičů alfa zářičů se specifickou akumulací v nádorových buňkách, následně využitelných jako radiofarmak.

Materiál: Radium se již od roku 1908, tedy necelých deset let po jeho objevu, používalo v medicíně především k léčbě kožních onemocnění. Od té doby prošla terapie pomocí radionuklidů dlouhou cestu – od ²²⁶Ra, přes negatronové zářiče, ²¹¹At, až po nuklidy tvořící krátké rozpadové řady označované jako in vivo generátory, např.: ²²⁵Ac, ²¹³Bi či ²²³Ra.

Předností alfa terapie je uvolnění vysoké energie v malém objemu, čímž dochází k nižší radiační zátěži okolních tkání. Díky vysokému LET alfa částic vznikají dvojité zlomy DNA, které jsou pro buňku letální. Z tohoto důvodu by měly být nosiče alfa radionuklidů schopné odolat vysoké uvolněné energii, aby nedošlo k jejich radiolýze. Rovněž je důležitá stabilizace odraženého dceřiného radionuklidu tak, aby nedošlo k jeho úniku do okolní tkáně, a tedy k jejímu poškození. Mezi studovanými nosiči alfa radionuklidů převažují anorganické nanomateriály, např. nanočástice oxidu železa, titanu, zlata či hydroxyapatity.

Závěr: Výzkum cílené alfa terapie otevírá cestu k léčbě některých druhů nádorových onemocnění, především ke zvýšení kvality a prodloužení života pacientů. Proto by mělo být i nadále věnováno úsilí přípravě nových radionuklidů, vhodných jak pro včasnou diagnostiku, tak i pro následnou terapii. Patříčná pozornost by měla být rovněž dedikována nosičům terapeutických radionuklidů, nejlépe splňujících i teranostický koncept, s ohledem na jejich chemickou a radiační stabilitu a dostupnost.

Klíčová slova: alfa radionuklidy, ²²³Ra, nosiče, nanočástice, cílená terapie, teranostika
NuklMed 2018;7:7-13

ABSTRACT:

Aim: Summary of the development of therapy using radionuclides and potential of alpha radionuclides in targeted therapy.

Introduction: The interest aimed on radionuclides emitting alpha particles is constantly growing in nuclear medicine. In the case of targeted alpha therapy, not only radionuclides decaying by one or several alphas are used, but also the suitable carriers for these radionuclides are developed and could be used as radiopharmaceuticals.

Material: Since 1908, less than ten years after its discovery, radium had been used in medicine mainly to treat skin diseases. Since then therapy using radionuclides has gone a long way – from radium-226, through electron emitters, ²¹¹At, to nuclides forming short-lived decay chains known as in vivo generators, e.g. ²²⁵Ac, ²¹³Bi or ²²³Ra.

The advantage of alpha therapy is the release of a high energy in a small volume, which leads to lower radiation exposure of surrounding tissues. Due to the high LET of alpha particles, double-strand breaks of DNA molecules, which are lethal for the cell, are formed. For this reason, the carriers of alpha radionuclides should resist to the high released energy, in order to prevent its radiolysis. The stabilisation of reflected daughter nuclide is also important because of its release into surrounding tissue and thus its damage. Among studied carriers of alpha radionuclides inorganic nanomaterials dominate, e.g. iron, titanium or gold oxide nanoparticles or hydroxyapatite.

Conclusion: The research in the field of targeted alpha therapy opens the way to treatment of some types of cancerous diseases and especially the increase of patients' life quality and its extension. Therefore, the effort to prepare new radionuclides should continue, suitable both for early diagnosis and subsequent therapy. Particular attention should also be given to the therapeutic radionuclide carriers, best suited to the theranostic concept, with regard to their chemical and radiation stability and availability.

Key Words: alpha radionuclides, ²²³Ra, carriers, nanoparticles, targeted therapy, theranostics

ÚVOD

Radionuklidová terapie onkologických onemocnění využívá emitory částicového záření, zejména beta, alfa, či v menší míře přeměny emisí Augerových elektronů, které působí na mnohobuněčné, buněčné, respektive subbuněčné úrovni. Alfa radionuklidy začaly být využívány pro medicínské účely už krátce po svém objevu.

V prosinci 1898 manželé Marie a Pierre Curieovi ohlásili objev nového prvku vyseparovaného ze smolince – radia. Vědecká veřejnost ale požadovala viditelný důkaz tohoto prvku, a tak si manželé Curieovi práci rozdělili: Pierre se věnoval výzkumu radioaktivity a Marie (Obr. 1) izolaci radia. Po nemalém úsilí se jí podařilo získat 0,1 g čistého RaCl_2 a určila hmotnostní číslo takto připraveného radia: 226.

Roku 1900 Walkhoff a Giesel zjistili, že radium má i fyziologické účinky, a tak se Pierre Curie ve spolupráci s mnoha významnými lékaři pustil do studia těchto účinků na zvířatech. Velmi rychle si všimli, že radium dokáže hojit rány a dokonce i vyléčit nádory. V červnu 1901 Pierre Curie spolu s Henrim Becquerelem vydali „Pojednání o fyziologických účincích paprsků radia“. Tehdy začala éra radioterapie, původně zvaná „radiumterapie“ nebo „Curieterapie“.

Radium se ihned stalo téměř univerzálním lékem na různá onemocnění, např. nádory kůže. V průběhu první světové války se dokonce pomocí radia „rentgenovali“ postižení, aby mohli lékaři rychleji a lépe lokalizovat kulku v jejich těle. Za pár let se radia chopily i farmaceutické firmy a začaly vyrábět nespočet produktů se „záračnými účinky“: mastičky, obklady, kapky či dokonce výživové doplňky pro zvířata.

Postupně ale byly odhaleny i negativní dopady „radiového“ záření na lidský organizmus a v roce 1921 byla vydána pravidla a doporučení pro zacházení s radiumem. V roce 1937 bylo radium zakázáno k nelékařským účelům až nakonec, v roce 1976, bylo od radia upuštěno definitivně a vystřídal ho iridium-192 nebo cesium-137.

Od časů manželů Curieových urazila radioterapie pořádný kus cesty, přičemž po objevu umělé radioaktivity už není odkázána jen na radionuklidy, které se vyskytují v přírodě. Díky různým fyzikálním a chemickým charakteristikám uměle připravených nuklidů se naskytla možnost vybrat radionuklid pro daného pacienta „na míru“.^{1,2,3}

Cílená alfa terapie (TAT)

Využití radionuklidů emitujících alfa částice ve výzkumu a klinických testech neustále roste. Prvními systémy používanými pro cílenou alfa terapii (angl. targeted alpha therapy – TAT) byly radionuklidy rozpadající se pouze jedním alfa rozpadem, např. ^{211}At .^{4,5} Následně byla pozornost věnována tzv. in vivo generátorům. Jedná se o radionuklidy, které se rozpadají kaskádou alfa rozpadů, např. ^{223}Ra , ^{225}Ac nebo ^{213}Bi .

Vysoká uvolněná energie při alfa rozpadu, která je přínosem pro alfa terapii, je však komplikací při konstrukci radiofarmaka. Během rozpadu dochází k radiačnímu poškození nosiče daného radionuklidu. Tento problém je důležitě vyřešit především pro molekuly nesoucí radionuklidy, které se rozpadají kaskádou několika rozpadů. Může totiž docházet k úniku dceřiných produktů, které následně mohou zvyšovat radiační zátěž okolních tkání.

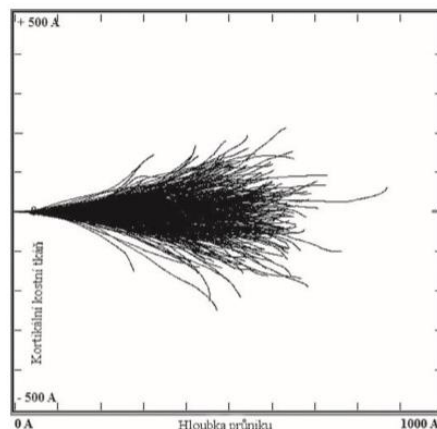
Na Obr. 2 je uveden příklad simulace stopy uvolněného horkého atomu v kortikální kostní tkáni za předpokladu, že je mateřský radionuklid uprostřed částice o poloměru 50 nm. Jak je z obrázku patrné, uvolněný horký atom může jednoduše z částice uniknout. Alfa částice, která odnáší převážnou většinu energie, má v tomto materiálu dosah okolo 37 μm , což odpovídá několika buněčným poloměrům. Pokud je atom na povrchu na-



Obr. 1 Marie Skłodowska-Curie, objevitelka radia.¹

nočástice, může následně dojít k jeho zpětné sorpci.⁶

Pokud nadefinujeme buněčný poloměr 20 μm , bude průměrný dosah beta částic emitovaných radionuklidy 215 buněčných poloměrů pro ^{90}Y ($E_{\beta\text{max}} = 2,3 \text{ MeV}$), 40 buněčných poloměrů pro ^{131}I ($E_{\beta\text{max}} = 606,3 \text{ keV}$), ale u alfa částic emitovaných radionuklidem ^{211}At bude průměrný dosah pouze 6 buněčných poloměrů. Bylo vypočítáno, že frakce energie, která se uvolní v nádorové tkáni o průměru 200 μm , bude pouze 1,5 % pro ^{90}Y , 17 % pro ^{131}I , avšak 50 % pro ^{211}At . Ve srovnání s ^{211}At je tedy potřeba tisíckrát více rozpadů ^{90}Y pro dosažení stejného efektu.⁷



Obr. 2 Simulace stopy uvolněného horkého atomu ^{219}Rn o energii 100 keV z bodového zdroje (500 opakování) v materiálu představujícím kortikální kostní tkáň ($\rho = 1,92 \text{ g/cm}^3$).⁶

nuklid	příprava	rozpad	poločas přeměny	energie [MeV] a procentuální zastoupení α částic ^{a)}	uvolněná energie [MeV] ^{b)}	ref.
²¹¹ At	²⁰⁹ Bi(α ,2n)	α (41,8 %)	7,21 h	5,87 (41,8 %)	–	8
		EZ (58,2 %)		7,45 (57,4 %) ^{c)}		
²²⁵ Ac	²²⁶ Ra(p,2n)	α (100 %)	10,0 d	5,79 (18,1 %)	27,3	8
				5,83 (50,7 %)		
²¹² Bi	generátor ²²⁴ Ra/ ²¹² Bi	α (35,9 %)	60,55 min	6,05 (25,1 %)	–	8
		β^- (64,1 %)		8,78 (64,1 %) ^{d)}		
²¹³ Bi	generátor ²²⁵ Ac/ ²¹³ Bi	α (2,2 %)	45,59 min	5,88 (1,96 %)	–	8
		β^- (97,8 %)		8,38 (97,8 %) ^{e)}		
²²³ Ra	generátor	α (100 %)	11,43 d	5,61 (25,2 %)	26,4	9
				5,72 (51,6 %)		
²²⁴ Ra	generátor	α (100 %)	3,66 d	5,45 (5,1 %)	26,6	8
				5,69 (94,9 %)		
¹⁴⁹ Tb	¹⁵² Gd(p,4n)	α (16,7 %)	4,12 h	3,97 (16,7 %)	–	10
		β^+ (7,1 %)				
		EZ (76,2 %)				
²³⁰ U	²³¹ Pa(p,2n)	α (100 %)	20,8 d	5,82 (32,0 %)	38,8	11
				5,89 (67,4 %)		

Tab. 1 Přehled radionuklidů (potenciálně) používaných pro TAT a jejich vlastností¹²
a) α částice s nejvyššími intenzitami
b) průměrná energie odnesená α částicemi po rozpadu celé řady (viz. Obr. 3, 4 a 6)

c) z rozpadu ²¹¹Po a intenzita propočítána na rozpad ²¹¹At
d) z rozpadu ²¹²Po a intenzita propočítána na rozpad ²¹²Bi
e) z rozpadu ²¹³Po a intenzita propočítána na rozpad ²¹³Bi

Alfa radionuklidy

Mezi radionuklidy, které si již našly místo jak v preklinických, tak i klinických testech a z nichž některé jsou v terapii již běžně využívány, patří například izotopy aktinia (²²⁵Ac), bismutu (²¹²Bi, ²¹³Bi) nebo radia (²²³Ra, ²²⁴Ra), jejichž vlastnosti shrnuje Tab. 1.

Zvláštní postavení mezi alfa terapeutickými radionuklidy přísluší astatu (²¹¹At), který je předmětem mnoha in vitro i in vivo experimentů. Astat-211 je jedním z prvních studovaných radionuklidů pro alfa terapii. Předpokládá se, že by díky své podobnosti s jodem mohl být využitelný k léčbě hypertyreózy. Nejčastěji je ²¹¹At navazován na protilátku. Avšak v důsledku jeho nejasné chemie není v klinické praxi rozšířen. Jedním ze studovaných příkladů terapeutického potenciálu ²¹¹At byla léčba intraperitoneálně rozšířeného ovariálního karcinomu OVCAR-3 pomocí ²¹¹At značené protilátky MOv18. My-

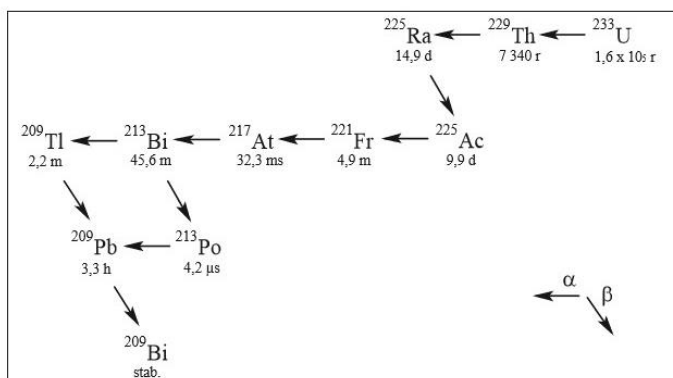
ším byla intraperitoneální cestou podána aktivita 400 kBq. Byl zjištěn medián přežití 213 dní oproti 138 dnům u kontrolních zvířat, které byly léčeny fyziologickým roztokem.¹³ Také byla studována výhoda alfa zářičů oproti beta zářičům a byla demonstrována studii ²¹¹At značené protilátky MOv18 (A = 310–400 kBq) a ¹³¹I značené protilátky MOv18 (aplikovaná aktivita 5,1–6,2 MBq). V prvním případě byl u 9 z 10 zvířat pozorován zánik makro- i mikronádorů, kdežto ve druhém pouze u 3 z 10.¹⁴

Jedním z velmi perspektivních preklinicky i klinicky ověřených radionuklidů přeměňujících se kaskádou rozpadů (Obr. 3) doprovázenou současnou emisí gama záření je ²²⁵Ac (10 d). Doprovodného gama záření lze s výhodou využít pro zobrazení biodistribuce pomocí SPECT. Aktinium-225 je připravováno (p,2n) reakcí na terči ²²⁶Ra, přičemž jednou z dalších možností jeho přípravy (oproti Tab. 1) je separace ²²⁹Th/²²⁵Ra z ²²³U, která probíhá iontovou výměnou a ex-

trakční chromatografií.¹⁵ V klinických studiích^{16,17} jsou nyní protilátky anti-CD33 (myší protilátka akutní myeloidní leukémie) a HuM195 (lidská protilátka akutní myeloidní leukémie) konjugovány s ²²⁵Ac. V jiné studii¹⁸ se autoři zaměřují na využití konjugátu ²²⁵Ac-PSMA-617 v terapii karcinomu prostaty ve srovnání s ¹⁷⁷Lu-PSMA-617, který byl pacientovi kontraindikován a místo beta zářiče byla pacientovi aplikována dávka 9–10 MBq ²²⁵Ac-PSMA-617 ve třech cyklech (100 kBq/kg) s další premedikací. Postterapeutický PET/CT pomocí ⁶⁸Ga-PSMA indikoval úplný úbytek léze a signifikantní depresi PSA (z původně 2 923 ng/mL na < 0,1 ng/mL) devět měsíců po zahájení experimentální terapie.

Pozornost jak v preklinických, tak i klinických studiích byla rovněž věnována izotopům bismutu ²¹²Bi a ²¹³Bi. První z nich – izotop ²¹²Bi – je získáván elucí generátoru ²²⁴Ra/²¹²Bi (Obr. 4), alternativně však také pomocí mateřského radionuklidu ²¹²Pb, který je beta zářičem s poločasem rozpadu 10 h a tvoří komplex s 2-(4-isothiokyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-karbamoyl methyl)-cyklohexanem (TCMC) (Obr. 5-1). Konjugát ²¹²Pb-TCMC byl následně využíván jako in vivo generátor ²¹²Bi. Klinické testy ²¹²Pb-TCMC-trastuzumab byly prováděny u pacientů s HER-2 exprimujícím karcinomem ovárií, přičemž byla zjišťována toxicita, farmakokinetika a dozimetrie. Klinická studie ukázala minimální distribuci radiofarmaka mimo peritoneální dutinu, což koreluje s preklinickými studiemi.¹⁹

Rovněž druhý izotop – ²¹³Bi – nachází potenciální využití v TAT. Byly studovány různé případy značení protilátek tímto nuklidem, avšak bylo zapotřebí se vypořádat s jeho krátkým poločasem rozpadu. Z tohoto důvodu je tedy klíčové nalezení vhodné protilátky s adekvátně rychlou kinetikou. Ve většině studií byl využíván jako chelátor N-[2-amino-3-(p-isothiokyanatofenyl)propyl]-trans-cyklohexan-1,2-diamin-



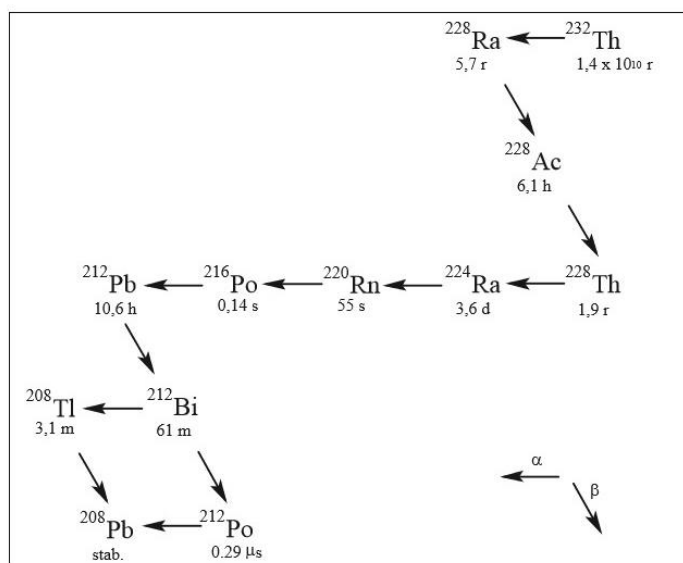
Obr. 3 Rozpadová řada ²³³U.

-N,N',N'',N'''-pentaocetová kyselina jako (CHX-A''-DTPA) (Obr. 5-2), konjugát ²¹³Bi-CHX-A''-DTPA je následně navázán na protilátku. První cílená radioterapie s alfa emitujícími radionuklidy byla studována u pacientů s akutní myeloidní leukémií s využitím konjugátu ²¹³Bi-HuM195. Celková podávaná aktivita byla v rozmezí 0,6–1,6 GBq ve 3–6 aplikacích i.v. po 10,4 – 15,5 – 20,7 MBq/kg během 48 h. Poměr absorbované dávky mezi kostní dřeví, játra a slezinu k celému tělu byl přibližně 1000krát větší než u radioterapeutik beta-emitujících radionuklidů. I když pacienti nedosáhli úplné remise, byla poprvé ukázána realizovatelnost cílené alfa terapie s přijatelnou bezpečností pro pacienta i zdravotnický personál.²⁰

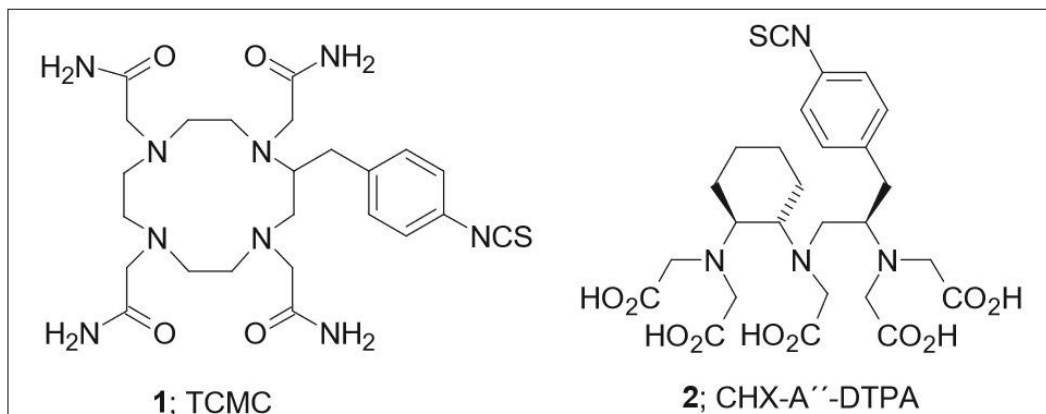
Z hlediska cílené alfa terapie je v současnosti pravděpodobně nejatraktivnějším izotopem ²²³Ra, jehož jednou z výhod je kratší poločas dceřiného radonu (²¹⁹Rn – 3,9 s) oproti ²²⁰Rn z přeměnové řady ²²⁴Ra, který se rozpadá s poločasem 55,5 s a u kterého je tedy větší pravděpodobnost emanace z kostní tkáně.

Izotop ²²³Ra sleduje metabolismus vápníku a díky tomu je selektivně cílen do kosti, především v místě zvýšeného metabolismu kostní tkáně – metastáz, kde tvoří komplexy s hydroxyapatitem.²¹ Xofigo® ²²³RaCl₂ je schválen FDA a používán v klinické praxi už několik let. Dodává se v podobě injekčního roztoku o objemové aktivitě 1 000 kBq/ml. Indikace pro použití přípravku Xofigo® je kastrálně rezistentní karcinom prostaty se symptomatickými metastázami v kostech bez známých viscerálních metastáz, přičemž intravenózně podávaná aktivita je 50 kBq/kg/inj. v intervalu 4 týdnů v 6 terapeutických dávkách.²²

V nedávno publikované klinické studii týkající se terapie kastrálně rezistentního karcinomu prostaty přípravkem Xofigo® bylo retrospektivně prozkoumáno 110 pacientů. Primárně bylo sledováno celkové přežití, přežití bez kostních příhod a selhání kostní dřevě a dále parametry stanovené před prvním podáním ²²³Ra, tedy sérová hladina hemoglobinu, hladina PSA, alkalické fosfatázy, skóre bolesti, použití chemoterapie či externího ozařování. Na základě těchto informací bylo zjištěno, že pacienti dobře tolerují chemoterapii a sekundární hormonální terapii doprovázenou



Obr. 4 Rozpadová řada ²³²Th.



Obr. 5-1 TCMC.

Obr. 5-2 CHX-A''-DTPA.

^{223}Ra . Na druhé straně riziko selhání kostní dřene vzrostlo se současným externím ozařováním. Následky externího ozařování během terapie přípravkem Xofigo[®] však doposud nebyly popsány, a je proto nutná jejich další studie.²³ Kromě klinicky používaného ^{223}Ra je vyvíjeno značné úsilí o nalezení nosičů, které by společně s ^{223}Ra a případně i dalšími radionuklidy byly vhodné pro TAT, jako například hydroxyapatity²¹, LaPO_4 ²⁴, nanozeolity²⁵ či superparamagnetické nanočástice.²⁶

Nosiče alfa radionuklidů

Nosiče radionuklidů rozpadajících se jednou nebo několika emisemi alfa i beta částic musí kromě obecných požadavků na chemické sloučeniny používané pro značení či transport splňovat i další specifické nároky.

Kromě účelové volby vhodného radionuklidu je nutné věnovat patřičnou pozornost také nosiči a celému cílovému systému – vektoru. Výběrem diagnostického (PET, SPECT) či terapeutického radionuklidu s využitím konkrétního vektoru je možné připravit přínosné teranostické léčivo. Cílení systému do nádorové tkáně může probíhat několika způsoby: jednak pasivním cílením např. na základě velikosti částic, jednak cílením aktivním, kdy dochází k vychytání daného radiofarmaka na základě specifické interakce, např. vazby na nosiči vázaného ligandu nebo antigenu na receptor.

K pasivnímu cílení farmak i radiofarmak do nádorové tkáně lze využít EPR efektu (Enhanced Permeation and Retention). Nádorová tkáň roste poměrně rychle, a tedy tvorba nových cév není precizní a stává se tak pro velké molekuly přístupnější a díky nedostatečnému odtoku lymfy jsou v ní i zadržovány. Velikost struktury tedy může určit akumulaci farmak v nádorové tkáni. EPR lze využít i pro cílení látek do tkání, jejichž cévy jsou zúžené a farmakum je aplikováno přímo do cévy vyživující příslušnou tkáň či orgán.^{27,28}

Na druhé straně, prostřednictvím specifického ligandu nebo antigenu dochází k aktivnímu transportu radiofarmak přímo do nádorové tkáně. Vazbou ligandu či antigenu na daný receptor dojde k jejich selektivnímu vychytání v cílových oblastech. Nádorové buňky ve většině případů mají na svém povrchu velké množství receptorů na rozdíl od zdravé tkáně, kde je jejich počet podstatně menší nebo úplně chybí.

Navázáním selektivního ligandu či antigenu na povrch nanočástice nesoucí radionuklid je možné výrazně ovlivnit či přímo docílit transport radionuklidu do nádorové tkáně a tím přispět ke snížení radiační zátěže pacienta. Vazba ligandu s nanočásticí musí být zprostředkována kovalentní vazbou přes tzv. spacer – dvojitý alifatický nebo aromatický uhlíkatý řetězec, aniž by negativním způsobem ovlivňovala specifickou vazbu ligand-receptor.²⁹

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím konstrukci nového alfa-radiofarmaka je stabilizace dceřiných produktů v nosiči. Touto stabilizací je možné dosáhnout přesnějšího cílení a uvolnění energie v požadované tkáni. Jedním z možných přístupů je využití nanočástic, např. nanočástic kovů jako je zlato, stříbro či železo (superparamagnetické nanočástice).²⁶ Dále jsou studovány částice hydroxyapatitu, který je přirozenou složkou kostní tkáně, nanozeolity nebo oxid titaničitý.

