



**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů**

**Evaluace nových analog cholinu jako
potenciálních radiodiagnostik karcinomu
prostaty**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Barbora Planičková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Barbora Planičková
Název práce	Evaluace nových analog cholinu jako potenciálních radiodiagnostik karcinomu prostaty
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Cholin je fyziologický substrát pro syntézu hlavního membránového fosfolipidu lecitinu. Nádorové buňky mají zvýšený příjem cholinu, jako důsledek jejich vysoké proliferace. Díky tomuto jevu se v diagnostice karcinomu prostaty používá ^{18}F-fluorcholin, který slouží jako radiofarmakum pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Cílem této práce je preklinické testování nových analog cholinu značených jodem jako potenciálních radiodiagnostik karcinomu prostaty, použitelných pro SPECT/PET/CT zobrazování. Na základě <i>in vitro</i> (IC₅₀) a <i>ex vivo</i> (biodistribuce) výsledků srovnatelných s ^{18}F-FCH, byl jako nejlepší kandidát pro <i>in vivo</i> zobrazování na myším modelu SCID zvolen analog cholinu ^{123}I-PS229. Při zobrazování se potvrdila velmi slabá detekce nádorů u myší při použití radiofarmaka ^{18}F-FCH (nádor LNCaP a PC-3) i při použití ^{123}I-PS229 (nádor U-87 MG). Úspěšná vizualizace nádoru (nádor LNCaP) pomocí <i>in vivo</i> zobrazování se však podařila při použití radiofarmaka ^{68}Ga-PSMA-11, které je v současnosti nejlepší volbou v diagnostice/terapii pokročilého stádia karcinomu prostaty.</p>
Klíčová slova	analog cholinu, cholin, karcinom prostaty, PET, SPECT, CT, diagnostika, preklinické hodnocení
Počet stran	75
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Barbora Planičková
Title of thesis	Evaluation of novel cholin analogs as potential radiotracers for prostate cancer
Type of thesis	Master
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>Cholin is a physiological substrate for the synthesis of major membrane phospholipid lecithin. As a result of increased proliferation, tumor cells have increased choline uptake. Because of this phenomenon ^{18}F-fluorocholine is used in the diagnosis of prostate cancer as a radiotracer for positron emission tomography (PET). The aim of this thesis is preclinical testing of novel iodine-labeled choline analogues as potential prostate cancer radiodiagnostics, usable for PET/SPECT/CT imaging. Based on the <i>in vitro</i> (IC50) and <i>ex vivo</i> (biodistribuce) results comparable to ^{18}F-FCH, the choline analog ^{123}I-PS229 was chosen as the best candidate for <i>in vivo</i> imaging in the SCID mouse model. Imaging showed very low tumor detection in mice using radiopharmaceutical ^{18}F-FCH (tumor LNCaP and PC-3) and also ^{123}I-PS229 (tumor U-87 MG). Only successful tumor <i>in vivo</i> imaging (LNCaP) was accomplished by using the ^{68}Ga-PSMA-11, which is currently the best choice in the diagnosis/therapy of advanced prostate cancer.</p>
Keywords	choline derivatives, prostate cancer, PET, SPECT, CT, radiotracer, preclinical evaluation
Number of pages	75
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování:

Děkuji především PharmDr. Zbyňkovi Novému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Dále děkuji Ing. Pavlovi Švecovi za poskytnutí analog cholinu značených jodem a Klinice nukleární medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci za poskytnutí ^{18}F -fluorcholinu. V neposlední řadě děkuji své mamce za její všestrannou podporu během mého studia.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. KARCINOM PROSTATY	11
2.1.1. <i>Epidemiologie</i>	11
2.1.2. <i>Etiopatogeneze</i>	11
2.1.3. <i>Diagnostika</i>	12
2.1.4. <i>Terapie</i>	14
2.1.5. <i>Prognóza</i>	15
2.2. ZOBRAZOVACÍ METODY NUKLEÁRNÍ MEDICÍNY	15
2.2.1. <i>PET/CT</i>	16
2.2.2. <i>SPECT/CT</i>	18
2.2.3. <i>μPET/SPECT/CT</i>	20
2.3. PREKLINICKÉ MODELY KARCINOMU PROSTATY	21
2.3.1. <i>In vitro modely</i>	22
2.3.2. <i>In vivo modely</i>	23
2.4. RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÁ ANALOGA CHOLINU V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY	27
2.4.1. <i>Vývoj analog cholinu</i>	27
2.4.2. <i>Mechanismus působení</i>	29
2.4.3. <i>Radioznačení léčiv</i>	30
2.5. DALŠÍ RADIOFARMAKA V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY	32
2.5.1. <i>¹⁸F-fluorid sodný</i>	32
2.5.2. <i>¹¹C-acetát</i>	32
2.5.3. <i>Anti-3-¹⁸F-FACBC</i>	33
2.5.4. <i>Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)</i>	34
2.6. RADIOAKTIVNÍ IZOTOPY JODU	36
2.6.1. <i>I-123</i>	36
2.6.2. <i>I-124</i>	37
2.6.3. <i>I-125</i>	37
2.6.4. <i>I-131</i>	37
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
3.1. MATERIÁL	39
3.1.1. <i>Laboratorní zvířata</i>	39
3.1.2. <i>Buněčné linie</i>	39
3.1.3. <i>Přístroje</i>	39
3.1.4. <i>Chemikálie</i>	40

3.2.	METODY	43
3.2.1.	<i>Kultivace a pasážování buněk</i>	43
3.2.2.	<i>Stanovení IC50 analog cholinu</i>	43
3.2.3.	<i>Radioaktivní značení ⁶⁸Ga-PSMA-11</i>	44
3.2.4.	<i>Testy in vitro stability ⁶⁸Ga-PSMA-11</i>	46
3.2.5.	<i>Akumulace ⁶⁸Ga-PSMA-11 in vitro</i>	47
3.2.6.	<i>Biodistribuce radiofarmak ex vivo</i>	48
3.2.7.	<i>Biodistribuce radiofarmak in vivo</i>	49
4.	VÝSLEDKY	51
4.1.	<i>IN VITRO STUDIE ⁶⁸Ga-PSMA-11</i>	51
4.1.1.	<i>Optimalizace značení</i>	51
4.1.2.	<i>Stabilita v různých prostředích</i>	52
4.1.3.	<i>Stanovení log P a vazby na plazmatické proteiny</i>	52
4.1.4.	<i>Akumulace v buněčných liniích</i>	52
4.2.	<i>IC50 ANALOG CHOLINU</i>	53
4.3.	<i>BIODISTRIBUCE EX VIVO</i>	54
4.3.1.	<i>Analoga cholinu značená jodem</i>	54
4.3.2.	<i>⁶⁸Ga-PSMA-11</i>	61
4.3.3.	<i>¹⁸F-FCH</i>	61
4.3.4.	<i>Poměr nádor/krev (% ID/g)</i>	62
4.4.	<i>BIODISTRIBUCE IN VIVO (PET/SPECT/CT)</i>	63
4.4.1.	<i>SPECT/CT zobrazování ¹²³I-PS152 a ¹²³I-PS229 (nádor U-87 MG)</i>	63
4.4.2.	<i>PET zobrazování ⁶⁸Ga-PSMA-11 (nádor PC-3)</i>	64
4.4.3.	<i>PET/CT zobrazování ⁶⁸Ga-PSMA-11 (nádor LNCaP)</i>	64
4.4.4.	<i>PET zobrazování – kompetice ¹⁸F-FCH a PS229 (nádor PC-3)</i>	65
4.4.5.	<i>PET/CT zobrazování ¹⁸F-FCH (nádor LNCaP)</i>	65
4.4.6.	<i>PET zobrazování ¹⁸F-FCH (nenádorové) + kvantifikace</i>	66
5.	DISKUZE	67
6.	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71

SEZNAM ZKRATEK

AR	androgenový receptor
CHT	angl. high-affinity choline transporter, vysoce afinitní transportér cholinu
CPM	angl. counts per minute, počet ionizujících eventů za minutu
CT	angl. computed tomography, výpočetní tomografie
CTL	angl. choline transporter-like protein, protein podobný transportéru cholinu
DMSO	dimethylsulfoxid
DPM	angl. desintegrations per minute, počet rozpadů za minutu
FDA	angl. Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FDG	^{18}F -fluordeoxyglukosa
FEC	^{18}F -fluorethylencholin
FCH	^{18}F -fluormethylencholin
HPLC	angl. high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC50	angl. half maximal inhibitory concentration, maximální koncentrace, při které je inhibice 50 %
ID	angl. injected dose, podaná dávka
LC-MS	angl. liquid chromatography – mass spektrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MRI	angl. magnetic resonance imaging, zobrazování magnetickou rezonancí
OCT	angl. organic cation transporter, transportér organických kationtů
PBS	angl. phosphate buffered saline, fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PET	angl. positron emission tomography, pozitronová emisní tomografie
PI	angl. post injection, po injekci
PSA	angl. prostate-specific antigen, prostatický specifický antigen

PSMA	angl. prostate-specific membrane antigen, prostatický specifický membránový antigen
SCID	angl. severe combined immunodeficiency disease, těžká kombinovaná imunodeficiencie
SPECT	angl. single-photon emission computed tomography, jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SUV	angl. standardized uptake value, standardizovaná hodnota uptake
TBR	angl. target to background ratio, poměr signálu cíle ku signálu pozadí

1. ÚVOD

Karcinom prostaty je jednou z nejčastějších život ohrožujících malignit u mužů. Přestože se během posledních let díky lepší prevenci snížila míra výskytu karcinomu prostaty, stále neexistuje dostatečná strategie prevence a léčby, která by dokázala ovlivnit vysokou úmrtnost související s touto nemocí. Zatímco existují efektivní možnosti léčby pro karcinom, který se nerozšířil mimo prostatu, úspěch při léčbě metastatické formy onemocnění je malý, zejména pokud selže hormonální léčba. Čím dříve jsou však metastázy diagnostikovány, tím lepší je prognóza pacienta.

Jako slibná diagnostická zobrazovací metoda pro hodnocení karcinomu prostaty u pacientů s vysokým podezřením na metastatické onemocnění se ukázala být pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií (PET/CT) celého těla (založena na podání radiofarmaka pacientovi a zobrazování jeho distribuce v těle) za použití derivátů cholinu radioaktivně značených ^{11}C a ^{18}F . Tyto metody se úspěšně používají k určení stádia nemoci u pacientů s biochemickou recidivou.

Cholin je u savců esenciální živina, která má v těle důležité fyziologické funkce. Slouží jako substrát pro syntézu fosfatidylcholinu (lecitinu), který je stěžejní složkou buněčných membrán. Jeho akumulace v nádorových tkáních při nádorových onemocněních (zejména rakovina prostaty a gliomy) se stala klíčovou vlastností, použitelnou pro výzkum diagnostiky/terapeutiky karcinomu prostaty.

Na základě těchto poznatků byly v rámci experimentální části této práce testovány nové radioaktivně značené (izotopy jodu) deriváty cholinu, u kterých byl hodnocen potenciál pro diagnostiku karcinomu prostaty. Ideálním případem je akumulace radiofarmaka v nádorové tkáni a minimální akumulace v tkáních zdravých.

Cílem mé diplomové práce je na základě *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* experimentů posoudit potenciál radioaktivně značených látek pro diagnostiku karcinomu prostaty. Studovanými látkami jsou deriváty cholinu značené jodem, které jsou porovnávány s v praxi již používanými radiofarmaky ^{18}F -fluorcholinem a ^{68}Ga -PSMA-11. *In vitro* testování je zaměřeno na stanovení hodnot IC_{50} derivátů cholinu použitím kompetiční studie s ^3H -cholinem na buněčné linii PC-3 (lidský karcinom prostaty). Při *in vivo* a *ex vivo* studiích je hodnocena biodistribuce testovaných látek v těle laboratorních myší.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Karcinom prostaty

Jedná se u mužů o druhou (po karcinomu plic) nejčastější příčinu smrti na maligní nádorové onemocnění. Karcinom prostaty je z 95 % případů adenokarcinom, tedy vzniká ze žláзовého epitelu. Obvykle roste pomalu a zpočátku zasahuje jen prostatickou žlázu, kde nemusí způsobit vážnou škodu. Nicméně zatímco některé typy karcinomu prostaty rostou bez symptomů a téměř nepotřebují léčbu, další typy jsou agresivní a mohou se šířit rychle (Hughes et al. 2005). Metastázy se přednostně šíří do blízkých lymfatických uzlin a kostí. Klinická manifestace pokročilého stádia je v podobě obtížného močení, retence moči, bolesti zad nebo hematurie (Daniyal et al. 2014).

2.1.1. Epidemiologie

Karcinom prostaty je rostoucí hrozbou v globální epidemiologii. Každoročně je diagnostikováno více než jeden milion případů a úmrtnost vzrostla na více než 300 000 úmrtí za rok (Cooperberg a Chan 2017). Zpravidla je diagnostikován mužům ve věku nad 50 let. Průměrný věk pacientů s tímto onemocněním je 72-74 let. Celosvětově je riziko karcinomu prostaty ve věku 85 let 0,5-20 %. Incidence se mění v závislosti na etnickém původu a zemi. Nejnižší výskyt této nemoci je obvykle v Asii, zejména v Číně (ve městě Tianjin 1,9 ze 100 000 mužů za rok). Nejvyšší incidence je v Severní Americe, zejména u Afroameričanů ve Spojených státech Amerických (137 ze 100 000 mužů za rok). Tyto rozdíly jsou ovlivněny kombinací faktorů, např. genetickou predispozicí, vnějšími rizikovými faktory, lidskou aktivitou ovlivnitelnými důvody jako registr onemocnění a kvalita zdravotní péče a další (Grönberg 2003).

2.1.2. Etiopatogeneze

Navzdory vysoké incidenci, etiologie karcinomu prostaty zůstává do značné míry neznámá. Zvyšující se věk, rasa a rodinná anamnéza jsou jedinými ustanovenými rizikovými faktory. Mnoho předpokládaných faktorů, včetně androgenů, stravování, fyzické aktivity, sexuálních faktorů, zánětu a obezity, je zkoumáno, ale jejich role v etiologii karcinomu prostaty zůstává nejasná. Odhaduje se, že až 42 % rizika karcinomu prostaty tvoří genetické vlivy (Hsing a Chokkalingam 2006).

Relativní riziko vývoje karcinomu prostaty je vyšší u mužů, kteří mají nemocného bratra či otce. Rodinná historie nemoci je zjevně důležitá, avšak v současné době pouze 35 % dědičného rizika je vysvětleno známými geny. Ačkoli je vzácná (1 ze 300), mutace BRCA2 poskytuje až 8,6krát zvýšené riziko u mužů mladších 65 let a také byla spojena s agresivní formou karcinomu prostaty. Další související vzácné mutace jsou v genech *BRCA1*, *HOXB13*, *NBS1* a *CHEK2*. Mutace *HOXB13* G84E je jediným dalším identifikovaným faktorem se zvýšeným relativním rizikem (3-4krát) a s frekvencí abnormální alely 1,3-1,4 % (Cuzick et al. 2014).

2.1.3. Diagnostika

Androgeny indukují produkci prostatického sekrečního glykoproteinu, prostatického specifického antigenu (PSA), jehož koncentrace v krevním séru se používá pro screening, určení stádia, monitorování odezvy na léčbu a detekci recidivy karcinomu prostaty. PSA byl poprvé identifikován Harou et al. v roce 1969. V klinické praxi se začal používat od počátku 80. let a stal se nejvýznamnějším nádorovým markerem karcinomu prostaty. PSA není specifický pro zhoubný karcinom, a jeho hodnoty tak mohou být zvýšené i díky jiným faktorům, např. benigní hyperplazii prostaty (Daniyal et al. 2014).

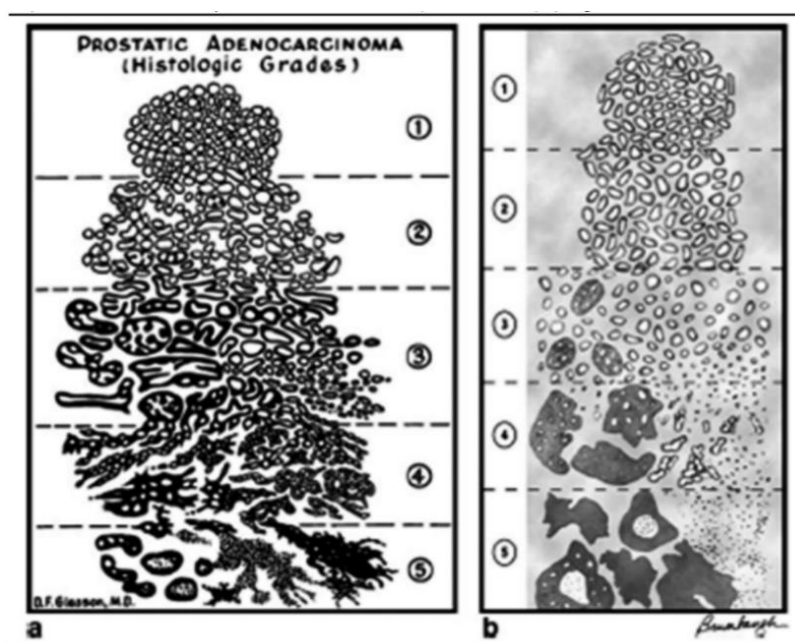
Další základní diagnostickou metodou je digitální rektální vyšetření. Při vyšetření per rectum jsme schopni vyšetřit jen asi 1/3 povrchu prostaty, přesto je toto vyšetření velmi důležité. Specificita digitálního rektálního vyšetření je asi 89-97 % a odhaduje se, že asi 50 % karcinomů prostaty diagnostikovaných touto metodou se již rozšířilo mimo prostatu. Elevace hladiny PSA nad 4 ng/ml a abnormální nález na prostatě (při vyšetření per rectum) bývají důvodem k histologickému vyšetření vzorků tkáně, získaných při biopsii prostaty, transuretrální resekci prostaty nebo transvezikální¹ prostatektomii (Kolombo et al. 2008).

Standardní biopsii prostaty představuje transrektální ultrazvukem vedená biopsie. Jedná se o invazivní metodu cíleného odběru vzorků prostaty za pomoci transrektální sonografie. Metoda je dobře dostupná, finančně i časově nenáročná, ale její senzitivita je relativně nízká. Až v 70 % není schopna identifikovat, a tedy ani zacílit ložisko karcinomu. Diagnostická nejistota pak vede k opakovaným biopsiím, a tím k zvýšení morbidity i finančních nákladů. Dle doporučení se bioptuje cíleně podezřelé ložisko nebo se odebírá minimálně 10 vzorků z celé prostaty. V současnosti je pro diagnostiku ložisek

¹ skrz močový měchýř

využívána nejčastěji multiparametrická magnetická rezonance. Poskytuje morfologické, molekulární a metabolické informace. Lépe definuje velikost, šíření i biologickou aktivitu a umožňuje odlišení od benigních lézí (Kudláčková et al. 2017).

Po potvrzení histologické diagnózy je pro určení dalšího postupu nezbytné stanovení klinického stádia onemocnění (staging) pomocí TNM¹ klasifikace a rizikosti stanovením histologického stupně malignity (grading). Určení T stádia je obtížné, a pomocí CT a MRI ne zcela spolehlivé. Určité naděje se vkládají do MRI spektroskopie, nevýhodou je však vysoká cena a relativní nedostupnost. K určení N stádia je nejspolehlivější pánevní lymfadenektomie a radioizotopové metody. M stádium se stanovuje pomocí zobrazovacích metod nukleární medicíny PET a SPECT, kterým se podrobněji věnují následující kapitoly. Metastazující onemocnění (PSA>20 ng/ml) je nutno doplnit scintigrafií skeletu (¹⁸F-fluorid sodný pro PET a ^{99m}Tc-hydroxydifosfonát pro SPECT), rentgenovým snímkem plic a CT vyšetřením. Stupeň malignity určuje Gleasonovo skóre, které se zakládá na pětistupňovém hodnocení uspořádání buněk karcinomu prostaty (viz Obr. 1.) – skóre je výsledkem součtu dvou nejčastěji se vyskytujících typů tkáňové architektury. Výsledkem je hodnota 2-10, kde hodnota nad 7 je již vysoce riziková (Balik a Brodak 2011).



Obr. 1. Schéma konvenčního (a) a modifikovaného (b) Gleasonova systému. V roce 2005 byl Gleasonův systém modifikován. K nejvýznamnějším změnám došlo v obraze 3 a 4. V modifikovaném systému jsou zahrnuty síťovité žlázy a abnormálně ohraničené žlázy v obraze 4 (Helpap a Egevad 2009).

¹ T – nádor, N – uzliny, M – metastázy

2.1.4. Terapie

Lékaři, kteří léčí pacienty s opakovanou zvýšenou hladinou PSA čelí složitému rozhodování. Zatímco se chtějí vyhnout zbytečnému přetížení (overtreatment) pacientů, jejichž onemocnění by nikdy neovlivnilo kvalitu jejich života, musí se snažit o zpoždění nástupu metastatického onemocnění a úmrtí.

Primární léčbu karcinomu prostaty představuje v dnešní době radikální prostatektomie, radiační terapie a terapie protonovým paprskem. Do strategie léčby dále patří chemoterapie, hormonální terapie, kryochirurgie a ultrazvuk s vysokou intenzitou v závislosti na klinických podmínkách a výsledcích. Výběr metody léčby závisí zejména na stádiu onemocnění, hladině PSA a Gleasonově skóre (Chen a Zhao 2013).

Radikální prostatektomie je chirurgický zákrok, při kterém se odstraňuje prostata se semennými vajíčky. Jedná se o standardní léčbu pro klinicky lokalizovaný karcinom prostaty. Provádí se otevřeně retropubicky nebo perineálně¹, laparoskopicky nebo za asistence robota. Souhrnná data naznačují, že chirurgické řešení má lepší vliv na přežití pacienta než radioterapie, ale znepokojující je chirurgická morbidita, erektilní dysfunkce a inkontinence (Dehn 2006).

Primární radioterapie pacientů s lokalizovaným onemocněním je zahájena u těch pacientů, kteří dávají přednost ozáření před chirurgickým zákrokem nebo je u nich operace kontraindikovaná. Dávka ozáření na cílovou tkáň by měla být nejvyšší rozumně dosažitelná, obvykle 70-82 Gy. Další možností je stereotaktická radioterapie (CyberKnife, X-nůž), která využívá aplikaci vysokých dávek záření ve více rovinách pomocí robotického ramene. V neposlední řadě u lokalizovaných stádií karcinomu prostaty má dobré výsledky brachyterapie, kdy jsou zdroje záření zaváděny přímo do prostaty (Balík a Broďák 2011).

Terapie protonovým paprskem je relativně nedostupná, nicméně má velký potenciál díky unikátním fyzikálním vlastnostem protonového záření. Tato metoda zvyšuje efekt dávky záření na cílovou tkáň a minimalizuje expozici záření pro necílové orgány (Gray a Efstathiou 2013).

Během posledních let se terapeutické strategie pro pacienty v pokročilém stádiu karcinomu prostaty značně rozvinuly. Bylo zavedeno a schváleno několik nových látek včetně sipuleucelu-T, radia-223, abirateronu, enzalutamidu a kabazitaxelu. Všechny prokázaly značné zlepšení celkového přežití pacientů (Komura et al. 2017).

¹ hrázový, perineum – svalnatá oblast mezi konečníkem a pohlavními orgány

2.1.5. Prognóza

Pacienti s lokalizovaným karcinomem prostaty mají po pěti letech od terapie šanci na přežití téměř 100 %, ale u pacientů s metastázami je prognóza mnohem horší, protože je tato forma stále nevléčitelná. Klinický přístup k těmto pacientům se stává komplexnější, protože se objevují stále nové terapeutické strategie (Pascale et al. 2017).

Nejlepšími markery progresu lokalizovaného karcinomu prostaty, zejména po radikální prostatektomii, jsou Gleasonovo skóre, rozsah karcinomu, hladina PSA, stádium nemoci a aneuploidie nádorových buněk. U pokročilého stádia může být pro predikci progresu použito Gleasonovo skóre, jaderná morfometrie (Buhmeida et al. 2006) a počet cirkulujících nádorových buněk (CTCs) v kostní dřeni nebo krvi. Existuje i široké spektrum molekulárních prognostických faktorů, nicméně zůstávají v klinické praxi poměrně nevyužity. Je to pravděpodobně způsobeno vysokou variabilitou a špatnou standardizací nástrojů detekce a analýzy. V současné době důležitou roli v pochopení biologických procesů karcinomu prostaty hraje onkogenomika a profilování genetické exprese (Martin et al. 2011). Nedávno výzkumníci z Kodaňské univerzity ve spolupráci s několika institucemi ve Švédsku objevili a validovali biomarker, tkáňový pro-neuropeptid Pro-NPY, který může být použit v prognóze progresu. Ukázal se být specifický pro karcinom prostaty a lze podle něj určit hranici mezi pomalu rostoucí a agresivní formou nemoci (Iglesias-Gato et al. 2016).

2.2. Zobrazovací metody nukleární medicíny

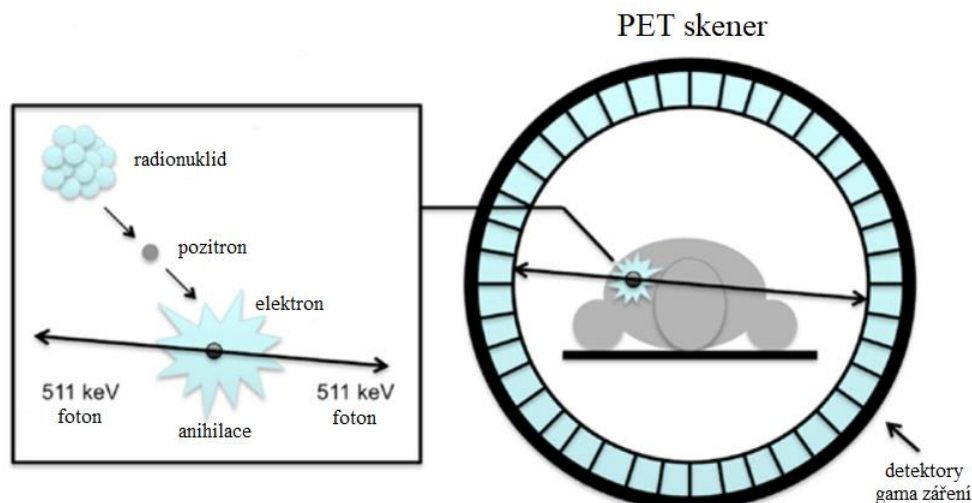
Rozvoj nukleárně medicínské zobrazovací techniky představují hybridní PET/CT a SPECT/CT přístroje. Souběžné provedení scintigrafického a radiodiagnostického vyšetření umožňuje nejlépe propojit funkční a metabolické zobrazení s anatomickou informací. Spojení obou obrazů poskytuje přesnější lokalizaci zjištěné abnormality a účinnější diagnostiku, určení stádia nemoci a monitorování. Dalším krokem v rozvoji multimodálního zobrazování je hybridní PET/MRI vyšetření, při kterém lze kombinovat dva druhy funkčního zobrazování s anatomickou informací. Aplikace těchto metod je velmi cenná i u preklinických studií, kde se používají ve zmenšeném tzv. mikro (μ) provedení.

Pro scintigrafické vyšetření (PET, SPECT), tj. zobrazování distribuce radiofarmaka v těle, se používá gamakamera, která je složena z detektorů a vyhodnocovacího počítače (Koranda et al. 2017).

2.2.1. PET/CT

Pozitronová emisní tomografie (PET) byla vynalezena v Mallinckrodtském Institutu Radiologie na Washingtonské Univerzitě v polovině sedmdesátých let a postupně se stala uznávanou metodou v nukleární medicíně, zejména důležitou v oboru onkologie. Na rozdíl od počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI), které ukazují anatomické detaily, PET zobrazuje biochemické nebo fyziologické jevy a dokáže rozlišit benigní od maligní léze a určit stádium nemoci. Jedná se o velmi nákladnou metodu, která vyžaduje přístroj - PET skener, speciální vybavení a vysoce školený personál pro přípravu PET radiofarmak (Griffeth 2005).

Pro PET zobrazování se používají radiofarmaka označená β^+ radioaktivními zářiči (např. izotopy ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O a ^{18}F – vyráběny v cyklotronu a ^{68}Ga a ^{82}Rb – získávány z generátoru radioizotopů), během jejichž přeměny dochází k emisi pozitronu. Jakmile je pozitron emitován, dochází ke srážce s blízkým elektronem v tkáni pacienta, což generuje dva fotony γ (každý s energií 511 keV), které se pohybují v opačných směrech. PET skenery jsou vybaveny koincidenční elektronikou, která detekuje tyto páry fotonů, když téměř současně narazí (event) na protilehlé strany soustavy detektorů, kterou tvoří řádově až desítky tisíc detektorů uspořádaných do prstenců obklopujících pacienta (viz Obr. 2.). Z dat získaných detekcí velkého počtu dvojic fotonů se pomocí počítače rekonstruuje trojrozměrný obraz distribuce radiofarmaka (Koranda et al. 2017).



Obr. 2. Schématické znázornění anihilační reakce a následné koincidenční detekce. Po srážce pozitronu (uvolněného z jádra radionuklidu) a elektronu (v tkáni pacienta) následuje jejich zánik (anihilace¹), během něhož se uvolní energie ve formě dvou fotonů s energií 511 keV, které jsou detekovány scintilačními detektory (Van Der Veldt et al. 2013).

Může nastat situace, kdy je jeden foton z páru fotonů absorbován v těle nebo není detekován, proto existuje řada algoritmů a technik ke korekci náhodných eventů, rozptylu, mrtvého času² a různé citlivosti detektorů. Jednou z výhod hybridních PET/CT systémů je to, že odpovídající CT snímky mohou být použity pro anatomickou lokalizaci i ke korekci útlumu, bez které PET i SPECT obraz nelze spolehlivě hodnotit (Farwell et al. 2014). Další výhody PET technologie jsou vysoká citlivost, prostorové rozlišení a možnost kvantifikovat uptake³.

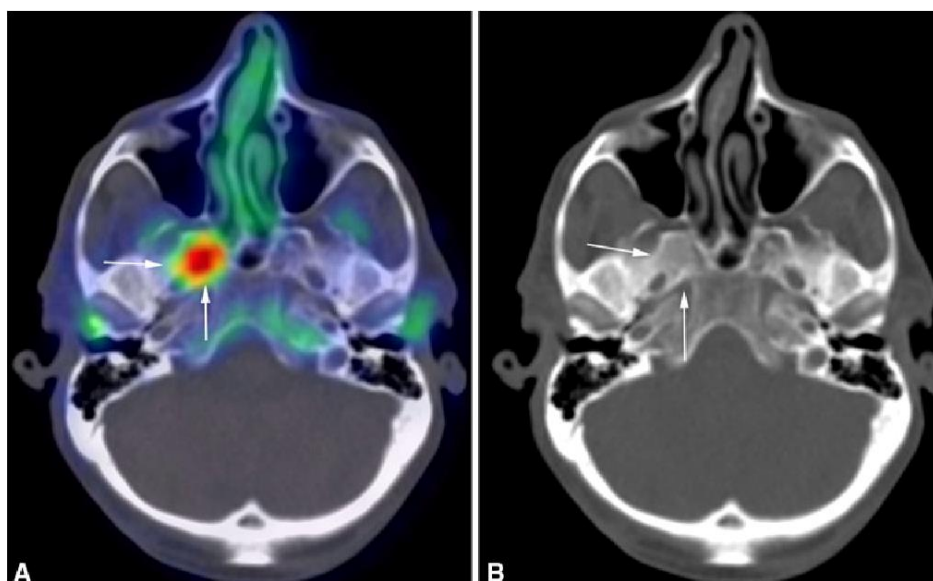
Nejčastěji používaným radiofarmakem pro PET je v onkologii ¹⁸F-fluorodeoxyglukosa (FDG). V detekci karcinomu prostaty jsou však výsledky ¹⁸F-FDG nedostačující, zejména kvůli nízkému metabolismu glukosy v buňkách karcinomu prostaty, tím pádem nižší expresi membránového transportního proteinu Glut-1 pro glukosu. Pro karcinom prostaty se používá nejčastěji radioaktivně značený ¹¹C-cholin (viz Obr. 3.) nebo ¹⁸F-fluorethylcholin a ¹⁸F-fluormethylcholin (¹⁸F-FCH) (Bouchelouche et al. 2011). Pro scintigrafii metastáz kostí je potom nejúčinnější ¹⁸F-fluorid sodný. Slibným cílem pro diagnostiku i léčbu karcinomu prostaty je prostatický specifický membránový antigen (PSMA), membránový glykoprotein na

¹ proces v částicové fyzice, při kterém dochází k zániku částice a její antičástice při jejich vzájemném setkání, resp. přeměny veškeré jejich hmoty na energii vyzářenou ve formě fotonů

² čas po eventu, během kterého systém není schopen detekovat další event

³ množství radiofarmaka v určité tkáni/orgánu

buněčném povrchu. V posledních letech byl zaveden radioaktivně značený (^{68}Ga) ligand cílený na PSMA a ukazuje se, že má vyšší citlivost než cholin (Barwick 2015).

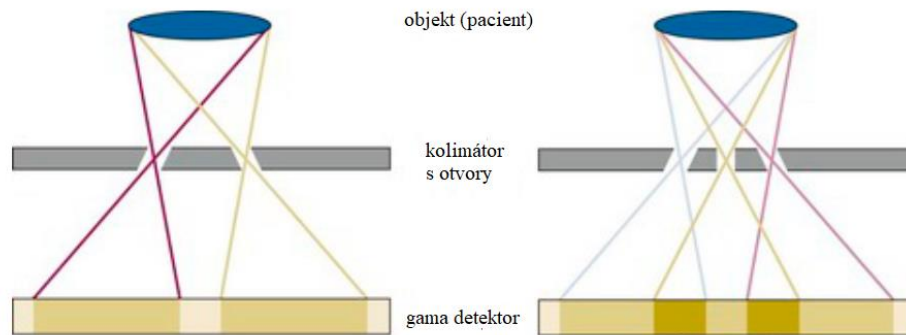


Obr. 3. ^{11}C -cholin PET/CT (A), který prokázal jedinou lézi (šipky) v pravém větším sfénovitém křídle¹, která původně vzbudila podezření na metastázi karcinomu prostaty u pacienta s lokální recidivou a zvýšeným PSA. Pomocí MRI byla však potvrzena benigní fibrózní dysplazie. Samostatný CT snímek (B) neposkytuje dostatečné rozlišení pro adekvátní charakterizaci léze (Gu et al. 2012).

2.2.2. SPECT/CT

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) sdílí mnoho výhod s PET. Jedná se o neinvazivní zobrazovací metodu, která poskytuje 3D funkční informaci s vysokou citlivostí a specificitou. Už několik dekad se používá v obecné nukleární medicíně, nukleární kardiologii a nukleární neurologii. Je založena na detekci fotonů γ , které vznikají při přeměně radioaktivního izotopu, který je součástí radiofarmaka. Fotony jsou detekovány scintilačním detektorem (obvykle dva, otáčející se kolem pacienta), který dává informaci o umístění příchozího fotonu a jeho energii (Koranda et al. 2017). Pro vytvoření obrazu je však důležité znát i dráhu, po které foton cestuje. Proto je mezi pacienta a detektor vložen kolimátor (olověná deska s 1 a více otvory), který propouští fotony pouze pod jistými úhly (viz Obr. 4.), čímž zároveň tlumí šum a zajišťuje větší přesnost výsledného obrazu (Accorsi 2008).