Nanočástice zlata mají hned několik důvodů pro využití v nanotechnologiích pro terapii i diagnostiku nádorových onemocnění. Jejich syntéza je jednoduchá, ekonomicky nenáročná, lze je syntetizovat v širokém rozmezí velikostí (od 2 do 500 nm) a tvarů. Další výhodou je možnost jejich povrchové modifikace pomocí biomolekul. Byla potvrzena jejich biokompatibilita a nízká akutní toxicita.³⁰ Pro terapeutické účely byly syntetizovány zlaté nanočástice značené ^{211}At , které byly konjugovány se substancí P (krátký peptid s vysokou afinitou k NK1 receptorům buněk gliomu). Stabilita těchto nanočástic byla studována v roztoku chloridu sodného, cysteinu, glutathionu a v lidském séru. Uvolněná aktivita ve všech roztocích se pohybovala pod 0,1 %.³¹

Podobně jako zlato jsou využívány i nanočástice stříbra, které jsou studovány především z důvodu jejich antibakteriálních vlastností, např. k čištění vody. V rámci studie TAT byly připraveny nanočástice stříbra obalené PEO (poly(ethylen oxid)), které odpuzují plazmatické proteiny a spolu se správnou velikostí částic mohou chránit před pohlcením makrofágy. Takto modifikované nanočástice byly značeny ^{211}At . Stabilita [^{211}At]Ag-PEO nanočástic byla studována při 37°C po dobu 3,5 h v přítomnosti kompetitivních chloridových iontů. Z těchto prvotních experimentů vyplynulo, že za takto zadaných podmínek jsou značené nanočástice v suspenzi stabilní.³²

Přehledová práce

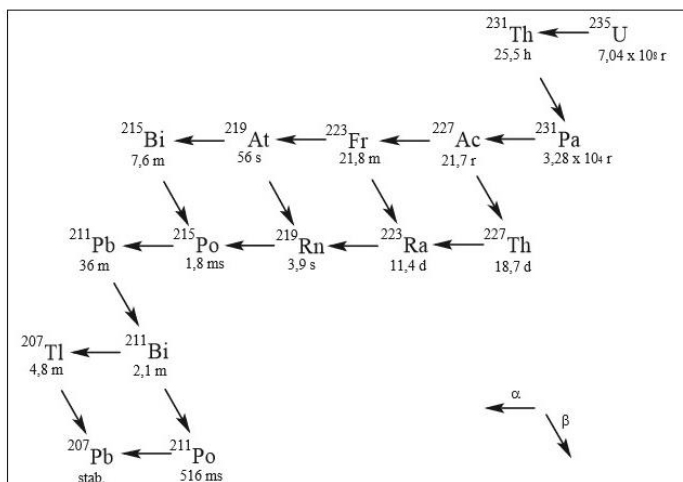
Zeolity jsou biokompatibilní krystalické hliníkokřemičité materiály. Jejich zajímavost tkví v prostorovém uspořádání: jsou tvořeny kanálky a dutinkami, které mají konstantní rozměry. V intersticiálních polohách jsou zachyceny ionty alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Toho bylo využito pro syntézu nanozeolitů značených radioizotopy Ra.²⁵

Hydroxyapatity jsou minerální látky přirozeně se nacházející v kostní tkáni či zubech. Jedná se o materiály, které se díky své biokompatibilitě běžně používají ve formě bločků či prášku k náhradě kosti a již jsou schváleny FDA. Díky své biokompatibilitě, dobré radiační stabilitě a schopnosti stabilizovat dceřiné atomy jsou tyto materiály studovány ve spojitosti s TAT. Bylo prováděno značení ²²³Ra pro terapii, které díky své analogii s vápníkem při inkorporaci radionuklidu do struktury hydroxyapatitu nahrazuje jeho místo. Uvolněné aktivity byly studovány ve fyziologickém roztoku. Po 24 hodinách bylo uvolněno méně než 5 % celkové aktivity.²¹

Magnetické nanočástice jsou využívány především v diagnostice. Jejich využití s terapeutickými radionuklidy je teprve studováno. První vlašťovkou je studie přípravy ²²³Ra-SPIONS (nanočástice Fe₃O₄). Jejich dobrá stabilita in vitro je slibný předpoklad pro další in vivo testy. Bylo zjištěno, že proces zachytu ²²³Ra nanočásticemi Fe₃O₄ odpovídá sorpci a povrchové komplexaci spíše než mechanismu srážení. Počáteční vychytávání ²²³Ra na povrchu je následováno pomalejším procesem zabudování ²²³Ra do intersticiálních poloh.²⁶

ZÁVĚR

Cílená radionuklidová terapie si klade za cíl nastavit léčbu pro pacienta na míru a má potenciál být levnější s nižší morbiditou v porovnání se standardní terapií (např. radiační synovektomie je alternativou k chirurgickému zákroku při revmatoidní artritidě; je levnější a pacient se po ní může dříve vrátit do běžného života). Výzkum na poli cílené alfa terapie tedy jednoznačně otevírá cestu ke zkvalitnění léčby některých druhů onemocnění, zvýšení kvality a prodloužení života pacientů. To jsou jednoznačně důvody, proč by mělo být i nadále věnováno nemalé úsilí přípravě nových a perspektivních radionuklidů a jejich nosičů ve vývoji tohoto typu léčby. Aby to všechno bylo možné, bude potřeba vysoce kvalifikovaný personál s interdisciplinárním zázemím ve fyzice, chemii, biologii, medicíně a dalších odvětvích vědy a techniky. Jinak by hrozilo, že se z TAT stane sice vysoce účinná, ale jen teoretická nebo jen zřídka využívaná možnost léčby.



Obr. 6 Rozpadová řada ²²⁵U.

Literatura

1. Běhounek F. Radium a paprsky X (Tajemství hmoty a energie). Praha, Šolc a Šimáček, Nakladatelská společnost s r. o. 1924, 174 p
2. Bayounes O, Souffrin C, Meunier D La radium: découverte, utilisation et danger; [online]. 2013. [cit. 1. 9. 2015]. Dostupné na: <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/le-radium-découverte-utilisation-et-danger>.
3. Curiová E. Paní Curiová. Praha, vyd. Mladá fronta, nakladatelství Máj, 1964, 320 p
4. Zalutsky MR, Reardon DA, Pozzia OR et al. Targeted α -Particle Radiotherapy with 211At-labeled Monoclonal Antibodies. Nucl Med Biol. 2007;34:779-785
5. Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, et al. Clinical Experience with α -Particle-Emitting 211At: Treatment of Recurrent Brain Tumor Patients with 211At-Labeled Chimeric Antineuroblastin Monoclonal Antibody 81C6. J Nucl Med. 2008;49:30-38
6. Kozempel J, Vlk M. Nanoconstructs in Targeted Alpha-Therapy. Recent Patents on Nanomedicine 2014;4:71-76
7. Humm JL. Dosimetric Aspect of Radiolabeled Antibodies for Tumor Therapy. J Nucl Med. 1986;27:1490-1497
8. Vértes A, Nagy S, Klencsár Z, et al. Handbook of Nuclear Chemistry, Heidelberg, Springer Sciences Business Media B.V. 2011, 389 p
9. Shishkin DN, Krupitskii SV, Kuznetsov SA. Extraction Generator of Ra-223 for Nuclear Medicine, Radiochemistry, 2011;53:404-406
10. Steyn GF, Vermeulen C, Szelecsenyi F et al. Cross sections of proton-induced reactions on ¹⁵²Gd, ¹⁵⁵Gd and ¹⁵⁶Tb with emphasis on the production of selected Tb radionuclides. Nucl Instrum Methods Phys Res B. 2014;319:128-140
11. Morgenstern A, Lebeda O, Stursa J, et al. Production of U-230/Th-226 for Targeted Alpha Therapy via Proton Irradiation of Pa-231, Anal. Chem. 2008;80:8763-8770
12. NuDat 2.6 National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory; [online]. [cit. 1. 4. 2016]. Dostupné na: www.nndc.bnl.gov/nudat2/.
13. Andersson H, Elqqvist J, Horvath G et al. Astatine-211-labeled Antibodies for Treatment of Disseminated Ovarian Cancer: An Overview of Results in an Ovarian Tumor Model. Clin Cancer Res. 2003;9:3914-3921
14. Andersson H, Palm S, Lindegren S et al. Comparison of the therapeutic efficacy of 211At- and 131I-labelled monoclonal antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer. Anticancer Res. 2001;21:409-412
15. Apostolidis C, Molinet R, McGinley J et al. Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy. Appl Radiat Isot. 2005;62:383-387
16. U.S. National Institutes of health. Low Dose Cytarabine and Lintuzumab-Ac-225 in Older AML Patients. Ident. No.: NCT02575963
17. U.S. National Institutes of health. Targeted Atomic Nano-Generators (Actini-

- um-225-Labeled Humanized Anti-CD33 Monoclonal Antibody HuM195) in Patients With Advanced Myeloid Malignancies. Ident. No.: NCT00672165
18. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL et al. 225Ac-PMSA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2016;57:1941-1944
 19. Meredith R F, Torgue J, Shen S et al. Pharmacokinetics and Imaging of 212Pb-TCMC-Trastuzumab After Intraperitoneal Administration in Ovarian Cancer Patients. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2014;29:12-17
 20. Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG et al. Pharmacokinetics and Dosimetry of an α -Particle Emitter Labeled Antibody: 213Bi-HuM195 (Anti-CD33) in Patients with Leukemia. *J Nucl Med*. 1999;40:1935-1946
 21. Kozempel J, Vlk M, Málková E et al. Prospective carriers of Ra-223 for targeted alpha particle therapy. *J Radioanal Nucl Chem*. 2014;34:443-447
 22. EMA: Xofigo (radium Ra-223 dichloride) [online]. 2017. [cit. 2. 1. 2016]. Dostupné na: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002653/human_med_001692.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
 23. Etchebehere EC, Milton DR, Araujo JC et al. Factors affecting 223Ra therapy: clinical experience after 532 cycles from a single institution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016;43:8-20
 24. Rojas JV, Woodward JD, Chen N et al. Synthesis and characterization of lanthanum phosphate nanoparticles as carriers for 223Ra and 225Ra for targeted alpha therapy. *Nucl Med Biol*. 2015;42:614-620
 25. Piotrowska A, Leszczuk E, Bruchertseifer F et al. Functionalized NaA nanozeolites labeled with 224,225Ra for targeted alpha therapy. *J Nanopart Res*. 2013;15:2082-2092
 26. Mokhodoeva O, Vlk M, Málková E et al. Study of 223Ra uptake mechanism by Fe3O4 nanoparticles: towards new prospective theranostic SPIONs. *J Nanopart Res* 2016;18:301
 27. Matsumura Y, Maeda H. A new Concept for Macromolecular therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research* 1986;46:6387-6392
 28. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J et al. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation chemotherapeutics and Photodynamic Therapy – Problems, Solutions and Prospects. *Microcirculation*. 2016;23:173-182
 29. Van Butsele K, Jérôme R, Jérôme C. Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *Polymer*. 2007;48:7431-7443
 30. Patra Ch R, Bhattacharya R, Mukhopadhyay D. et al. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62:346-361
 31. Janiszewska Ł, Koźmiński P, Pruszyński M. et al. Gold Nanoparticle-Substance P(5-11) Conjugate as a Carrier for 211At in Alpha Particle Therapy. Abstrakt – 9th Symposium on Targeted Alpha Therapy, Varšava, Polsko (2015)
 32. Kučka J, Hrubý M, Koňák Č. et al. Astatination of nanoparticles containing silver as possible carriers of 211At. *Applied Radiation and Isotopes*. 2006;64:201-206

Publikace B:

Kukleva E, **Suchánková P**, Štamberg K, Vlk M, Šlouf M, Kozempel J (2019) Surface protolytic property characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *RSC Advances*, 9, 21989-21995. DOI: 10.1039/c9ra03698a.

Cite this: *RSC Adv.*, 2019, 9, 21989

Surface protolytic property characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles†

 Ekaterina Kukleva,^a Petra Suchánková,^a Karel Štamberg,^a Martin Vlk,^a Miroslav Šlouf^b and Ján Kozempel^{b,*a}

We provide characterization data of hydroxyapatite (nHAp) and titanium dioxide (nTiO₂) nanoparticles as potential materials for ion sorption, e.g. in targeted therapy, barrier materials for waste repositories or photovoltaics. The study is focused on the determination of the values of protonation and ion exchange constants and site densities ($\sum\text{SOH}$, $\sum\text{X}$; [mol kg⁻¹]) of nTiO₂ and nHAp for further Ra kinetics and sorption experiments. These data are very important for further investigation of the materials, which can be used e.g. as drug delivery systems or in engineered barriers of deep geological repositories. The characterization was based on the evaluation of the dependence of titrating agent consumption on pH. Titration results were evaluated on the basis of several model combinations, however the combination of the Chemical Equilibrium Model (CEM) and Ion Exchange Model (IExM) fits best to the experimental titration curves. However, the differences between the two sorbents were relatively large. Due to stability in a broad pH range and available surface sites, nTiO₂ seems to have a wide application range. The applicability of nHAp is not so wide because of its dissolution under pH 5. Both sorbents are virtually able to sorb cationic species on deprotonated edge and layer sites with different capacities, which can be important for sorption and decontaminating applications.

Received 16th May 2019
Accepted 5th July 2019

DOI: 10.1039/c9ra03698a

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Both hydroxyapatite and titanium dioxide are known as low-toxicity compounds with high specific surface area.^{1–3} These materials have a variety of applications in a wide range of areas like environmental science, photovoltaics and medicine, and applications exploiting their biocompatibility, sorption or photoelectric properties. Applications that exploit their sorption properties include water decontamination of different pollutants, such as metal ions^{4–7} or organic compounds⁸ or the use of their nanoparticulate form as radionuclide carriers in nuclear medicine.^{9–12} Doping these materials with metallic impurities also significantly influences their properties.^{13–16} Understanding of the sorption mechanisms is thus extremely important for further investigations, particularly concerning the stability of the materials in biological systems.

One of the possible applications of these inorganic nanoparticles is a radionuclide-drug carrier system. They were chosen due to their radiation stability and size.¹⁷ Firstly, due to nanoparticle size and ability to resorb ions, recoil nuclei remain in the

particle and no undesirable irradiation is therefore observed. Secondly, nanoparticles can be targeted to cancer by both passive and active mechanisms, due to the EPR effect or functionalization of the surface.¹⁸ Nanohydroxyapatite and nTiO₂ were chosen for this purpose because these materials are already widely used in medicine and cosmetics. They are stable, nontoxic, biocompatible, cheap, and easy to prepare.^{19–22} Moreover, nanoparticles can be used for theranostic systems with bonded diagnostic nuclides such as ^{99m}Tc, ⁶⁸Ga, ¹⁸F, *etc.* and therapeutic nuclides such as ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ¹⁸⁶Re, ⁹⁰Y, *etc.*^{23–28}

Our aim was to determine nanomaterial properties including the parameters characterizing the protonation and ion-exchange processes taking place on the surface of nHAp and nTiO₂ for further ²²³Ra sorption studies, as a nanoparticle radionuclide carrier for nuclear medicine.^{29–32} Due to modeling of the new material surface sorption processes, separate experiments should be performed in order to obtain credible input surface protolysis and site density data.

The study is mainly focused on modelling of the sorption mechanisms. Generally, there are two types of surface groups responsible for sorption: the edge sites on the edges of the surface structure, and the layer sites which appear due to isomorphic substitution of cations and lead to a permanent negative charge on the solid particle surface.^{33,34} The presence of the charge depends on the crystallographic structure of a studied material, or, in some cases, on the conditions in a studied system (e.g. the surface of the material having only the

^aCzech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry, Břehová 7, 11519 Prague 1, Czech Republic. E-mail: jan.kozempel@jfifi.cvut.cz

^bInstitute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Heyrovského nám. 2, 16206 Prague 6, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ra03698a

edge sites can be contaminated with another material having the layer sites), and therefore the presence of both types of sites should be assumed.

The modeling of sorption processes requires surface protolysis and site density input data such as specific surface area, protonation and ion exchange constants, and the concentrations (densities) of edge sites and/or layer sites.

Protonation and sorption processes taking part on the edge sites can be described by several types of Surface Complexation Models (SCM) from which the following models are the most utilized: Constant Capacitance Model (CCM), Diffusion Double Layer Model (DLM), and non-electrostatistical Chemical Equilibrium Model (CEM).^{33,34} The processes taking part on layer sites are always described by classical Ion Exchange Model (IExM). Since hydroxyapatite can substitute Ca^{2+} for other cations, the necessity to involve IExM into nHAp modeling seems to be obvious. According to the literature³⁵ the edge site density is approx. 3 mol kg^{-1} for nHAp, and approx. 0.3 mol kg^{-1} for nTiO₂, which points to its potentially very good sorption.

General material description was performed by FTIR spectroscopy, XRPD and TEM. Detailed surface description was carried out on the basis of titration experiments through material modeling which can be briefly described as follows: the reactions taking place on the surface of nHAp or nTiO₂ may be described by two equations. The first one is protonation reaction being in progress on edge sites ($\equiv\text{SOH}$), the second one describes the ion-exchange on layer sites ($\equiv\text{XH}$).

The balance equations of charge densities on edge sites ($\sum\text{SOH}$) (1) and layer sites ($\sum\text{X}$) (2) have to be taken into account in order to provide correct description of surface reactions:

$$\sum\text{SOH} = [\text{SOH}] + [\text{SO}^-] + [\text{SOH}_2^+] [\text{mol kg}^{-1}] \quad (1)$$

$$\sum\text{X} = [\text{XH}] + [\text{X}^-] = [\text{XH}] + [\text{XNa}] [\text{mol kg}^{-1}] \quad (2)$$

It is important to notice that the edge sites of the nHAp are characterized as $\equiv\text{POH}$ functional groups,³⁶ while nTiO₂ edge sites are formed by $\equiv\text{SOH}$ groups.

Further description can be found in the ESI.† The description of the individual models and their application in detail were described by Filipská.³³

Experimental

Materials and methods

All chemicals were of analytical grade purchased from Merck and were used without further purification: tetrabutyl *ortho*-titanate (TBOT), 2-propanol (IPO), sodium hydroxide, phosphoric acid, boric acid, acetic acid, nitric acid, sodium nitrate, ammonium hydroxide solution (28%), calcium nitrate tetrahydrate, ammonium hydrogen phosphate. Demineralized water of $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ was obtained from Millipore, USA water purification system.

Sorbent preparation

nHAp. Bulk HAp was prepared by adding 1.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (24 mL) into 0.5 L of demineralized water. The pH of the mixture was set to 11 with ammonium hydroxide and maintained

during the reaction, and 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (24 mL) was added dropwise under stirring. The mixture was left overnight under stirring, washed with DEMI water ($3 \times 20 \text{ mL}$) and dried. The resulting powder was fine-ground.

nTiO₂. The mixture of TBOT (1 mL, 2.8 mmol) in IPO (4 mL) was dropwise added to 100 mL of DEMI water in ultrasonic generator. The suspension was stirred for 30 minutes at the laboratory temperature. Prepared nanoparticles were washed with DEMI water ($3 \times 20 \text{ mL}$), once with IPO (10 mL) and then dried under vacuum. The resulting powder was fine-ground.

Characterization of the materials

The specific surface area was determined by selective sorption of nitrogen at the temperature of liquid nitrogen using a multi-point BET method. Confirmation of the composition of the materials was made with FTIR spectra recorded on Nicolet iS50 FTIR (ThermoScientific, USA) in middle infrared region $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ with resolution 2 cm^{-1} on a diamond crystal which were compared to relevant records in HR Inorganics I. – Minerals database.³⁷ Powder X-ray diffractograms using Rigaku MiniFlex 600 (Ni-filtered $\text{Cu-K}_{\alpha 1,2}$ radiation) equipped with NaI(Tl) scintillation detector were compared to the relevant records in the ICDD PDF-2 database (version 2013).³⁸

TEM analyses. The nanoparticles were dispersed in water, a small droplet (2 μL) of the suspension was dropped onto the standard TEM supporting copper grid covered with an electron transparent carbon film. The excess of the solution was removed after 1 min by touching the bottom of the grid by a thin strip of filter paper in order to avoid oversaturation and nanoprecipitation during the drying process. The specimens were then left to dry completely. After drying the samples were transferred to a TEM microscope (Tecnai G2 Spirit Twin 12; FEI Company, Czech Republic) and observed at accelerating voltage 120 kV. Morphology of the particles was observed with standard bright field imaging (TEM/BF), energy-dispersive analysis of X-rays (TEM/EDX) yielded the elemental composition, and selected area electron diffraction (TEM/SAED) was used to verify the crystalline structures. Electron diffraction patterns were transformed to 1D-diffractograms (by means of Process Diffraction³⁹) and compared with X-ray diffraction patterns (calculated with PowderCell⁴⁰) of the expected crystalline structures of nHAp and nTiO₂ (the structures were obtained from Crystallography Open Database⁴¹). An estimate of crystallite size from electron diffraction patterns and a calculation of particle size distribution and specific surface area in comparison with BET experiment is provided in ESI.†

Potentiometric titrations

Automatic titration was made on TIM845 Potentiometric Titrator (HACH, USA) equipped with Ag/AgCl electrode (HACH, USA).

The nHAp or nTiO₂ (150 mg) was dispersed in 50 mL of 0.1 M NaNO_3 to ensure stability of the ionic strength (suspension concentration was 3 g L^{-1}). Titration was performed at $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ with 0.1 M NaOH for alkaline part of titration curve and 0.1 M HNO_3 for acidic one. During the titration with NaOH the sample

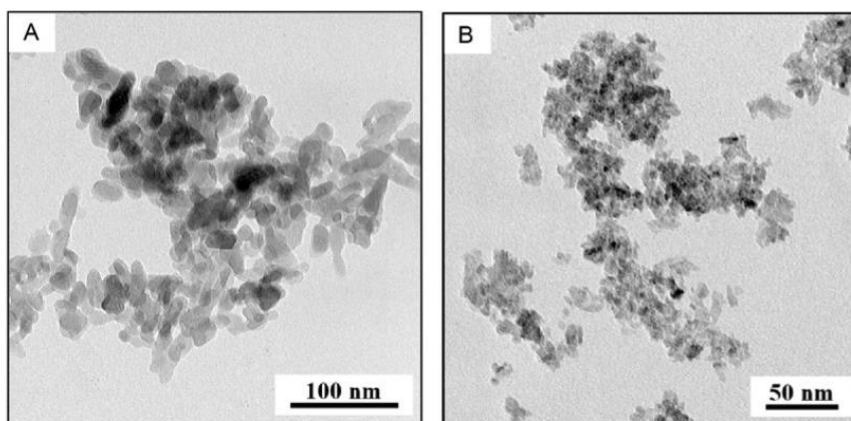


Fig. 1 TEM analysis (A) TEM/BF micrograph showing the size and shape of nHAp, (B) TEM/BF micrograph showing the size and shape of nTiO₂.

and the titrant were bubbled with N₂ to eliminate atmospheric CO₂ absorption and dissolution.

In the case of nTiO₂, the studied pH range was between 2.5 and 10. In the case of nHAp, with regard to its possible dissolving in acidic medium, the lowest reached pH was approx. 5. The experiments were repeated three times for each line and solid phase. A blank experiment was performed with 50 mL of 0.1 M NaNO₃ without any solid phase added for the both acidic and alkaline part of the titration curve. Increment was set to 0.05 mL and stability conditions to 20 mpH min⁻¹. The pH was recorded after each addition of titrant as a function of its volume.

Results and discussion

Specific surface area, FTIR, XRPD

The specific surface areas *via* BET measurements were determined at $117 \pm 8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for nHAp and $330 \pm 10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for nTiO₂. FTIR spectra of the nHAp showed the characteristic vibration bands of hydroxyapatite: vibration bands at 600–473 cm⁻¹ and 1089–962 cm⁻¹ might be attributed to PO₄³⁻. Band at ~1400 cm⁻¹

belongs to the characteristic vibration of the CO₃²⁻, that at 1630 cm⁻¹ corresponds to deformation vibration band of OH⁻ and that at 3500–3000 cm⁻¹ belongs to stretching mode of OH⁻. FTIR spectrum of nTiO₂ has the band at 3500–3000 cm⁻¹ that might be attributed to stretching mode of OH⁻ and at 1632 cm⁻¹ associated with deformation vibrations of OH⁻ bonds on the surface of TiO₂. Arms on the band at 1000–400 cm⁻¹ are assigned to Ti–O and Ti–O–Ti stretching modes.⁴² Both FTIR spectra were compared to database³⁷ records #15 and #216 for nHAp and nTiO₂ respectively; they fit properly.

Nanohydroxyapatite and nTiO₂ diffractograms showed that both samples are single phase. Experimental conditions for nHAp synthesis meet the requirements for hydroxyapatite formation. Titanium dioxide has the structure of anatase as proved by library data³⁸ comparison. Low intensity peaks of nTiO₂ can be interpreted either as nano-sized crystals or as amorphous phase formation. According to TEM/BF micrograph (Fig. 1B) the nanoparticle size is under 20 nm.

Both FTIR and XRPD spectra could be found in the ESI (Fig. S1 and S2†).

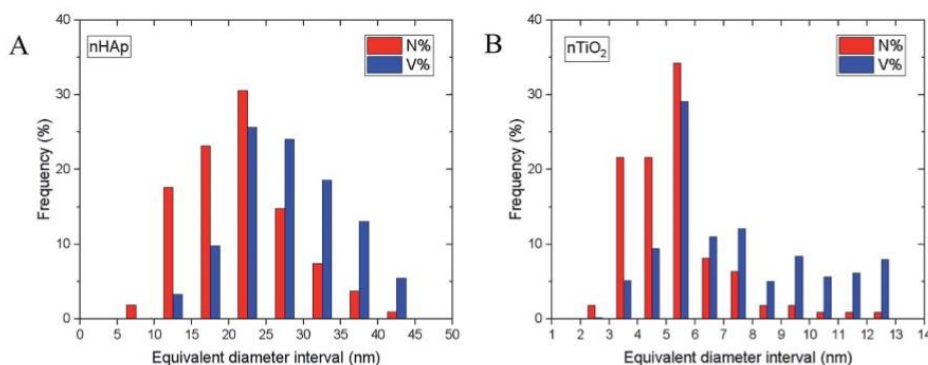


Fig. 2 Particle size distributions determined from image analysis of TEM/BF micrographs using program MDISTR^{45–47} for (A) nHAp and (B) nTiO₂. The symbols N% and V% denote number and volume distributions, respectively.

Table 1 Morphological descriptors of the nanoparticles

Sample	Crystallite size ^a [nm]	Equivalent diameter [nm]		Elongation [–]	
		Average	StDev	Average	StDev
nHAp	5.18	21.7	6.9	1.70	0.49
nTiO ₂	2.44	5.3	1.7	1.50	0.41

^a Crystallite size was obtained from TEM/SAED diffractograms using Scherrer equation. Equivalent diameter and elongation were assessed from measurements of TEM/BF micrographs.

TEM characterization of the nanoparticles

TEM characterization of nHAp and nTiO₂ is shown in Fig. 1 where TEM/BF micrographs demonstrated that both nanoparticles had quite narrow size distribution, nHAp (Fig. 1A) being larger than nTiO₂ (Fig. 1B). TEM/SAED diffractograms and their comparison with theoretically calculated XRD diffraction patterns confirmed the expected crystalline structures: hexagonal structure of nHAp (Crystallography Open Database⁴¹ COD #9001233) and tetragonal anatase structure of nTiO₂ (Crystallography Open Database⁴¹ COD #1526931). TEM/EDX spectra yielded the expected elemental composition and confirmed that both prepared nanoparticles were free from impurities (we note that C and Cu peaks come from the standard TEM supporting copper grids, which were covered with thin, electron transparent carbon film). TEM/SAED diffractograms and TEM/EDX spectra are shown in ESI (Fig. S3 and S4†).

TEM image analysis and calculation of specific surface area

Both TEM/BF micrographs and TEM/SAED diffraction patterns were employed in estimating the nanoparticle size. Image analysis

Table 2 Particle numbers and specific surface areas calculated by the MDISTR program

Model ID ^a	nHAp		nTiO ₂	
	<i>N</i> [–]	<i>A</i> [m ² g ^{−1}]	<i>N</i> [–]	<i>A</i> [m ² g ^{−1}]
Model 1	4.35 × 10 ¹⁸	367	3.11 × 10 ¹⁹	581
Model 2	5.92 × 10 ¹⁶	88	3.05 × 10 ¹⁸	268
Model 3	4.49 × 10 ¹⁶	73	2.25 × 10 ¹⁸	218
Model 4	8.98 × 10 ¹⁶	102	4.49 × 10 ¹⁸	298
Model 5	8.98 × 10 ¹⁶	107	4.49 × 10 ¹⁸	342
BET experiment	—	117	—	330

^a All calculations were performed by the MDISTR^{45–47} program based on parameters from image analysis of TEM/BF micrographs and/or TEM/SAED diffraction patterns. *N* denotes number of particles and *A* denotes specific surface area of the nanoparticles. The models used for calculations were as follows: Model 1 = uniform spherical particles with average size determined from broadening of TEM/SAED diffractions (5.2 nm for nHAp, 2.4 nm for nTiO₂); Model 2 = uniform spherical particles with average size determined from image analysis of TEM/BF micrographs (21.7 nm for nHAp, 5.3 nm for nTiO₂); Model 3 = spherical particles with the size distribution determined from image analysis; Model 4 = the same as previous, but with additional corrections for elongation and flatness of the particles, which were measured or estimated from TEM micrographs; Model 5 = the same as previous, but with additional correction for surface roughness of the nanoparticles, which was estimated from TEM micrographs.

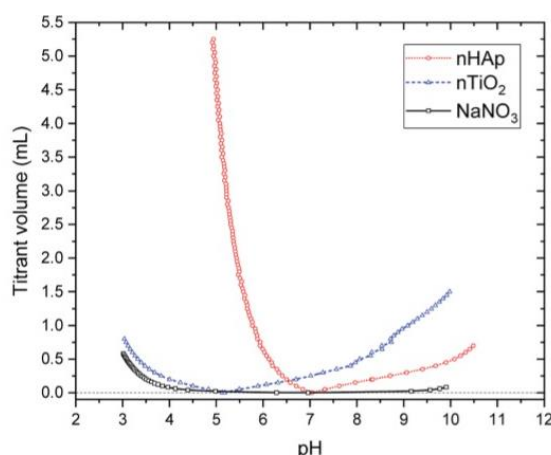


Fig. 3 Experimental dependences of added volume of titrant 0.1 M NaOH, for basic part and 0.1 M HNO₃ for acidic part of titration curves on pH and blank titration curve of 0.1 M NaNO₃.

of TEM/BF micrographs was based on direct measurement of >100 particles and yielded an average particle size (morphological descriptor: equivalent diameter), aspect ratios (morphological descriptor: elongation) and the particle size distributions (shown in Fig. 2); technical details concerning image analysis are given in the ESI.† An estimate of the nanoparticle sizes from TEM/SAED was based on Scherrer equation.⁴³ It is worth noting that Scherrer equation is applied mostly to X-ray diffraction data, but its application on SAED diffraction patterns is also possible, although it may not be so common.^{43,44} The average particle sizes are summarized in Table 1.