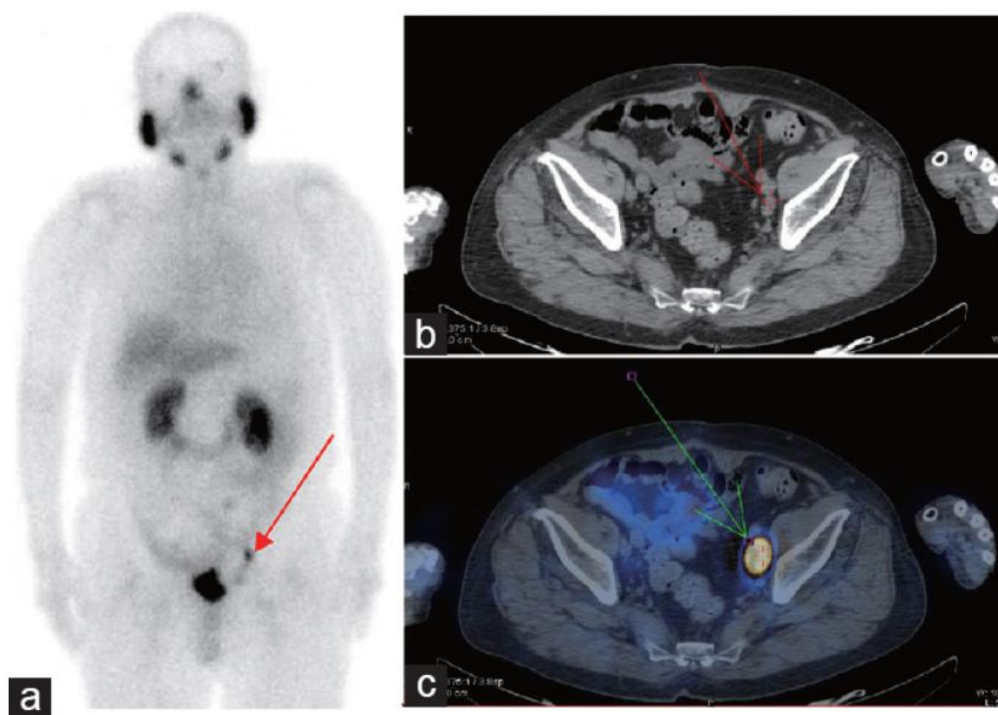
¹ kost ve spodní části lebky



Obr. 4. Ilustrace systému kolimátorů s více otvory. Levý obraz znázorňuje kolimátor s dvěma otvory, které jsou od sebe dostatečně vzdáleny, aby se zabránilo překrytí projekcí na detektoru. Zvýšený počet otvorů v kolimátoru, znázorněný v pravém obraze, poskytuje vyšší citlivost, ale na úkor částečného překrytí dat projekce (Larsson 1980).

Přestože v posledních letech roste počet PET/CT vyšetření, které má vyšší citlivost, počet SPECT/CT vyšetření zůstává stabilní. Radionuklidy používané pro SPECT mají zpravidla poločas v rozmezí od několika hodin do několika dnů, a tak mohou být vyráběny ve velkém množství a distribuovány farmaceutickými firmami. Pro PET se používají radionuklidy s poločasem v rozmezí od několika sekund do několika desítek minut, proto vzdálené nemocnice potřebují mít k dispozici vlastní cyklotronovou infrastrukturu, což výrazně zvyšuje náklady.

Nejčastěji používaný radionuklid pro SPECT je ^{99m}Tc , které má poločas 6,01 hodin. Dalšími převládajícími radionuklidy jsou ^{123}I , ^{131}I a ^{111}In . V onkologii se pro scintigrafii skeletu aplikují převážně radiofarmaka ^{99m}Tc -methylendifosfonát (^{99m}Tc -MDP) a ^{99m}Tc -hydroxydifosfonát (^{99m}Tc -HDP) (Van Audenhaege et al. 2015). Pro detekci kostních metastáz karcinomu prostaty lze použít i ^{99m}Tc -PSMA (viz Obr. 5.).



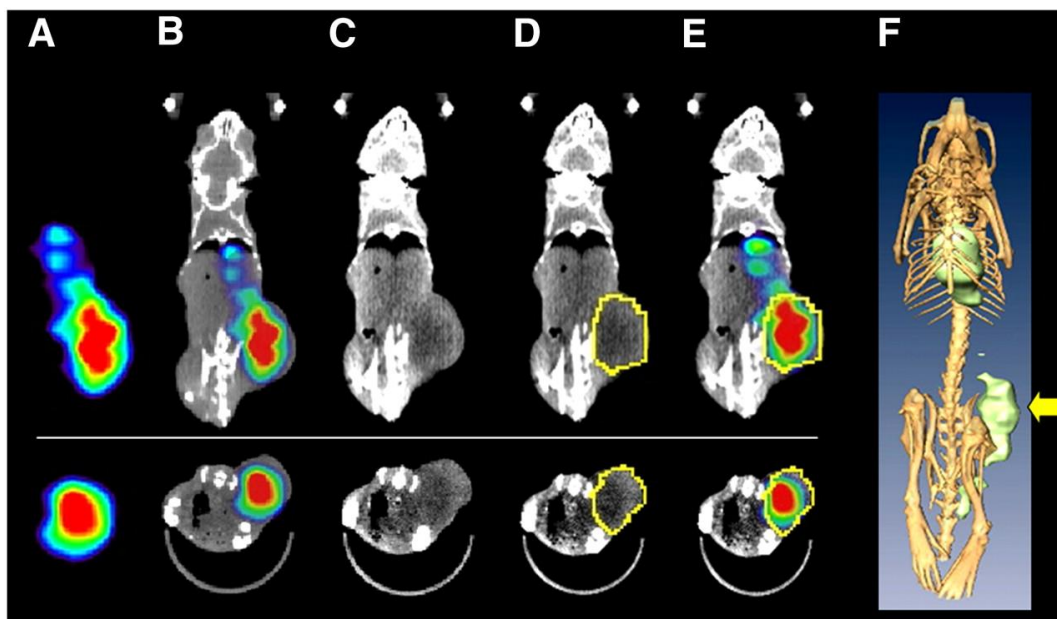
Obr. 5. Příklad zobrazení pacienta. Pacient byl 70letý muž, kterému byla po radikální prostatektomii naměřena zvýšená hladina PSA. Zobrazování ^{99m}Tc -PSMA pomocí SPECT/CT indikovalo metastázy v lymfatických uzlinách poblíž levých kyčelních arterií ([a] planární snímek celého těla, [b] CT snímek, [c] SPECT/CT snímek) (Su et al. 2017).

2.2.3. $\mu\text{PET/SPECT/CT}$

S rozvojem PET/CT a SPECT/CT se zobrazování laboratorních zvířat stalo nedílnou součástí molekulární medicíny. Translace testované látky do klinické praxe vyžaduje verifikační a validační krok, kdy molekulární zobrazovací modalita slouží jako nástroj při vývoji nových radiofarmak, návrhů léků a terapeutických režimů. V posledních letech se úsilí soustředilo na vývoj nových mikro-zobrazovacích systémů pro větší prostorové rozlišení a citlivou detekci, které se dobře vyrovnají se zobrazováním malých laboratorních zvířat, jako jsou myši a potkani (viz Obr. 6. a Obr. 7.). Důležitým aspektem preklinického zobrazování je schopnost studovat fyziologii v několika časových bodech (longitudinální studie). Mezi další výhody patří redukce nákladů, počtu zvířat a intervariability. Lze se tak téměř vyhnout i *ex vivo* přístupům a autoradiografickým studiím (Khalil et al. 2011).

8–12 mm	4–6 mm	1–2 mm	≤ 1 mm
Clinical SPECT	Clinical PET	Preclinical PET	Preclinical SPECT

Obr. 6. Prostorové rozlišení v klinických a preklinických SPECT a PET zobrazovacích skenerech (Khalil et al. 2011).



Obr. 7. μ SPECT/CT v onkologickém výzkumu. Koronální (A-E horní, F) a transaxiální (A-E spodní, F) snímky z SPECT/CT studie modelu xenograftu karcinomu prostaty (LNCaP linie) 72 hodin po podání protilátky pro PSMA značené ^{177}Lu . Uptake nádorem je na SPECT snímku (A) těžké lokalizovat, ale lze snadno anatomicky lokalizovat na fúzovaném snímku SPECT/CT (B). Pro kvantifikaci uptake radiofarmaka mohou být na CT (C) vizualizovány hranice nádoru. Oblast zájmu je vybrána na základě CT (D) a aplikována na data ze SPECT (E). Trojrozměrné vykreslení (F; šipka označuje nádor) může být užitečné pro lepší pochopení anatomických vztahů, ale zřídka hraje roli v kvantifikaci (Franc et al. 2008).

2.3. Preklinické modely karcinomu prostaty

Preklinické modely karcinomů, které s určitou přesností reprezentují nádory pacientů, kterým mají pomoci, jsou nezbytné k testování potenciálních terapeutických přístupů a k lepším objevům v translačním výzkumu. Nicméně zhruba 85 % preklinických látek vstupujících do klinických studií onkologických onemocnění neprokazuje dostatečnou bezpečnost nebo účinnost pro získání regulačního schválení. Tato vysoká míra neúspěšnosti poukazuje na slabé porozumění složitosti lidských malignit, limitaci

prediktivní hodnoty stávajících preklinických modelů a měřítko, s jakým jsou modely v preklinických podmínkách hodnoceny (Gao et al. 2015).

Výzkum v oblasti karcinomu prostaty je omezen limitovaným počtem lidských buněčných linií a modelů xenograftů, z nichž většina nerekapituluje onemocnění klinicky pozorované u lidí. Přestože některé buněčné linie (např. LNCaP s více než 8000 publikacemi v PubMed databázi v roce 2018) slouží v oboru úspěšně, v poslední době bylo vynaloženo úsilí vyvíjet a používat preklinické modely, které lépe reprezentují pacienty. Snahou je zavést od pacientů odvozené modely, specifické pro stádium a formu onemocnění (Risbridger et al. 2018).

2.3.1. *In vitro* modely

Nejužitečnější *in vitro* model karcinomu prostaty je buněčná kultura. Vzhledem k tomu, že karcinom může vzniknout z několika druhů buněk prostaty a může měnit vlastnosti v závislosti na stádiu nemoci, existuje pro studium široká škála buněčných linií. Nejčastěji používané buněčné linie karcinomu prostaty jsou DU-145, PC-3 a LNCaP. Existuje však mnoho dalších nových buněčných linií a klonálních derivátů těchto původních linií (Sobel a Sadar 2005). Immortalizované buněčné linie jsou široce používané ke studiu různých aspektů karcinomu prostaty, zejména v souvislosti s genetickou deregulací a molekulárními mechanismy (Valkenburg a Williams 2011).

2.3.1.1. DU-145

DU-145 buňky byly izolovány z mozkových metastáz karcinomu prostaty v roce 1975. Tato linie je hormonálně nezávislá a neexprimuje androgenový receptor (AR) ani PSA. Převážná většina karcinomů prostaty AR exprimuje, a proto se linie DU-145 uplatnila u experimentů, které nesledují efekt hormonálního statusu. Kromě chybějícího AR je tato linie charakteristická zvýšenou expresí receptorů růstových faktorů TGF- α a IGF-1 a jejich receptorů, změnou v expresi proteinu p53, markerovými chromozomy M1, M2 a M3 a karyotypem 46-143 (Sobel a Sadar 2005).

Důležitým hlediskem při výběru buněčné linie je rychlost růstu a vlastnosti xenograftu. Doba, za kterou dojde k zdvojnásobení množství buněk této linie je 34 hodin. DU-145 buňky si po aplikaci do laboratorního zvířete zachovávají fenotyp i genotyp a metastazují do různých orgánů, včetně sleziny, plic a jater (Cunningham a You 2015).

2.3.1.2. PC-3

PC-3 buňky byly izolovány z obratlových metastáz karcinomu prostaty v roce 1979. Tato buněčná linie je stejně jako DU-145 hormonálně nezávislá a neexprimuje AR ani PSA. Také má nestandardní expresi proteinu p53 a zvýšenou hladinu exprese růstových faktorů a jejich receptorů (TGF- α a EGF-R). Další charakteristikou linie PC-3 je zvýšená hladina exprese receptoru pro transferin. Jedná se o vysoce aneuploidní linii (karyotyp ± 58) a doba za kterou dojde k zdvojnásobení buněk je cca 33 hodin (Cunningham a You 2015).

Bylo zjištěno, že PC-3 linie je charakteristická pro neuroendokrinní nebo malobuněčný karcinom prostaty, spíše než adenokarcinom (Tai et al. 2011).

2.3.1.3. LNCaP

LNCaP buňky byly poprvé izolovány z metastáz adenokarcinomu prostaty v lymfatické uzlině (Horoszewicz et al. 1983). Tato buněčná linie exprimuje AR i PSA, a tedy reaguje na hladiny androgenů. Nicméně v sekvenci kódující AR obsahuje mutaci, která jí dává neselektivní vazebnou afinitu k celé řadě steroidních sloučenin, které tím pádem soutěží s androgeny o vazebné místo a mohou stimulovat růst (Veldscholte et al. 1990).

Jedná se o pomalu rostoucí linii, která zdvojnásobí počet buněk kolem 60-72 hodin. Buňky se relativně volně drží na substrátu a snadno se oddělují poklepáním, protřepáním nebo pipetováním. Rostou dobře v médiu s koncentracemi fetálního telecího séra 2,5-10 %. Charakteristická je exprese cytokeratinů (8, 18 a 20), divoký typ proteinu p53, inaktivace proteinu PTEN, karyotyp 33-91 chromozomů a markerový chromozom M1 a další (Cunningham a You 2015).

2.3.2. *In vivo* modely

In vivo experimenty na zvířatech jsou nezbytné pro současný výzkum karcinomu prostaty a jsou zvláště důležité pro studium interakcí mezi nádorovými buňkami a jejich mikroprostředím. V současné době je k dispozici mnoho preklinických zvířecích modelů karcinomu prostaty, včetně transgenních myších modelů a myších modelů s lidskými xenografty karcinomu prostaty. Transgenní myší modely produkují více heterogenní populace karcinomů než myší xenograftové modely, které zase poskytují více řízených přístupů (Park et al. 2010).

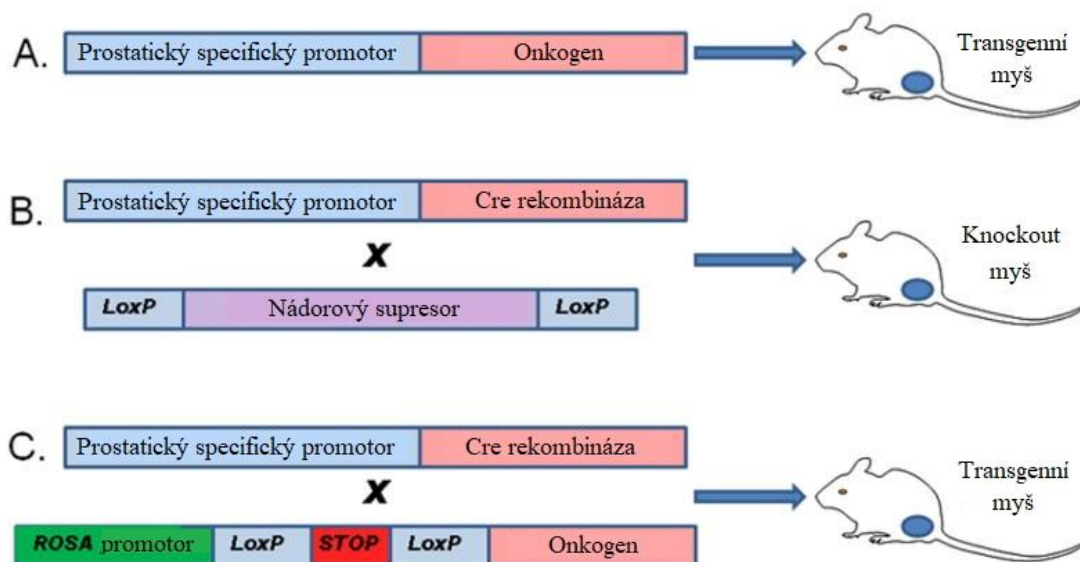
Pro některé důležité objevy o spontánních lézích prostaty byl použit i pes a potkan. Tyto modely však často nejsou podporovány vědeckou komunitou kvůli nedostatečně účinné genetické manipulaci v případě potkanů nebo vysoké ceně a citové náklonnosti u psů. Myši se proto staly oblíbeným modelovým organismem pro reprezentování různých aspektů chorobného procesu karcinomu prostaty (Cunningham a You 2015).

2.3.2.1. Transgenní myší modely

Ve většině případů geneticky upravené myší modely karcinomu prostaty využívají omezenou expresi onkogenů nebo Cre rekombinázy (k inaktivaci nádorových supresorů), pomocí probasinu nebo jiných prostatických specifických promotorů, k vytvoření genetických lézí, které mimikují léze identifikované u lidského karcinomu prostaty. Nedávno byly také použity modely, které používají lox-stop-lox k úpravě exprese prostatických specifických genů z promotorů na androgenech nezávislých, protože buněčná dediferenciace¹ během progresu nebo terapie zaměřené na androgenový receptor může snížit expresi onkogenů řízenou probasinem (viz Obr. 8.).