The nHAp and nTiO₂ morphological descriptors (Table 1), particle size distributions (Fig. 2) and overall semi-quantitative characteristics of the observed nanoparticles (such as their roughness estimated from their shapes in higher magnification TEM/BF micrographs), were employed in the calculation of the specific surface area of the nanoparticles. The calculations, which are properly described in the ESI,† were performed by our program MDISTR.^{45–47} The final calculated values were compared with the experimentally determined specific surface

Table 3 Evaluation of titration curves by six different models: the values of WSOS/DF characterizing the agreement between the experimental (22 ± 1 °C) and calculated data (N/A – evaluation was not performed)

Model	nHAp	nTiO ₂
	WSOS/DF	WSOS/DF
CEM	34.1	8.88
CEM + IExM	1.07	1.26
CCM	46.9	1.77
CCM + IExM	42.4	1.88
DLM	N/A	1.16
DLM + IExM	13.4	0.70

Table 4 The total nHAp concentration of edge sites (ΣPOH) and ion exchange groups (layer sites) (ΣX), protonation (K_1 , K_2), and ion exchange ($K_{\text{Na}^+/\text{H}^+}$) constants based on the titration curve evaluation

Model	ΣPOH [mol kg ⁻¹]	ΣX [mol kg ⁻¹]	K_1 [L mol ⁻¹]	K_2 [L mol ⁻¹]	$K_{\text{Na}^+/\text{H}^+}$ [—]
CEM + IExM	5.10 ± 1.20	0.15 ± 0.01	5.12 × 10 ¹¹ ± 1.10 × 10 ¹¹	1.19 × 10 ⁵ ± 2.73 × 10 ⁴	3.01 × 10 ⁶ ± 3.26 × 10 ⁵
DLM + IExM	13.90 ± 4.35	0.20 ± 0.10	1.83 × 10 ¹¹ ± 6.84 × 10 ¹⁰	1.80 × 10 ⁷ ± 5.07 × 10 ⁶	1.12 × 10 ⁵ ± 3.34 × 10 ⁵

Table 5 The total nTiO₂ concentration of edge sites (ΣSOH) and ion exchange groups (layer sites) (ΣX), protonation (K_1 , K_2), and ion exchange ($K_{\text{Na}^+/\text{H}^+}$) constants based on evaluation of titration curves

Model	ΣSOH [mol kg ⁻¹]	ΣX [mol kg ⁻¹]	K_1 [L mol ⁻¹]	K_2 [L mol ⁻¹]	$K_{\text{Na}^+/\text{H}^+}$ [—]
CEM + IExM	0.20 ± 0.01	0.67 ± 0.01	2.31 × 10 ⁶ ± 1.93 × 10 ⁴	1.84 × 10 ⁴ ± 1.65 × 10 ²	5.67 × 10 ⁷ ± 2.01 × 10 ⁶
DLM + IExM	1.42 ± 0.10	0.07 ± 0.01	3.26 × 10 ⁷ ± 2.73 × 10 ⁶	4.32 × 10 ³ ± 2.61 × 10 ²	6.96 × 10 ⁴ ± 1.74 × 10 ³

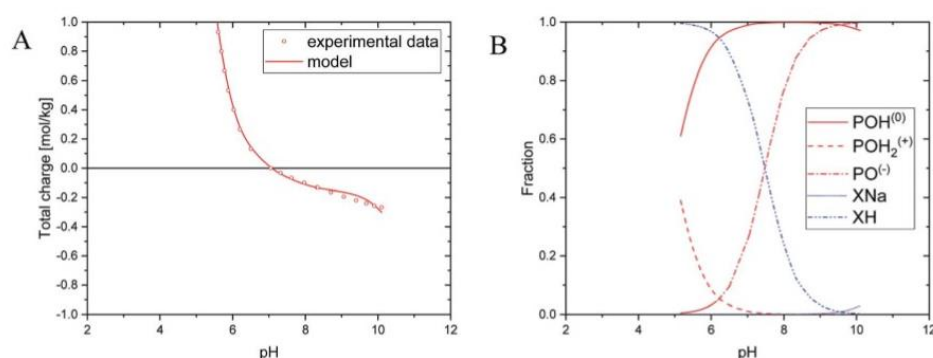


Fig. 4 (A) Experimental data and calculated titration curve; (B) molar fractions of individual forms of surface sites for nHAp (CEM + IExM).

areas from BET experiments (Table 2). The agreement between theoretical calculations based on TEM data including all corrections and the experimental results from BET experiments was very good. In both samples, the SAED-based crystallite sizes resulted in overestimation of specific surface area in comparison with BET experiments (Table 2, compare results of Model 1 and BET experiments), which implied that SAED-based

crystallite sizes were small, resulting in too high numbers of particles with too high specific surface area. Other models showed good agreement with BET experimental results. For more information see ESI.†

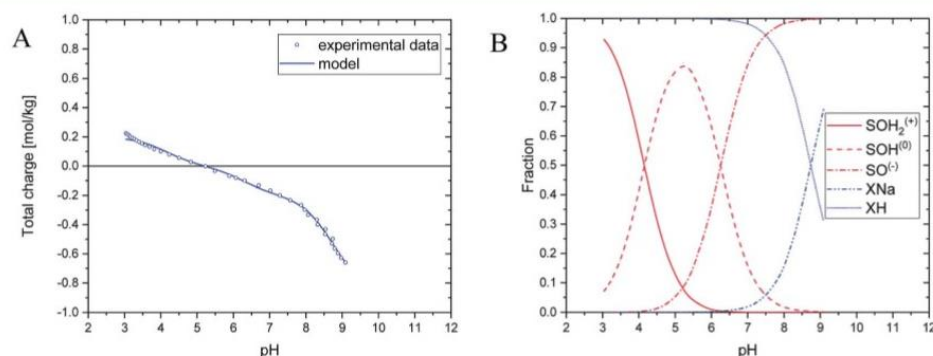


Fig. 5 (A) Experimental and calculated titration curve; (B) molar fractions of individual forms of surface sites for nTiO₂ (CEM + IExM).

Evaluation of the titration experiments

Experimentally obtained dependences are shown in Fig. 3. As mentioned above, due to nHAp dissolution the titration range was from 5 to 10. Strictly speaking, the dissolution of nHAp starts at approx. pH = 7, but it is negligible if the titration is fast enough and pH = 5 is reached within a few minutes.

The WSOS/DF value (weighted sum of squares of differences divided by the degrees of freedom) is taken as an appropriate criterion of goodness-of-fit and it should be in the interval $0.1 < \text{WSOS/DS} < 20$, so the model used for the description of the given experimental dependence can be taken as acceptable. In addition, the physical meaning of individual parameter values has to be taken into account, as well. Evidently, the WSOS/DF criterion (Table 3) is completely fulfilled for nTiO₂, nHAp it holds for CEM + IExM and DLM + IExM models, only. But, if we take into account the values in Tables 4 and 5, and if we allow for literature data $\sum\text{SOH}$ and $\sum\text{POH}$ mentioned above,³⁵ combination of CEM + IExM models describe experimental data in the most accurate way for both nHAp and nTiO₂.

According to the chosen models, total concentrations of the edge sites and ion exchange groups, protonation and ion exchange constants (for Na⁺/H⁺ exchange) were calculated and their values were summarized in Table 4 for nHAp, and in Table 5 for nTiO₂. On comparing the parameter values in Tables 1–3 to each other and considering the literature data mentioned above,³⁵ the best model seems to be CEM + IExM for both materials.

The experimental and calculated titration curves are depicted as total surface charge density, Q [mol kg⁻¹], or (Q_{cal})_i, on pH for nHAp and nTiO₂, respectively (Fig. 4A and 5A). The molar fractions of individual forms of sites (see the ESI†) can be found, again as the dependences on pH (Fig. 4B and 5B). In both cases, CEM + IExM model was used for experimental data evaluation.

Of course, there are great differences between nHAp and nTiO₂ not only in the density values of surface sites ($\sum\text{SOH}$, $\sum\text{POH}$ and $\sum\text{X}$), but above all in the values of protonation constants – what does it mean, it is evident from the comparison of curves in Fig. 4B and 5B. Evidently, the pH value plays the basic role in the applicability of both materials to the surface sorption of anionic, cationic and molecular species (surface complexation). The applicability of nHAp is limited to pH interval from approx. 5 to 11, whereas in case of nTiO₂, it deals with pH from approx. 3 to 11. The both materials differ in the sorption property (ability) in respect of different species, such that on nHAp (Fig. 4B) can take place the sorption of cationic forms on PO⁻ and X⁻ or surface complexation can proceed on PO⁻. As for nTiO₂ (Fig. 5B), cationic forms can be sorbed on SO⁻ and X⁻, and by analogy the surface complexation can proceed on SO⁻, in addition, the sorption of anionic species can be under way on SOH₂⁺. Evidently, in principle, both materials can be used as carrier of cation in question, *i.e.*, ²²³Ra, namely, for example as ²²³Ra²⁺ or ²²³Ra(OH)⁺.

Conclusions

An investigation of nHAp and nTiO₂ preparation and surface sorption properties was performed in order to provide more

detailed data for further studies considering ²²³Ra uptake on these sorbents. However, the differences between the two sorbents were relatively large, as follows from the values of parameters determined for nHAp ($K_1 = 5.12 \times 10^1$ [L mol⁻¹]; $K_2 = 1.19 \times 10^5$ [L mol⁻¹]; $\sum\text{SOH} = 5.10$ [mol kg⁻¹]; $K_{\text{ex}} = 3.01 \times 10^6$ [–]; $\sum\text{X} = 0.15$ [mol kg⁻¹]), and for nTiO₂ ($K_1 = 2.31 \times 10^6$ [L mol⁻¹]; $K_2 = 1.84 \times 10^4$ [L mol⁻¹]; $\sum\text{SOH} = 0.20$ [mol kg⁻¹]; $K_{\text{ex}} = 5.67 \times 10^7$ [–]; $\sum\text{X} = 0.67$ [mol kg⁻¹]). Deep understanding of the surface properties of HAp and TiO₂ nanoparticles, as prospective carriers for targeted alpha-particle therapy by *in vivo* generators, is important.¹⁸ The results will allow us to predict and provide further evaluation of kinetics and sorption dependences of various ions and radionuclides, including ²²³Ra and its decay products which are present in the form of cations. Therefore, the studied nanoparticles, which are capable of both capture and resorption, due to their high capacity and suitable size, are a promising solution.

Based on our experiments and calculations it can be stated that applicability of nTiO₂ is high due to its stability in a broad pH range and available surface sites ($\sum\text{SOH} = 0.20$ mol kg⁻¹; $\sum\text{X} = 0.67$ mol kg⁻¹). Evidently, cationic species sorption on nTiO₂ can proceed *via* ion-exchange on deprotonated edge sites ($\equiv\text{SO}^-$) and on layer sites ($\equiv\text{X}^-$) as well. Applicability of nHAp is not as wide as nTiO₂ because of its dissolution under pH 5. On the one hand, surface site density of nHAp is greater than that of nTiO₂ ($\sum\text{POH} = 5.10$ mol kg⁻¹; $\sum\text{X} = 0.15$ mol kg⁻¹), which can be regarded as an advantage of nHAp. On the other hand, nHAp deprotonated edge sites ($\equiv\text{PO}^-$) are virtually able to sorb only cationic species. Uptake of anionic and molecular species on edge sites of the two sorbents can also undergo surface complexation mechanism, but regarding the purposes of our study it was not taken into account.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Research at the Czech Technical University was supported by the grants of NV16-30544A (the Health Research Agency of the Czech Republic), CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000464 (EU and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), and SGS16/251/OHK4/3T/14 (Czech Technical University in Prague). Electron microscopy at the Institute of Macromolecular Chemistry was supported through grants 17-05007S (Czech Science Foundation) and POLYMAT LO1507 (Ministry of Education, Youth and Sports of the CR, program NPU I).

References

- 1 T. Jones and T. A. Egerton, Titanium Compounds, Inorganic, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
- 2 R. Z. LeGeros, A. Ito, A. Ishikawa, T. Sakae and J. P. LeGeros, in *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and*

- Applications*, The American Ceramic Society, Ohio, 2010, ch. 2, pp. 19–52.
- 3 S. A. Pappus, B. Ekka, S. Sahu, D. Sabat, D. Dash and M. Mishra, *J. Nanopart. Res.*, 2017, **19**(4), 136.
 - 4 C. Bogatu, D. Perniu, C. Sau, O. Iorga, M. Cosnita and A. Duta, *Ceram. Int.*, 2017, **43**(11), 7963–7969.
 - 5 A. Corami, S. Mignardi and V. Ferrini, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **146**(1–2), 164–170.
 - 6 S. Handley-Sidhu, T. K. Mullan, Q. Grail, M. Albadarneh, T. Ohnuki and L. E. Macaskie, *Sci. Rep.*, 2016, **6**(1), 23361.
 - 7 L. Reddy, P. Venkata, B. Kavitha, P. Anil, K. Reddy and K. H. Kim, *Environ. Res.*, 2017, **154**, 296–303.
 - 8 H. He, B. Wu and C. Yang, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2018, **15**, DOI: 10.1007/s13762-018-2148-2.
 - 9 E. Cędrowska, M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, S. Męczyńska-Wielgosz, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern and A. Bilewicz, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**(3), 83.
 - 10 D. Duan, H. Liu, Y. Xu, Y. Han, M. Xu, Z. Zhang and Z. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**(6), 5278–5286.
 - 11 A. Rajeswari, K. V. Vimalnath, H. D. Sarma, P. Shetty, S. K. Mohammed, J. Nuwad, S. Chakraborty and A. Dash, *Appl. Radiat. Isot.*, 2017, **116**, 85–91.
 - 12 K. V. Vimalnath, S. Chakraborty, A. Rajeswari, H. D. Sarma, J. Nuwad, U. Pandey, K. Kamaleshwaran, A. Shinto and A. Dash, *Nucl. Med. Biol.*, 2015, **42**(5), 455–464.
 - 13 X. Wu, W. Qin, S. Wang, Z. Jiang, Y. Guo and Z. Xie, *Rare Met.*, 2006, **25**(6), 169–172.
 - 14 P. Mazierski, A. Mikolajczyk, B. Bajorowicz, A. Malankowska, A. Zaleska-Medynska and J. Nadolna, *Appl. Catal., B*, 2018, **233**, 301–317.
 - 15 S. Mondal, S. V. Dorozhkin and U. Pal, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2018, **10**, e1504.
 - 16 O. Kaygili, S. Keser, S. V. Dorozhkin, F. Yakuphanoglu, A. A. Al-Ghamdi, S. Kirbag, D. Sertkaya, T. Ates and N. Canan Gursoy, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2014, **24**, 1001–1008.
 - 17 J. Kozempel, M. Vlk, E. Malková, A. Bajžíková, J. Bárta, R. Santos-Oliveira and A. Malta Rossi, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2015, **304**, 443–447.
 - 18 J. Kozempel, O. Mokhodoeva and M. Vlk, *Molecules*, 2018, **23**(3), 581.
 - 19 M. P. Ferraz, F. J. Monteiro and C. M. Manuel, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, 2004, **2**(2), 74–80.
 - 20 S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **62**(4), 600–612.
 - 21 M. Malekshahi Byranvand, A. Nemati Kharat, L. Fatholahi and Z. Malekshahi Beiranvand, *J. Nanostruct.*, 2013, **3**, 1–9.
 - 22 S. Mital Gupta and M. Tripathi, *Cent. Eur. J. Chem.*, 2012, **10**(2), 279–294.
 - 23 L. D. Esposti, A. Tampieri and M. Iafisco, in *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine*, ed. V. Uskokovic, Elsevier, New York, 2017, ch. 6.3, pp. 465–486.
 - 24 W. Zhou and J. Zheng, *Adv. Mat. Res.*, 2012, **503/504**, 688–691.
 - 25 S. Chakraborty, K. V. Vimalnath, A. Rajeswari, H. D. Sarma, A. Shinto, E. R. Radhakrishnan and A. Dash, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2017, **302**(2), 875–881.
 - 26 J. Xie, S. Lee and X. Chen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**(11), 1064–1079.
 - 27 M. Sakmar, M. Vlk, P. Suchankova, E. Kukleva, J. Kozempel, M. Hruby and V. Lobaz, *presented in part at 13th international Symposium on the Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds*, Prague, June, 2018.
 - 28 P. Micolova, E. Kukleva, P. Nykl, M. Sakmar, M. Vlk, L. Nespesna and J. Kozempel, *presented in part at 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Dresden, May, 2017.
 - 29 *Xofigo – summary of product characteristics*, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002653/WC500156172.pdf, accessed January 2018.
 - 30 S. Mirzadeh, *Appl. Radiat. Isot.*, 1998, **49**(4), 345–349.
 - 31 E. Kukleva, J. Kozempel, M. Vlk, P. Micolova and D. Vopalka, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **304**(1), 263–266.
 - 32 O. Mokhodoeva, L. Guseva and N. Dogadkin, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **304**(1), 449–453.
 - 33 H. Filipková and K. Štamberg, *Acta Polytech.*, 2005, **45**(5), 11–18.
 - 34 J. Lützenkirchen, *Surface complexation modelling*, Academic Press, Elsevier Ltd., London, 2006.
 - 35 *RES³T/Rosendorf Expert System for Surface and Sorption Thermodynamics*, <https://www.hzdr.de/db/res3t.login>, accessed January 2018.
 - 36 B. Sandrine, N. Ange, B. A. Didier, C. Eric and S. Patrick, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **139**(3), 443–446.
 - 37 *HR Inorganics I. – Minerals database – FTIR*, Thermo Scientific™ OMNIC™, USA.
 - 38 *ICDD PDF-2 database, Version 2013*, ISDD, USA.
 - 39 J. L. Lábár, *Ultramicroscopy*, 2005, **103**, 237–249.
 - 40 W. Kraus and G. Nolze, *J. Appl. Crystallogr.*, 1996, **29**, 301–303.
 - 41 *Crystallography Open Database—an open-access collection of crystal structures*, <http://www.crystallography.net/cod/search.html>, accessed May 2018.
 - 42 T. Ivanova and A. Harizanova, *Solid State Ionics*, 2001, **138**, 227–232.
 - 43 B. Ingham and M. F. Toney, Chapter 1: X-ray diffraction for characterizing metallic films, in *Metallic Films for Electronic, Optical and Magnetic Application*, ed. K. Barmak and K. Coffey, Elsevier, New York, 2014, pp. 3–38.
 - 44 B. Fultz and J. Howe, *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*, Springer, Berlin, 3rd edn, 2008.
 - 45 J. Gallo, M. Slouf and S. B. Goodman, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2010, **94B**(1), 171–177.
 - 46 M. Slouf, A. Ostafinska, M. Nevoralova and I. Fortelny, *Polym. Test.*, 2015, **42**, 8–16.
 - 47 P. Fulín, D. Pokorný, M. Slouf, M. Lapčíková, E. Pavlova and E. Zolotarevová, *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.*, 2011, **78**(2), 131–137.

Supplementary information

Surface protolytic properties characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles.

Ekaterina Kukleva¹, Petra Suchánková¹, Karel Štamberg¹, Martin Vlk¹, Miroslav Šlouf²,
Ján Kozempel^{1*}

¹ Czech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering,
Department of Nuclear Chemistry, Břehová 7, 11519 Prague 1, Czech Republic

² Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Heyrovský square 2,
16206 Prague 6, Czech Republic

*E.mail: jan.kozempel@fjfi.cvut.cz

Theoretical basis for titration modelling and evaluation

Protonation and sorption processes taking part on the edge sites can be described (modeled) by several types of Surface Complexation Models (SCM)^{1,2} from which the following models are the most utilized: Constant Capacitance Model (CCM), Diffusion Double Layer Model (DLM), and non-electrostatical Chemical Equilibrium Model (CEM). The processes taking part on layer sites are always described by classical Ion Exchange Model (IEXM). Since hydroxyapatite can substitute Ca²⁺ for other cations, the necessity to involve IEXM into HAp modelling seems to be obvious.

Modeling by IEXM could be, but does not have to be taken into account in order to find out the most accurate fit. Therefore, six model combinations should be tested, namely, CCM, CCM+IEXM, DLM, DLM+IEXM, CEM and CEM+IEXM. General parameters characterizing the nHAp and nTiO₂ can be found in RES³T- Database³, which is constantly updated. Especially, with regards to nTiO₂, there are different values of surface protolysis and sites density data taken from more than 20 articles. These values differ in the way of nTiO₂ preparation and in its specific surface area. In the case of nHAp, in contrast to nTiO₂, only 4 articles are cited. However, according to the literature³ the edge site density is approx. 0.3 mol·kg⁻¹ for nTiO₂, and approx. 3 mol·kg⁻¹ for nHAp, which points to its potentially very good sorption.

The reactions taking place on the surface of nHAp or nTiO₂ can be described by three equations (1) - (3). The first two are protonation reactions being in progress on edge sites, the third one describes the ion-exchange on layer sites.



The equilibrium constants for reactions (1) - (3), K_1 , K_2 and K_{ex} respectively are given by equations (4) - (6):

$$K_1 = \frac{[SOH]}{[SO^-][H^+]} \quad (4)$$

$$K_2 = \frac{[SOH_2^+]}{[SOH][H^+]} \quad (5)$$

$$K_{ex} = \frac{[XH][Na^+]}{[XNa][H^+]} \quad (6)$$

The balance equations of charge densities on edge sites ($\sum SOH$) (7) and layer sites ($\sum X$) (8) have to be taken into account in order to provide correct description of surface reactions:

$$\sum SOH = [SOH] + [SO^-] + [SOH_2^+] \quad [\text{mol.kg}^{-1}] \quad (7)$$

$$\sum X = [XH] + [X^-] = [XH] + [XNa] \quad [\text{mol.kg}^{-1}] \quad (8)$$

It is important to notice that the edge sites of the nHAp are characterized as $\equiv POH$ functional groups⁴, while nTiO₂ edge sites are formed by $\equiv SOH$ groups.

The modeling procedure of the titration system can be characterized as follows: the total surface charge density, $(Q_{cal})_i$ in the i -th point of the titration curve equals the sum of charge density on the edge sites, $(Q_{ES})_i$, and on the layer sites, $(Q_{LS})_i$.^{1,5} Therefore, it holds:

$$(Q_{cal})_i = (Q_{ES})_i + (Q_{LS})_i \quad (9)$$

Based on the character of titration curve and equations (10) and (11), the charge density is the function of pH. The values of $(Q_{ES})_i$ and $(Q_{LS})_i$ can be calculated by means of equations (10) and (11), respectively:

$$(Q_{ES})_i = \frac{\sum SOH \cdot (K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^2 + 1)}{K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+]^2 + 1} \quad [\text{mol.kg}^{-1}] \quad (10)$$

$$(Q_{LS})_i = \frac{\sum X \cdot [Na^+]}{[Na^+] + K_{ex} \cdot [H^+]} \quad [\text{mol.kg}^{-1}] \quad (11)$$

The experimental value of the surface charge for i -th point of titration curve, $(Q_{exp})_i$, can be obtained using equation (12):

$$(Q_{exp})_i = \frac{V_i \times (C_{a,i} - C_{b,i} + [OH^-]_i - [H^+]_i)}{m_i} \quad [\text{mol.kg}^{-1}] \quad (12)$$

Where V_i [L] is the total volume of liquid phase; m_i [kg] is the mass of solid phase; $C_{a,i}$ [mol·L⁻¹] and $C_{b,i}$ [mol·L⁻¹] are bulk concentrations of acid (e.g. HNO₃) and sodium hydroxide in liquid phase, respectively, which are given by stock concentrations of acid and base solutions and by their consumptions during titration.

If the values of parameters K_1 , K_2 , K_{ex} , $\sum SOH$ and

$\sum X$, were sought, some non-linear multi-dimensional regression procedure should be used that deals with the fitting of experimental data, $(Q_{exp})_i$, with model data, $(Q_{cal})_i$. The software product FAMULUS⁶ and the proper code P46DNRLG.fim (code package STAMB 2015) based on the Newton-Raphson multidimensional nonlinear regression procedure were used. *WSOS/DF* (weighted

sum of squares of differences divided by number of degrees of freedom) was used as the criterion of goodness-of-fit.⁷

It is necessary to add that the basic assumption of the surface complexation models is the validity of Boltzman equation (13)¹ quantifying the relation between the concentration of i -th-component in aqueous phase near the surface (in aqueous layer adhering to the surface), $(C_i)_s$, and its bulk concentration, C_i , (13):

$$(C_i)_s = C_i \cdot \exp(-z \cdot \psi \cdot F / (R \cdot T)) \quad (13)$$

where z is the charge of i -th component (valency), ψ [V] is the electrostatic potential, F [C.mol⁻¹] is Faraday constant, R [J.K⁻¹.mol⁻¹] is gas constant and T [K] is the absolute temperature. The following dependences then hold between surface charge, σ [C.m⁻²], and electrostatic potential, ψ , (14, 15, 16):

$$\sigma = G \cdot \psi \quad (\text{CCM}) \quad (14)$$

$$\sigma = 0.1174 \cdot I^{1/2} \cdot \sinh(z_i \cdot \psi \cdot F / (2RT)) \quad (\text{DLM}) \quad (15)$$

$$\psi = 0 \text{ and } (C_i)_s = C_i \quad (\text{CEM}) \quad (16)$$

where G [F.m⁻²] is the so-called Helmholtz capacitance.

Specific surface area, FTIR, XRPD and TEM

FTIR spectra (**Fig. S1**) have showed the characteristic vibration bands of both studied materials and are described in detail in the article.

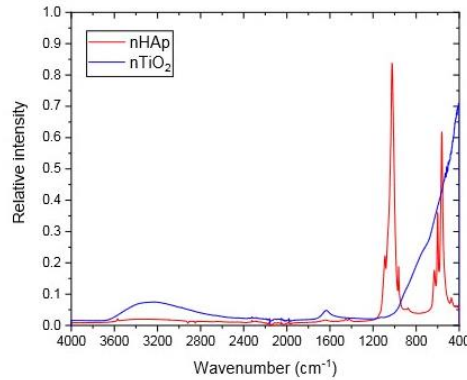


Fig. S1 FTIR spectrum of nTiO₂ and nHAp.

Nanohydroxyapatite and nTiO₂ diffractograms showed that both samples are single phase and structure of both materials were proven by library data⁸ comparison (**Fig. S2**).

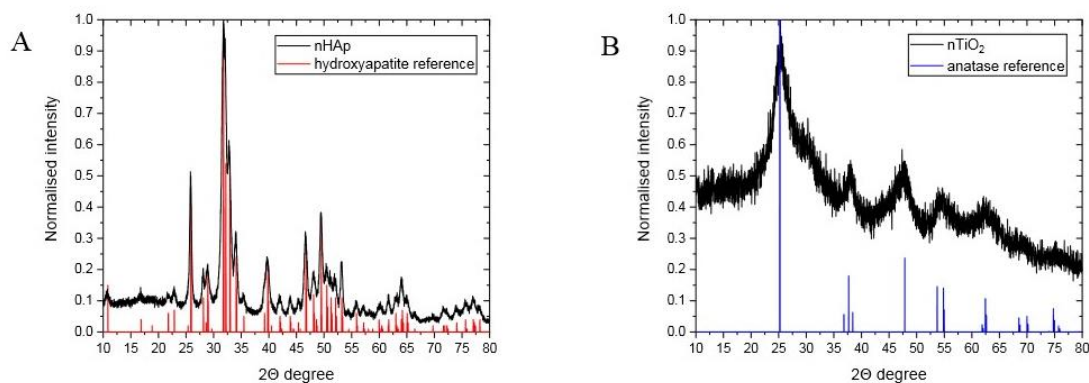


Fig. S2 nHAp (A) and nTiO₂ (B) diffractograms compared with library records ICDD PDF-2 database⁸ (version 2013) (HAp – card# 01-071-5048; TiO₂ – card# 01-084-1285).

TEM characterization of nHAp and nTiO₂ is shown in **Figs. S3** and **S4**, respectively, and are described in detail in the article.

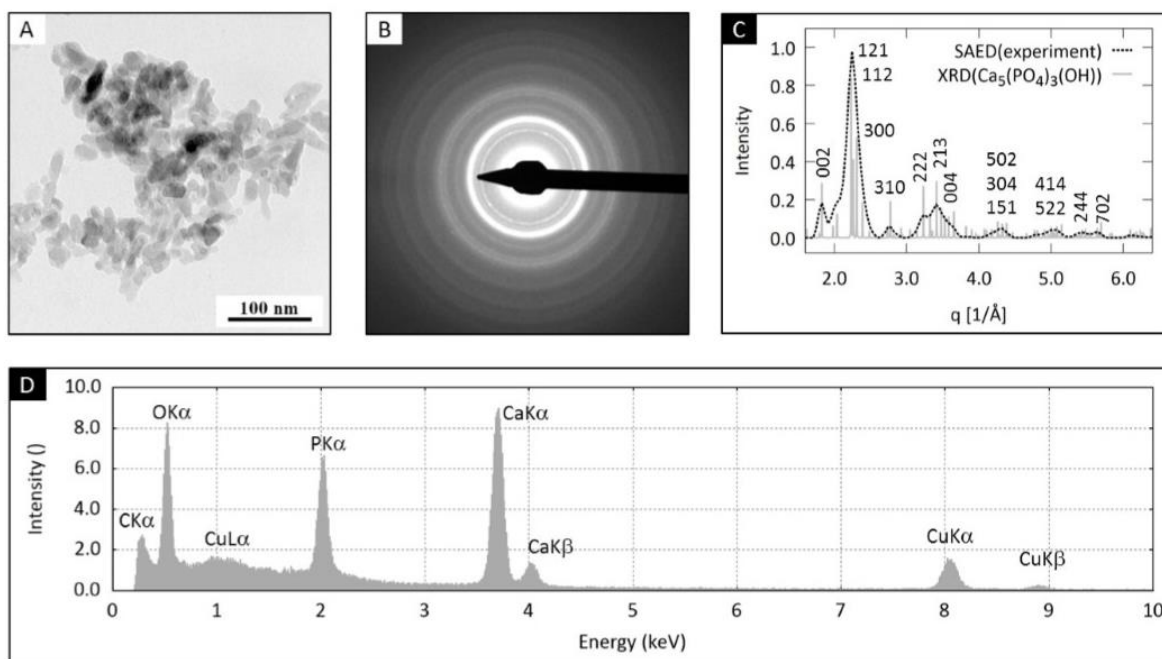


Fig. S3 TEM analysis of nHAp: A) TEM/BF micrograph showing the size and shape of nHAp, B) TEM/SAED diffraction pattern, C) comparison of the experimental SAED pattern and theoretically calculated XRD pattern of hydroxyapatite, D) TEM/EDX spectrum of nHAp.

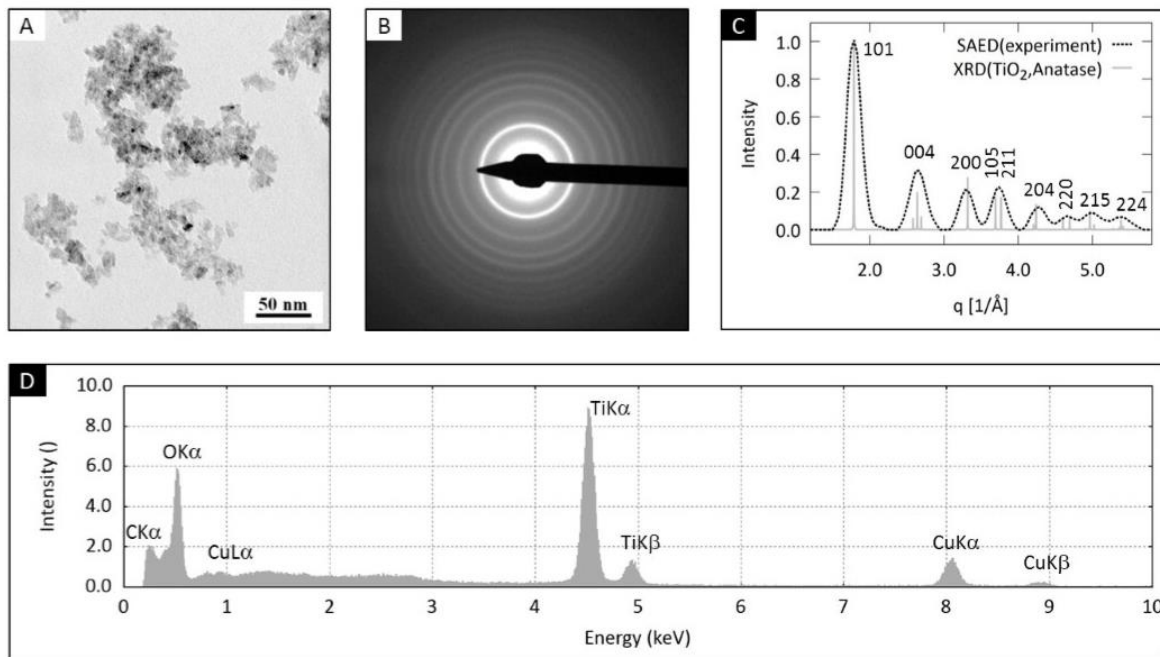


Fig. S4 TEM/SAED analysis of nTiO₂: A) TEM/BF micrograph showing the size and shape of nTiO₂, B) TEM/SAED diffraction pattern, C) comparison of the experimental SAED pattern and theoretically calculated XRD pattern of anatase, D) TEM/EDX spectrum of nTiO₂.

Estimate of crystallite size from electron diffraction patterns

The crystallite size was estimated from Scherrer equation that relates average crystallite size, L , with the full width of the diffraction peaks at half-maxima of the peaks ($FWHM(q)$)⁹:

$$L = (K \cdot 2\pi) / FWHM(q) \quad (17)$$

The constant K is usually set equal to 0.89,¹⁰ while q represents diffraction vector ($q = 4\pi \cdot \sin(\theta) / \lambda$, where θ is the diffraction angle and λ is the wavelength of diffracting electrons).^{9,10}

Image analysis: calculation of particle size distribution and specific surface area

Image analysis of TEM/BF micrographs consisted in interactive measurement of particles using ImageJ¹¹ and further processing of the measured values using our program MDISTR^{12,13}. For each sample, more than 100 particles were measured with ImageJ. For each particle, we measured both minimal and maximal projected lengths (i.e. the smallest and the biggest diameter of the particle; morphological descriptors: $MaxFeret$ and $MinFeret$). From the projected lengths we estimated average particle size (morphological descriptor: $EqDiameter$; (18)) and average asphericity (morphological descriptor: $Elongation$; (19)):

$$EqDiameter \approx 1/2 \cdot (MaxFeret + MinFeret) \quad (18)$$

$$Elongation = MaxFeret / MinFeret \quad (19)$$

In the next step, we employed our own MDISTR software package to calculate histograms, plot particle size distributions and total number and total surface area of the particles with given

distribution and total mass. If the MDISTR program is instructed to calculate total surface area of the investigated particles with total mass = 1 g, we obtain specific surface area that should be equal to the experimentally determined specific surface area from BET experiments (which is usually expressed in m^2/g). The MDISTR package was originally developed for analysis of synthetic polymer systems with complex morphologies¹²⁻¹⁴, but later it has been extended to calculate also specific surface areas, considering various corrections due to particle shapes and/or particle surface roughness. Comparison of specific surface area models and BET experiments is summarized in **Fig. S5**.

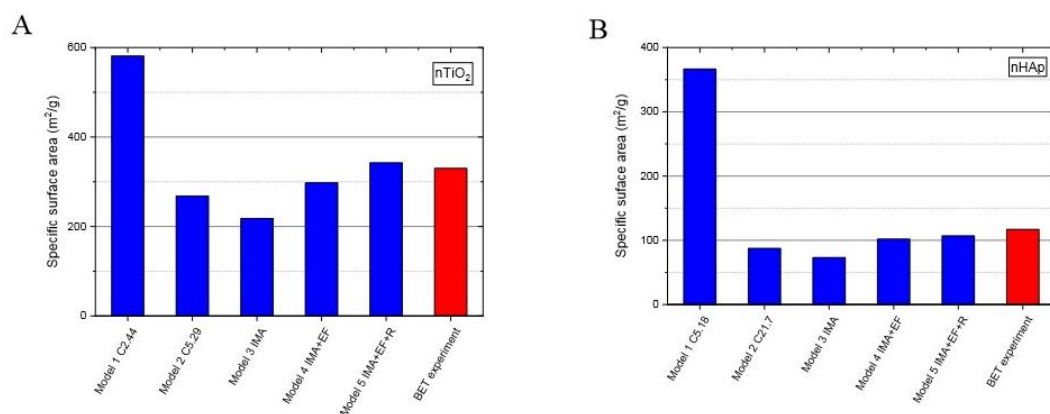


Fig. S5 Comparison of specific surface area models and BET experiment, A) nTiO₂; B) nHAp; the model-based values (blue columns) were calculated with MDISTR software¹²⁻¹⁴.

The HAp and TiO₂ morphological descriptors, particle size distributions and overall semi-quantitative characteristics of the observed nanoparticles (such as their roughness estimated from their shapes in higher magnification TEM/BF micrographs), were employed in the calculation of the specific surface area of the nanoparticles. The final calculated values from MDISTR program (Tab. 2 in the article) were compared with the experimentally determined specific surface areas from BET experiments (**Fig. S5**). The agreement between theoretical calculations based on TEM data including all corrections and the experimental results from BET experiments was very good. In both samples, the SAED-based crystallite sizes resulted in overestimation of specific surface area in comparison with BET experiments (**Fig. S5**, compare results of Model 1 and BET experiments), which implied that SAED-based crystallite sizes were too small, resulting in too high numbers of particles with too high specific surface area. This could be attributed to two facts: Firstly, the Scherrer equation is just an approximate relation, which yields lower bound of the volume-averaged crystallite size. Secondly, certain fraction of the nanocrystals (observed in TEM/BF micrographs) could be composed of two or more crystallites (whose size is estimated from TEM/SAED diffractograms). The above argument is confirmed by the fact that the estimate of specific surface area based on average crystal sizes which come from image analysis of TEM/BF micrographs was significantly closer to reality (**Fig. S5**, compare results of Model 2 and BET experiments). However, calculation with spherical particles with uniform size (constant particle size distribution) is just an approximation resulting in slight underestimation of specific surface area. We have to take into account the real particle size distribution (**Fig. S5**, Models 3), correction for particle elongation and flattening (**Fig. S5**, Models 4), and finally also correction for particle surface roughness (**Fig. S5**, Models 5). The corrections that are inserted as user-defined input, are either directly calculated

(elongation) or merely estimated (flattening, roughness) from the shapes and/or contrast of nanoparticles in the TEM/BF micrographs.¹² The change from uniform, constant distribution (**Fig. S5**, Models 2) to real, broadened distribution (**Fig. S5**, Models 3) is always accompanied by a decrease in total number of particles (and, as a result, also by a decrease of total surface area) because in the real, broadened distribution the bigger particles occupy more volume and less surface than smaller particles.^{12,14} The introduction of elongation and flatness corrections (**Fig. S5**, Models 4) does not change the total number of particles, but somewhat increases their total surface area because the elongated and/or flat particles exhibit larger surface area than equivalent spherical particles. The introduction of roughness correction (**Fig. S5**, Model 5) further increases the total surface area, as the rough particles logically exhibit larger surface than smooth spheres, ellipsoids, or platelets. Although all corrections introduced into the program are rather approximate or even semi-quantitative, the final values were in a very good agreement with the specific surface areas from BET experiments, which confirms both the correctness of our MDISTR program package and reliability of our TEM analyses.

Supplementary References

- 1 H. Filipská and K. Štamberg, *Acta Polytech.*, 2005, 45(5), **11-18**
- 2 J. Lützenkirchen, *Surface complexation modelling*, Academic Press, Elsevier Ltd., London, 2006
- 3 RES3T / Rossendorf Expert System for Surface and Sorption Thermodynamics, <https://www.hzdr.de/db/res3t.login>, (accessed January 2018)
- 4 B. Sandrine, N. Ange, B.A. Didier, C. Eric and S. Patrick, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **139(3)**, 443-446
- 5 H. Wanner, Y. Albinson, O. Karnland, E. Wieland, P. Wersin and L. Charlet, *Radiochim. Acta*, 1994, **66/67**, 157-162
- 6 L. Dvořák, T. Ledvinka and M. Sobotka, FAMULUS 3.1, Computer equipment, Prague, 1991
- 7 A.L. Herbelin and J.C. Westall, FITEQL – a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data. Version 3., Report 96-01. Department of Chemistry, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA, 1996
- 8 ICDD PDF-2 Database - version 2013, ISDD, USA
- 9 B. Ingham and M.F. Toney, in *Metallic Films for Electronic, Optical and Magnetic Application*, ed. K. Barmak and K. Coffey, Elsevier, New York, 2014, chapter 1: X-ray diffraction for characterizing metallic films, 3-38
- 10 B. Fultz and J. Howe, *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*, Springer, Berlin, 2008
- 11 C.A. Schneider, W.S. Rasband and K.W. Eliceiri, *Nat Methods*, 2012, **9(7)**, 671–675
- 12 J. Gallo, M. Slouf and S.B. Goodman, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2010, **94B(1)**, 171-177
- 13 M. Slouf, A. Ostafinska, M. Nevoralova and I. Fortelny, *Polym. Test.*, 2015, **42**, 8–16
- 14 P. Fulín, D. Pokorný, M. Slouf, M. Lapčíková, E. Pavlova and E. Zolotarevová, *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.*, 2011, **78(2)**, 131-7

Publikace C:

Suchánková P, Kukleva E, Štamberg K, Nykl P, Vlk M, Kozempel J (2020) Study of ^{223}Ra uptake mechanism by hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles as a function of pH. *RSC Advances*, 10, 3659–3666. DOI: 10.1039/c9ra08953e.

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, **10**, 3659

Study of ^{223}Ra uptake mechanism on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles as a function of pH

Petra Suchánková,[†] Ekaterina Kukleva,[†] Karel Štamberg, Pavel Nykl, Martin Vlk[†] and Ján Kozempel[†]*

The mechanism of ^{223}Ra uptake on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles was studied as a function of pH. Both materials are widely used in food industry and medicine. They offer properties suitable for labelling with medicinal radionuclides, particularly for targeted radionuclide therapy. The selected isotope, ^{223}Ra , is an alpha emitter widely used in targeted alpha particle therapy due to high-dose delivery in very small tissue volume, nevertheless the results are applicable for any radium isotope including ^{226}Ra . The study was performed in the pH range 4.5 to 12 for hydroxyapatite nanoparticles and 2 to 12 for titanium dioxide nanoparticles in Britton–Robinson buffer solution. Both nanomaterials at pH 6 and higher showed that over 95% of the radium has been sorbed. According to the applied chemical equilibrium model, the most important species playing a role in sorption on the edge-sites were RaCO_3 , RaPO_4^- , RaHPO_4 and $\text{Ra}(\text{Ac}^-)_2$, and Ra^{2+} and $\text{RaH}_2\text{PO}_4^+$ on layer-sites. All experiments were conducted under free air conditions and no negative impact of CO_2 was found. The surface complexation model was found suitable for describing radium uptake by the studied hydroxyapatite and titanium dioxide nanomaterials.

Received 30th October 2019
Accepted 14th January 2020

DOI: 10.1039/c9ra08953e

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Hydroxyapatite (HAp) and titanium dioxide are materials intensely studied and widely used for their favorable properties in many fields. Due to this, the range of their applications is extended from foodstuffs, cosmetics and sunscreen creams through environmental decontamination to medicine, which is our area of interest. Both materials are biocompatible and have relatively low clinical toxicity (LD_{50} , HAp (oral, rat) over 25 g kg^{-1} ; LD_{50} , TiO_2 (oral, rat) over 10 g kg^{-1}), which is the underlying assumption for using them for patient applications.¹ Some advantages of radionuclide sorption are the following properties: high specific surface area, radiation stability and size. Apart from the previously mentioned reasons, ease of synthesis on a nanoscale size is another argument for selection of these two materials.^{2–7}

Our main area of interest is specifically the possibility of the application of the chosen nanomaterials as a drug carrier system for diagnostic, therapeutic or theragnostic radionuclides. The targeting of the nanoparticles to the required tissue can be enabled by two mechanisms. The first one is passive targeting due to the Enhanced Permeability and Retention effect (EPR effect). This effect exploits the size of the drug carriers. Tumor tissue grows fast and stimulates angiogenesis.

Conveniently, the novel blood vessels are abnormal and leaky, so the nanocarriers can get stuck in the tumor tissue.^{8–10} The second one is active targeting by functionalization of the drug carrier surface. The carriers can be modified by specific ligands or antigens and the drugs are delivered to the target tissue due to their bond to the required receptor.¹¹ The basic principles of nanocarriers' preparation for the targeted alpha particle therapy (TAT), particularly bearing the alpha-emitting nuclides that decay in series, were described previously.¹²

Accordingly, hydroxyapatite (*n*HAp) and titanium dioxide nanoparticles (*n*TiO₂) could be applied as useful vehicles for radionuclide delivery in case of radiolabelling with an appropriate radionuclide, such as ^{18}F , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ etc. for diagnostic purposes or ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{177}Lu , ^{223}Ra , ^{186}Re , ^{90}Y and others for therapeutic purposes.^{13–20} Nowadays, there are several publications dealing with radiolabelling of *n*HAp and *n*TiO₂. For example, there are published studies, where the *n*HAp is labelled by alpha therapeutic radionuclide – ^{223}Ra .¹² Other radionuclides used for labelling were $^{134,137}\text{Cs}$ or ^{90}Sr , where the *n*HAp was applied for remediation of contaminated waters by anthropogenic radionuclides.²¹ Available published data for radiolabelling of *n*TiO₂ are limited. There are some studies dedicated to labelling of TiO₂ with ^{48}V or ^{125}I for *in vivo* toxicological studies^{22,23} and with ^{225}Ac for targeted alpha radionuclide therapy.²⁴

This article is focused on the study of ^{223}Ra sorption on *n*HAp and *n*TiO₂. The published data on radium sorption using

Czech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry, Břehová 7, 11519 Prague 1, Czech Republic. E-mail: jan.kozempel@jfj.cvut.cz

chosen nanoparticles are quite limited and available papers are focused mainly on ^{226}Ra behavior in uranium mill tailings and the articles studied only iron compounds as a goethite or ferrihydrite, or environmental minerals.^{25–27}

The ^{223}Ra is a radionuclide used for TAT as radium chloride (Xofigo®).^{12,28–30} Due to the cascade of emitted alpha particles, it could provide accurate high-dose irradiation of the target tissue (range of the alpha particles approx. 10 cells) without damage to the organism, if appropriate targeting strategy is applied. Nowadays, Xofigo® is used for the therapy of metastatic prostate cancer, but number of its applications decreases. Possible fields and ways of its applications could be significantly wider due to the capture of recoil nuclei by the nanoparticles and advantages of ^{223}Ra . Furthermore, ^{223}Ra can be obtained from a radionuclide generator $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$,^{28–33} which can probably guarantee availability of the radionuclide in the hospitals. Main introduced disadvantage of ^{223}Ra are recoil nuclei appearing during the radioactive decay. They have considerable energy, which means, that daughter nuclei are escaping from chemical bonds and are distributed into the organism due to their chemical and biological properties. In the case of ^{223}Ra (α -emitter, $T_{1/2} = 11.4$ days), its daughter decay products with half-lives longer than one minute are: ^{213}Pb (β^- -emitter, $T_{1/2} = 36.1$ min), ^{213}Bi (α -emitter, $T_{1/2} = 2.1$ min) and ^{207}Tl (β^- -emitter, $T_{1/2} = 4.8$ min).³⁴

The aim of this work is focused on the study of ^{223}Ra sorption as a function of pH. The mechanism of radium uptake by $n\text{HAP}$ and $n\text{TiO}_2$ in Britton–Robinson buffer solution (BRB) was modelled and absorbed species were studied. For describing the surface complexation systems, chemical equilibrium model (CEM) was used. Modelling programs and codes for study of sorption mechanism requires protonation constants, ion-exchange constants and total concentration of edge-sites and layer-sites, which were determined experimentally *via* titration method and corresponding models.^{35–37}

Experimental

Materials

All chemicals were of analytical grade purchased from Merck Millipore (Germany) and were used without further purification: sodium hydroxide, tetrabutyl *ortho*-titanate (TBOT), 2-propanol (IPA), ammonium hydroxide, phosphoric acid, nitric acid, methanol, boric acid, acetic acid, calcium nitrate tetrahydrate and diammonium hydrogen phosphate. Demineralized water of $18\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ was obtained from water purification system (Millipore, USA). The activities of the samples were measured with a well-type NaI(Tl) crystal detector (Capintec, USA). For mixing of samples, Stuart SSM3 rocker (Cole-Parmer Ltd, United Kingdom) was used and the separation was made on VWR Micro Star 12 centrifuge (VWR International, LLC, USA). Gamma spectra were recorded on Canberra Packard HPGe detector (USA) under GammaVision software.

Britton–Robinson buffer solution

For Britton–Robinson buffer solution preparation in the pH ranging from 2 to 12, two stock solutions were mixed in

appropriate ratio. The first one was 0.2 M sodium hydroxide and the second one was the mixture of 0.04 M phosphoric acid, 0.04 M boric acid and 0.04 M acetic acid.

Preparation of ^{223}Ra stock solution

The ^{223}Ra was eluted from $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$ generator, which was prepared at our laboratory based on the study published by Guseva *et al.*³³ The column of the generator was filled with 0.5 g of Dowex-1 \times 8 and ^{227}Ac in equilibrium with its decay products was loaded on it. The elution was provided by 0.7 M nitric acid in 80% methanol solution for the separation of ^{223}Ra from ^{227}Ac and ^{227}Th . The eluted $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ solutions were dried and reconstituted with deionized water. Possible breakthrough of parent radionuclides was checked by gamma spectrometry and was not observed in the eluate.

Sorbent materials preparation

The sorbent preparation was described by Kukleva *et al.* in detail.³⁵ In this article only brief procedure is mentioned.

For hydroxyapatite nanoparticles preparation, 1.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (24 mL) was added into 0.5 L of demineralized water. It was necessary to set and maintain the pH of the mixture to 11 with ammonium hydroxide. Afterwards, the solution of calcium nitrate was stirred and 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (24 mL) was added dropwise. The mixture was left overnight under stirring, washed three times with demineralized water (20 mL) and then dried under vacuum.

The titanium dioxide nanoparticles were prepared by the dropwise addition of the mixture of TBOT (1 mL) in IPA (4 mL) into demineralized water in ultrasonic generator and was stirred for 30 minutes. Prepared $n\text{TiO}_2$ were washed three times with demineralized water (20 mL), once with IPA (10 mL) and then dried under vacuum.

Sorption experiments

Experiments were performed in pH range from 4.5 to 12 for $n\text{HAP}$ and from 2 to 12 for $n\text{TiO}_2$. All samples were in triplets and were prepared in a following way: 2 mg of $n\text{HAP}$ or 5 mg of $n\text{TiO}_2$ were dispersed in 1 mL of BRB. Then 50 μL of $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ was dosed into each sample vial (pH of Ra solution was adjusted before adding to the sample by diluted ammonium hydroxide to the approx. sample pH in order not to exceed BRB's buffering capacity). Added radioactivity was ranged between 1.4 and 2.4 kBq. All samples were shaken for 24 hours, centrifuged and the supernatant was quantitatively removed. Then samples were dispersed in 1 mL of demineralized water in order to ensure same geometry of measurement. All samples and all supernatants were measured. All experiments were accomplished under free air conditions and at the laboratory temperature.

In the same manner, sorption of pure ^{223}Ra (without addition of nanomaterials) on the vial walls was studied in pH range from 2 to 12.

Modelling of the ^{223}Ra uptake

First of all, calculations of ^{223}Ra speciation diagrams were performed based on stability constants of Ra^{2+} mainly. In the

case of unavailable Ra constants, Ba^{2+} , Sr^{2+} and Ca^{2+} were used and were chosen due to their similar chemical properties. The stability constant values were taken from the Hatches database used in the geochemical code PhreeQC.³⁸

Then the model based on the surface complexation theory was constructed and incorporated into the simulation code. According to the surface complexation theory, it is supposed that there are two types of surface functional groups: edge-sites and layer-sites. Their concentrations were already calculated based on experimental data.^{35,36} For further modelling protonation constants of edge-sites, ion-exchange constant of layer-sites and the total concentration of both sites were used as input data.

The software product FAMULUS³⁹ and our code Prasp6c.fm (code package STAMB 2017) were used for the speciation calculations. The corresponding code, Pramp6ZM.fm (code package STAMB 2017), is based on the Newton–Raphson multidimensional nonlinear regression used for experimental data fitting. It has to be added, that the number of complexing reactions, which can be used in calculation, is selectable. The appropriateness of the fit is evaluated by the χ^2 -test, and the values of χ^2 are used to the calculation of criterion WSOS/DF (weighted sum of squares divided by degrees of freedom).⁴⁰ It holds, if $0.1 < \text{WSOS/DF} < 20$, then there is a good agreement between the experimental and the calculated data.

Results and discussion

As mentioned above, published studies^{25–27} were focused only on ^{226}Ra and the sorption was studied only on a few materials.

Table 1 Comparison of stability constants (β) and solubility products (SP) of Ra and Ca complexes^{38,41}

Compound	log β /log SP	
	Ra ²⁺	Ca ²⁺
CO_3^{2-}	2.50/–8.30	3.15/–8.14
Cl^-	–0.10	–0.29
SO_4^{2-}	2.75	2.31
OH^-	–13.49	–12.78

Table 2 The values of stability and dissociation constants ($I = 0$)^{38,41}

Ligand	Stability constant	log K	Dissociation constant	log K
H_2PO_4^-	$K = [\text{CaH}_2\text{PO}_4]/([\text{Ca}] \cdot [\text{H}_2\text{PO}_4])$	1.28	$K = [\text{HPO}_4]/([\text{H}] \cdot [\text{PO}_4])$	12.36
HPO_4^{2-}	$K = [\text{CaHPO}_4]/([\text{Ca}] \cdot [\text{HPO}_4])$	2.68	$K = [\text{H}_2\text{PO}_4]/([\text{H}]^2 \cdot [\text{PO}_4])$	19.70
PO_4^{3-}	$K = [\text{CaPO}_4]/([\text{Ca}] \cdot [\text{PO}_4])$	6.46	$K = [\text{H}_3\text{PO}_4]/([\text{H}]^3 \cdot [\text{PO}_4])$	21.93
H_2BO_3^-	$K = [\text{CaH}_2\text{BO}_3]/([\text{Ca}] \cdot [\text{H}_2\text{BO}_3^-])$	1.80	$K = [\text{HCO}_3]/([\text{H}] \cdot [\text{CO}_3])$	10.33
OH^-	$K = [\text{RaOH}]/([\text{Ra}] \cdot [\text{OH}])$	–0.5	$K = [\text{H}_2\text{CO}_3]/([\text{H}]^2 \cdot [\text{CO}_3])$	16.68
CO_3^{2-}	$K = [\text{RaCO}_3]/([\text{Ra}] \cdot [\text{CO}_3])$	2.50	$K_p = [\text{pCO}_2]/([\text{H}]^2 \cdot [\text{CO}_3])$	18.60 ^a
Ac^-	$K = [\text{CaAc}]/([\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{Ac}^-])$	1.18	$K = [\text{HAc}]/([\text{H}] \cdot [\text{Ac}^-])$	4.76
$(\text{Ac}^-)_2$	$K = [\text{Ca}(\text{Ac})_2]/([\text{Ca}^{2+}] \cdot [(\text{Ac}^-)_2])$	4.00	$K = ([\text{H}_2\text{BO}_3] \cdot [\text{H}])/[\text{H}_3\text{BO}_3]$	–9.24
$(\text{Ac}^-)_3$	$K = [\text{Ca}(\text{Ac})_3]/([\text{Ca}^{2+}] \cdot [(\text{Ac}^-)_3])$	4.45	$K = ([\text{HBO}_3] \cdot [\text{H}])/[\text{H}_2\text{BO}_3]$	–12.74
$(\text{Ac}^-)_4$	$K = [\text{Ca}(\text{Ac})_4]/([\text{Ca}^{2+}] \cdot [(\text{Ac}^-)_4])$	3.60	$K = ([\text{BO}_3] \cdot [\text{H}])/[\text{HBO}_3]$	–13.79
–	$\text{SP} = [\text{Ra}] \cdot [\text{CO}_3]$	–8.30	$K_v = [\text{H}] \cdot [\text{OH}^-]$	–14

^a pCO_2 [at] – partial pressure of CO_2 , atmospheric $\text{pCO}_2 = 3.16 \times 10^{-4}$ [at], $\text{Ac} = \text{CH}_3\text{COO}^-$.