Transgenní myší modely mají významné výhody v tom, že mimikují progresi nádorů v průběhu času od iniciace preinvasivních lézí po invazivní a v některých případech metastatické léze v rámci mikroprostředí prostaty včetně plně intaktního imunitního systému. Hlavní nevýhodou těchto modelů je, že v některých případech mohou existovat důležité biologické rozdíly mezi myší a lidskou prostatou a jinými tkáněmi, které mohou ovlivňovat modelové fenotypy. Například karcinogeneze je u transgenních myší obecně zahájena v době pohlavní dospělosti, takže chybí změny mikroprostředí nádoru související se stárnutím. Novější generace modelů používající chemicky aktivovanou Cre rekombinázu mohou dovolit pozdější aktivaci karcinogeneze, ačkoli spektrum změn asociovaných se stárnutím myšího stroma jen částečně překrývá spektrum změn sledovaných u lidí. V praxi mají transgenní modely také obvykle vyšší náklady a delší časový rámec pro generování výsledků ve srovnání s xenograftovými modely (Ittmann et al. 2013). Mezi geneticky upravené myší modely pro karcinom prostaty patří model TRAMP, LADY, PTEN knockout, Nkx3.1 knockout a další (Hensley a Kyprianou 2012).

¹ ztráta schopnosti vyžrávat a získávat specializované vlastnosti a funkce



Obr. 8. Metody pro vytvoření transgenních myších modelů karcinomu prostaty. [A] Promotor specifický pro prostatu je používán k řízení exprese zvoleného prostatického specifického genu, typicky onkogenu. [B] Myši jsou generovány s loxP místy ohraničujícími klíčové exony ve zvoleném genu (obvykle gen nádorového supresoru). Tyto myši jsou poté zkříženy s myšmi, které exprimují Cre rekombinázu pod kontrolou probasinu nebo jiného prostatického specifického promotoru, což vede k vyřazení klíčových exonů a inaktivaci cílového genu v prostatických epiteliálních buňkách nesoucích cílovou sekvenci v jedné nebo obou alelách zvoleného genu. [C] Myši jsou generovány se zvoleným genem v pozici downstream¹ za silným konstitutivním promotorem (např. ROSA). Transkripce/translace je inhibována lox-stop-lox kazetou v pozici upstream² před zvoleným genem. Tyto myši mohou být zkříženy s probasin Cre myšmi, což vede k vyřazení stopové sekvence a expresi zvoleného genu. Tato metoda má tu výhodu, že exprese daného genu již není závislá na androgenovém receptoru a dalších prostatických specifických faktorech, jejichž aktivita může být pozměněna progresí nádoru nebo terapií (Ittmann et al. 2013).

2.3.2.2. Xenograftové myší modely

Obvyklým modelem karcinomu prostaty *in vivo* je imunodeficientní myš jako příjemce lidské nádorové tkáně, buněčné linie, nebo primární buněčné kultury. Tyto myši se používají kvůli jejich neschopnosti nasměrovat imunologickou odezvu na cizí tkáň, což umožňuje lidským nádorům růst poměrně neomezeně. Další výhodou je snadné generování modelu a skutečnost, že hodnocení terapie se odehrává v lidské nádorové tkáni, na rozdíl od jiných druhů (Gopinathan a Tuveson 2008). Lidské vzorky mohou být sériově transplantovány paralelně do několika jednotlivých myší tak, aby mohla být hodnocena účinnost specifického radiofarmaka. Tento přístup je příslibem pro identifikaci nejúčinnější léčby u pacientů (Valkenburg a Williams 2011).

¹ směrem k 3' konci DNA řetězce

² směrem k 5' konci DNA řetězce

Nejčastěji používané imunodeficientní myši pro xenograftové modely jsou nude (myši s inhibovaným imunitním systémem, bez srsti), NOD (diabetické myši netrpící obezitou), SCID (myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí) a NOD-SCID myši. Buňky se implantují subkutánně¹, ortotopicky do prostaty nebo pod renální pouzdro (SRC).

Subkutánní xenograftové modely byly nejprve vyvinuty pro vložení prostatické tkáně pacienta do plece nude myši koncem sedmdesátých let Schröderem a kolegy na Erasmus Univerzitě v Rotterdamu. To poskytlo první transplantovatelnou nádorovou buněčnou linii, PC-82. Výhody tohoto modelového systému zahrnují snadnou dostupnost, méně náročnou technickou odbornost a množství nádorové tkáně, které je možné použít. Nicméně málo až středně agresivním nádorům se v tomto prostředí příliš nedaří, protože se zdá, že většinu nádorů získaných z nude myši tvoří pouze nádory vysoce agresivní (Cunningham a You 2015).

Ortotopické xenograftové modely umožňují zavedení rakovinné prostatické tkáně do prostaty myši. Stephenson a kol. tento model poprvé představili v roce 1992. Ve své prvotní studii jednoznačně dospěli k závěru, že subkutánní nebo jakýkoli jiný ektopický² model neukazuje metastatický potenciál implantované lidské tkáně karcinomu prostaty. Hlavními výhodami tohoto modelu jsou relevance interakcí mezi implantovanou tkání a orgánem původu, což je potvrzeno důkazy o tom, že se metastatický potenciál zvyšuje nejen v ortotopicky implantované prostatické tkáni, ale i v dalších orgánech. Hlavní nevýhodou tohoto typu modelu jsou dovednosti, které jsou nutné k provedení operace a omezené množství tkáně, které lze zavést do myši prostaty (Ittmann et al. 2013).

SRC xenograftové modely představují nejnovější vývoj v xenotransplantaci. Původně byly zavedeny do literatury Wangem v roce 2005. Autoři tvrdí, že tato technika je úspěšná kvůli vysokému stupni prokrvení tkáně. Navzdory nevýhodě, že se jedná o tkáň, ze které přirozeně nevzniká karcinom prostaty, SRC xenografty nabízejí zajímavé možnosti v kombinaci s použitím tkáně pacienta (Cunningham a You 2015).

¹ podkožně

² uložený mimo obvyklé místo

2.4. Radioaktivně značená analoga cholinu v diagnostice karcinomu prostaty

Cholin je přirozeně se vyskytující základní substrát v těle, který je transportován intracelulárně a je v buňce fosforylován cholinkinázou na fosfocholin (prekurzor fosfatidylcholinu). Malignity díky zvýšené proliferaci často exprimují výrazně vyšší množství cholinových transportérů a cholinkinázy než normální tkáň, proto mají radioaktivně značená analoga cholinu potenciál sloužit jako radiofarmaka pro PET. Zejména derivát cholinu fluorcholin (FCH) značený fluorem-18 (^{18}F) se ukázal být užitečný pro zobrazování různých typů malignit, včetně malignit prostaty, prsu, jater a mozku. Farmakokinetika ^{18}F -FCH a dalších značených analogů cholinu umožňuje PET zobrazování celého těla během několika minut po podání dávky, přičemž je dosaženo vysokého kontrastu mezi nádorem a pozadím ve většině orgánů (Kwee et al. 2007).

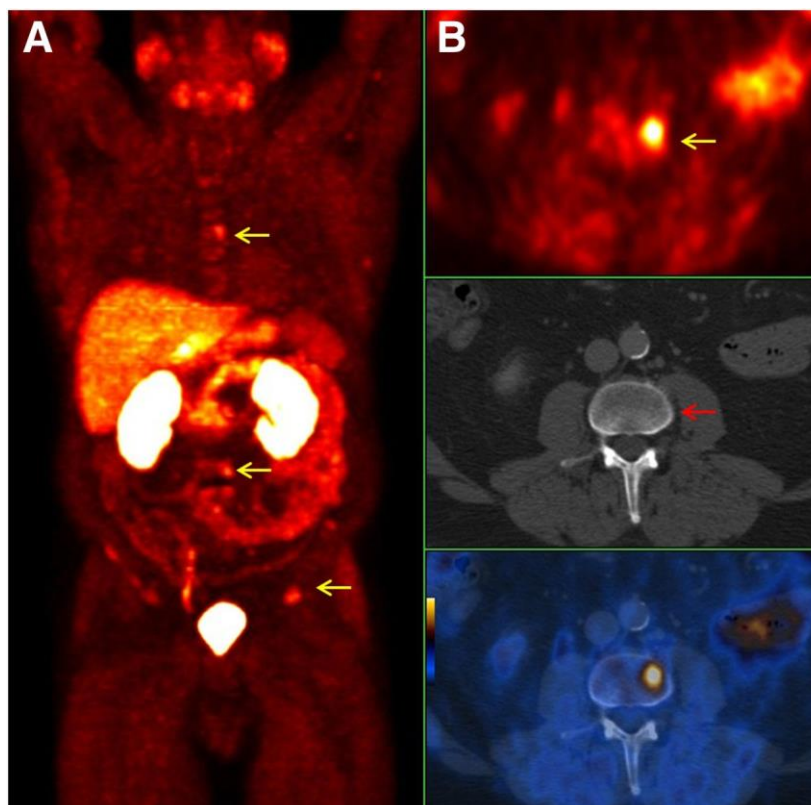
2.4.1. Vývoj analog cholinu

V klinické praxi existují tři varianty radiofarmaka pro vizualizaci cholinového uptake a metabolismu. Jsou jimi ^{11}C -cholin, ^{18}F -fluormethylcholin (FCH) a méně častý ^{18}F -fluorethylcholin (FEC).

^{11}C -cholin byl Harou et al. (1997) představen jako první PET radiofarmakum na bázi cholinu. Kromě zobrazování malignit mozku se prokázal být zvláště užitečný i pro zobrazování malignit genitourinálního traktu díky jeho nízké ledvinné clearance¹. Přestože byl v roce 2012 schválen FDA pro klinické použití u pacientů s karcinomem prostaty, pro rutinní klinické použití není příliš výhodný, protože ^{11}C má krátký poločas (20,4 minut). K překonání tohoto omezení byla vyvinuta ^{18}F značená analoga cholinu s fyzikálním poločasem 109,8 minut.

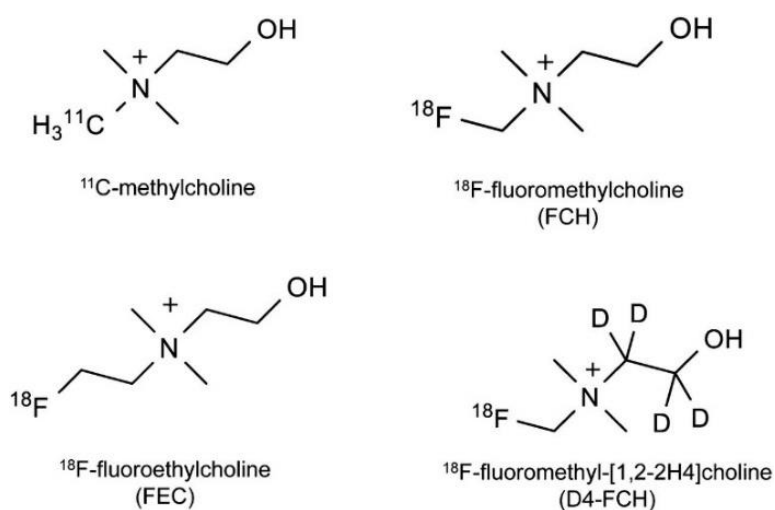
Hara et al. (2002) posléze vyvinuli také ^{18}F -FEC, který však vykazuje vysokou akumulaci v močovém měchýři, což je nežádoucí pro zobrazování karcinomu prostaty a pánevních lymfatických uzlin. Degrado et al. (2001) vyvinuli analog s lepšími biologickými vlastnostmi, ^{18}F -FCH, který je v dnešní době široce používán pro diagnostiku karcinomu prostaty (viz. Obr. 9.). Vykazuje vysoký uptake jak v mozkových, tak i v prostatických malignitách a autoři naznačují, že jeho chování v těle je téměř identické chování neznačeného cholinu (Hara 2001).

¹ objem, z něhož je radiofarmakum zcela eliminováno za jednotku času



Obr. 9. Zobrazení ^{18}F -FCH pomocí PET/CT u pacienta (64 let) s karcinomem prostaty. (A) ^{18}F -FCH PET s maximální intenzitou projekce ukazuje více ložisek s patologickým zvýšeným uptakem ^{18}F -FCH v kostní tkáni (šípky). (B) Transaxiální ^{18}F -FCH PET/CT snímky (horní: PET snímek ukazuje lézi v páteři, střední: CT snímek neukazuje žádné morfologické změny, spodní: fúzovaný PET/CT snímek) (Beheshti et al. 2013).

Nedávno byl vyvinut metabolicky stabilnější analog ^{18}F -fluormethylcholinu, který je na ethylovém řetězci deuterovaný (viz Obr. 10.).



Obr. 10. Chemické vzorce hlavních cholinových radiofarmak v současné praxi a vývoji (Challapalli et al. 2014).

Kromě sloučenin, které slouží jako specifické substráty pro cholinkinázu, existují ligandy specifické pro transportéry cholinu, které mohou být použity k zobrazování transportního systému cholinu. Patří sem např. deshydroxy- ^{18}F -FCH a analogy hemicholinia-3 (HC-3), inhibitoru membránového transportéru cholinu (Kwee et al. 2007).

2.4.2. Mechanismus působení

Analoga cholinu se v těle chovají téměř jako přírodní cholin. Vstupují do buněk karcinomu prostaty pomocí transportérového systému. Cholin je v buňce metabolizován cholinkinázou (fosforylace) a pokračuje Kennedyho dráhou. Vzniká fosfatidylcholin (lecitin), který je začleněn do membrán buněk. Metabolismus nádorových buněk je zvýšený, a tím se zvyšuje příjem cholinu, tedy i exprese transportérů a enzymů jako je cholinkináza. Cholin se v těle kromě fosfatidylcholinu vyskutekuje i v menší míře jako volný cholin, fosfocholin, glycerofosfocholin, cytidin difosfát cholin, acetylcholin a jiné fosfolipidy obsahující cholin (Gibellini a Smith 2010).

Existují tři typy transportérů zprostředkovávající pohyb cholinu přes membrány u vyšších eukaryot (viz Tab. 1.). Prvním typem jsou transportéry organických kationtů, dále vysoce afinitní transportéry cholinu, které jsou úzce spojeny se syntézou acetylcholinu v neuronech, a proteiny podobné transportérům cholinu (Fagone a Jackowski 2013). Hlavním úkolem transportérů je vychytávání cholinu z extracelulárního prostoru, vedení cholinu k mitochondriím, kde dochází k degradaci a produkci betainu (ledviny a játra), a k přechodu ven z buňky.

Po aplikaci dávky ^{18}F -FCH je radiofarmakum z krevního řečiště rychle distribuováno do tkání (4-5 minut). Normální biodistribuce ^{18}F -FCH je, kromě uptake v ledvinách a močovém měchýři při exkreci, ještě do slinných žláz, jater, sleziny a slinivky břišní (Vali et al. 2015). Fyziologická biodistribuce ^{18}F -FEC obvykle poukazuje na zvýšený uptake v ledvinách, močovodech, močovém měchýři, játrech a variabilně v kostní dřeni, slinných žlázách, slinivce břišní a slezině (Ferdinando et al. 2015). Pro ^{11}C -cholin je charakteristický vyšší uptake ve slinivce břišní, ledvinách, játrech, slezině, osteogenních buňkách kostí a v žlučníku.

Tab. 1. Přehled transportérů cholinu a jejich vlastností (Inazu 2014).

Název proteinu	Místa exprese	K_m pro cholin	Citlivost pro HC-3 (K_i)	Závislost na sodíku	Substráty
CHT1	mozek, mícha	<10 μM	50-100 nM	ano	cholin
CTL1	mozek, tlusté střevo a další	10-50 μM	10-100 μM	ne	cholin, organické kationty
CTL2	jazyk, sval, ledviny, plíce, vnitřní ucho, neutrofil	neznámo	neznámo	neznámo	cholin
CTL3	ledviny, tlusté střevo	neznámo	neznámo	neznámo	neznámo
CTL4	střevo, ledviny, žaludek	neznámo	neznámo	neznámo	neznámo
CTL5	mícha	neznámo	neznámo	neznámo	neznámo
OCT1	játra, ledviny, střevo, mozek	300-400 μM	nízká (250 μM)	ne	organické kationty
OCT2	ledviny, mozek	100-500 μM	nízká (250 μM)	ne	organické kationty

CHT – vysoce afinitní transportér cholinu, CTL – protein podobný transportéru cholinu, OCT – transportér organických kationtů

2.4.3. Radioznačení léčiv

Většina radiofarmak jsou organické látky a látky biologické povahy značené vhodným radionuklidem. Pro jejich přípravu jsou zpravidla používány metody organické chemie modifikované pro malé množství výchozích látek. Hlavními požadavky pro tyto metody jsou časová nenáročnost a reakce s co nejvyšším výtěžkem. Principem je nahrazení atomu nebo skupiny atomů organické sloučeniny radioaktivním atomem. Cílem je získat radiofarmakum o vysoké čistotě a dostatečně stabilní, přičemž označení musí být specifické na předem určeném místě organické molekuly.

K přípravě radiofarmak pro klinickou praxi jsou aplikovány tři základní metody, a to výměnná reakce nebo chemická či biochemická syntéza. Volba metody závisí na povaze zvoleného radionuklidu a struktuře organické sloučeniny (Lázníček a Komárek 1998).