For the medicinal purposes, the attention was paid to the sorption of ^{223}Ra in BRB and it was experimentally studied on $n\text{HAP}$ in the pH range of 4.5–12 and of 2–12 for $n\text{TiO}_2$. Studied pH ranges were different due to dissolution of the HAP under pH 4.5 while TiO_2 is stable in a wide pH range. The BRB consists of sodium compounds derived from phosphoric, boric and acetic acids – the speciation of which strongly depends on the pH value. Not only the corresponding ^{223}Ra complexes have to be taken into account, but also the hydroxo- and carbonate-complexes especially if the pH is higher than 7 due to dissolution of atmospheric CO_2 .

Sorption of ^{223}Ra on superparamagnetic iron oxide nanoparticles ($n\text{Fe}_3\text{O}_4$, SPIONs) was studied earlier in our laboratory,⁴² therefore, in the current work the results of ^{223}Ra sorption on $n\text{HAP}$ and $n\text{TiO}_2$ were compared with SPIONs.

Calculation of speciation diagram for ^{223}Ra in Britton–Robinson buffer solution

At first, it was necessary to draw attention to the fact, that the present state of stability constants knowledge for radium complexes was limited. The reliable values of studied complexes were available only for RaOH^+ and RaCO_3 . Therefore, stability constants were taken into consideration for elements with similar chemical properties, namely for Ba, Sr and Ca. Unfortunately, data availability for Ba was also not sufficient, for Sr it was slightly better, but constants for acetic and boric acids complexes were also not available. Therefore, stability constants for Ca with above mentioned ligands were taken in addition to Ra hydroxo- and carbonate-complexes constants. The similarity of Ra and Ca complexation is demonstrated in Table 1 on the values of stability constants (β) and solubility product (SP)^{38,41} (the values hold for $I = 0$).

The calculation of speciation diagrams were performed for the following composition of aqueous phase: 5.00×10^{-12} mol L^{-1} $\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$; $\sum[\text{H}_3\text{PO}_4] = 4.00 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; $\sum[\text{H}_3\text{BO}_3] = 4.00 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; $\sum[\text{CH}_3\text{COOH}] = 4.00 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; $\text{pCO}_2 = 3.16 \times 10^{-4}$ at, ionic strength $I \approx 0.15$. It deals with sodium salts of above-mentioned acids in a case of higher pH values.

The values of stability and dissociation constants ($I = 0$) are summarized in Table 2 and the results of calculation are shown

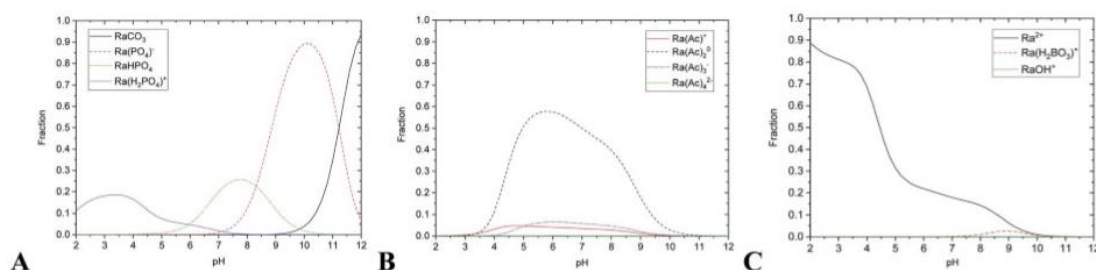


Fig. 1 The relative abundances of studied radium species on pH (A) phosphate and carbonate complexes, (B) acetate complexes, (C) ionic radium, hydroxyl and borate complex; total $\sum_{\text{Ra species}} = 1$.

in Fig. 1. Complexing reactions and corresponding complex compounds were incorporated in the code Prasp6c6.fm (Table 2.). Under the given conditions, only five of them can be regarded as more important, namely, the complexing reactions with PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , CO_3^{2-} and $(\text{CH}_3\text{COO})_2$. The calculation of possible precipitation of RaCO_3 was also considered in code Prasp6c6.fm, however, due to the very low Ra concentration, precipitation could not occur.

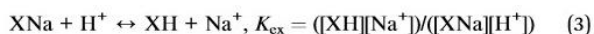
Modelling of experimental data as a function of pH

Chemical equilibrium model³⁶ was used to describe the surface complexation systems. It consisted of two groups of equations. The first one characterized the protonation and ion-exchange behavior of sites (eqn (1)–(3)) and the second one the sorption of individual species including the balance equations (eqn (4)–(12)). The values of sorption constants, K , (eqn (4)–(10)) were obtained during iterations.

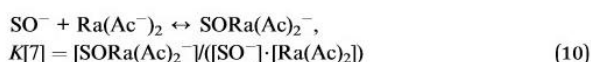
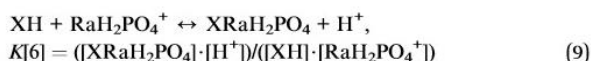
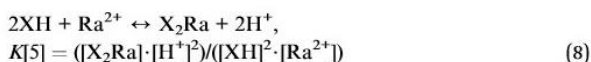
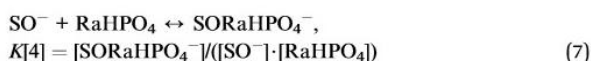
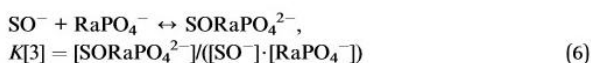
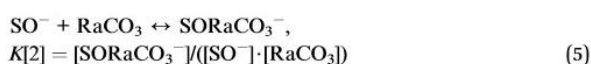
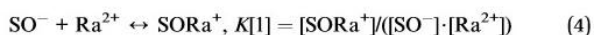
The equations (eqn (1)–(12)) listed below were incorporated in the regression function of the code Pramp6zp6c6.fm. The protonation reactions (eqn (1) and (2)) on edge-sites were:



The Na^+/H^+ ion-exchange reaction (eqn (3)) on layer-sites was:



The sorption reactions (eqn (4)–(10)) were:



The balance equations (eqn (11) and (12)) were:

$$\begin{aligned} \sum \text{SOH} = & [\text{SO}^-] + [\text{SOH}_2^+] + [\text{SOH}^0] + [\text{SORa}^+] \\ & + [\text{SORaCO}_3^-] + [\text{SORaPO}_4^{2-}] \\ & + [\text{SORaHPO}_4^-] + [\text{SORa}(\text{Ac})_2^-] \end{aligned} \quad (11)$$

$$\sum \text{X} = [\text{XNa}] + [\text{XH}] + 2 \cdot [\text{X}_2\text{Ra}] + [\text{XRaH}_2\text{PO}_4] \quad (12)$$

Following input data were also needed: the composition of liquid phase, the phase ratio V/m (L kg^{-1}), the values of stability and dissociation constants of Ra complexes and CO_2 atmospheric pressure (Table 2), protonation constants, ion-exchange constant and total concentration of edge-sites $\sum \text{SOH}$ and layer-sites $\sum \text{X}$ (Table 3). All data in the Table 3 were described in detail in publication Kukleva *et al.*³⁵

Table 3 Constants describing the surface protolytic properties of *n*HAp, *n*TiO₂ and SPIONs respectively^{35,42}

Constant	Units	<i>n</i> HAp	<i>n</i> TiO ₂	<i>n</i> Fe ₃ O ₄
Protonation constant – K_{S1}	$[\text{L mol}^{-1}]$	5.12×10^{11}	2.31×10^6	9.65×10^8
Protonation constant – K_{S2}	$[\text{L mol}^{-1}]$	1.19×10^5	1.84×10^4	9.13×10^5
Ion-exchange constant – K_{ex}	[–]	3.01×10^6	5.67×10^7	3.60×10^7
Concentration of edge-sites – $\sum \text{SOH}$	$[\text{mol kg}^{-1}]$	5.10	0.20	0.05
Concentration of layer-sites – $\sum \text{X}$	$[\text{mol kg}^{-1}]$	0.15	0.67	0.09
Specific surface area	$[\text{m}^2 \text{kg}^{-1}]$	1.17×10^5	3.30×10^5	1.09×10^5

Table 4 Resulting values of constants $K[1-7]$ of sorption reactions (eqn (4)–(10)) for $n\text{HAp}$ and $n\text{TiO}_2$

Eqn	$K[-] (I = 0)$	
	$n\text{HAp}$	$n\text{TiO}_2$
(4)	$K[1] = 2.44 \times 10^8$	$K[1] = 4.13 \times 10^{11}$
(5)	$K[2] = 9.87 \times 10^4$	$K[2] = 7.34 \times 10^{11}$
(6)	$K[3] = 3.02 \times 10^7$	$K[3] = 1.69 \times 10^{12}$
(7)	$K[4] = 3.79 \times 10^{10}$	$K[4] = 6.16 \times 10^{11}$
(8)	$K[5] = 7.85 \times 10^{-6}$	$K[5] = 7.37 \times 10^0$
(9)	$K[6] = 6.60 \times 10^4$	$K[6] = 2.34 \times 10^4$
(10)	$K[7] = 2.81 \times 10^8$	$K[7] = 4.88 \times 10^{11}$
WSOS/DF	0.21	0.18

The results are summarized in Table 4 and Fig. 2 and 3. Experimental data were in a good agreement with calculated values of radium uptake as a function of pH on both edge- and layer-sites (Fig. 2A and 3A). The results of the modelling of the $n\text{HAp}$ and $n\text{TiO}_2$ labelling with ^{223}Ra support the concept that the radium uptake can be described with the surface complexation model type of CEM and both edge- and layer-sites were involved in sorption mechanism (Fig. 2 and 3). It means, in our opinion, that labelling corresponds better with sorption than with co-precipitation mechanism.

The sorption efficiency ($Y\%$) was calculated based on the equation

$$Y\% = \frac{A_{\text{NP}}}{A_{\text{NP}} + A_{\text{aq}}} \times 100\% \quad (13)$$

where the A_{NP} is the activity of the centrifuged and secondary dispersed nanoparticles [cps], the A_{aq} is the activity of the supernatant [cps]. The A_{NP} and the A_{aq} were measured under the same conditions and no time correction was applied.

The sorption efficiency on $n\text{HAp}$ was $95 \pm 5\%$ in the pH range from 5 to 12 (Fig. 2 and 5). It could be caused by relatively high sorption capacity or high specific surface area of $n\text{HAp}$ ($117 \pm 8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)³⁵ and by the composition of used aqueous solution (BRB). Fig. 2 shows that the most important sorption reactions going on edge sites were RaCO_3 (eqn (4), minor), RaPO_4^- (eqn (6)) and RaHPO_4 (eqn (7)), and on layer-sites were Ra^{2+} (eqn (8)) and $\text{RaH}_2\text{PO}_4^+$ (eqn (9)). On the base of speciation diagrams (Fig. 1), the greater role of PO_4^{3-} , CO_3^{2-} and CH_3COO^- ligands were expected, but this supposition especially in a case of acetic anion was not confirmed. However, the role of HPO_4^{2-} seems to be underestimated.

In the case of $n\text{TiO}_2$ sorption efficiency was about 100% in pH range from 3 to 12 and decreased to 75% at lower pH values (Fig. 3 and 5), which could be also caused by high sorption

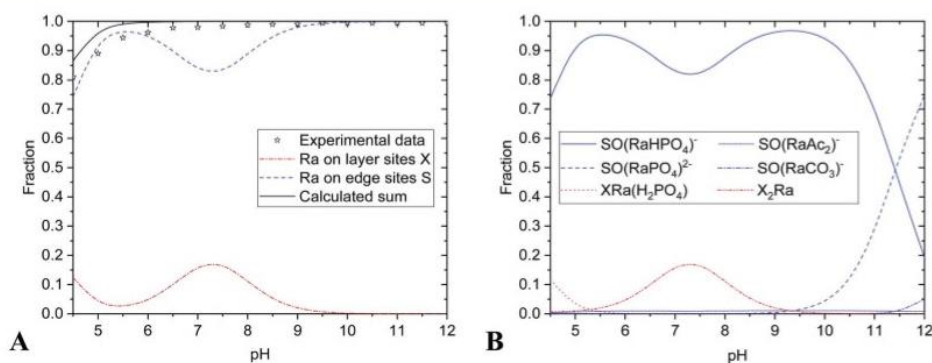


Fig. 2 Sorption on $n\text{HAp}$: (A) ^{223}Ra uptake vs. pH; (B) uptake of given species vs. pH.

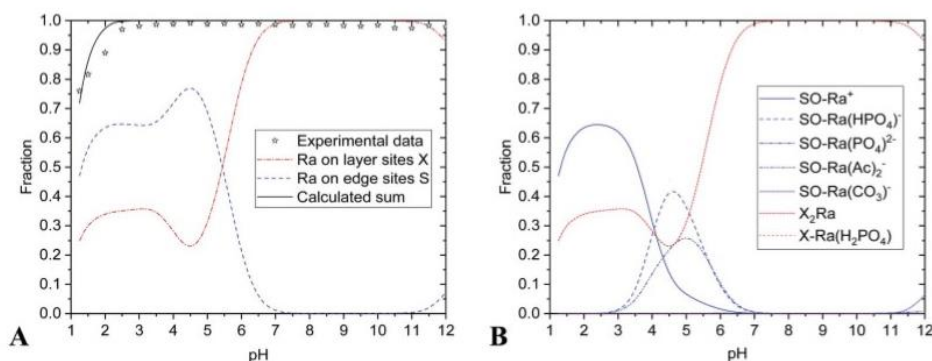


Fig. 3 Sorption on $n\text{TiO}_2$: (A) ^{223}Ra uptake vs. pH; (B) uptake of given species vs. pH.

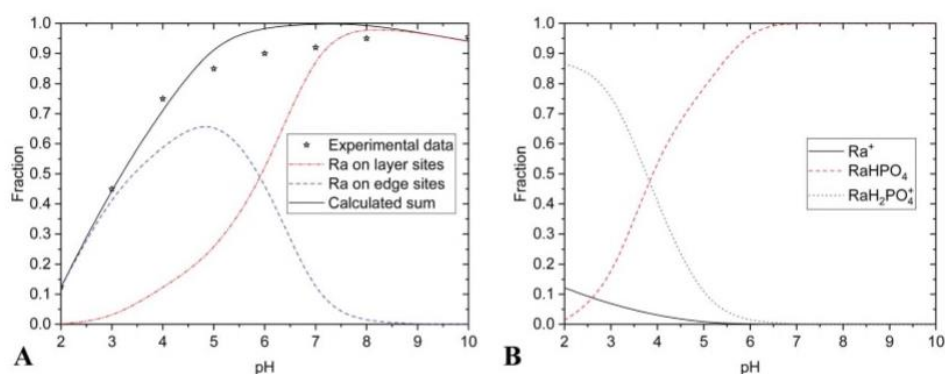


Fig. 4 Sorption on SPIONs: (A) ^{223}Ra uptake vs. pH; (B) uptake of given species vs. pH.

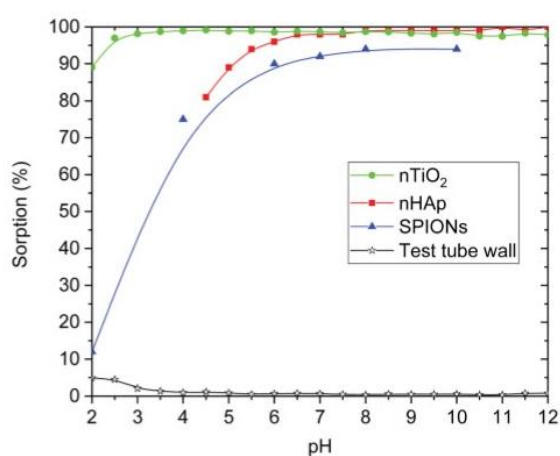


Fig. 5 Dependence of sorption yield on pH value for nHAp, $n\text{TiO}_2$, SPIONs and plastic test tube wall.

capacity or high specific surface area ($330 \pm 10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)⁴⁵ of $n\text{TiO}_2$, and also due to the composition of aqueous phase. The main role in sorption reactions on layer-sites played Ra^{2+} itself

(eqn (8) and Fig. 3). On edge-sites the most important species seems to be Ra^{2+} (eqn (4)), RaCO_3 (eqn (5)), RaHPO_4 (eqn (7)) and $\text{Ra}(\text{Ac}^-)_2$ (eqn (10)) (Fig. 4). On the base of speciation diagrams, the greater role of PO_4^{3-} (Fig. 1A) and CH_3COO^- (Fig. 1B) ligands were expected, however this expectation were not verified. One of the most interesting result is that surface complexation model type of CEM is suitable as a describing model of studied $n\text{TiO}_2$ radium uptake, as well as of nHAp.

Certainly, the question considering presence of atmospheric CO_2 also needs to be taken into account. Relatively high concentrations of carbonates in samples with pH greater than 8–9 could affect the results, therefore, it might be better to use inert atmosphere for clearer experiments. In spite of this, the CO_2 and HCO_3^- were included in calculations.

Radium sorption properties of nHAp and $n\text{TiO}_2$ were compared also with SPIONs (Fig. 4 and 5).⁴² From comparison, it is evident that all three materials have relatively high sorption affinity to $\text{Ra}^{(II)}$ under the studied conditions. It is necessary to keep in mind that low initial radium concentrations were used (approx. 2 kBq, $5 \times 10^{-12} \text{ M}$). Although there were some differences in the values of parameters of edge-sites (K_{S1} , K_{S2} , $\sum\text{SOH}$), of layer-sites (K_{ex} , $\sum X$) and of the specific surface area, sorption yields for all three materials were high. Additional

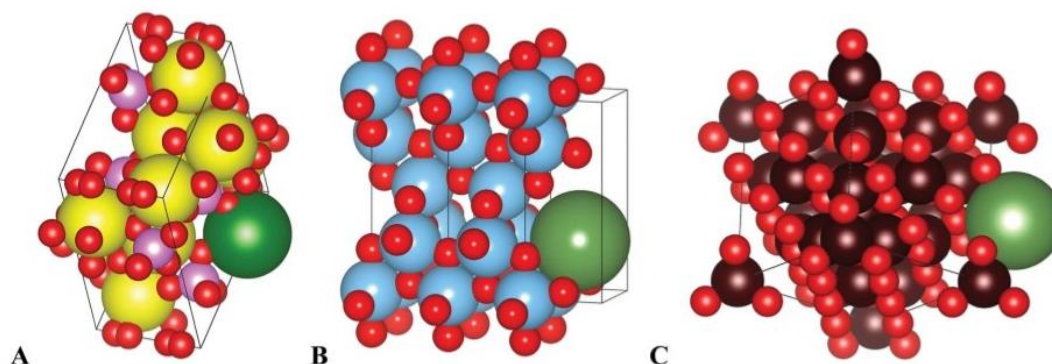


Fig. 6 Schematical drawing of radium uptake in (A) nHAp, (B) $n\text{TiO}_2$, (C) SPIONs. Yellow – calcium, blue – titanium, dark red – iron, green – radium, red – oxygen, pink – phosphorus. Images were created in Vesta software.⁴⁵

distinction of *n*HAp towards *n*TiO₂ and SPIONs was its lower chemical stability in acidic aqueous solutions. Regarding its possible application *in vivo*, it should not play any significant role.

The values of *n*HAp's and *n*TiO₂'s *K*S₁ (equilibrium constant of reaction eqn (1)) indicated the relatively greater shift of *n*HAp's protonation reaction (eqn (1)) to the right in comparison to the *n*TiO₂. In relation to *K*S₁ values, the deprotonated species SO⁻ did not exist in pH lower than 6 in the case of *n*HAp and lower than 5 for *n*TiO₂.³⁵ This fact played a certain role in ion-exchange reactions (eqn (3)) and surface complexation reactions (eqn (4)–(7) and (10)).

Comparing all three materials, it could be said that all of them have comparable properties in the context of Ra sorption (Fig. 5 and 6). Hydroxyapatite nanoparticles as well as SPIONs showed high yields of ²²³Ra uptake at pH over 6. In the case of *n*HAp, it could be due to low chemical stability of nanomaterial at lower pH. In the case of SPIONs, it is probably caused by presented species (SPIONs labelling was performed in PBS, where the main component is phosphate and at pH lower than 6 it was presented in the form of H₃PO₄ and H₂PO₄⁻ (Fig. 4)).⁴² Chemically stable *n*TiO₂ has shown very high sorption yields at pH 2.5 and higher. It is also important to notice, that sorption of all presented radium species on plastic was negligible (Fig. 5).

Despite CO₂ presence interfere and tangle modelling, it did not affect experimental the sorption results. This can be extremely beneficial for easier experimental setup, where necessary requirements could be lower.

Furthermore, another interesting result was that there was a good evidence for the modelling of radium uptake (labelling, sorption) on nanoparticles of *n*HAp, *n*TiO₂ and SPIONs by means of the surface complexation model type of CEM, in spite of the fact, that studied materials were not similar.

Conclusions

Studied materials *n*HAp and *n*TiO₂ had shown relatively high sorption affinity to Ra^(II) under the studied conditions and the radiolabelling yields were over 95% in a wide pH range. Based on the calculations and modelling it was found, that the main role in sorption in the case of *n*HAp played RaCO₃, RaPO₄⁻, RaHPO₄, Ra²⁺ and RaH₂PO₄⁺. In the case of *n*TiO₂ the main role in sorption reactions played Ra²⁺ itself, RaCO₃, RaHPO₄ and Ra(Ac⁻)₂. Furthermore, it was found, that presence of CO₂ did not interfere high sorption yields, what could be important to take into account for further experiments.

This paper shows possibility to use *n*HAp and *n*TiO₂ nanoparticles as a useful vehicle for ²²³Ra delivery for targeted alpha therapy. So, it could be concluded, that *n*HAp and *n*TiO₂ are suitable nanomaterials for medicinal usage due to high sorption properties in a pH range required for medicine, radiation stability and biocompatibility. Another important benefit is labelling procedure simplicity, where radium chloride in a liquid form is mixed with ready-made particles under laboratory temperature without any inert atmosphere. Obviously, this study is preliminary and further investigations of labelling

kinetics and *in vitro* stability in biologically relevant media are necessary.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the grants of NV16-30544A (Czech Health Research Council), CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000464 (EU and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), and SGS19/194/OHK4/3T/14 (Czech Technical University in Prague).

References

- 1 U.S. National Library of Medicine, *Toxicology Data Network*, November 2019, Available on: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/index.html>.
- 2 M. P. Ferraz, F. J. Monteiro and C. M. Manuel, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, 2004, **2**(2), 74–80.
- 3 S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **62**(4), 600–612.
- 4 W. Kreyling, U. Holzwarth, N. Haberl, J. Kozempel, S. Hirn, A. Wenk, C. Schleh, M. Schäffler, *et al.*, *Nanotoxicology*, 2017, **11**(4), 434–442.
- 5 M. Malekshahi Byranvand, A. Nemati Kharat, L. Fatholahi and Z. Malekshahi Beiranvand, *J. Nanostruct.*, 2013, **3**, 1–9.
- 6 S. Mital Gupta and M. Tripathi, *Cent. Eur. J. Chem.*, 2012, **10**(2), 279–294.
- 7 A. Salvador, M. C. Pascual-Martí, J. R. Adell, A. Requeñi and J. G. March, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **22**(2), 301–306.
- 8 Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, 1986, **46**(12), 6387–6392.
- 9 H. Maeda, K. Tsukigawa and J. Fang, *Microcirculation*, 2016, **23**(3), 173–182.
- 10 J. A. Nagy, S.-H. Chang, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak, *Br. J. Cancer*, 2009, **100**(6), 865–869.
- 11 K. Van Butsele, R. Jérôme and C. Jérôme, *Polymer*, 2007, **48**(26), 7431–7443.
- 12 J. Kozempel, M. Vlk, E. Málková, A. Bajžíková, J. Bárta, R. Santos-Oliveira and A. Malta Rossi, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **34**(1), 443–447.
- 13 L. D. Esposti, A. Tampieri and M. Iafisco, in *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine*, ed. V. Uskokovic, Elsevier, New York, 2017, ch. 6.3, pp. 465–486.
- 14 M. Sakmar, M. Vlk, P. Suchankova, E. Kukleva, J. Kozempel, M. Hruby and V. Lobaz, *presented in part at 13th international symposium on the synthesis and application of isotopically labelled compounds*, Prague, June 2018.
- 15 P. Micolova, E. Kukleva, P. Nykl, M. Sakmar, M. Vlk, L. Nespesna and J. Kozempel, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2017, **60**(S1), S283.
- 16 S. Chakraborty, K. V. Vimalnath, A. Rajeswari, H. D. Sarma, A. Shinto, E. R. Radhakrishnan and A. Dash, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2017, **302**(2), 875–881.

- 17 G. Sgouros, A. M. Ballangrud, J. G. Jurcic, M. R. McDevitt, J. L. Humm, E. Y. Erdi, B. M. Mehta, R. D. Finn, S. M. Larson and D. A. Scheinberg, *J. Nucl. Med.*, 1999, **40**(1), 1935–1946.
- 18 W. Zhou and J. Zheng, *Adv. Mater. Res.*, 2012, **503/504**, 688–691.
- 19 J. Xie, S. Lee and X. Chen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**(11), 1064–1079.
- 20 C. Apostolidis, R. Molinet, J. McGinley, K. Abbas, J. Möllenbeck and A. Morgenstern, *Appl. Radiat. Isot.*, 2005, **62**(3), 383–387.
- 21 S. Handley-Sidhu, T. K. Mullan, Q. Grail, M. Albadarneh, T. Ohnuki and L. E. Macaskie, *Sci. Rep.*, 2016, **6**(1), 1–8.
- 22 W. G. Kreyling, U. Holzwarth, C. Schleh, J. Kozempel, A. Wenk, N. Haberl, S. Hirn, M. Schäffler, J. Lipka, M. Semmler-Behnke and N. Gibson, *Nanotoxicology*, 2017, **11**(4), 443–453.
- 23 G. Xie, C. Wang, J. Sun and G. Zhong, *Toxicol. Lett.*, 2011, **205**(1), 55–61.
- 24 E. Cedrowska, M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, S. Meczyńska-Wielgosz, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern and A. Bilewicz, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 83, DOI: 10.1007/s11051-018-4181-y.
- 25 S. Bassot, C. Mallet and D. Stammose, *MRS Online Proc. Libr.*, 2000, **663**, 1081.
- 26 M. Sajih, N. D. Bryan, F. R. Livens, D. J. Vaughan, M. Descostes, V. Phrommavanh, J. Nos and K. Morris, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2014, **146**, 150–163.
- 27 J. M. Zachara, C. E. Cowan and C. T. Resch, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1991, **55**(6), 1549–1562.
- 28 European Medicines Agency, *Xofigo*, June 2019, Available on: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofigo>.
- 29 S. Nilsson, P. Strang, A. K. Aksnes, L. Franzén, P. Olivier, A. Pecking, J. Staffurth, S. Vasanthan, C. Andersson and Ø. S. Bruland, *Eur. J. Cancer*, 2012, **48**(5), 678–686.
- 30 S. Mirzadeh, *Appl. Radiat. Isot.*, 1998, **49**(4), 345–349.
- 31 O. Mokhodoeva, L. Guseva and N. Dogadkin, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **304**(1), 449–453.
- 32 E. Kukleva, J. Kozempel, M. Vlk, P. Micolova and D. Vopalka, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2014, **304**(1), 263–266.
- 33 L. I. Guseva, G. S. Tikhomirova and N. N. Dogadkin, *Radiochemistry*, 2004, **46**(1), 58–62.
- 34 WWW, *Table of radioactive isotopes: nuclide search*, June 2019, Available on: <http://nucleardata.nuclear.lu.se/toi/nucSearch.asp>.
- 35 E. Kukleva, P. Suchankova, K. Stamberg, M. Vlk, M. Slouf and J. Kozempel, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 21989–21995.
- 36 H. Filipská and K. Štamberg, *Acta Polytech.*, 2005, **45**(5), 11–18.
- 37 H. Wanner, Y. Albinsson, O. Karnland, E. Wieland, P. Wersin and L. Charlet, *Radiochim. Acta*, 1994, **66**(67), 157–162.
- 38 ZZ HATCHES-20, *Database for radiochemical modelling*, May 2019, Available on: <https://www.oecd-nea.org/tools/abstract/detail/nea-1210>.
- 39 L. Dvořák, T. Ledvinka and M. Sobotka, *FAMULUS 3.1*, 1991, Custom made software, Prague, Czech Republic.
- 40 A. L. Herbelin and J. C. Westall, *FITEQL 3.2, Custom made software*. Department of Chemistry, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA, 1996.
- 41 ThermoChimie, *Thermodynamic database*, August 2019, Available on: <https://www.thermochimie-tdb.com>.
- 42 O. Mokhodoeva, M. Vlk, E. Málková, E. Kukleva, P. Mičolová, K. Štamberg, M. Šlouf, R. Dzhaneloda and J. Kozempel, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**(10), 1–12.
- 43 K. Momma, August 2019, Available on: <https://jp-minerals.org/vesta/en/>.