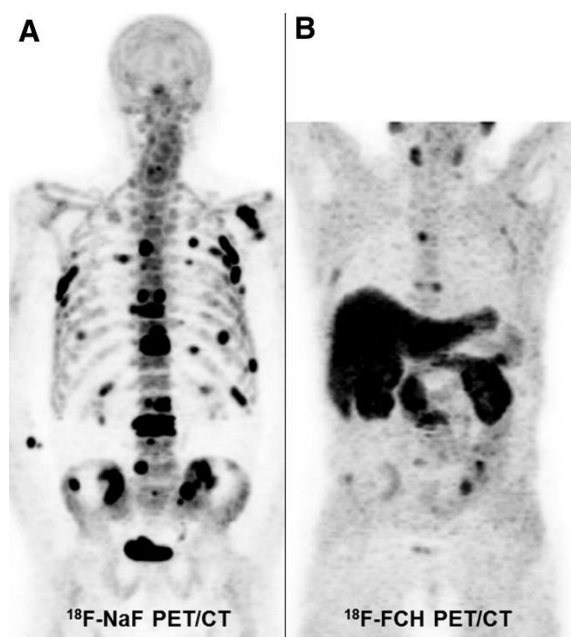
Peptidy a jiné malé molekuly jsou vynikajícími kandidáty pro použití jako ^{18}F značené radiofarmakum, protože rychle vstupují z krve do extracelulárního prostoru, kde jsou přístupné buňkám a pak jsou rychle vyloučeny z těla ven. Malé biomolekuly jsou typicky radioaktivně značeny ^{18}F navázáním na uhlíkový atom. Tento proces je obvykle navržen unikátně pro každou novou molekulu a vyžaduje několik zdlouhavých kroků. První krok obvykle zahrnuje purifikaci ^{18}F , který se dále smísí s uhličitanem draselným a cyklickým etherem (Kryptofix). Tato směs je vyvařena do sucha a následně dvakrát sušena acetonitrilem. Poté je ^{18}F připojen k prostetické skupině, která je ve vysokém přebytku ve srovnání s ^{18}F . Radioaktivně značená prostetická skupina by měla být purifikována a následně je konjugována s požadovanou cílovou molekulou. Produkt se opět purifikuje, aby byla získána co nejvyšší specifická aktivita získaného radiofarmaka. Doba syntézy je obvykle 1-3 hodiny, z čehož je časově nejnáročnější purifikace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (McBride et al. 2009).

2.5. Další radiofarmaka v diagnostice karcinomu prostaty

Mezi další účinná radiofarmaka pro diagnostiku karcinomu prostaty patří ^{18}F -fluorid sodný, ^{11}C -acetát, ^{18}F -analog L-leucinu a radiofarmaka cílená na prostatický specifický membránový antigen (PSMA).

2.5.1. ^{18}F -fluorid sodný

^{18}F -NaF PET/CT je obecně používán pro hodnocení primárních a sekundárních malignit kostí, hodnocení reakce na léčbu a pro objasnění abnormalit u jiných zobrazovacích modalit nebo v klinických datech. Jedná se o vysoce citlivou metodu pro hodnocení kostních metastáz karcinomu prostaty, ale její specifita je problémová, především kvůli akumulaci radiofarmaka u degenerativních a zánětlivých onemocnění kostí. Proto je pro detekci časných metastáz v kostní dřeni vhodnější ^{18}F -FCH (viz Obr. 11.).



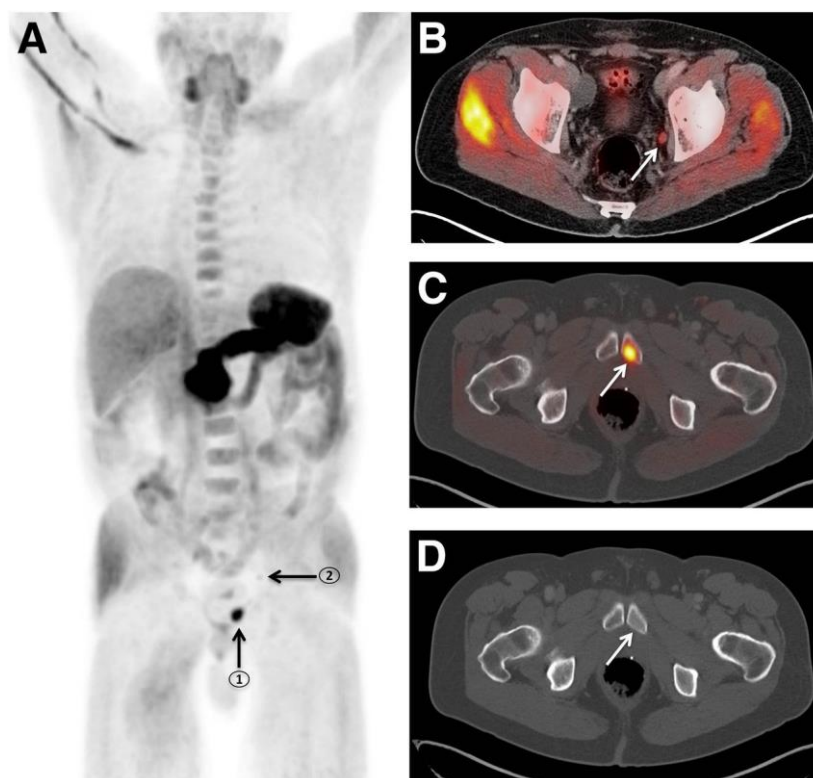
Obr. 11. Srovnání ^{18}F -NaF PET a ^{18}F -FCH PET snímků pacienta s karcinomem prostaty. ^{18}F -NaF PET snímek (A) ukazuje mnohem více lézí než ^{18}F -fluorocholine PET snímek (B) (Beheshti et al. 2016).

2.5.2. ^{11}C -acetát

Acetát značený ^{11}C byl původně použit pro PET měření oxidativního metabolismu myokardu, protože acetát vstupuje do Krebsova cyklu po přeměně na acetyl-koenzym A. Nicméně jeho metabolické cesty mohou být i jiné, protože je také substrátem pro syntézu

lipidů a cholesterolu. Vzhledem k tomu že tkáně se zvýšenou proliferací (malignity) mají zvýšenou potřebu lipidů, je ^{11}C -acetát vhodný pro PET zobrazování.

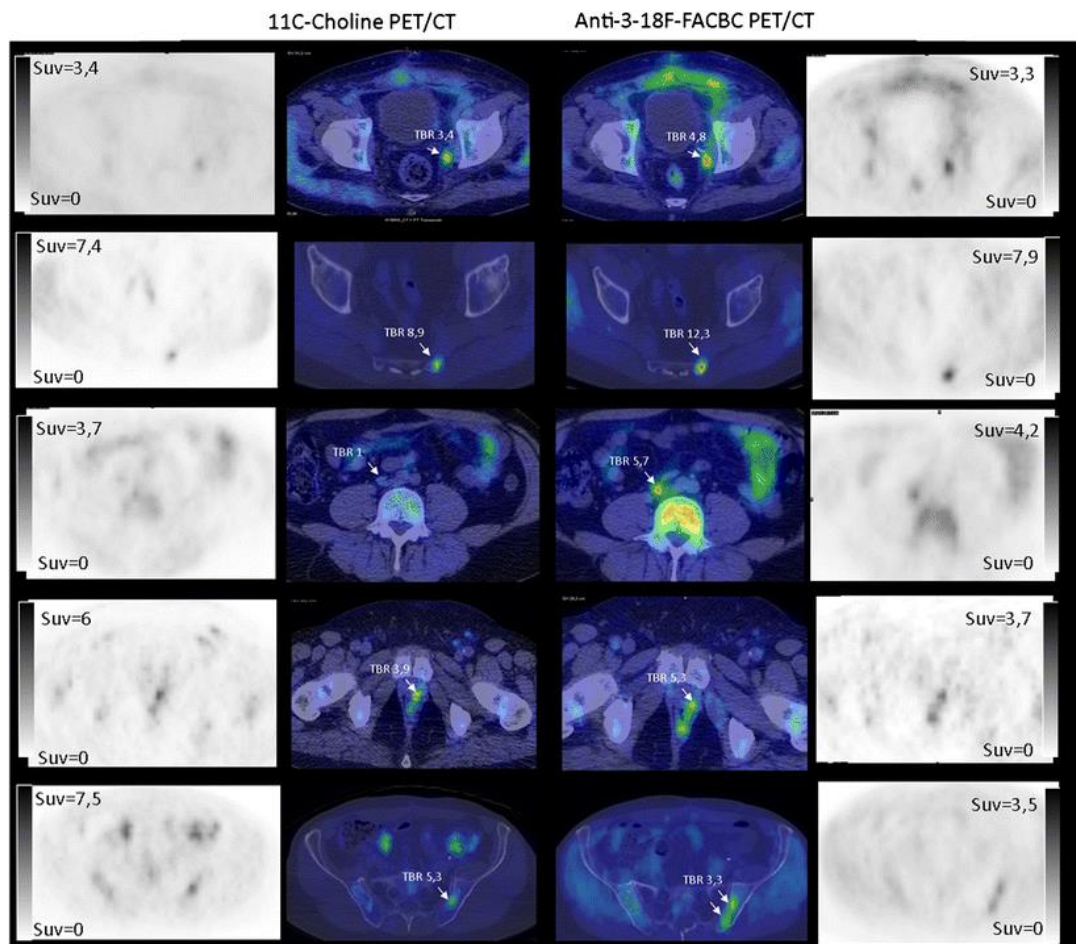
^{11}C -acetát je výhodný pro zobrazování karcinomu prostaty díky tomu, že se neakumuluje v močovém měchýři, protože je v ledvinách reabsorbován. Ve srovnání s konvenčními skeny skeletu pacientů ukázal srovnatelné výsledky (viz Obr. 12.). Jeho použití je vhodné zejména pro diagnostiku lokalizovaného karcinomu prostaty.



Obr. 12. Zobrazení karcinomu prostaty pomocí ^{11}C -acetátu u pacienta ve věku 59 let. [A] PET (projekce maximální intenzity) snímek celého těla, který odhaluje signál ve stydké sponě (1) a levé vnitřní pánevní lymfatické uzlině (2). [B-C] Axiální obrázky PET/CT zobrazují hypermetabolickou levou vnitřní pánevní uzlinu (B, šipka) a lézi ve stydké sponě (C, šipka). [D] CT snímek (Spick et al. 2016).

2.5.3. Anti-3- ^{18}F -FACBC

Anti 1-amino-3- ^{18}F -fluorocyklobutan-1-karboxylová kyselina je syntetizovaný analog L-leucinu. Je to nová slibná metoda pro PET zobrazování karcinomu prostaty. Hodnocení Nanni et al. (2013) naznačuje, že se může jednat o lepší radiofarmakum ve srovnání s cholinovým PET/CT (viz Obr. 13.).



Obr. 13. Axiální PET snímky (intenzita signálu ve stupních šedi) a PET/CT snímky u pacientů s pozitivními anti-3-¹⁸F-FACBC a ¹¹C-cholin nálezy (bílé šipky) (Nanni et al. 2013).

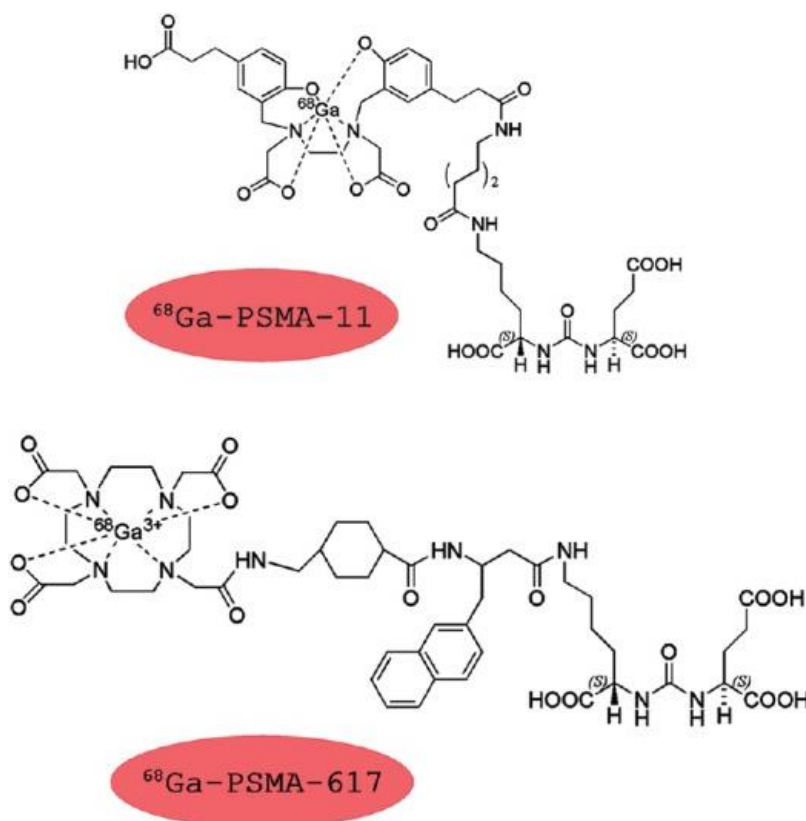
2.5.4. Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)

V poslední době byl největší zájem v diagnostice a terapii karcinomu prostaty zaměřen na prostatický specifický membránový antigen (PSMA). Jedná se o transmembránový protein typu II s glutamát-karboxypeptidázovou aktivitou. Po vazbě ligandu na PSMA se komplex internalizuje prostřednictvím klatrinem potažených vychlípenin membrány a následně endocytózou, což vede k efektivnímu transportu ligandu do buněk.

Téměř u všech adenokarcinomů prostaty je většina primárních a metastatických lézí charakteristická zvýšenou specifickou expresí PSMA oproti dalším tkáním, které PSMA exprimují (ledviny, tenké střevo a slinné žlázy). Zajímavé je, že se exprese PSMA objevuje i u karcinomů tlustého střeva a prsu, a také u nově vzniklých cév ledvinového původu. Vzhledem ke všem zjištěním se PSMA jeví jako ideální cíl pro vysoce kontrastní

molekulární zobrazování (PET/CT, SPECT/CT), a proto má velký potenciál ke zlepšení diagnostiky a léčby pacientů v pokročilém stádiu onemocnění (Eder et al. 2013).

Byla vyvinuta celá řada na PSMA zacílených radiofarmak (viz Obr. 14.), z nichž mnohé ukazují slibné výsledky pro přesnou diagnózu a určení stádia primárních karcinomů, dokonce i v případě nízkých hladin PSA. Nejvíce používaný ligand PSMA pro PET zobrazování je inhibitor PSMA značený ^{68}Ga (poločas 68 minut), ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC (^{68}Ga -PSMA-11). U lidí byly aplikovány také $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Glu-močovina-A pro SPECT a ^{177}Lu -PSMA-617 pro radioligandovou terapii a ukázaly velmi zajímavé předběžné výsledky týkající se možného teranostického¹ přístupu. Navržena byla také potenciální role radioligandů PSMA v radiologicky řízené chirurgii (Cuccurullo et al. 2018).



Obr. 14. Chemické vzorce různých radiofarmak cílených na PSMA (Cuccurullo et al. 2018).

¹ teranostika je novou oblastí medicíny, která kombinuje specifickou cílenou terapii na základě specifických diagnostických testů, snaží se o sjednocení diagnostických a terapeutických aplikací do jednoho radiofarmaka

2.6. Radioaktivní izotopy jodu

Je známo 34 izotopů jodu od ^{108}I po ^{142}I , z nichž pouze jeden izotop je stabilní (^{127}I) a pouze jeden radioizotop se vyskytuje v přírodě (^{129}I). Většina radioizotopů jodu má krátký poločas (5 izotopů s poločasem delším než jeden den). V nukleární medicíně se používají obvykle pouze ^{123}I a ^{131}I , méně často ^{125}I a ^{124}I . Uplatnění mají zejména pro zobrazování (PET, SPECT), dále pro terapii (^{131}I) a radioaktivní značení a studium radiofarmak (^{125}I , ^{131}I), kde se ukázaly být užitečné pro značení malých i velkých molekul (Hou a Ding 2009).

Existuje mnoho způsobů značení radioaktivním jodem (Seevers a Counsell 1982). Nejčastější metodou je použití chloraminu T (oxidační činidlo) nebo jodogenu (oxidační činidlo připomínající chloramin T). V porovnání s chloramin T metodou poskytuje jodogenová metoda nižší radiochemické výtěžky, ale menší oxidativní poškození. Jodogen je ve vodě nerozpustný oxidant rozpuštěný v organickém rozpouštědle a jsou jím potaženy stěny skleněné reakční trubice. Značení jodem se iniciuje přidáním proteinu/peptidu a jodidu sodného (s radioaktivním izotopem jodu) ve vodném roztoku.

2.6.1. I-123

^{123}I je vyráběn v cyklotronu protonovým ozářením obohaceného xenonu (^{124}Xe). Rozpad ^{123}I na telur (^{123}Te) se děje elektronovým záchytem¹ s poločasem 13,22 hodin, během čehož je emitováno γ záření převážně s energií 159 keV.

Vzhledem k emisi γ záření může být ^{123}I použit pro zobrazování štítné žlázy. Kratší poločas, typ přeměny a nízká energie emitovaného γ záření výrazně snižují obdrženou efektivní dávku při zobrazování štítné žlázy oproti ^{131}I , i když je použita stejná aktivita. Kromě toho je ^{123}I velmi užitečný pro značení nových radiofarmak, protože jeho fyzikální vlastnosti jsou téměř ideální pro SPECT studie. Poskytuje vyšší kontrast léze ku pozadí, čímž se zlepšuje citlivost a kvalita zobrazování pomocí SPECT (viz Obr. 15.). Bohužel na trhu zůstává poněkud nedostupný (Hou a Ding 2009).