Publikace D:

Suchánková P, Kukleva E, Štamberg K, Nykl P, Sakmár M, Vlk M, Kozempel J (2020) Determination, modelling and evaluation of kinetics of ^{223}Ra sorption on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *Materials*, 13, 1915-1924. DOI: 10.3390/ma13081915.

Article

Determination, Modeling and Evaluation of Kinetics of ^{223}Ra Sorption on Hydroxyapatite and Titanium Dioxide Nanoparticles

Petra Suchánková, Ekaterina Kukleva, Karel Štamberg, Pavel Nykl, Michal Sakmár, Martin Vlk and Ján Kozempel *

Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry, Czech Technical University in Prague, Břehová 7, 11519 Prague 1, Czech Republic; petra.suchankova@fffi.cvut.cz (P.S.); ekaterina.kukleva@fffi.cvut.cz (E.K.); kstamberg@volny.cz (K.Š.); nyklpavel1@gmail.com (P.N.); michal.sakmar@fffi.cvut.cz (M.S.); martin.vlk@fffi.cvut.cz (M.V.)

* Correspondence: jan.kozempel@fffi.cvut.cz

Received: 28 March 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 19 April 2020

Abstract: Sorption kinetics of radium on hydroxyapatite and titanium dioxide nanomaterials were studied. The main aim of the current study was to determine the rate-controlling process and the corresponding kinetic model, due to the application of studied nanomaterials as α -emitters' carriers, and to assess the sorption properties of both materials from the radiopharmaceutical point of view by time regulated sorption experiments on the nanoparticles. Radium-223 was investigated as radionuclide used in targeted alpha particle therapy as an in vivo generator. It was found that the controlling process of the ^{223}Ra sorption kinetics was the diffusion in a reacted layer. Therefore, parameters like particle size, their specific surface area, contact time and temperature played important role. Moreover, the composition of liquid phase, such as pH, the concentration of ^{223}Ra , ionic strength, the presence of complexation ligands, etc., had to be considered. Experiments were conducted under free air conditions and at pH 8 for hydroxyapatite and pH 6 for titanium dioxide in Britton–Robinson buffer. Initial ^{223}Ra concentration was in the range from 10^{-11} to 10^{-12} mol/L. It was found that sorption kinetics was very fast (more than 90% in the first hour) in the case of both nanomaterials, so they can be directly used for efficient radium sorption.

Keywords: hydroxyapatite; titanium dioxide; radium-223; nanoparticles; ion sorption kinetics; kinetic models

1. Introduction

Both studied materials, hydroxyapatite (HAp) and titanium dioxide are situated among natural sorbents. Their properties were studied in the case of inorganic and organic contaminants' separation from different types of waters [1–5]. Recently, the attention was devoted to nanoparticles (NPs) because of their large specific surface area that leads to relatively fast either sorption or desorption kinetics and high sorption capacity. Especially, the pH dependent sorption properties, based on the protonation or deprotonation of surface sites [1,6–9], enable the sorption of cationic or anionic species on studied nanoparticles by ion exchange and surface-complexation mechanism simultaneously [6,8–11].

Another advantage of both materials is their biocompatibility. Hydroxyapatite— $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ —is the natural component of bones and its synthetic analogue is widely used as artificial bones, adsorbent for protein chromatography, additive in toothpastes, etc. [2] Several studies focusing on adsorption of various substances onto hydroxyapatite, such as icariin [12], organic dyes [13], Pb^{2+} [2,3,14], Cd^{2+} [2,15], etc., were already published. They were dealing with contaminant retention and purification. It was found that the retention kinetics of the HAp could be

quite fast and strongly depending on the substance. For substances, which do not react with HAp—i.e., their retention mechanism has physical character—it took approximately 15 min [12,13]. In the case of cations, which could interact with the HAp structure, required time for the reaction was in the range from 15 min to 1.5 h for different ions. Sorption capacity also belongs to important parameters. It was found that sorption capacity of HAp was up to 500 mg/g for Pb [3,14]. Due to those facts, HAp can be used not only as a sorbent for contamination removal, but also as a carrier for different radionuclides [2,3,14,15].

Titanium dioxide is widely used in food technology as a pigment known as E171, moreover, TiO₂ is used as a filling material in drugs or cosmetics. However, sorption properties of TiO₂, which were studied in this paper, were being investigated for a very long time. For example, ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators used in nuclear medicine are packed with titania [16]. Another way to use TiO₂ as a sorbent was the treatment technique for pollutant removing from the environment. Several studies were involved in the research of suitable conditions for removing organic contaminants, such as dyes [4], dioxane, N-nitrosodimethylamine (NDMA), tris-2-chloroethyl phosphate (TCEP) and estradiol [17], oxalic acid [18], and inorganic ions, such as Zn²⁺ [5], As³⁺ and As⁵⁺ [19,20], Fe²⁺ [21], etc. mainly from water. According to the above-mentioned studies, sorption kinetics of TiO₂ were rather fast, lasted from several minutes to few hours, and was depended on the type of contaminant. Sorption capacity of TiO₂ was reported to be about 5 mg/g for the most ions [22].

The radioisotope ²²³Ra (T_{1/2} = 11.4 d) was chosen for the study due to its beneficial properties as an in vivo generator for targeted alpha therapy. Alpha emitting radionuclides are able to damage cells including DNA strand, and in the case of correct radionuclide-carrier combination could be very powerful in cancer treatment [23]. Radium-223 chloride (Xofigo®) is already used for palliative treatment of bone metastases of prostate cancer [24,25] due to its chemical behavior similar to calcium. Unfortunately, the application of Xofigo® had to be restricted due to found side effects during ongoing clinical studies. Nowadays, Xofigo® can be used only in several specific indications. This recommendation went from Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (European Medicines Agency) [26]. Due to these recommendations and for the possibility of other organs treatment, it is necessary to create an appropriate carrier, which will immobilize the radionuclide and its decay products and drive into the tissue of interest. During the alpha decay a lot of energy is released and about 95% is carried by alpha particle (in the case of ²²³Ra it is approximately 5 MeV), and the rest, 5%, is carried by the new nucleus. Therefore, the bond between radionuclide and organic molecule is destroyed, because the nucleus energy is much higher than the energy of chemical bond [23]. For this and other reasons, e.g., the radiation stability, it is better to choose inorganic materials as carriers. So, in order to immobilize ²²³Ra and its daughter radionuclides, hydroxyapatite (*n*HAp) and titanium dioxide nanoparticles (*n*TiO₂) were chosen.

The subject and goal of this study can be conceived as follows: (a) to summarize sorption kinetic models derived for two phase systems, (b) to evaluate the time dependent concentrations of ²²³Ra^(II) with the aim of identifying the rate-controlling sorption process and to find the corresponding kinetic model, and (c) to assess the influence of the basic reaction parameters. Surface protolytic properties [6], dependence of sorption on pH [10], and sorbed species of ²²³Ra [10] were already studied and described in detail. Current paper continues the study on *n*HAp and *n*TiO₂ as perspective materials for nuclear medicine as a radionuclide vehicle.

2. Materials and Methods

All chemicals were of analytical grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and were used without further purification: tetrabutyl *ortho*-titanate (TBOT), prop an-2-ol (IPA), sodium hydroxide, phosphoric acid, boric acid, acetic acid, sodium nitrate, ammonium hydroxide solution (28%), calcium nitrate tetrahydrate, and ammonium hydrogen phosphate. Demineralized water of 18 MΩ/cm was obtained from Millipore, (Burlington, MA, USA) water purification system.

Radioactivity measurement was performed on CRC-55tW (CAPINTEC, Ramsey, NJ, USA) calibrated detector. During the experiments, all samples were mixed with curved glass stick fixed in

IKA RW 11 stirrer (Staufen, Germany), centrifugation was performed on Centrifuge MPW-360 (MPW, Warsaw, Poland).

2.1. Preparation of ^{223}Ra Stock Solution

Radium-223 generator ($^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}/^{223}\text{Ra}$) was prepared in our laboratory according to Guseva et al. [27]. The elution was performed by 0.7 M nitric acid in 80% methanol solution from column (0.5 g of Dowex-1 \times 8 and ^{227}Ac in equilibrium with its decay products) for the separation of ^{223}Ra stock solution from ^{227}Ac and ^{227}Th . The gained ^{223}Ra in the form of $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ was dried and reconstituted with saline. No breakthrough of parent radionuclides was observed in γ -spectrum of the eluate.

2.2. Britton–Robinson Buffer Solution

The necessary Britton–Robinson buffer (BRB) was prepared from two stock solutions, which were mixed in an appropriate ratio. The first one was 0.2 M sodium hydroxide and the second one was the mixture of 0.04 M phosphoric acid, 0.04 M boric acid, and 0.04 M acetic acids.

2.3. Sorbent Material Preparation

Hydroxyapatite nanoparticles were prepared by using equal volumes of 1.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ in order to obtain the Ca:P = 1.67 ratio. At first, the calcium salt solution was added to 0.5 L of demineralized water. The pH of the mixture was set to 11 and maintained during the reaction. Then $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was added dropwise during stirring. After overnight stirring, gained NPs were washed (demineralized water–three times) and dried under vacuum.

Mixture of TBOT and IPA (1:4) was used for titanium dioxide nanoparticles preparation. The mixture was added dropwise into excess of demineralized water under ultrasonication. The whole mixture was in ultrasonic generator for 30 min. Gained NPs were washed (demineralized water–three times, IPA–once) and then dried under vacuum. Detailed description of the materials preparation and characterization was published by Kukleva et al. [6] earlier.

2.4. Determination of Kinetic Dependences

The pH of following kinetic experiments was set to eight for $n\text{HAp}$ and to six for $n\text{TiO}_2$ according to the study of ^{223}Ra uptake mechanism by NPs as a function of pH described by Suchánková et al. [10] and future planned use of these materials in medicine in vivo. Prepared sorbents were dispersed in 25 mL of BRB, so the concentration of NPs was 1 g/L. Then $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ solution of similar pH was added, so average activity per sample was 200 kBq. The suspension was continuously stirred during the whole experiment (24 h). Small aliquots of suspension (0.5 mL) were taken from the sample in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and 60 min and then after 2, 3, 4, 5, 7, 10, and 24 h, so the solid to liquid phase ratio remained constant. The zero aliquot was taken immediately after ^{223}Ra solution addition. The aliquots were centrifuged for 30 s at 3000 rpm in the case of $n\text{HAp}$ and 40 s at 4000 rpm in the case of $n\text{TiO}_2$, due to different stability of nanomaterial dispersion. After separation, nanoparticles were redispersed in 0.5 mL of water to ensure uniform counting geometry. The radiochemical yield (Y %) of adsorbed ^{223}Ra was calculated based on activity measurements of separated supernatant (A_s) and nanoparticles (A_p) according to Equation (1):

$$Y (\%) = \frac{A_s}{A_s + A_p} \times 100\% \quad (1)$$

Based on ^{223}Ra absolute activity the concentration in the solution was calculated using Equation (2):

$$c = \frac{A \times T_{1/2}}{\ln 2 \times V_{aq} \times N_A} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}] \quad (2)$$

where A (Bq) is the absolute activity of the radionuclide, $T_{1/2}$ (s) is the radionuclide half-life, V_{aq} (L) is the volume of the solution, and N_A is the Avogadro constant.

The experiments were repeated three times for each sorbent.

2.5. Kinetic Models for Two-Phase Systems

Kinetic models are summarized in Table 1 [28] and reflect the following different rate-controlling processes: mass transfer (DM), film diffusion (FD), diffusion in inert layer (ID), diffusion in reacted layer (RLD), chemical reaction (CR), and gel diffusion (GD). All of these models are given by first order differential equations.

Table 1. Kinetic models of sorption/extraction taking place in two-phase systems [28].

Control Process	Model Abbreviation	Differential Equation	Equation #
Mass transfer	DM	$dq/dt = K_{DM} \times (q^* - q)$	(3)
Film diffusion	FD	$dq/dt = K_{FD} \times (c - c^*)$	(4)
		$K_{FD} = 3 \times D / (\delta \times R \times h_s)$	(5)
Diffusion in an inert layer	ID	$dq/dt = K_{ID} \times (c - c^*) / \{ [1 - (q/q^*)]^{-1/3} - 1 \}$	(6)
		$K_{ID} = 3 \times D / (R^2 \times h_s)$	(7)
Diffusion in a reacted layer	RLD	$dq/dt = K_{RLD} \times (q^* - q) / \{ [1 - (q/q^*)]^{-1/3} - 1 \}$	(8)
		$K_{RLD} = 3 \times D / (R^2 \times h_s)$	(9)
Chemical reaction in the reaction zone, e.g., 1st order reversible reaction	CR	$dq/dt = K_{CR} \times r_{CR} \times [1 - (q/q^*)]^{2\beta}$	(10)
		$K_{CR} = 3 / (R \times h_s)$	(11)
		$R_{CR} = K_{CR} \times (c - c^*)$	(12)
Gel diffusion	GD	$dq/dt = K_{GD} \times [(q^* - q_0)^2 - (q - q_0)^2] / (q - q_0)$	(13)
		$K_{GD} = D \times \pi^2 / (2 \times R^2)$	(14)

Following balance equations hold:

$$dq/dt = -r \times dc/dt \quad (15)$$

$$\text{if } c \text{ is the integration variable: } q = r \times (c_0 - c) + q_0 \quad (16)$$

$$\text{if } q \text{ is the integration variable: } c = c_0 - (q - q_0)/r \quad (17)$$

$$\text{Equilibrium equations used: } q^* = K_a \times c, \text{ and } c^* = q/K_a \quad (18)$$

c is a concentration of the component in the aqueous phase at time t ; c^* —equilibrium concentration of the component in the aqueous phase corresponding to the concentration of the component in the sorbent at time t ; q —concentration of the component in the sorbent at time t ; q^* —equilibrium concentration of the component in the sorbent corresponding to the concentration of the component in the aqueous phase at time t ; q_0 —starting concentration of the component in the sorbent; t —time; r —volume ratio of aqueous to solid phase; D —diffusion coefficient of the component, K_{DM} , K_{FD} , K_{ID} , K_{RLD} , K_{CR} , and K_{GD} —over-all kinetic coefficients; k_{CR} —kinetic coefficient of the chemical reaction; r_{CR} —rate of the chemical reaction; R —mean radius of the solid phase particle; h_s —specific mass of the solid sorbent; and δ —thickness of the “liquid film” on the surface of the solid particle.

2.6. Procedure of the Experimental Data Evaluation

The RLD-model was used to demonstrate calculations of the liquid–solid sorption kinetics in detail (Equations (8) and (9)). The systems were following $^{223}\text{Ra}^{(III)}-n\text{HAp}$ and $^{223}\text{Ra}^{(III)}-n\text{TiO}_2$. Sorption from the aqueous phase into the solid sorbent is described by the Equation (8), which was modified with balance and equilibrium equations (Equations (15) and (18)). The obtained equation can be used for direct evaluation of the experimental data. The value of the over-all mass transfer coefficient, K_{RLD} , was sought based on the Newton–Raphson multidimensional non-linear regression method combined with the solution of the differential equation under given boundary conditions (Runge–Kutha method). Calculations were performed on in-house made code P60.fm of software product FAMULUS (Famulus Etc., Prague, Czech Republic) [28].

If the value of WSOS/DF (weighted sum of squares divided by degrees of freedom) was in the range from 0.1 to 20 [29], the evaluated model was taken as suitable. The calculations were based on the χ^2 -test according to Equation (19). Based on Equation (20) the value of WSOS/DF was obtained.

$$\chi^2 = \sum \{(SSx)_i / (s_p)_i^2\}; i = 1, 2, 3, \dots, n_p, \quad (19)$$

$$WSOS/DF = (\chi^2/n_d); n_d = n_p - n, \quad (20)$$

where $(SSx)_i$ is the i -th square of the deviation of i -the experimental value from the corresponding calculated one, $(s_p)_i$ is the estimate of standard deviation (uncertainty) of the i -the experimental point, n_p is the number of experimental points, n_d is the number of degrees of freedom, and n is the number of model parameters sought during the regression procedure.

3. Results and Discussion

3.1. Parameters of $n\text{HAp}$ and $n\text{TiO}_2$

As mentioned above, the preparation and characterization of the sorbents was published earlier by Kukleva et al. [6] and the pH values were chosen in terms of ^{223}Ra sorption mechanism results published by Suchánková et al. [10]. Characterization parameters of the sorbents are summarized in Table 2. The significant differences can be seen in the values of specific surface area determined by the Brunauer–Emmett–Teller (B.E.T.) method, crystallite size and equivalent diameter of NPs. Based on this data, higher kinetic rate should be expected in the case of $n\text{TiO}_2$ than of $n\text{HAp}$. However, $n\text{HAp}$ has higher concentration of surface edge sites, which can be interpreted as its potential higher sorption capacity for species present under $\text{pH} \geq 8-9$ [6], but the radionuclide concentration was very low (Table 3), so this advantage has probably not played an important role.

Table 2. The basic properties of $n\text{HAp}$ and $n\text{TiO}_2$ [6,10].

Parameter	Unit	$n\text{HAp}$	$n\text{TiO}_2$
Specific surface area	($\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$)	117 ± 8	330 ± 10
Crystallite size	(nm)	5.18	2.64
Equivalent diameter	(nm)	21.7 ± 6.9	5.3 ± 1.7
Surface edge sites	($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	5.10 ± 1.20	0.20 ± 0.01
Surface layer sites	($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	0.15 ± 0.01	0.67 ± 0.01
pH applicability	pH	5–10	2–10
Specific mass	($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	3.14–3.21	3.90–4.30

3.2. Evaluation of Kinetic Dependence

The parameters used as input data, in addition to experimental time dependent concentrations (Figure 1a,b), are summarized in Table 3. Values of K_d were obtained from equilibrium values of given kinetic experiments.

Table 3. Starting aqueous phase concentrations of ^{223}Ra , c_0 , and the values of parameters K_d and r in kinetic experiments of sorption on $n\text{HAp}$ and $n\text{TiO}_2$ (at $t = 0$).

Experiment No.	$n\text{HAp}$			$n\text{TiO}_2$		
	c_0 ($\text{mol}\cdot\text{L}_{\text{aq}}^{-1}$)	K_d ($\text{L}_{\text{aq}}\cdot\text{kg}^{-1}$)	r ($\text{L}_{\text{aq}}\cdot\text{kg}^{-1}$)	c_0 ($\text{mol}\cdot\text{L}_{\text{aq}}^{-1}$)	K_d ($\text{L}_{\text{aq}}\cdot\text{kg}^{-1}$)	r ($\text{L}_{\text{aq}}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1	9.92×10^{-12}	3.03×10^4	1000	1.01×10^{-11}	5.90×10^4	1000
2	9.46×10^{-12}	1.55×10^4	1000	1.05×10^{-11}	1.25×10^5	1000
3	1.12×10^{-11}	1.54×10^4	1000	9.86×10^{-12}	1.52×10^5	1000
Mean value \pm σ_{es} *	$1.02 \times 10^{-11} \pm$ 0.07×10^{-11}	$2.04 \times 10^4 \pm$ 0.70×10^4	1000	$1.01 \times 10^{-11} \pm$ 0.03×10^{-11}	$1.12 \times 10^5 \pm$ 0.39×10^5	1000

($q_0 = 0$, in all cases); * σ_{es} : standard deviation based on the entire population given as arguments (MC Office Excel function STDEV.P).

Primarily, each of the experimental kinetic dependence was fitted by all six models one by one (Table 1) and then evaluated based on the WSOS/DF value (Table 4). According to WSOS/DF values, only two models (ID and RLD) were found suitable for further modeling and description of the experimental results. However, RLD model better corresponds with the studied systems from the physical–chemical point of view, therefore it was chosen for further evaluation. Namely, the diffusion through reacted layer seems to be more realistic than through the inert one.

Table 4. The evaluation of kinetic dependences by six different models (Table 1) based on the values of WSOS/DF (weighted sum of squares divided by degrees of freedom) characterizing the agreement between the experimental (22 ± 1 °C) and calculated data.

Sorbent	Experiment No.	WSOS/DF					
		DM	FD	ID	RLD	CR	GD
$n\text{HAp}$	1	59.70	1860	5.35	5.47	1320	40.30
	2	8.28	186	7.45	7.25	92.60	10.10
	3	8.06	461	2.60	2.71	250	27.60
	Mean value \pm σ_{es} *	$25.34 \pm$ 24.29	$835.67 \pm$ 732.96	$5.13 \pm$ 1.99	$5.14 \pm$ 1.87	$554.20 \pm$ 545.30	$26.00 \pm$ 12.38
$n\text{TiO}_2$	1	48.70	54.70	6.72	7.63	52.80	9.99
	2	5.76	757	1.23	3.18	36.30	9.42
	3	33.40	258	8.09	16.10	239	5.43
	Mean value \pm σ_{es} *	$29.29 \pm$ 17.77	$356.57 \pm$ 295.06	$5.35 \pm$ 2.97	$8.96 \pm$ 5.36	$109.37 \pm$ 91.91	$8.27 \pm$ 2.04

* σ_{es} : standard deviation based on the entire population given as arguments (MC Office Excel function STDEV.P).

The experimental and calculated data are illustrated as time dependent percentage fraction of ^{223}Ra sorbed on $n\text{HAp}$ (Figure 1a) and on $n\text{TiO}_2$ (Figure 1b) together with error bars. Due to the fast

sorption kinetics, frequent sampling, very low radium concentration, and precautions applied for the work with radioactive materials, experimental errors, i.e., error bars, seem to be relatively high. However, all three repeated experiments for both materials were evaluated separately and the resulted mean values of: overall mass transfer coefficient, K_{RLD} ; diffusion coefficient, D , and sorption half-life, $t_{1/2}$, are summarized with their correspond values of standard uncertainties, σ_{es} , in Table 5 (the results also include the mean K_d values). As for the sorption half-life, $t_{1/2}$, it represents the time needed for a sorption to increase by half compared to its maximal (equilibrium) level in the given kinetic experiment. The diffusion coefficient in the solid phase, D , is determined using Equation (9) (mean radius of the solid phase particle, R , and its specific mass density, h_s , can be found in Table 2). It is obvious that among the parameters mentioned above the most important, from the kinetic point of view, especially for NPs is mean radius, R , in addition to specific surface area (Table 2). Diffusion coefficient, D , depends on the temperature, type, and speciation of given component (in this case of ^{223}Ra as RaHPO_4 , $\text{RaH}_2\text{PO}_4^+$, and Ra^{2+}) [10,30]. Distribution coefficient, K_d , is responsible for the value of driving force of the given transport process ($(q^* - q)$ or $(c - c^*)$ in Table 1). The larger K_d , the larger driving force especially during first seconds or minutes and the larger positive contribution to the rate of kinetic process. This contribution to the increase in sorption rate is, as we believe, characterized by the half-life $t_{1/2}$. If we compare the mean values of $t_{1/2} \pm \sigma$ (Table 5) with the mean values of $K_d \pm \sigma$ (Table 3) then we can conclude that the mean values have approximately comparable statistical significance and that their values correlate with each other. In our opinion, this indicates the positive impact of K_d on the rate of the sorption process.

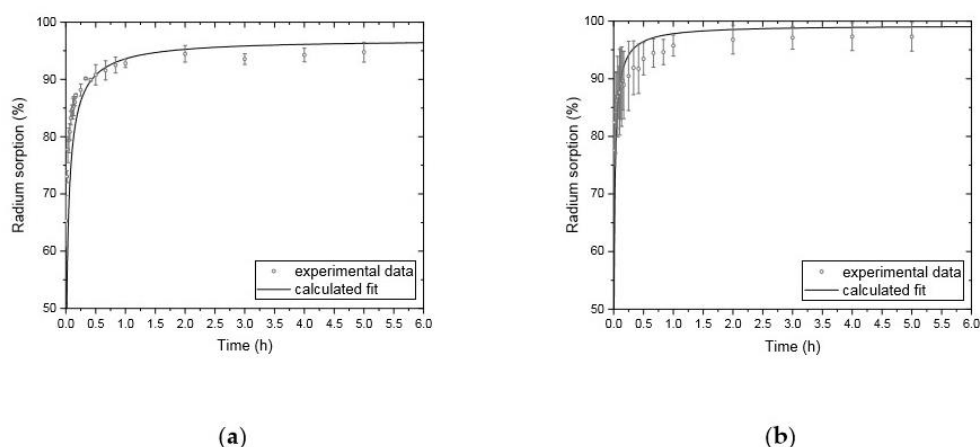


Figure 1. The kinetic of ^{223}Ra sorption on nanoparticles (NPs) during the first hour: (a) $n\text{HAp}$ (mean initial concentration $c_0 = 1.02 \times 10^{-11}$ mol/L) and (b) $n\text{TiO}_2$ (mean initial concentration $c_0 = 1.01 \times 10^{-11}$ mol/L).

Table 5. The values of over-all kinetic, K_{RLD} , and diffusion, D , coefficients, and half-life of sorption, $t_{1/2}$, for the diffusion in reacted layer (RLD) model.

Sorbent	Experiment No.:	$K_{RLD} \pm \sigma$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Mean* $K_{RLD} \pm \sigma_{es}$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Mean* $D \pm \sigma_{es}$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$)	Mean* $t_{1/2} \pm \sigma_{es}$ (min)
$n\text{HAp}$	1	1.24×10^{-1}	$5.03 \times 10^{-1} \pm$	$2.50 \times 10^{-12} \pm$	0.75 ± 0.18
	2	7.53×10^{-1}	2.72×10^{-1}	1.80×10^{-12}	
	3	6.31×10^{-1}			
$n\text{TiO}_2$	1	2.82×10^{-2}	$4.01 \times 10^{-2} \pm$	$1.60 \times 10^{-14} \pm$	0.51 ± 0.32
	2	1.80×10^{-2}	2.44×10^{-2}	0.96×10^{-14}	
	3	0.74×10^{-2}			

* σ_{es} : standard deviation based on the entire population given as arguments (MC Office Excel function STDEV.P).

Comparing the mean values of K_{RLD} (Table 5), at first glance it seems that the sorption on *n*HAp ought to be faster than on *n*TiO₂. Of course, it does not hold true because the difference in K_{RLD} values is in consequence of the reversible character of the sorption process studied. Especially in this case, it is the dependence of the sorption rate on the driving force given by the value K_a , as mentioned above. The half-lives of the sorption reaction, $t_{1/2}$ (Table 5), were considered as the quantification of this effect, the mean values of which were 0.75 ± 0.18 min and 0.51 ± 0.32 min for *n*HAp and *n*TiO₂ respectively. Based not only on these values, but also on the values of R , K_a , and specific surface area, the sorption kinetics on *n*TiO₂ can be validated as faster than on *n*HAp.

4. Conclusions

The sorption kinetics of ²²³Ra to *n*HAp and *n*TiO₂ were experimentally studied under free air conditions at 22 ± 1 °C. (a) There were summarized sorption kinetic models for the two phase system. The results were evaluated using six different kinetic models of a two-phase system, derived for six different rate control processes, based on first-order differential equations. (b) According to goodness-of-fit values, WSOS/DF, the model based on diffusion in the reacted layer (RLD) of the solid phase was chosen as the best for both types of sorbents studied. (c) Further, the influence of the basic reaction parameters was assessed. It was found that *n*TiO₂ had higher value of K_a compared to *n*HAp, which could be understood not only as higher sorption capacity for ²²³Ra under given reaction conditions, but also as higher time dependent driving force in the course of given kinetics, which contributes to a higher sorption rate on *n*TiO₂. This was confirmed by the values of half-life reaction quantity, $t_{1/2}$, *n*TiO₂. This corresponded with the larger specific surface area of *n*TiO₂ and its smaller particle diameter. Unfortunately, the values of overall kinetic coefficients, K_{RLD} , on the basis of the first quick look, pointed to the opposite result. However, it is necessary to take into account the reversible nature of the sorption reaction, which implies that the parameter of the sorption kinetics is not only K_{RLD} , but also K_a , i.e., the driving force of the given reaction. In any case, the ²²³Ra sorption rate is sufficient and serves the purpose of *n*HAp and *n*TiO₂ for medicinal and industrial applications.

Author Contributions: Conceptualization, P.S. and J.K.; methodology, P.S., E.K. and K.Š.; software, K.Š.; validation, P.S., P.N. and M.S.; formal analysis, E.K. and K.Š.; investigation, P.S., P.N., M.S. and E.K.; resources, M.V.; data curation, P.S., M.S., E.K. and M.V.; writing—original draft preparation, P.S.; writing—review and editing, E.K.; visualization, E.K. and J.K.; supervision, J.K.; project administration, J.K. and M.V.; funding acquisition, P.S., J.K. and M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, grant number SGS19/194/OHK4/3T/14, TECHNOLOGY AGENCY OF THE CZECH REPUBLIC, grant number TA03010027, HEALTH RESEARCH AGENCY OF THE CZECH REPUBLIC, grant number NV16-30544A and the EU and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant number CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000464.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. RES³T/Rosendorf Expert System for Surface and Sorption Thermodynamics. Available online: <https://www.hzdr.de/db/res3t.login> (accessed on 16 January 2019).
2. Yasukawa, A.; Yokoyama, T.; Kandori, K.; Ishikawa, T. Reaction of calcium hydroxyapatite with Cd²⁺ and Pb²⁺ ions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *299*, 203–208.
3. Sandrine, B.; Ange, N.; Didier, B.A.; Eric, C.; Patrick, S. Removal of aqueous lead ions by hydroxyapatites: Equilibria and kinetic processes. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *139*, 443–446.
4. Maruszewska, A.; Podsiadly, R. Dyes based on the azo-¹H-pyrrole moiety—Synthesis, spectroscopic and electrochemical properties, and adsorption on TiO₂. *Colora. Technol.* **2016**, *132*, 92–97.

5. Li, W.; Pan, G.; Zhang, M.; Zhao, D.; Yang, Y.; Chen, H.; He, G. EXAFS studies on adsorption irreversibility of Zn^(II) on TiO₂: Temperature dependence. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319*, 385–391.
6. Kukleva, E.; Suchankova, P.; Štamberg, K.; Vlk, M.; Slouf, M.; Kozempel, J. Surface protolytic property characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 21989–21995.
7. Dzombak, D.A.; Morel, F.M.N. *Surface Complexation Modeling: Hydrous Ferric Oxide*; Wiley-Interscience: New York, NY, USA, 1990.
8. Luetzenkirchen, J. *Surface Complexation Modelling*; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2006.
9. Filipská, H.; Štamberg, K. Mathematical Modeling of a Cs(I)-Sr(II)-Bentonite—Magnetite Sorption System, Simulating the Processes Taking Place in a Deep Geological Repository. *Acta Polytech. J. Adv. Eng.* **2005**, *45*, 11–18.
10. Suchánková, P.; Kukleva, E.; Štamberg, K.; Nykl, P.; Vlk, M.; Kozempel, J. Study of ²²³Ra uptake mechanism on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles as a function of pH. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 3659–3666.
11. Kroupová, H.; Štamberg, K. Experimental study and mathematical modelling of Cs^(I) and Sr^(II) sorption on bentonite as barrier material in deep geological repository. *Acta Geodynam. Mater.* **2005**, *2*, 79–86.
12. Liu, M.; Jing, H.; Bai, R.; Wang, Y. Adsorption of icariin on nano-hydroxyapatite: Isotherm, kinetics, pH, ionic strength and construction. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 478–479.
13. Valizadeh, S.; Rasoulifard, M.H.; Dorraji, M.S.S. Adsorption and photocatalytic degradation of organic dyes onto crystalline and amorphous hydroxyapatite: Optimization, kinetic and isotherm studies. *Korean J. Chem. Eng.* **2016**, *33*, 481–489.
14. Hammari, L.E.; Laghizil, A.; Saoiabi, A.; Barboux, P.; Meyer, M.; Brandès, S.; Guillard, R. Some Factors Affecting the Removal of Lead^(II) Ions from Aqueous Solution by Porous Calcium Hydroxyapatite: Relationships between Surface and Adsorption Properties. *Adsorpt. Sci. Technol.* **2006**, *24*, 507–516.
15. Gómez del Río, J.; Sanchez, P.; Morando, P.J.; Cicerone, D.S. Retention of Cd, Zn and Co on hydroxyapatite filters. *Chemosphere* **2006**, *64*, 1015–1020.
16. Summary of Product Characteristic: GalliaPharm—Radionuclide Generator. Available online: http://mri.medagencies.org/download/DK_H_2294_001_FinalPI.pdf (accessed on 17 January 2019).
17. Alvarez-Corena, J.R.; Bergendahl, J.A.; Hart, F.L. Advanced oxidation of five contaminants in water by UV/TiO₂: Reaction kinetics and byproducts identification. *J. Environ. Manag.* **2016**, *181*, 544–551.
18. Roncaroli, F.; Blesa, M.A. Kinetics of adsorption of oxalic acid on different titanium dioxide samples. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *356*, 227–233.
19. Pena, M.E.; Korfiatis, G.P.; Patel, M.; Lippincott, L.; Meng, X. Adsorption of As^(V) and As^(III) by nanocrystalline titanium dioxide. *Water Res.* **2005**, *39*, 2327–2337.
20. Jegadeesan, G.; Al-Abed, S.R.; Sundaram, V.; Choi, H.; Scheckel, K.G.; Dionysiou, D.D. Arsenic sorption on TiO₂ nanoparticles: Size and crystallinity effects. *Water Res.* **2010**, *44*, 965–973.
21. Nano, G.V.; Strathmann, T.J. Ferrous iron sorption by hydrous metal oxides. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *297*, 443–454.
22. Vasileva, E.; Proinova, I.; Hadjiivanov, K. Solid-phase extraction of heavy metal ions on a high surface area titanium dioxide (anatase). *Analyst* **1996**, *121*, 607–612.
23. Kozempel, J.; Vlk, M. Nanoconstructs in Targeted Alpha-Therapy. *Recent Pat. Nanomed.* **2014**, *4*, 71–76.
24. Parker, C.; Nilsson, S.; Heinrich, D.; Helle, S.I.; O'sullivan, J.M.; Fosså, S.D.; Chodacki, A.; Wiechno, P.; Logue, J.; Widmark, A.; et al. Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Eng. J. Med.* **2013**, *369*, 213–223.
25. EMA: Xofigo. 2013. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofigo> (accessed on 20 November 2019).
26. EMA: PRAC Recommendation. 2018. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/xofigo-article-20-procedure-prac-recommends-restricting-use-prostate-cancer-medicine-xofigo_en.pdf (accessed on 20 December 2019).
27. Guseva, L.I.; Tikhomirova, G.S.; Dogadkin, N.N. Anion-Exchange Separation of Radium from Alkaline-Earth Metals and Actinides in Aqueous-Methanol Solutions of HNO₃. ²²⁷Ac-²²³Ra Generator. *Radiochemistry* **2004**, *46*, 58–62.
28. Beneš, P.; Štamberg, K.; Štegman, R. Study of the Kinetics of the Interaction of Cs-137 and Sr-85 with Soils Using a Batch Method: Methodological Problems. *Radiochim. Acta* **1994**, *66*, 315–321.

29. Herbelin, A.L.; Westall, J.C. *FITEQL-A Computer Program for Determination of Chemical Equilibrium Constants from Experimental Data, 1996, Version 3.2. Report 96-01*; Department of Chemistry, Oregon State University: Corvallis, OR, USA, 1996.
30. Mokhodoeva, O.; Vlk, M.; Málková, E.; Kukleva, E.; Mičolová, P.; Štamberg, K.; Šlouf, M.; Dzhenloda, R.; Kozempel, J. Study of ^{223}Ra uptake mechanism by Fe_3O_4 nanoparticles: Towards new prospective theranostic SPIONs. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 301.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publikace E:

Suchánková P, Kukleva E, Málková E, Nykl P, Sakmár M, Vlk M, Kozempel J (2020) Radiolabelled hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles: preparation and stability *in vitro* of prospective theranostic nanocarriers for ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Podáno do *Nanomaterials*, ref. označení Manuscript No.: nanomaterials-876253.



Article

Radiolabelled Hydroxyapatite and Titanium Dioxide Nanoparticles: Preparation and *In Vitro* Stability of Prospective Theranostic Nanocarriers for ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Petra Suchánková, Ekaterina Kukleva, Eva Nykl, Pavel Nykl, Michal Sakmár, Martin Vlk and Ján Kozempel *

Czech Technical University in Prague, Faculty on Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry, Břehová 7, 11519 Prague 1, Czech Republic Affiliation 1; petra.suchankova@jfifi.cvut.cz (P.S.); ekaterina.kukleva@jfifi.cvut.cz (E.K.); emmalkova@gmail.com (E.N.); nyklpavel1@gmail.com (P.N.); michal.sakmar@jfifi.cvut.cz (M.S.); martin.vlk@jfifi.cvut.cz (M.V.)

* Correspondence: jan.kozempel@jfifi.cvut.cz (J.K.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Hydroxyapatite and titanium dioxide are widely used materials in a broad spectrum of branches. Due to their appropriate properties, they could be potentially used as nanocarriers for medicinal radionuclides for diagnostics and therapy. Two radiolabelling strategies of both nanomaterials were carried out by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for diagnostic purposes and by ^{223}Ra for therapeutic purposes. The first one was radionuclide sorption on ready-made nanoparticles and the second one was direct radionuclide incorporation into the structure of the nanoparticles. Achieved labelling yields were higher than 94 % for both nanomaterials with both radionuclides. Afterwards *in vitro* stability tests were carried out in several solutions: physiological saline, bovine blood plasma, bovine blood serum, 1 % and 5 % human albumin solutions. *In vitro* stability studies were performed as short-term (59 hours for ^{223}Ra and 31 hours for $^{99\text{m}}\text{Tc}$) and long-term experiments (5 half-lives of ^{223}Ra , approx. 55 days). Both radiolabelled nanoparticles with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ have shown similar released activities (about 20 %) in all solutions. The best results were obtained for ^{223}Ra radiolabelled titanium dioxide nanoparticles, where overall released activities were under 6 % for 59 hours study in all matrices and under 3 % for 55 days in long-term perspective.

Keywords: hydroxyapatite; titanium dioxide; nanoparticles; radium; ^{223}Ra ; technetium; $^{99\text{m}}\text{Tc}$; theranostic; radiolabelling; *in vitro* stability

1. Introduction

The progress in the development of nanomaterial technology has a significant influence on all scientific and everyday life applications [1,2]. The massive expansion of nanomaterials is well seen also in medicine as bandages with antimicrobial nanosilver or with antibiotic capsules and nanoparticles (NPs), which are applicable for delivering of drugs, light, heat etc. [3]. In nuclear medicine, inorganic NPs could be used as one of the possible carriers for diagnostics or therapeutic radionuclides. Nowadays, e.g. hydroxyapatite (HAp) [4], BaSO_4 -NPs [5], Ag-NPs [6], LaPO_4 -NPs [7], TiO_2 [8], superparamagnetic iron oxide NPs [9] are under examination. An important advantage of nanoparticles is large specific surface area and radiation stability which allows them to resorb ions and also to retain recoil radionuclides [10]. For these reasons, hydroxyapatite (*n*HAp) and titanium dioxide nanoparticles (*n*TiO₂) were chosen.

Hydroxyapatite is a natural material occurring in bones and teeth. Its artificial analogue is used in medicine as a part of bone and tooth implants [11,12]. Another HAp's applications such as additive

to sunscreens [13] or biologically active material for cell proliferation and osteogenic differentiation are under research [14]. Content of calcium and phosphorus in HAp structure in stoichiometric ratio 1.67 (Ca to P) leads to the most stable modification. However, the natural one is not stoichiometric, so the ratio is lower, but HAp with calcium deficit is still stable from the biological point of view. Moreover, the natural structure is usually more complicated and contains other ion traces, such as fluorine etc. [12]. Precipitation from aquatic solutions is the easiest and the fastest method for HAp preparation and can be used on a large scale [15].

Titanium dioxide is commonly and widely used in everyday life. People encounter it either in a pill as a filling agent or in cosmetics, toothpaste, and food as a white dye. Due to its optical properties, TiO₂ is also used as a functional part of sunscreens [16]. This material was chosen due to its biocompatibility and low toxicity [17-20]. Moreover, its preparation is quick, easy and proper for large-scale production [15]. In nuclear medicine, TiO₂ has found its place as a sorbent in a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator, where ⁶⁸Ge is sorbed on titania and ⁶⁸Ga is eluted by sterile ultra-pure 0.1 mol/l hydrochloric acid [21].

Hydroxyapatite was already labelled with diagnostic radionuclides e.g. ^{99m}Tc, ¹⁸F. Radiolabelled NPs with ^{99m}Tc were developed for bone cancer imaging [4]. Nanoparticles with citrate modified surface for ¹⁸F radiolabelling were prepared by Sandhöfer et al. [22]. The literature on therapeutic radionuclides ¹⁷⁷Lu and ²²³Ra for nHAp radiolabelling is also available. For therapy of hepatocellular carcinoma [23] and the treatment of rheumatoid arthritis [24], ¹⁷⁷Lu-HAp were studied. In all these studies, *in vitro* and *in vivo* preliminary studies were performed and the results were promising. Radium-223 was used for radiolabelling of NPs [25] and spherical HAp granules [26]. Preliminary experiments with HAp, which has programmable properties, were also performed with short-lived radionuclides of copper and zinc [27]. In a dosimetric study in radiosynoviorthesis, HAp labelled with ¹⁵³Sm and ⁹⁰Y were compared [28]. Also, ¹⁶⁹Er and ¹⁷⁷Lu labelled HAp were used in radiation synovectomy [23,29]. Besides medicine, HAp is studied for radionuclide removal from radioactive waste [30].

Only several publications are devoted to radiolabelling of nTiO₂ describing mostly studies of titania biodistribution in tissues and organs. Radiolabelling with ⁴⁸V was used for *in vivo* investigation of nanoparticles' transport in lungs [31]. Vanadium-48 was also applied for the toxicological study of nTiO₂ quantitative biokinetics and clearance in rats after intravenous injection, oral application and intratracheal instillation [17-19]. Short-term *in vivo* biodistribution studies were performed with ¹⁸F, where ¹⁸O-enriched TiO₂ was irradiated by proton beam [32]. Another diagnostic radionuclide ⁶⁸Ga as an emitter of Cerenkov radiation was used together with TiO₂ for photodynamic therapy [33]. Different type of radiolabelling study was the low-temperature diffusion of titanium radioisotopes - ⁴⁴Ti, ⁴⁵Ti [34]. Targeted alpha therapy using TiO₂ was already studied by its ²²⁵Ac-radiolabelling [8] and Ag-doped TiO₂ particles by its ²¹¹At-radiolabelling [35]. Also, a number of studies dealing with uranium and uranyl salts sorption on TiO₂ for radioactive repositories describe its beneficial impact for long-term storage as an extra barrier for radionuclide sorption [36,37].

The main interest in the current paper was given to ²²³Ra due to its therapeutic properties. Also, the paper is a continuation of already published results by Kukleva et al. [15], Suchánková et al. [38] and Suchánková et al. [39]. The total released energy of ²²³Ra in a form of alpha particles through all the decays is high enough to destroy cell DNA without broad damage of surrounding tissue. Radium-223 is already used in clinical trials as a Xofigo® (RaCl₂) for palliative treatment of bone metastases of prostate cancer [40]. Due to similar pathways as Ca²⁺, Ra²⁺ is targeted into bones, where it replaces calcium. Simultaneously, such an elegant natural targeting is a limitation for Xofigo® which cannot be delivered to other damaged tissue. This disadvantage could be solved by an appropriate carrier and chosen NPs could be a solution. As a complementary radionuclide for theranostic approach, ^{99m}Tc, as the most frequently used diagnostic radionuclide in medicine, was chosen. Among its benefits belong suitable energy of gamma and suitable half-life, moreover, it is easily obtained from radionuclide generator. Radium-223 generators are also under investigation.

This article is aimed to verify prepared nanoparticles and provide evidence whether they can be used as suitable materials as radionuclide carriers in nuclear medicine. The first task was to develop

a suitable and fast radiolabelling strategy with appropriate yields. For this purpose, two strategies of radiolabelling were chosen. The first one was sorption on ready-made NPs and the second one was the intrinsic labelling, where the radionuclide was incorporated into the structure of NPs. The second task was to establish the *in vitro* influence of biologically relevant media on the stability of radiolabelled *n*HAp and *n*TiO₂. For this *in vitro* study physiological saline, bovine blood plasma and serum, 1 % and 5 % albumin solution were used. These data will allow to determine if nanocarriers could be used for further *in vivo* experiments and if the radioactivity remains on the NPs and the radionuclides are not being released to the surrounding tissue.

2. Materials and Methods

All chemicals were of analytical grade and were used without further purification: tetrabutyl orthotitanate (TBOT), propane-2-ol (IPA), ammonium hydroxide, calcium nitrate tetrahydrate, sodium chloride, diammonium hydrogen phosphate, and sodium azide purchased from Merck (Darmstadt, Germany); SnCl₂ purchased from The British drug houses LTD (United Kingdom), and bovine plasma and serum, albumin lyophilised (pH 7) purchased from Biowest (Nuaille, France). Demineralized water of 18 MΩ/cm⁻¹ was obtained from Millipore (Burlington, MA, USA) water purification system.

Gamma spectra were measured with a HPGe detector and analysed using the Maestro Software (ORTEC, Oak Ridge, Tennessee, USA). Overall activities were measured with a well-type NaI(Tl) crystal CII CRC-55tW (CAPINTEC, Ramsey, NJ, USA). For mixing of samples, Stuart SSM3 rocker (Cole-Parmer Ltd, Illinois, USA) was used and separation was made on VWR Micro Star 12 centrifuge (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA). All experiments were performed under aseptic conditions in laminar box Airflow 150 UV (Esi FLUFRANCE, Arcueil, France).

2.1 Preparation of nanomaterials

The detailed description of both hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles' synthesis and characterization was already published by Kukleva et al. [15]. Here only synthesis is described briefly.

For the synthesis of *n*HAp, 1.2 M Ca(NO₃)₂ in demineralized water was used. For correct synthesis running pH was set and maintained at 11 by ammonium hydroxide solution. Afterwards, the same volume of 0.7 M (NH₄)₂HPO₄ was dropwise added and mixed overnight. Then prepared nanoparticles were washed with demineralized water (3x) and dried under vacuum.

The chosen preparation method of *n*TiO₂ was hydrolysis of TBOT. The mixture of TBOT and IPA (1:4 respectively) was dropwise added into demineralized water in ultrasonic generator and the solution was mixed at the laboratory temperature. After that, prepared nanoparticles were washed with physiological saline (3x) and IPA (1x) and dried under vacuum.

2.2 Preparation of ²²³Ra and ^{99m}Tc stock solutions

The stock ²²³Ra solution was obtained from ²²⁷Ac/²²⁷Th/²²³Ra generator prepared at the Department of Nuclear Chemistry at our laboratory according to Guseva et al. [41]. The column was filled with anion-exchanger Dowex-1x8 resin. The elution of ²²³Ra was performed by 0.7 M HNO₃ in 80 % methanol. Gamma-spectrometric analysis was used for radionuclide purity detection of ²²³Ra(NO₃)₂ solutions (breakthrough of parents radionuclides in the eluate). The eluted ²²³Ra(NO₃)₂ solutions were dried and reconstituted in demineralised water [25].

The ^{99m}Tc solution stock was gained from commercial generator DRYTEC™ (GE Healthcare LTD Chicago, Illinois, USA). The elution was performed by physiological saline.

2.3 Radiolabelling procedure

Two strategies of radiolabelling with both ²²³Ra and ^{99m}Tc were chosen. The first strategy was the surface radiolabelling, where the radionuclide was sorbed on the ready-made NPs' surface. Prepared NPs (5 mg) were dispersed in 300 µl of physiological saline for ²²³Ra radiolabelling or in 500 µl of fresh stannous chloride solution (480 mg/L) for ^{99m}Tc radiolabelling. Consequently, ²²³Ra or ^{99m}Tc

solutions were added. The radioactivity of ^{223}Ra was added in the range from 5 to 10 kBq and the radioactivity of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ solution was in the range from 60 to 100 MBq. The samples were mixed during one hour at laboratory temperature and then washed by physiological saline (3 \times).

The second strategy was the intrinsic labelling, where the radionuclide was directly incorporated into NPs' structure. Radiolabelled *n*HAp were prepared in the following way: 35 μl of 1.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was added to 500 μl of demineralized water, then pH was set to 11 by 1 M ammonium hydroxide solution. Then the ^{223}Ra solution was added in a small volume so the activity added was in the same range as for surface labelling. Finally, 35 μl of 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was added and the mixture was stirred for 1 hour at laboratory temperature. In the case of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiolabelling, the procedure was basically the same, but instead of ^{223}Ra solution $^{99\text{m}}\text{Tc}$ was added. The samples were washed by physiological saline (3 \times).

Radiolabelled *n*TiO₂ was prepared in the following way: tetrabutyl orthotitanate in IPA (1:4, 70 μL) was dropwise hydrolysed in physiological saline (300 μL) with already added ^{223}Ra solution or in stannous chloride solution (500 μL) with added $^{99\text{m}}\text{Tc}$. The radioactivity was in a similar range as in the previous case. The samples were mixed for 1 hour at laboratory temperature and washed by physiological saline (3 \times).

All experiments for both radiolabelling strategies for both materials were repeated 6 times and resulting yields were calculated.

2.4 In vitro stability studies of radiolabelled materials

In vitro stability studies were performed in several matrices: physiological saline, bovine blood plasma and serum and human albumin solutions (1 % and 5 %). Nanoparticles after labelling and washing were centrifuged and the solution was replaced with a new matrix. All samples were in triplets. The samples were incubated at laboratory temperature and shaken during the incubation. The matrices were replaced with the same but fresh solution after 2 h – 7 h – 12 h – 17 h – 26 h – 35 h – 59 h from the beginning of the experiment (in the case of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ last interval was removed and the previous one was shortened from 9 h to 5 h due to its shorter half-life). Samples and supernatants were measured on NaI(Tl) scintillation detector. The percentages of released radioactivity were specified separately for ^{223}Ra -NPs (short-term) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NPs. Also, long-term stability studies were provided for ^{223}Ra , where chosen matrices were replaced every 11 days ($T_{1/2}(^{223}\text{Ra}) = 11.4 \text{ d}$) for 5 times (total 55 days).

3. Results and Discussion

3.1. Radiolabelling

Two strategies of NPs' radiolabelling were tested: surface (S) and intrinsic (I) labelling. The radiolabelling yields were determined according to the Equation (1):

$$\%Y = \frac{A_{NPs}}{A_{init}} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

where A_{NPs} is the final activity of radiolabelled nanoparticles and A_{init} is an initial activity. The longest radionuclide in the decay chain – ^{223}Ra – was measured. Daughter radionuclides were not specifically determined.

All radiolabelling yields for both strategies and materials were higher than 94 % (Table 1).

Table 1. Yields for ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labelling of *n*HAp and *n*TiO₂ (n=6).

Labelling	^{223}Ra [%]		$^{99\text{m}}\text{Tc}$ [%]	
	<i>n</i> HAp	<i>n</i> TiO ₂	<i>n</i> HAp	<i>n</i> TiO ₂
S	94.2 \pm 0.5	98.7 \pm 0.5	95.9 \pm 1.5	98.4 \pm 0.5
I	97.0 \pm 0.5	99.1 \pm 0.3	94.6 \pm 0.4	97.6 \pm 0.7

S – surface labelling, I – intrinsic labelling

Some data about HAp radiolabelling were already published by other scientists. Spherical hydroxyapatite with diameter 900-1000 μm (10 mg or 19 spherical granules) were incubated 24 hours

with ^{223}Ra . The radiolabelling yield was approximately 80 % [26]. Another paper focused on hydroxyapatite was the one by Albernaz et al. [4]. Hydroxyapatite powder ($< 210 \mu\text{m}$) was radiolabelled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (approx. 3.7 MBq). Particles were incubated for 10 minutes and the average radiolabelling yield was 98.5 % [4]. These literature results are in good agreement with obtained experimental data.

Nowadays, there was no literature found dealing with ^{223}Ra radiolabelling of titanium dioxide. Presented results of $n\text{TiO}_2$ radiolabelling yields were slightly higher than $n\text{HAp}$ yields and strategy of intrinsic labelling has shown the same or even better yields than surface radiolabelling. However, the difference was statistically undetectable. It is important to note that all the results correspond with earlier published data from sorption and kinetic studies [38,39].

Both strategies were found to be suitable for nuclear medicine. On the one hand, the surface radiolabelling is preferable for often prepared radiopharmaceutical doses. Standardised kits with ready-made NPs of defined size can be prepared with required sterile and apyrogenic properties easily. The kit type radiopharmaceuticals are nowadays often used in nuclear medicine departments and could be stored and used in laboratory conditions. On the other hand, the intrinsic labelling is suitable for quick method, where both nanoparticle preparation and radiolabelling procedures are in one step. This method could be useful for a variety of modifications of radiolabelled nanoparticles, which cannot be provided before radiolabelling.

3.2. *In vitro* stability studies of radiolabelled nanomaterials

In vitro experiments were designed as pseudo-open system, where used liquid was replaced in defined periods under free air conditions. All samples were shaken during incubation period.

Both radiolabelled nanomaterials were studied *in vitro* in the following solutions: physiological saline, bovine blood plasma and bovine blood serum, 1 % and 5 % human albumin solution. The percentage of released activity, %A, was performed according to Equation (2):

$$\%A = \frac{A_{sup}}{A_{sup} + A_{NPs}} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

where A_{sup} is activity of supernatant and A_{NPs} is activity of labelled separated nanoparticles.

Physiological saline is the most frequently used solution in medicine, therefore it was chosen as a standard and comparative sample. The final radiopharmaceutical should be applied intravenously. For this reason, it is necessary to study labelled nanoparticles behaviour in plasma and serum. The plasma composition consists mostly of water and proteins as albumins, globulins and fibrinogen, then ions, saccharides etc. The difference between blood plasma and serum is the presence of fibrinogen and clotting factors in plasma [42]. Commercially available plasma also contains sodium citrate as a stabilizing agent. The blood proteins serve as transporters of various compounds, therefore, two different solutions of albumin were used for examination.

Hydroxyapatite nanoparticles in figures are given always as (a) and (b) and $n\text{TiO}_2$ as (c) and (d). The first radiolabelling strategy, the surface labelling (S), is shown as (a) and (c) and the second one strategy, the intrinsic labelling (I), as (b) and (d). Error bars were not included in *in vitro* stability figures due to better clarity and ranged under 0.5 %.

Short-term *in vitro* stability study of ^{223}Ra radiolabelled nanoparticles are shown in Figure 1. At first sight, the difference between the two studied nanomaterials could have been seen. In the case of $n\text{HAp}$, the total released activity was around 60 % in saline and bovine blood plasma after 59 hours from radiolabelling. The released activities in saline were unexpectedly high. However, it can be possibly explained by lower stability of $n\text{HAp}$ and its dissolution at lower pH or by the influence of relatively high concentration of the sodium ions (0.9 % sodium chloride solution).

Despite this fact, short term stability experiments in saline showed that labelled nanoparticles could be temporarily stored in saline before the injection. Plasma experiments showed high released activities in comparison with serum results, which can be caused by proteins or sodium citrate interference. To eliminate the sodium citrate influence stability studies with 1 % solution were performed, but they did not show such a massive effect. It is important to notice that the concentration of sodium citrate in plasma was unknown and was not provided in datasheet by

manufacturer, so the influence of such a well-known complexation agent cannot be excluded. Short-term stability of ^{223}Ra -*n*HAp in serum had a very promising performance.

The released activity from ^{223}Ra -*n*TiO₂ was lower than 6 % for surface radiolabelling and lower than 2.5 % for radionuclide incorporation. In opposite to *n*HAp, the lowest released activity was in saline and then in bovine blood serum for both radiolabelling strategies. The released activity in the rest of biological matrices was slightly higher but the differences are so slight that there is a bigger role of statistical mistakes. It could be also noticed that in the case of surface labelling, the worst results were again in plasma. Another difference compared to *n*HAp is the slight contrast between radiolabelling types. In the case of intrinsic labelling, the activity releasing is slightly lower than in the surface labelling.