¹ proces, kdy jádro (bohaté na protony) elektricky neutrálního atomu absorbuje elektron z elektronového obalu; důsledkem je změna jaderného protonu na neutron a emise neutrina jádrem a emise γ záření

2.6.2. I-124

^{124}I je vyráběn v cyklotronu protonovým ozářením obohaceného $^{124}\text{TeO}_2$. Jedná se o jediný radioizotop jodu, který emituje pozitrony a má dlouhý fyzikální poločas (4,15 dní). Rozpadá se přeměnou β^+ (23 %) a elektronovým záchytem (77 %) na ^{124}Te , kdy dochází k emisi vysoce energetických γ fotonů (603 keV, 723 keV, 1691 keV) a anihilačních fotonů (511 keV), díky kterým může být ^{124}I použit pro PET zobrazování (Sajjad et al. 2006). Ve srovnání s ^{18}F zobrazováním dochází pouze k malé ztrátě rozlišení a kontrastu obrazu kvůli malému zvýšení pozadí emitovanými γ fotony s vysokou energií. Díky svým vhodným fyzikálním vlastnostem se ^{124}I v praxi používá stále častěji, např. ve výzkumu pro značení radiofarmak, pro zobrazování štítné žlázy nebo pro funkční zobrazování buněčné proliferace mozkových malignit (Schmitz 2011).

2.6.3. I-125

^{125}I je získáván v jaderném reaktoru neutronovým záchytem¹ z ozářeného xenonového plynu (^{124}Xe). Rozpad ^{125}I se děje přeměnou typu elektronového záchytu na excitovaný ^{125}Te a dále na základní stav ^{125}Te , přičemž dochází k emisi Augerových elektronů a rentgenového i γ záření (35 keV).

Hlavní uplatnění má pro zobrazování štítné žlázy a pro biologické studie radioaktivně značených (^{125}I) radiofarmak (viz Obr. 16.), zejména peptidů a protilátek. Díky relativně dlouhému poločasu (59,39 dní) se ^{125}I používá také pro radioimunoanalýzu nebo jiné *in vitro* metody. Může být použit i pro brachyterapii solidních nádorů, včetně karcinomu prostaty a mozku. Nicméně kvůli nízké emitované γ energii není vhodný pro zobrazování celého těla (Oh a Ahn 2012).

2.6.4. I-131

^{131}I je získáván z jaderného reaktoru neutronovým ozářením přírodního teluru (^{127}Te) a rozpadá se na xenon (^{133}Xe). Poločas má 8,02 dnů a při přeměně je emitováno β^- i γ záření. Nejčastěji (89 %) svoji energii (971 keV) uvolní při přeměně na stabilní ^{131}Xe ve dvou krocích – β rozpad rychle následován γ rozpadem. Primárním emitovaným zářením ^{131}I jsou β částice s maximální energií 606 keV a γ paprsky s energií 364 keV.

¹ proces, kdy jádro atomu absorbuje jeden nebo více neutronů a splynou za vzniku těžšího jádra a emise γ záření

Používá se zejména pro terapii onemocnění štítné žlázy, kdy po orálním podání vhodné dávky (ve formě jodidu) dochází k poškození tkáně štítné žlázy, což je vhodné při její nadměrné aktivitě (hyperthyroidismus) nebo pro léčbu karcinomu štítné žlázy. Pro zobrazování není příliš vhodný kvůli vysoké radiační zátěži štítné žlázy a poměrně vysoké fotonové energii. Nicméně je široce dostupný a relativně nenákladný, a proto často používaný i pro biomedicínské studie (Mettler a Guiberteau 2012).

3. Experimentální část

3.1. Materiál

3.1.1. Laboratorní zvířata

Pro všechny *in vivo* a *ex vivo* experimenty byly použity laboratorní myši (samci) kmene SCID (Harlan, USA). Kmen SCID byl zvolen jako myší model kvůli charakteristické těžké deficienci ve funkčních B a T lymfocytech, díky čemuž je možné při experimentech použít lidské xenografty. Chov i experimenty byly provedeny v souladu se všemi právními normami pro práci s laboratorními zvířaty (Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů) a se souhlasem Ministerstva zemědělství (Odbor živočišných komodit) a Krajské veterinární správy Státní veterinární správy pro Olomoucký kraj.

3.1.2. Buněčné linie

Pro experimenty byly použity buněčné linie PC-3 (katalog. č. CRL-1435, ATCC, USA) a LNCaP (katalog. č. CRL-1740, ATCC, USA) odvozené od lidského karcinomu prostaty. Pro *in vivo* zobrazování byla použita také buněčná linie odvozená od lidského glioblastomu U-87 MG (katalog. č. HTB-14, ATCC, USA), která stejně jako karcinom prostaty exprimuje cholinové transportéry. Jako negativní kontrola pro akumulaci ^{68}Ga -PSMA-11 *in vitro* byla použita buněčná linie BJ (katalog. č. CRL-2522, ATCC, USA) odvozená od lidského kožního fibroblastu.

3.1.3. Přístroje

Kultivace a pasážování buněk: inkubátor (Thermo Scientific, USA), laminární box Herasafe KS (Thermo Scientific, USA), vodní lázeň (Mettler, Německo), mikroskop Primo Vert (Zeiss, Německo) a centrifuga Rotina 420R (Hettich, Německo).

Eluce ^{68}Ga a značení: ^{68}Ga generátor model IGG100 (Eckert a Ziegler, Německo), laminární box (Veenstra Instruments, Nizozemí) s měřičem radioaktivity (Veenstra Instruments, Nizozemí) a termostat (Major Science, USA).

Kontrola čistoty značení ^{68}Ga : vysokoúčinný kapalinový chromatograf UltiMate 3000 HPLC (Dionex, Německo) s kolonou Nucleosil 120 C18 5 μ 250x4 mm (Watrex, ČR) a detektorem radioaktivity Gabi (Raytest, Německo).

In vitro studie: inkubátor (Thermo Scientific, USA), třepačka (SGM Lab Solution, Indie), kolona MicroSpin G-50 s náplní Sephadex G-50 s frakcionačním rozsahem 1,5-30 kDa (GE Healthcare, USA), mikrocentrifuga Smart 15 (Hanil BioMed Inc., Korea), analytické váhy (Radwag, Polsko) a vortex IKA (Sigma Aldrich, USA).

Měření radioaktivity vzorků: automatický gama počítač Wizard² (PerkinElmer, USA) a kapalinový scintilační analyzátor Tri-Carb 2910 TR (PerkinElmer, USA).

Zobrazování laboratorních zvířat: hybridní systém μ PET/SPECT/CT Albira (Carestream Health, Inc., nyní Bruker Corp., USA) a systém pro inhalační anestezii pro laboratorní zvířata (Summit Anesthesia Support, USA).

Zpracování dat: programy Chromeleon 7.1 (Dionex, USA) a Albira Suite, PMOD a VOLVIEW (Bruker Corp., USA).

3.1.4. Chemikálie

Kultivace a pasážování buněk: PBS, PC-3 médium [F12HAM (katalog. č. N3520, Sigma-Aldrich, USA), 857 ml destilované vody, 33 ml 7,5% hydrogenuhličitanu sodného, 100 ml fetálního telecího séra FCSi (katalog. č. 12133C, Sigma-Aldrich, USA), 10 ml směsi antibiotik (streptomycin 0,1 mg/ml, penicilin 10 IU/ml)], TrypLE (modifikovaný trypsin, Gibco[®] Thermo Scientific, USA), 70% ethanol.

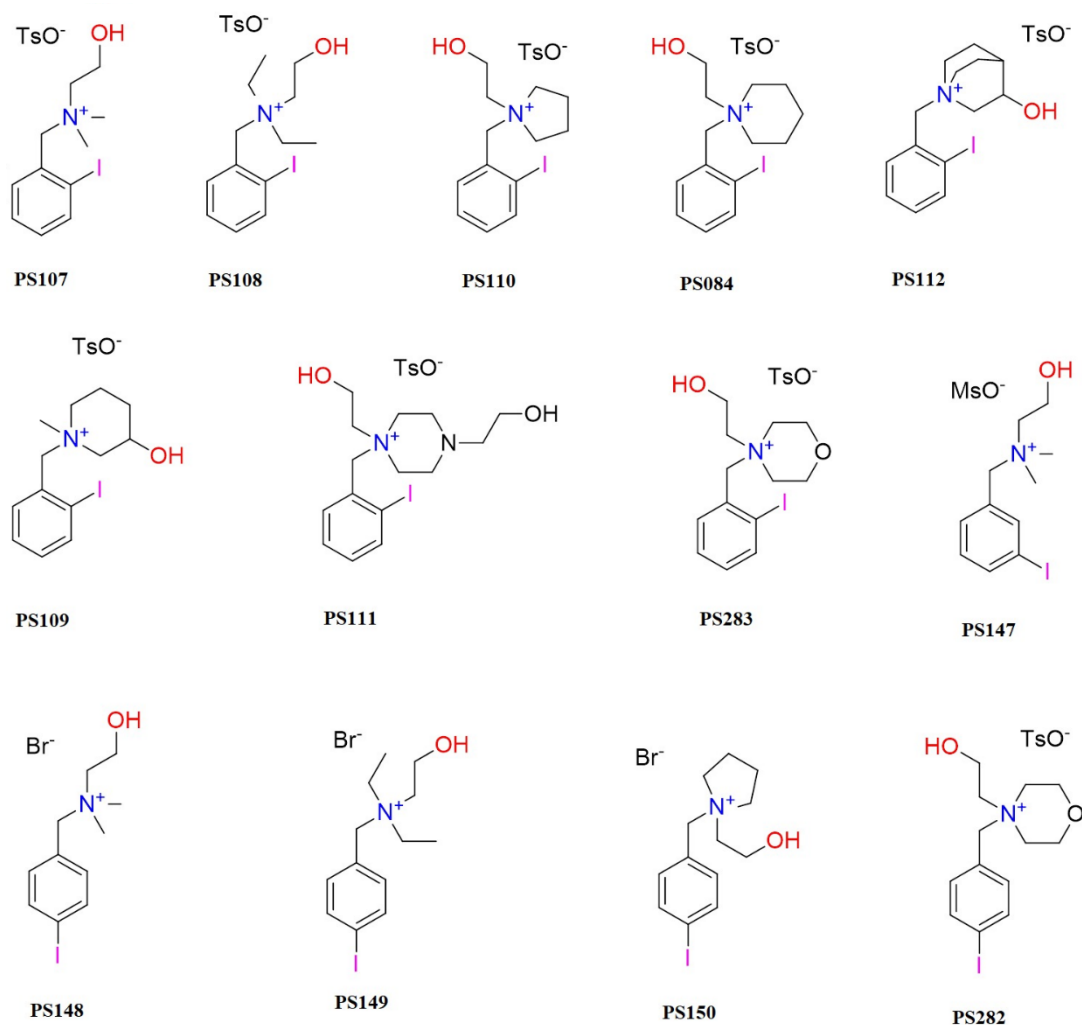
In vitro studie: PBS, oktanol, 0,1 M chlorid železitý, 6 mM diethylentriaminpentaacetát (DTPA), lidská plazma, ³H-cholin (katalog. č. ART 0197, American R. Chemicals, Inc., USA), scintilační roztok Ultima Gold (PerkinElmer, USA), DMSO, inkubační pufr (25 mM Tris/HCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM glukosa, 140 mM NaCl, pH upraveno na 7,4), acetátový pufr (310 mg 1,1 M NaAc \times 3H₂O/2 ml vody), 0,1 M hydroxid sodný, pH papírek, voda.

Eluce ⁶⁸Ga a značení: 0,1 N roztok kyseliny chlorovodíkové (Sigma-Aldrich, USA), acetátový pufr.

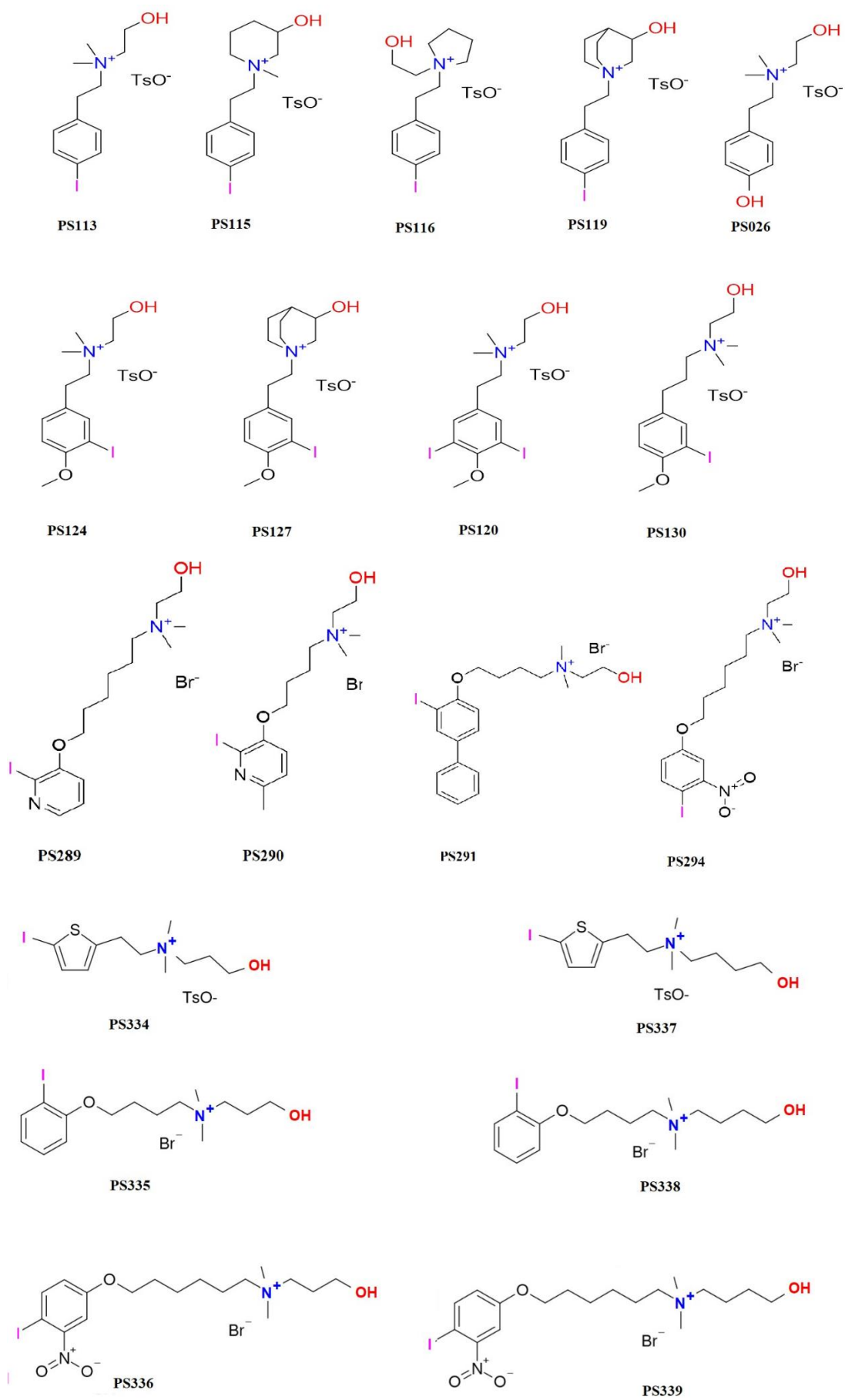
HPLC: trifluoroctová kyselina (čistota \geq 99 %, Sigma-Aldrich, USA), acetonitril (čistota \geq 99,98 %, Roth, Německo), LC-MS voda (Sigma-Aldrich, ČR), destilovaná voda, methanol.

Zobrazování laboratorních zvířat: Isofluran (Piramal, Indie), plynný medicínální kyslík (Respirox, SIAD, ČR), oční mast Ophthalm-Azulen (Zentiva, ČR).

Zkoumanými látkami byly deriváty cholinu (viz Obr. 15a. a 15b.) značené jodem, které syntetizoval a značil Ing. Pavel Švec (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha). Pro testování byly rozpuštěny v 50 μ l DMSO. Pro srovnání výsledků byly použity dvě již používaná radiofarmaka ^{18}F -FCH (Iason, Rakousko) a ^{68}Ga -PSMA-11 (čistota \geq 95 %, katalog. č. 9920, ABX, Německo).



Obr. 15a. Chemické vzorce zkoumaných derivátů cholinu – část 1 (Pavel Švec).



Obr. 15b. Chemické vzorce zkoumaných derivátů cholinu – část 2 (Pavel Švec).

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace a pasážování buněk

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s médiem v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. V inkubátoru byla udržována vlhkost a třikrát týdně byla kontrolována konfluence buněk pomocí mikroskopu. Pokud konfluence dosáhla nad 75 % bylo provedeno pasážování buněk v laminárním boxu. Před samotným pasážováním byly z lednice přeneseny PBS, médium a tryPLE do vodní lázně (37 °C) a bylo spuštěno UV světlo v laminárním boxu (30 minut). Následně bylo z lahví odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS. Po odsátí PBS byl přidán tryPLE a buňky se nechaly trypsinizovat v inkubátoru po dobu 5 minut. Po uvolnění buněk ze dna lahve bylo přidáno médium a pipetou byly buňky promíchány. Pasážování bylo obvykle provedeno v poměru 1:2.

Implantace buněk (5×10^6 buněk) do laboratorních myší byla provedena subkutánně do pravého/levého boku. Velikost nádorů ideální pro *in vivo* a *ex vivo* studie byla 100-300 mm³, která byla obvykle pozorována po 1-2 měsících od implantace.

3.2.2. Stanovení IC50 analog cholinu

Stanovení IC50 studovaných derivátů cholinu bylo provedeno formou kompetiční studie s ³H-cholinem na buněčné linii PC-3. Buňky PC-3 byly napěstovány v 24-jamkových destičkách do konfluence 70-100 % (0,5 ml buněk + 0,5 ml média/jamku). Vzorok ³H-cholinu a studovaného derivátu cholinu byly vždy zředěny inkubačním pufrem do příslušných koncentrací.

Z jamek bylo odsáto kultivační médium a následně byly buňky opláchnuty 0,5 ml PBS. K buňkám bylo přidáno 0,3 ml inkubačního pufru a 100 µl roztoku studovaného derivátu (50 µl DMSO + 450 µl H₂O + analog cholinu). Destička byla vložena do inkubátoru na 15 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 100 µl roztoku ³H-cholinu/jamku (aktivita 15 kBq/jamku). Nechalo se inkubovat 60 minut při 37 °C. Po inkubaci byl z jamek odsát pufr a následně byly buňky opláchnuty PBS. Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 0,2 ml NaOH (0,1 M)/jamku a nechalo se inkubovat (lýza) 30 minut při 37 °C. Lyzát byl homogenizován pipetou a bylo odebráno 10 µl z každé jamky do mikrodestičky pro stanovení koncentrace proteinů (BCA). Lyzát byl kvantitativně přenesen do scintilačních lahvíček s předpřipraveným scintilačním roztokem (2 ml/lahvičku). Jamky byly vypláchnuty 0,2 ml vody a ta přidána do příslušných

scintilačních lahvíček. Do 3 scintilačních lahvíček se scintilačním roztokem (2 ml/lahvičku) byly přidány standardy ^3H -cholinu, tj. 10 μl roztoku ^3H -cholinu (= 10 % podané dávky) + 190 μl NaOH (0,1 M) + 200 μl vody. Lahvičky byly zavíčkované a zamíchány pomocí vortexu. Následně byla měřena aktivita lahvíček na kapalinovém scintilačním analyzátoru. Naměřené hodnoty DPM byly zpracovány do inhibiční křivky a byla vypočtena hodnota IC50.

BCA stanovení koncentrace proteinu:

Nejprve byl připraven pracovní roztok (22 ml) smícháním 21,57 ml roztoku A (kyselina bicinchonová – BCA) s 431 μl roztoku B (síran měďnatý) v poměru 50A:1B. Takto připravený pracovní roztok je stabilní po dobu 24 hodin. Pomocí multikanálové automatické pipety byl pracovní roztok v poměru 1:20 (vzorek:pracovní roztok) přidán do mikrodestičky s lyzátem, tj. 200 μl pracovního roztoku k 10 μl vzorku. Stejný objem pracovního roztoku byl použit pro jamky kalibrační křivky. Mikrodestička byla inkubována 30 minut při 37 °C a následně byla změřena absorbance na spektrofotometru (vlnová délka 562 nm). Byla vypočtena koncentrace bílkovin ve vzorcích pomocí kalibrační křivky.

3.2.3. Radioaktivní značení ^{68}Ga -PSMA-11

Ke zjištění optimálních podmínek radioaktivního značení ^{68}Ga -PSMA-11 byly testovány 3 navážky PSMA-11 (1, 5, 10 μl) a 3 časy inkubace (1, 5, 10 minut).

Pomocí elučního činidla 0,1 N HCl byl z ^{68}Ga generátoru získán izotop ^{68}Ga ve formě $^{68}\text{GaCl}_3$. Při eluci bylo použito 10 ml HCl, přičemž byl odebrán 1 ml $^{68}\text{GaCl}_3$ o nejvyšší aktivitě (4. ml, zbytek do odpadu).

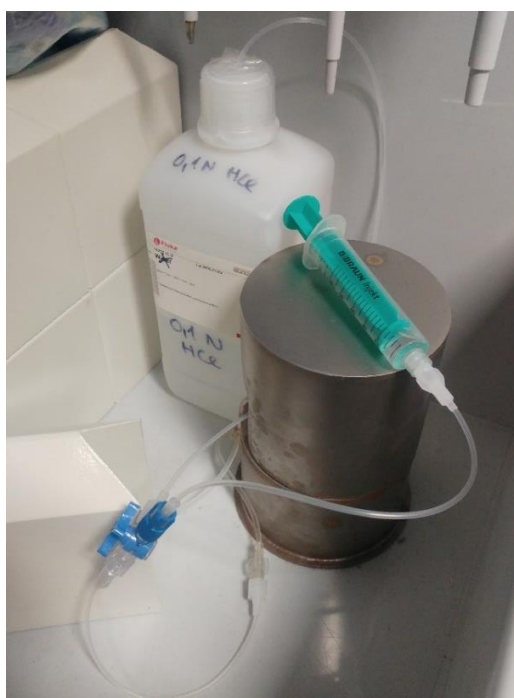
Byla připravena zkumavka s 30 μl acetátového pufru a 5 μl PSMA-11. Do zkumavky bylo přidáno 300 μl (poměr pufru a eluátu vždy 1:10) získaného eluátu a pomocí vortexu se směs promíchala. Vzorek byl vložen do termostatu (90 °C) na 5 minut. Po ukončení značení se ze vzorku odebralo 10 μl do nové zkumavky a zředilo se LC-MS vodou, aby byla získána vhodná aktivita pro HPLC analýzu (ideální nástřik 5-20 μl o aktivitě 50-100 kBq). Z chromatografu (program Chromeleon 7.1) byl zjištěn poměr volné a navázané frakce ^{68}Ga a byla stanovena kvalita značení (minimální radiochemická čistota 95 %).

Podmínky HPLC:

Pro HPLC gradientovou eluci byly použity mobilní fáze A (80 % acetonitril, 20 % H₂O) a B (99,9 % acetonitril, 0,1 % kyselina trifluoroctová) s rychlostí průtoku 1 ml/min. Eluce probíhala 15 minut (viz Tab. 2.).

Tab. 2. Gradient eluce pro HPLC analýzu peptidů.

čas (minuty)	mobilní fáze
0-3	100 % A
3-10	50 % A, 50 % B
10-13	20 % A, 80 % B
13-15	100 % A



Obr. 16. Aparatura pro eluci ⁶⁸Ga. Vlevo je umístěno eluční činidlo, roztok 0,1 N HCl, které je nasáto zelenou injekční stříkačkou (10 ml) a po změně směru průtoku (modrý ventil) vpuštěno (8 ml) do generátoru ⁶⁸Ga, který je umístěn pod laminárním boxem. Laminární box je vybaven olověným stíněním, aby se minimalizovalo ozáření. Fotograf: Barbora Planičková.

3.2.4. Testy *in vitro* stability ⁶⁸Ga-PSMA-11

3.2.4.1. Stanovení plazmatické stability

Ve zkumavce bylo smícháno 100 µl značeného preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 s 400 µl lidské plazmy. Po pečlivém zamíchání byla směs inkubována při 37 °C. V časech 0, 30, 60 a 120 minut byl odebrán vzorek 100 µl pro analýzu. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl acetonitrilu a nechal se třepat 1 minutu na třepačce (450 rpm). Následně byl vzorek centrifugován (15 000 rpm, 3 minuty) a odebrán supernatant, jehož radiochemická čistota byla analyzována pomocí HPLC. Provedeno ve třech opakováních.

3.2.4.2. Stanovení vazby na plazmatické proteiny

Ve zkumavce bylo smícháno 10 µl značeného preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 se 190 µl lidské plazmy. V další zkumavce bylo smícháno 10 µl značeného preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 se 190 µl PBS pro ověření funkce gelové kolony. Oba vzorky byly inkubovány při 37 °C. V časech 0, 30, 60 a 120 byl odebrán vzorek 25 µl a nanesen na gelovou kolonu, která byla předem připravena (otevřená kolona na obou koncích byla vložena do zkumavky a centrifugována 1 minutu při 2000 g). Kolona se dále centrifugovala 2 minuty při 2000 g. Po centrifugaci bylo zkontrolováno, zda mají vzorky aktivitu pod 20 kBq a byla změřena radioaktivita eluátu a gelové kolony pomocí gama počítáče, která se pohybovala v rozmezí 10×10³-1×10⁶ CPM. Provedeno ve třech opakováních. Ze získaných dat byla vypočtena vazba na plazmatické proteiny podle vzorce:

$$\% \text{ vazby} = \frac{\text{aktivita eluátu CPM}}{\text{aktivita celkem CPM}} \times 100$$

3.2.4.3. Stanovení stability v prostředí konkurenčního kationtu

Ve zkumavce bylo smícháno 50 µl značeného preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 se 150 µl roztoku FeCl₃ (0,1 mol/l). Po pečlivém zamíchání byla směs inkubována při 37 °C. V časech 30, 60 a 120 minut byl odebrán vzorek (5-20 µl) pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC. Provedeno ve třech opakováních.

3.2.4.4. Stanovení stability v prostředí konkurenčního chelátoru

Ve zkumavce bylo smícháno 50 µl značeného preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 se 150 µl roztoku DTPA (6 mmol/l). Po pečlivém zamíchání byla směs inkubována při 37 °C.

V časech 30, 60 a 120 minut byl odebrán vzorek pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC. Provedeno ve třech opakováních.

3.2.4.5. Stanovení stability v prostředí zvýšeného pH

Ve zkumavce bylo smícháno 300 μl značeného preparátu ^{68}Ga -PSMA-11 se 100 μl acetátového pufru (1,1 mol/l). Po zamíchání a zkontrolování pH (6-7) byla směs inkubována při 37 °C. V časech 30, 60 a 120 minut byl odebrán vzorek pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC. Provedeno ve třech opakováních.

3.2.4.6. Stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (P)

Ve zkumavce bylo smícháno 300 μl značeného preparátu ^{68}Ga -PSMA-11 s 600 μl PBS. Z připravené směsi bylo odebráno 50 μl a k tomu přidáno 500 μl oktanolu a 450 μl PBS. Takto bylo připraveno celkem 6 vzorků, které byly následně protřepány na třepače (450 rpm) po dobu 20 minut. Dále byla provedena centrifugace (15000 rpm, 1 minuta), po které bylo odebráno 50 μl vzorku z oktanolové a 50 μl z vodné fáze. Bylo zkontrolováno, zda mají vzorky aktivitu pod 20 kBq/vzorek a byla změřena radioaktivita všech vzorků pomocí gama počítáče, která se pohybovala v rozmezí cca 10×10^3 - 1×10^6 CPM. Ze získaných dat byl vypočten rozdělovací koeficient ($\log P$), tj. dekadický logaritmus podílu radioaktivity (%) v oktanolové a vodné fázi podle vzorce:

$$\log P = \log \frac{\text{oktanolová fáze (CPM)}}{\text{vodná fáze (CPM)}}$$

3.2.5. Akumulace ^{68}Ga -PSMA-11 *in vitro*

Buňky byly ve 24-jamkové destičce napěstovány do konfluence 100 %. Byl připraven preparát ^{68}Ga -PSMA-11 (335 μl) a z něj odebráno 165 μl (pro aktivitu preparátu 23 MBq) a naředěno inkubačním puftrem na objem 1,5 ml. Pomocí pH papírku bylo zkontrolováno pH (6).

Z jamek destičky bylo odsáto kultivační médium a buňky byly opláchnuty 1 ml PBS. Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 0,4 ml inkubačního pufru a 100 μl roztoku ^{68}Ga -PSMA-11. Destička se nechala inkubovat 60 minut při 37 °C. Po inkubaci byl z jamek odsát pufr a buňky byly opláchnuty 0,5 ml PBS. Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 0,2 ml NaOH (0,1 M/jamku) a následovala inkubace (lýza) buněk po dobu 30

minut při 37 °C. Lyzát byl homogenizován pipetou a kvantitativně přenesen do scintilačních lahvíček. Jamky byly vypláchnuty 0,5 ml vody a ta přidána do příslušných scintilačních lahvíček. Do 3 scintilačních lahvíček byly přidány standardy ⁶⁸Ga-PSMA-11, tj. 10 µl preparátu ⁶⁸Ga-PSMA-11 (= 10 % standardu) + 700 µl vody. Lahvičky byly zavíčkované a zamíchány pomocí vortexu. Následně byla měřena aktivita lahvíček na gama počítací. Naměřené hodnoty CPM byly použity pro výpočet akumulace ⁶⁸Ga-PSMA-11 podle vzorce:

$$\% \text{ akumulace} = \frac{\text{CPM vzorku}}{\text{CPM standardu}} \times 100$$

3.2.6. Biodistribuce radiofarmak *ex vivo*

Připravená radiofarmaka byla naředěna fyziologickým roztokem (aktivita 1-2 MBq/myš) a retroorbitálně aplikována laboratorním myším pod anestézií (4 % isofluran, plynný kyslík 2l/min). Po působení po dobu 1 nebo 3 hodin byly myši pod anestézií usmrceny přerušáním míchy. Ihned po usmrcení byla myším odebrána krev z krkavice (největší krční tepna) a 13 orgánů (slezina, slinivka, manuálně vyprázděný žaludek, střeva, ledviny, játra, srdce, plíce, sval, stehenní kost, nádor, štítná žláza a mozek) do scintilačních lahvíček. Lahvičky byly zváženy a následně jim byla společně se standardy změřena jejich aktivita pomocí gama počítáče. Získaná data byla vyjádřena jako procento podaného radiofarmaka na gram orgánu (% ID/g).

Příprava standardů (6 pro 1 radiofarmakum):

1. 10 µl roztoku podaného myši
2. 10 µl roztoku podaného myši
3. 50 µl zředěného roztoku 1 (450 µl H₂O + 50 µl roztoku podaného myši)
4. 50 µl zředěného roztoku 1
5. 50 µl zředěného roztoku 2 (980 µl H₂O + 20 µl roztoku podaného myši)
6. 50 µl zředěného roztoku 2



Obr. 17. Pracovní plocha pro sekci laboratorních myší. Vlevo je umístěna polystyrenová podložka pokrytá igelitem. Na podložce se provádí usmrcení a sekce myší, které se k ní připevňují jehlami kvůli snazší manipulaci. Vpravo je umístěna kádinka s vodou, která slouží k oplachu použitých nástrojů (pinzeta, nůžky). Odebrané orgány se pokládají na zobrazený papírový ubrousek (odsátí přebytečné krve).

Fotograf: Barbora Planičková.

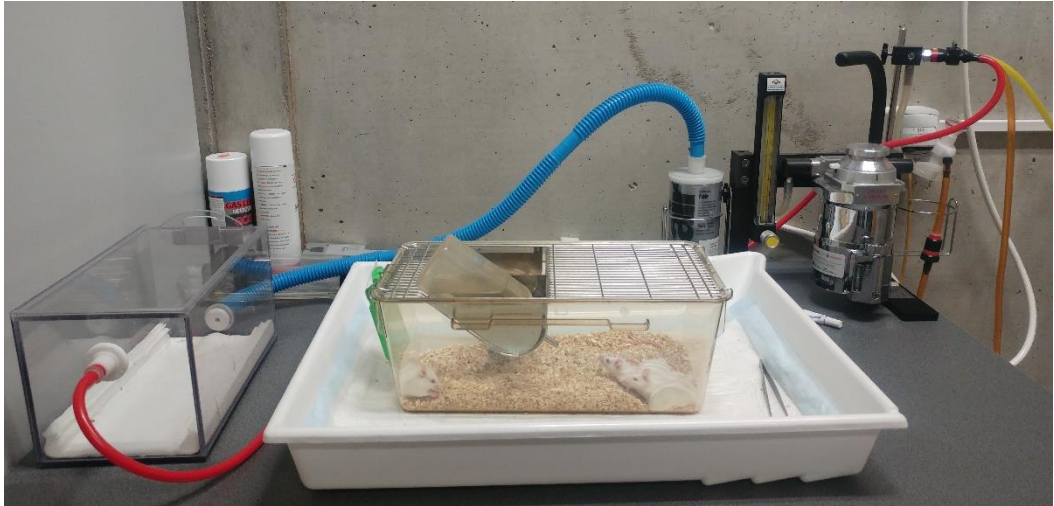
3.2.7. Biodistribuce radiofarmak *in vivo*

Biodistribuce radiofarmak *in vivo* byla zjištěna pomocí μ PET/SPECT/CT (Albira) zobrazování laboratorních zvířat.

Před a po podání dávky radiofarmaka byla změřena radioaktivita v injekční stříkačce a rozdílem zjištěna aktivita aplikované dávky (ideální aktivita dávky 5-10 MBq/myš). Radiofarmakum bylo do myší aplikováno retroorbitálně¹ pod anestézií a biodistribuce se staticky měřila zpravidla po 1 nebo 3 hodinách. Pět minut před skenováním byla u myši zahájena anestezie a na oči byla aplikována oční mast proti vysychání. Uspaná myš byla zvážena a vložena na lůžko v Albira přístroji, u kterého byl zajištěn přívod anestetika (2 % isofluran, plynný kyslík 2 l/min).

Zpracování obrazu probíhalo v programu Albira Suite, kde byly předem nastaveny parametry měření (aktivita dávky, radionuklid, čas aplikace, hmotnost myši, poloha lůžka, způsob snímání). Pro následnou úpravu PET/SPECT/CT obrazu byly použity programy PMOD (2D snímky) a VOLVIEW (3D snímky a animace).

¹ aplikace dávky do retroorbitálního sinu umístěného za okem, jedná se o alternativu intravenózní aplikace do ocasní žíly



Obr. 18. Aparatura pro anestezii laboratorních zvířat. Vlevo: uzavřený box pro umístění myši s přítokem kyslíku a isofluranu (červeně) a výstupním filtrem pro nespotřebovaný isofluran (modře). Uprostřed: klec s laboratorními myšmi, vybavená hoblinami, vodou a jídlem (granule). Pod ní podložka pro umístění myši při aplikaci dávky. Vpravo: zařízení pro inhalační anestezii s regulátory kyslíku a isofluranu.

Fotograf: Barbora Planičková.