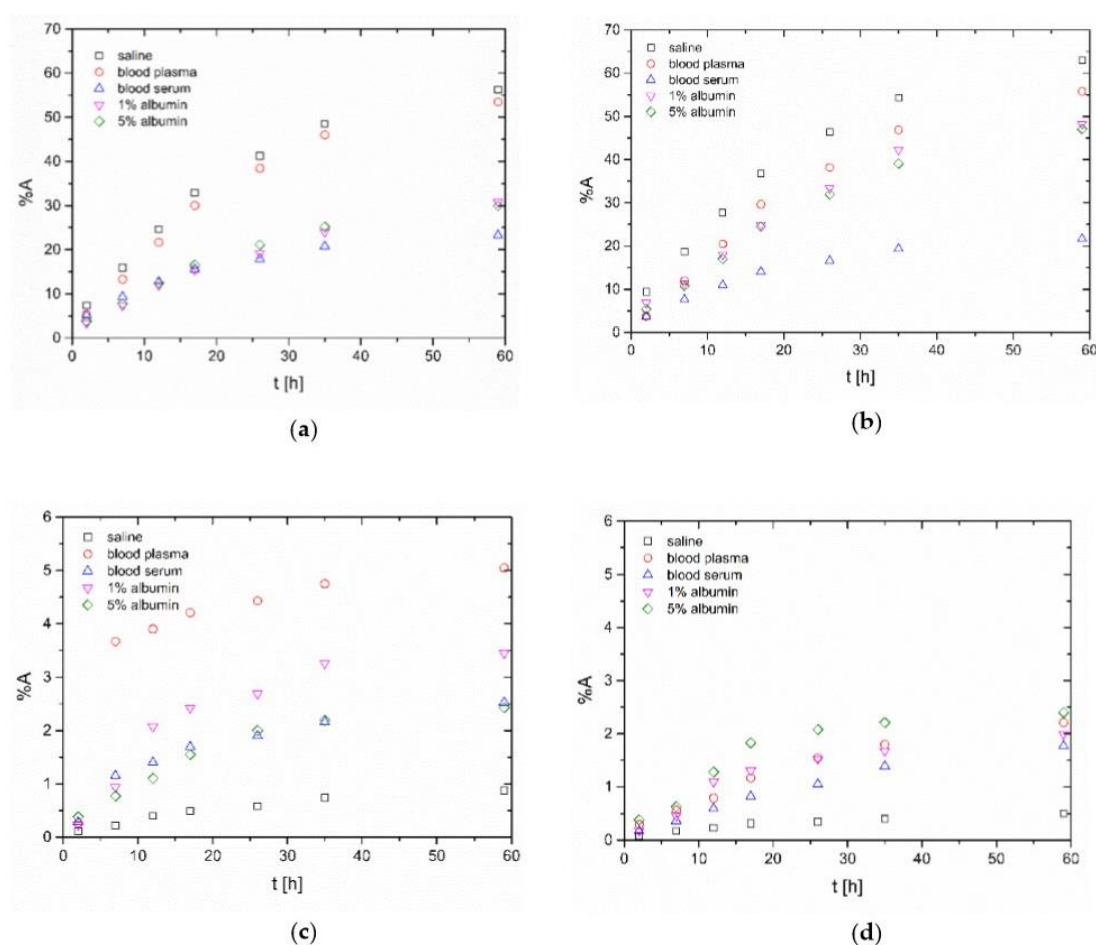


Figure 1. Short-term *in vitro* stability study of ^{223}Ra -labelled nanoparticles (a) surface radiolabelling of *n*HAp; (b) intrinsic radiolabelling of *n*HAp; (c) surface radiolabelling of *n*TiO₂; (d) intrinsic radiolabelling of *n*TiO₂.

Total released activities in long-term *in vitro* studies (Figure 2) were similar to short-term studies, which can be explained by distribution coefficients and rather fast kinetics, where the equilibrium was reached before matrix replacement. Comparing the short-term and the long-term studies it could be seen that the ion-exchange and the resorption of radionuclides back on the nanoparticle surfaces play an important role. This effect could improve *in vivo* radionuclides release in the case of NPs depo accumulation, where the radionuclides retain in the tissue.

Despite similar values of released activity (from 10 to 50 %), ^{223}Ra -*n*HAp showed better stability in saline in the long-term study than short-term. The highest effect on activity release probably had

albumin solution, which showed similar results for all 4 series of stability studies with ^{223}Ra -*n*HAp. Considering serum experiments with total released activity about 10 %, it can be concluded, that serum does not have such a negative impact on radiolabelled material, therefore *n*HAp still can be taken as a suitable material, however, it requires further study with other radionuclides, modified labelling strategy or carrier modifications. In the case of ^{223}Ra -*n*HAp long-term *in vitro* stability studies copy the short-term ones (Figure 2).

Released activities from *n*TiO₂ were lower than 3 %, which may be caused by radionuclide resorption during the longer studied interval. The lowest value was in the reference saline solution as in the previous case. Again, the differences among each matrix for ^{223}Ra -*n*TiO₂ were negligible, so it is not possible to define reliably in which matrix activity releasing was higher. Also, in the case of *n*TiO₂ effect of lower activity releasing for intrinsic labelling was observable.

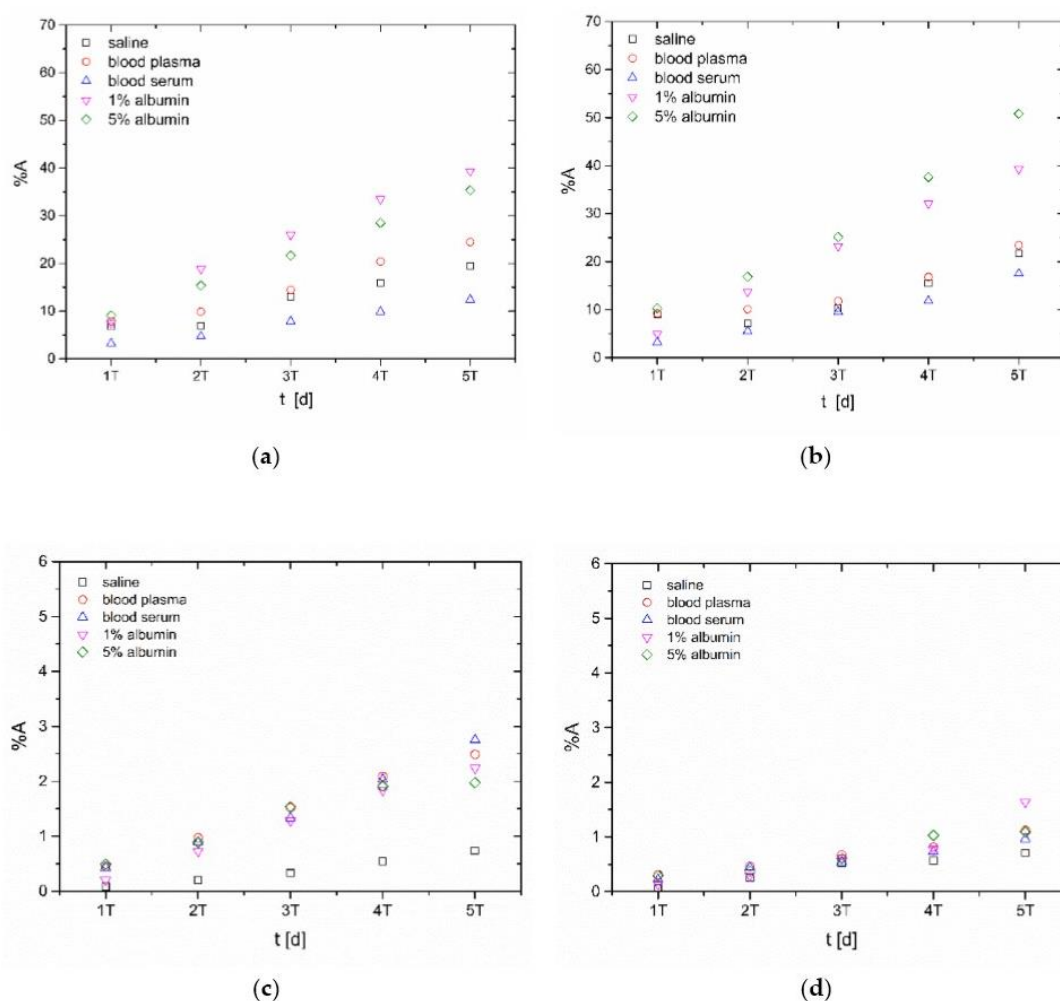


Figure 2. Long-term *in vitro* stability of ^{223}Ra -labelled nanoparticles over approx. ^{223}Ra half-life ($T = 11$ d) (a) surface radiolabelling of *n*HAp; (b) intrinsic radiolabelling of *n*HAp; (c) surface radiolabelling of *n*TiO₂; (d) intrinsic radiolabelling of *n*TiO₂.

To support the theranostic idea of inorganic nanoparticles as carriers, short-term *in vitro* stability study of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiolabelled nanoparticles was performed and the results are summarized in Figure 3. Long-term studies of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NPs were not possible due to its half-life. The behaviour of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labelled

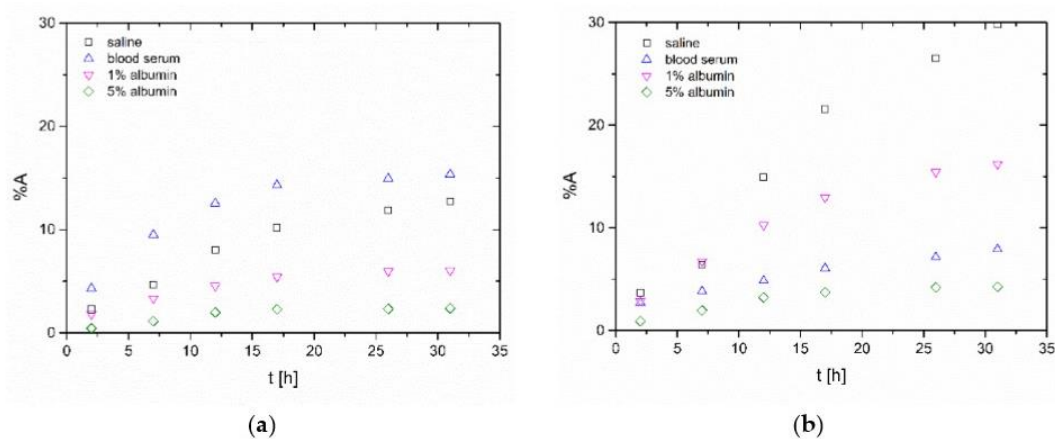
nanoparticles was different from ^{223}Ra labelled ones. On the contrary, the released activities of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ were lower in the case of *n*HAp and higher for *n*TiO₂ than in the case of ^{223}Ra .

In the case of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -*n*HAp, the released activities were under 20 % for both radiolabelling strategies in 31 hours. However, there was high released activity in blood plasma, which was around 60 %, which could be caused by sodium citrate as a preservative agent or plasma itself. During $^{99\text{m}}\text{Tc}$ experiments different batches of blood plasma from the same manufacturer were used and surprisingly, they have shown very different results. For better visualisation of obtained results, plasma data were not included in Figure 3 in the case of *n*HAp due to fast and high activity releasing, where it was higher than 50 % after only 10 hours from labelling. The lowest released activities were found in 5 % albumin solution for both type of radiolabelling. It is also the enormous difference against the ^{223}Ra -*n*HAp. This difference between *in vitro* stability studies of both studied radionuclides may be caused especially by their dissimilarity, which is e.g. valence, reactivity and other properties originating from type of metal, where the radium is alkaline earth metal and technetium is transition metal.

The stability of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HAp was also published in literature by Albernaz et al. [4]. However, the stability experiments were performed only in reaction solution (stannous chloride solution) in 24 hours. The average overall released activity was 6 %. This is in good agreement with obtained experimental results from short-term stability studies of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -*n*HAp.

The highest released activities from *n*TiO₂ were around 15 % in 5 % albumin solution in the case of surface radiolabelling and it was even around 25 % in bovine blood plasma in the case of intrinsic labelling. In all samples with titania, the lowest released activities were in physiological saline.

These results also showed that the sorption and kinetic experiments with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ on *n*HAp and *n*TiO₂ are necessary. They could bring the answers about mechanism of technetium uptake and identify the rate-controlling sorption process as it could have an influence on *in vitro* stability of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NPs. In the case of ^{223}Ra , these experiments were already performed (see previously publications) and it was found, that ion exchange mechanism plays the main role in sorption on *n*HAp and *n*TiO₂.



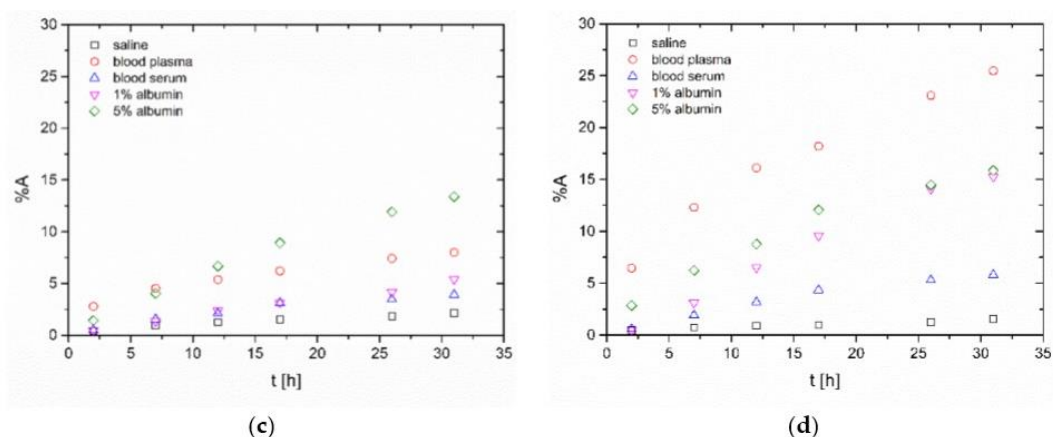


Figure 3. Short-term *in vitro* stability study of ^{99m}Tc -labelled nanoparticles (a) surface radiolabelling of *n*HAp (except plasma results); (b) intrinsic radiolabelling of *n*HAp (except plasma results); (c) surface radiolabelling of *n*TiO₂; (d) intrinsic radiolabelling of *n*TiO₂.

In general, it is possible to conclude that overall released activities were lower for ^{223}Ra -*n*TiO₂, than for any other studied material. The best performance was shown by *n*TiO₂ with ^{223}Ra , however, overall released activities from ^{99m}Tc radiolabelled nanoparticles were similar for both types of materials and radiolabelling strategies. Although released activities from ^{223}Ra -*n*HAp were relatively high, it is still a promising carrier according to serum stability results. Previously published results [15,38,39] showed that both materials are suitable as carriers and both radiolabelling strategies showed high radiolabelling yields for inorganic nanomaterials.

The nanocarriers preparation and radiolabelling is the first step on the long way of new radiopharmaceutical development. Consequently, it could be necessary to upgrade the carrier: prepare a core-shell particles or modify the surface with required substances. The first mentioned step should stabilize the nanoparticle, also could prevent the radionuclide from escape or be useful for better biodistribution. For this purpose, e.g. polyethylene glycol could be used [6]. This concept could be also useful for *n*HAp modification to improve the behaviour of the radiolabelled nanoparticles in biologically relevant media. The second mentioned step is the surface modification for active targeting into cells. These modifications are necessary to study as a part of following research of both nanomaterials as promising radionuclide carriers.

5. Conclusions

Two nanomaterials labelled with two radionuclides by two methods were studied. Nanosized HAp and TiO₂ were labelled with ^{99m}Tc or ^{223}Ra using two labelling strategies, which was labelling of ready-made particles (surface labelling) and radionuclides incorporation into the structure of the nanomaterial (intrinsic labelling). Both methods of radiolabelling showed high labelling yields (> 94 % for both nanoparticle types and both radionuclides). Consequently, the *in vitro* stability studies of radiolabelled nanoparticles were performed in biologically relevant media: physiological saline, bovine blood plasma and serum and 1 % and 5 % human albumin solutions. The most stable in all media were ^{223}Ra radiolabelled *n*TiO₂, where overall released activities in short-term stability experiments were under 6 % in 59 hours. Also, good results were shown by both ^{99m}Tc radiolabelled nanoparticles, where overall released activities were under 20 % in short-term aspect. In general, the worst stability showed by all materials were in plasma. In the long-term perspective both type of NPs showed positive results, in some cases even better than in the case of short-term perspective. It may be caused by resorption of radionuclides due to longer studied periods.

Both labelling strategies can find their application in practice. Despite, the several high released activities, overall activity releasing in all experiments were stable and both nanomaterials are still promising radionuclide carriers and e.g. surface modification could improve the stability of radiolabelled nanomaterials. Based on the obtained results, it could be concluded that *n*HAp is more

appropriate for local application and controlled activity releasing and $n\text{TiO}_2$ is suitable for system application due to its good long-term stability.

Author Contributions: Conceptualization, P.S. and J.K.; methodology, P.S., E.N., P.N. and M.V.; validation, P.S. and E.K.; formal analysis, E.K. and M.S.; investigation, E.N., P.N., P.S., E.K. and M.V.; resources, M.V.; data curation, P.S., E.K. and M.S.; writing—original draft preparation, P.S.; writing—review and editing, E.K.; visualization, E.K. and J.K.; supervision, J.K.; project administration, J.K. and M.V.; funding acquisition, P.S., M.V. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, grant number SGS19/194/OHK4/3T/14, TECHNOLOGY AGENCY OF THE CZECH REPUBLIC, grant number TA03010027, the EU and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant number CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000464, the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant number 8J20PL016.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem.* 2019, 12, 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
2. Mirshojaei, S.F.; Ahmadi, A.; Morales-Avila, E.; Ortiz-Reynoso, M.; Reyes-Perez, H. Radiolabelled nanoparticles: novel classification of radiopharmaceuticals for molecular imaging of cancer. *J Drug Target.* 2015, 24, 91–101. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1048516>
3. Murthy SK Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine.* 2007, 2, 129–141.
4. Albernaz, M.S.; Ospina, C.A.; Rossi, A.M.; Santos-Oliveira, R. Radiolabelled nanohydroxyapatite with ^{99m}Tc : perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2014, 42, 88–91. <https://doi.org/10.3109/21691401.2013.785954>
5. Reissig, F.; Hübner, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, H.-J.; Mamat, C. Facile preparation of radium-doped, functionalized nanoparticles as carriers for targeted alpha therapy. *Inorg. Chem. Front.* 2019, 6, 1341–1349. <https://doi.org/10.1039/C9QI00208A>
6. Kučka, J.; Hrubý, M.; Konák, C.; Kozempel, J.; Lebeda, O. Astatination of nanoparticles containing silver as possible carriers of ^{211}At . *Appl Radiat Isot.* 2006, 64, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2005.07.021>
7. Rojas, J.V.; Woodward, J.D.; Chen, N.; Rondinone, A.J.; Castano, C.H.; Mirzadeh, S. Synthesis and characterization of lanthanum phosphate nanoparticles as carriers for ^{223}Ra and ^{225}Ra for targeted alpha therapy. *Nucl Med Biol.* 2015, 42, 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.03.007>
8. Cedrowska, E.; Pruszyński, M.; Majkowska-Pilip, A.; Męczyńska-Wielgosz, S.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Bilewicz, A. Functionalized TiO_2 nanoparticles labelled with ^{225}Ac for targeted alpha radionuclide therapy. *J Nanopart Res.* 2018, 20, 83. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4181-y>
9. Mokhodoeva, O.; Vlk, M.; Málková, E.; Kukleva, E.; Mičolová, P.; Štamberg, K.; Šlouf, M.; Dzhenloda, R.; Kozempel, J. Study of ^{223}Ra uptake mechanism by Fe_3O_4 nanoparticles: Towards new prospective theranostic SPIONs. *J. Nanopart. Res.* 2016, 18, 301. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3615-7>
10. Kozempel, J.; Vlk, M. Nanoconstructs in Targeted Alpha-Therapy. *Recent Patents on Nanomedicine.* 2014, 4, 71–76. <https://doi.org/10.2174/1877912305666150102000549>
11. LeGeros, R.Z.; Ito, A.; Ishikawa, K.; Sakae, T.; LeGeros, J.P. *Advanced Biomaterials*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
12. Rivera-Muñoz, E.M. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTechOpen, 2009, 75–98. <https://doi.org/10.5772/19123>
13. Teixeira, C.M.A.; Piccirillo, C.; Tobaldi, D.M.; Pullar, R.C.; Labrincha, J.A.; Ferreira, M.O.; Castro, P.M.L.; Pintado, M.M.E. Effect of preparation and processing conditions on UV absorbing properties of hydroxyapatite- Fe_2O_3 sunscreen. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017, 71, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.065>
14. Stojanović, Z.S.; Ignjatović, N.; Wu, V.; Žunić, V.; Veselinović, L.; Škapin, S.; Miljković, M.; Uskoković, V.; Uskoković, D. Hydrothermally processed 1D hydroxyapatite: Mechanism of formation and

- biocompatibility studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016, 68, 746-757. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.047>
15. Kukleva, E.; Suchánková, P.; Štamberg, K.; Vlk, M.; Šlouf, M.; Kozempel, J. Surface protolytic property characterization of hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *RSC Adv.* 2019, 9, 21989-21995. <https://doi.org/10.1039/c9ra03698a>
 16. Salvador, A.; Pascual-Martí, M.C.; Adell, J.R.; Requeni, A.; March, J.G. Analytical methodologies for atomic spectrometric determination of metallic oxides in UV sunscreen creams. *J Pharm Biomed Anal.* 2000, 22, 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00286-1)
 17. Kreyling, W.G.; Holzwarth, U.; Haberl, N.; Kozempel, J.; Hirn, S.; Wenk, A.; Schleh, C.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1. *Nanotoxicology* 2017, 11, 434-442. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306892>
 18. Kreyling, W.G.; Holzwarth, U.; Schleh, C.; Kozempel, J.; Wenk, A.; Haberl, N.; Hirn, S.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats: Part 2. *Nanotoxicology* 2017, 11, 443-453. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306893>
 19. Kreyling, W.G.; Holzwarth, U.; Haberl, N.; Kozempel, J.; Wenk, A.; Hirn, S.; Schleh, C.; Schäffler, M.; Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3. *Nanotoxicology* 2017, 11, 454-464. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306894>
 20. Toxicology Data Network, U.S. National Library of Medicine. Available online: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/index.html> (accessed 13th November 2019)
 21. SPC GalliaPharm (2014) Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH. Summary of product characteristic: GalliaPharm – radionuclide generator. Available online: http://mri.medagencies.org/download/DK_H_2294_001_FinalPI.pdf. (accessed 17th January 2019)
 22. Sandhöfer, B.; Meckel, M.; Delgado-López, J.M.; Patricio, T.; Tampieri, A.; Rösch, F.; Iafisco, M. Synthesis and preliminary in vivo evaluation of well-dispersed biomimetic nanocrystalline apatites labeled with positron emission tomographic imaging agents. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015, 7, 10623-10633. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02624>
 23. Das, T.; Banerjee, S. Theranostic Applications of Lutetium-177 in Radionuclide Therapy. *Curr Radiopharm.* 2016, 9, 94-101. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150313114644>
 24. Chakraborty, S.; Vimalnath, K.V.; Rajeswari, A.; Shinto, A.; Sarma, H.D.; Kamaleshwaran, K.; Thirumalaisamy, P.; Dash, A. Preparation, evaluation, and first clinical use of ¹⁷⁷Lu-labeled hydroxyapatite (HA) particles in the treatment of rheumatoid arthritis: utility of cold kits for convenient dose formulation at hospital radiopharmacy. *J Labelled Compd Rad.* 2014, 57, 453-462. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3202>
 25. Kozempel, J.; Vlk, M.; Málková, E.; Bajžlková, A.; Bárta, J.; Santos-Oliveira, R.; Malta Rossi, A. Prospective carriers of ²²³Ra for targeted alpha particle therapy. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2015, 304, 443-447. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3615-y>
 26. Severin, A.V.; Vasilieva, A.N.; Gopina, A.V.; Vlasova, I.E.; Chernykha, E.V. Dynamics of Sorption-Desorption of ²²³Ra Therapeutic α -Emitter on Granulated Hydroxyapatite. *Radiochemistry.* 2019, 61, 339-346. <https://doi.org/10.1134/S1066362219030093>
 27. Orlova, M.A.; Nikolaev, A.L.; Trofimova, T.P.; Orlov, A.P.; Severin, A.V.; Kalmykov, S.N. Hydroxyapatite and porphyrin-fullerene nanoparticles for diagnostic and therapeutic delivery of paramagnetic ions and radionuclides. *Bulletin of RSMU.* 2008, 6, 86-93. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.075>
 28. Torres Berdeguez, M.B.; Thomas, S.; Medeiros, S.; de Sá, L.V.; Mas Milian, F.; da Silva, A.X. Dosimetry in Radiosynoviorthesis: ⁹⁰Y vs. ¹⁵³Sm. *Health Physics Society.* 2017, 1. <https://doi.org/10.1097/hp.0000000000000730>
 29. Chakraborty, S.; Das, T.; Chirayil, V.; Lohar, S.P.; Sarma, H.D. Erbium-169 labeled hydroxyapatite particulates for use in radiation synovectomy of digital joints – a preliminary investigation. *Radiochim Acta* 2014, 102, 443-450. <https://doi.org/10.1515/ract-2013-2166>
 30. Rigali, M.J.; Brady, P.V.; Moore, R.C. Radionuclide removal by apatite. *American Mineralogist* 2016, 101, 2611-2619. <https://doi.org/10.2138/am-2016-5769>
 31. Abbas, K.; Cydzik, I.; Del Torchio, R.; Farina, M.; Forti, E.; Gibson, N.; Holzwarth, U.; Simonelli, F.; Kreyling, W. Radiolabelling of TiO₂ nanoparticles for radiotracer studies. *J. Nanopart. Res.* 2010, 12, 2435-2443. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9806-8>

32. Pérez-Campaña, C.; Sansaloni, F.; Gómez-Vallejo, V.; Baz, Z.; Martín, A.; Moya, S.E.; Lagares, J.I.; Ziolo, R.F.; Llop, J. Production of ^{18}F -Labeled Titanium Dioxide Nanoparticles by Proton Irradiation for Biodistribution and Biological Fate Studies in Rats. *Part. Part. Syst. Charact.* 2014, 31, 134–142. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300302>
33. Duan, D.; Liu, H.; Xu, Y.; Han, Y.; Xu, M.; Zhang, Z.; Liu, Z. Activating TiO_2 Nanoparticle: Gallium-68 Serves As a High-Yielded Photon Emitter for Cerenkov Induced Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018, 10, 5278–5286. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17902>
34. Hildebrand, H.; Schymura, S.; Holzwarth, U.; Gibson, N.; Dalmiglio, M.; Franke, K. Strategies for radiolabelling of commercial TiO_2 nanopowder as a tool for sensitive nanoparticle detection in complex matrices. *J Nanopart Res.* 2015, 17, 278. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3080-8>
35. Cedrowska, E.; Łyczko, M.; Piotrowska, A.; Bilewicz, A.; Stolarz, A.; Trzcińska, A.; Szkliniarz, K.; Wąs, B. Silver impregnated nanoparticles of titanium dioxide as carriers for ^{211}At . *Radiochim. Acta* 2016, 104, 267–275. <https://doi.org/10.1515/ract-2014-2373>
36. Comarmond, M.J.; Payne, T.E.; Harrison, J.J.; Thiruvoth, S.; Wong, H.K.; Aughterson, R.D.; Lumpkin, G.R.; Müller, K.; Foerstendorf, H. Uranium Sorption on Various Forms of Titanium Dioxide Influence of Surface Area, Surface Charge, and Impurities. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45, 5536–5542. <https://doi.org/10.1021/es201046x>
37. Tits, J.; Walther, C.; Stumpf, T.; Macé, N.; Wielanda, E. A luminescence line-narrowing spectroscopic study of the uranium(VI) interaction with cementitious materials and titanium dioxide. *Dalton Trans.* 2015, 44, 966–976. <https://doi.org/10.1039/c4dt02172j>
38. Suchánková, P.; Kukleva, E.; Štamberg, K.; Nykl, P.; Vlk, M.; Kozempel, J. Study of ^{223}Ra uptake mechanism on hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles as a function of pH. *RSC Adv.* 2020, 10, 3659–3666. <https://doi.org/10.1039/c9ra08953e>
39. Suchánková, P.; Kukleva, E.; Štamberg, K.; Nykl, P.; Sakmár, M.; Vlk, M.; Kozempel, J. Determination, Modeling and Evaluation of Kinetics of ^{223}Ra Sorption on Hydroxyapatite and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Materials* 2020, 13, 1915. <https://doi.org/10.3390/ma13081915>
40. SPC Xofigo (2013) Summary of product characteristic: Xofigo. European Medicines Agency. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofigo>. (accessed 20th November 2019).
41. Guseva, L.I.; Tikhomirova, G.S.; Dogadkin, N.N. Anion-Exchange Separation of Radium from Alkaline-Earth Metals and Actinides in Aqueous-Methanol Solutions of HNO_3 . ^{227}Ac - ^{223}Ra Generator. *Radiochemistry* 2004, 46, 58–62. <https://doi.org/10.1023/B:RACH.0000024637.39523.e4>
42. Benjamin, R.J.; McLaughlin, L.S. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion* 2012, 52, 9S–19S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x>



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).