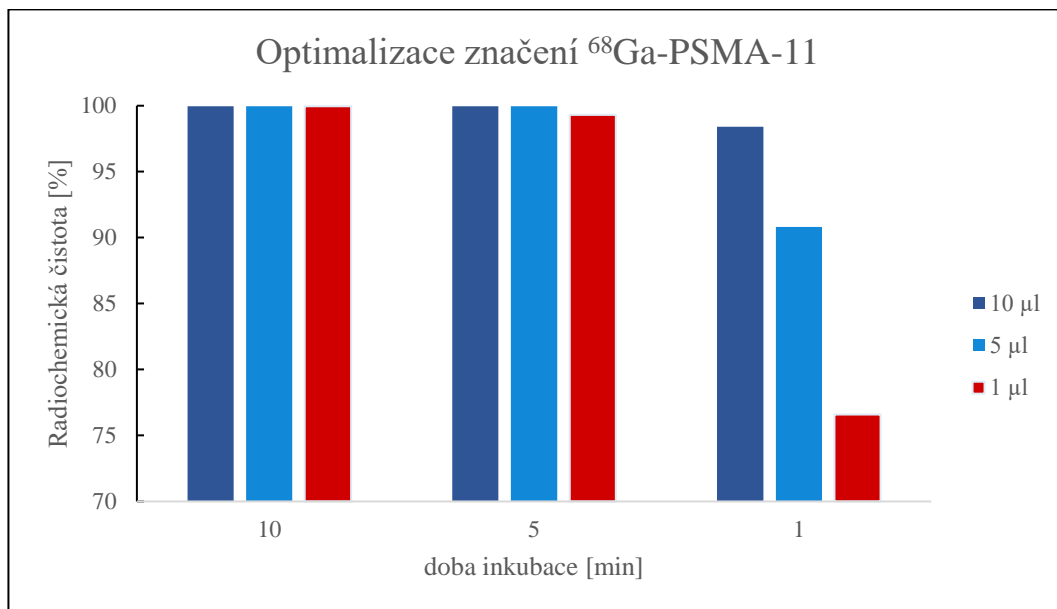
Obr. 19. Příklad přístroje Albira pro PET/SPECT/CT zobrazování laboratorních zvířat. V pravé části je umístěno lůžko pro laboratorní zvířata, které je při měření zasunuto do levé části, kde probíhá měření. Fotograf:

Barbora Planičková.

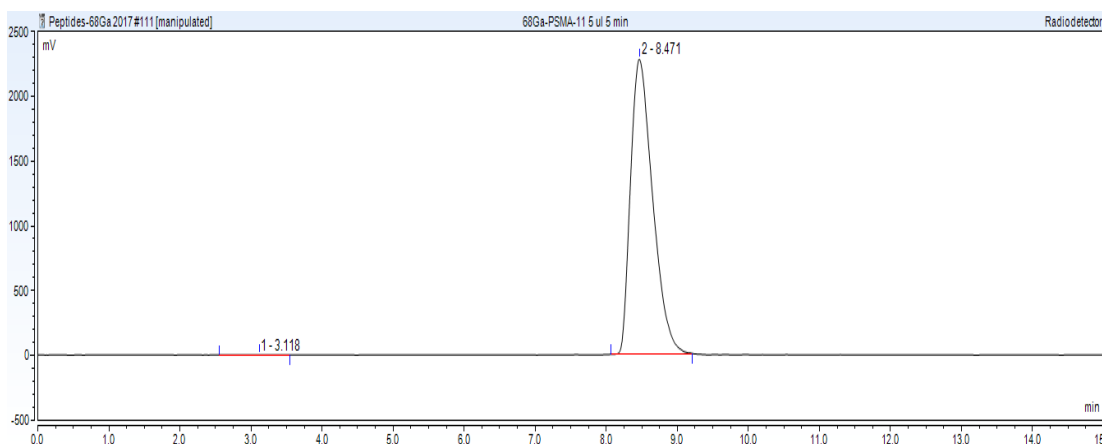
4. Výsledky

4.1. *In vitro* studie ^{68}Ga -PSMA-11

4.1.1. Optimalizace značení



Graf 1. Optimalizace radioaktivního značení ^{68}Ga -PSMA-11. Testovány byly tři navážky PSMA-11 (1, 5, 10 µl) a tři časy inkubace (1, 5, 10 minut) při 90 °C. Výsledky radiochemické čistoty získané pomocí HPLC byly vyjádřeny v procentech navázané frakce a podle jejich hodnot byly určeny optimální podmínky značení (5 µl PSMA-11, 5 min inkubace, 90 °C).



Obr. 20. Radiochromatogram úspěšného značení ^{68}Ga -PSMA-11 (značení: navážka 5 µl PSMA-11, inkubační čas 5 minut při 90 °C). Zobrazená křivka vyjadřuje intenzitu naměřené radioaktivity (mV, osa y) v závislosti na retenčním čase (min, osa x). Retenční čas frakce volného ^{68}Ga je kolem 3 minut a retenční čas frakce navázaného ^{68}Ga -PSMA-11 je 8-9 minut.

4.1.2. Stabilita v různých prostředích

Tab. 3. HPLC výsledky *in vitro* stability ^{68}Ga -PSMA-11 v různých prostředích. Radiochemická čistota ^{68}Ga -PSMA-11 byla vyjádřena v procentech navázané frakce (radiochemická čistota) s uvedenou směrodatnou odchylkou.

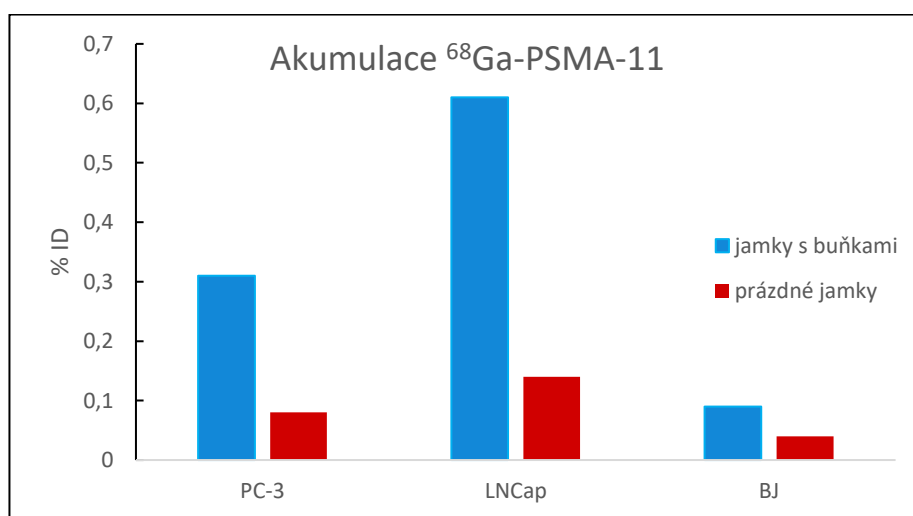
Doba inkubace	plazma	0,1 M FeCl ₃	6 mM DTPA	zvýšené pH
30 min	99,86 ± 0,05	53,84 ± 4,77	96,14 ± 0,34	99,89 ± 0,04
60 min	99,88 ± 0,12	35,75 ± 2,18	93,97 ± 0,25	99,86 ± 0,02
120 min	99,90 ± 0,06	16,52 ± 3,40	89,92 ± 0,55	99,84 ± 0,08

4.1.3. Stanovení log P a vazby na plazmatické proteiny

Tab. 4. Výsledky *in vitro* stanovení vazby ^{68}Ga -PSMA-11 na plazmatické proteiny a stanovení ^{68}Ga -PSMA-11 rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (P). Výsledky byly získány z dat naměřených na automatickém gama počítači a jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou. Vazba na proteiny je vyjádřena jako průměrná procentuální hodnota radioaktivity eluátu.

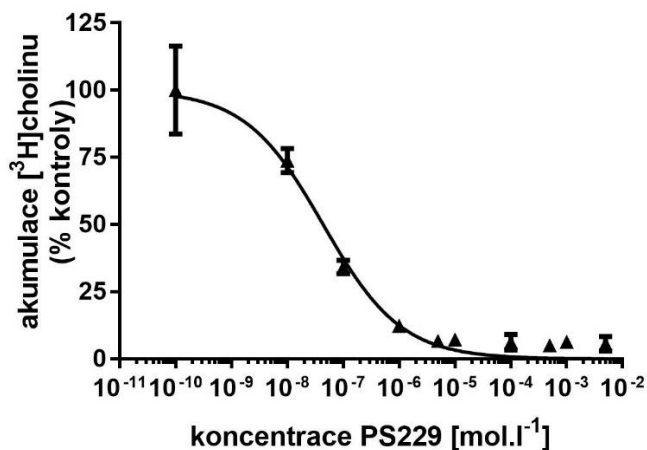
Doba inkubace	vazba na proteiny (%)	log P
0 min	26,16 ± 3,47	-3,4 ± 0,54
30 min	30,57 ± 2,52	
60 min	30,02 ± 2,17	
120 min	30,55 ± 2,23	

4.1.4. Akumulace v buněčných liniích



Graf 2. Výsledky akumulace ^{68}Ga -PSMA-11 v buněčných liniích PC-3, LNCaP a negativní kontrolní linii BJ. Pro kontrolu byla měřena i radioaktivita (CPM) prázdných jamek. Výsledky byly vyjádřeny jako % ID. Směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,01-0,12.

4.2. IC50 analog cholinu



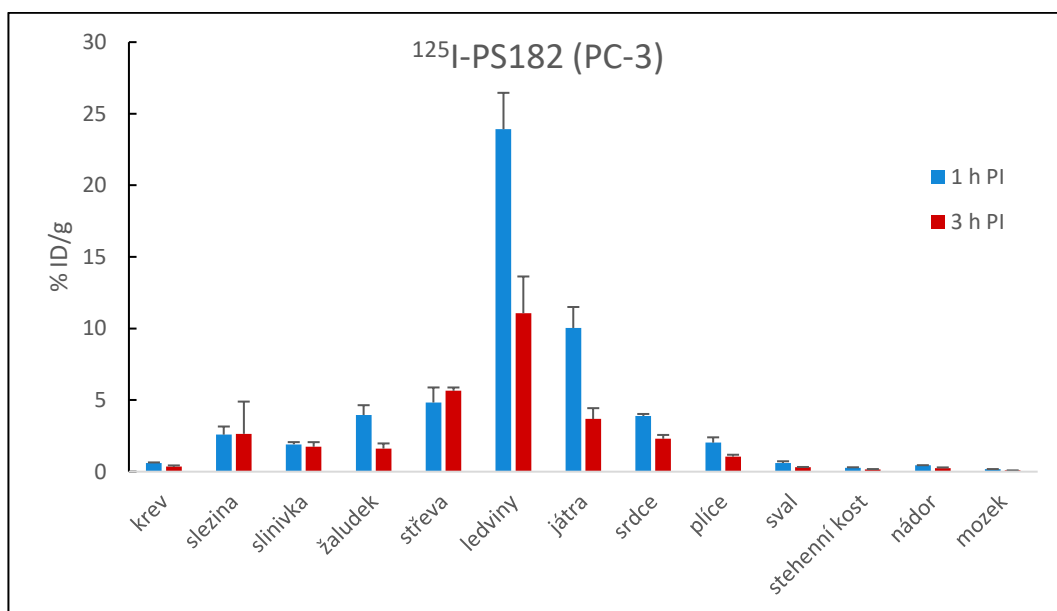
Obr. 21. Ilustrační graf pro zjištění hodnoty IC₅₀ testované látky (PS229). Graf vyjadřuje závislost akumulace ³H-cholinu (% kontroly) na molární koncentraci testované látky (logaritmovaná).

Tab. 5. Získané hodnoty IC₅₀ studovaných derivátů cholinu. Červeným písmem jsou vyznačeny analogy cholinu s podobnou nebo lepší hodnotou IC₅₀ v porovnání s ¹⁸F-FCH.

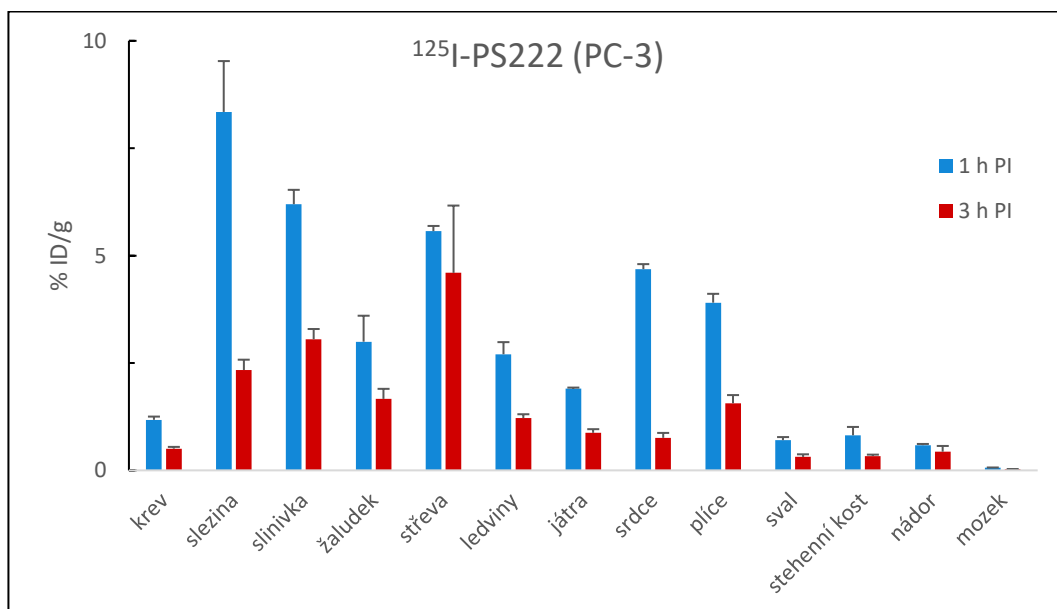
Derivát cholinu	IC ₅₀ (mol/l)	Derivát cholinu	IC ₅₀ (mol/l)
¹⁸ F-FCH	3 × 10 ⁻⁶	PS147	1,33 × 10 ⁻⁴
PS026	1,17 × 10⁻⁵	PS148	1,30 × 10 ⁻⁴
PS084	2,17 × 10 ⁻⁴	PS149	7,67 × 10 ⁻⁵
PS107	2,16 × 10 ⁻⁴	PS150	1,56 × 10⁻⁵
PS108	8,08 × 10⁻⁶	PS282	2,73 × 10 ⁻⁴
PS109	1,97 × 10 ⁻⁴	PS283	4,33 × 10 ⁻⁵
PS110	1,13 × 10⁻⁵	PS289	1,36 × 10⁻⁶
PS111	9,08 × 10 ⁻⁴	PS290	1,82 × 10 ⁻⁵
PS112	1,60 × 10 ⁻⁴	PS291	1,27 × 10⁻⁶
PS113	8,58 × 10⁻⁶	PS294	1,36 × 10⁻⁷
PS115	1,06 × 10 ⁻⁴	PS334	1,06 × 10⁻⁶
PS116	1,88 × 10 ⁻⁵	PS335	2,99 × 10 ⁻⁵
PS119	7,45 × 10 ⁻⁵	PS336	1,06 × 10⁻⁶
PS120	5,34 × 10 ⁻⁵	PS337	2,99 × 10 ⁻⁵
PS124	2,42 × 10 ⁻⁵	PS338	2,33 × 10 ⁻⁵
PS127	1,15 × 10 ⁻⁴	PS339	3,69 × 10⁻⁷
PS130	3,41 × 10 ⁻⁵		

4.3. Biodistribuce *ex vivo*

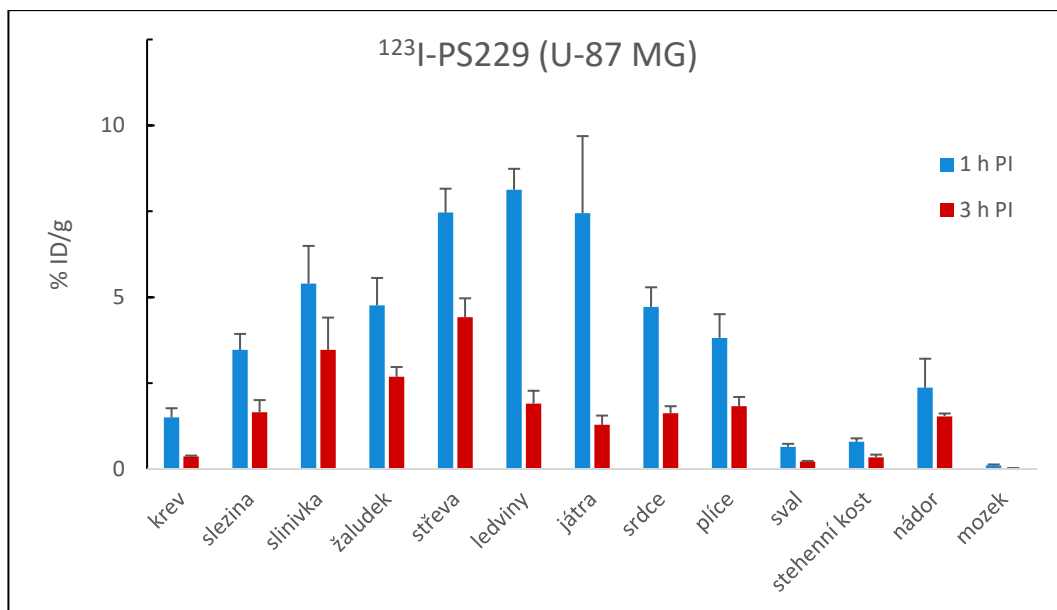
4.3.1. Analoga cholinu značená jodem



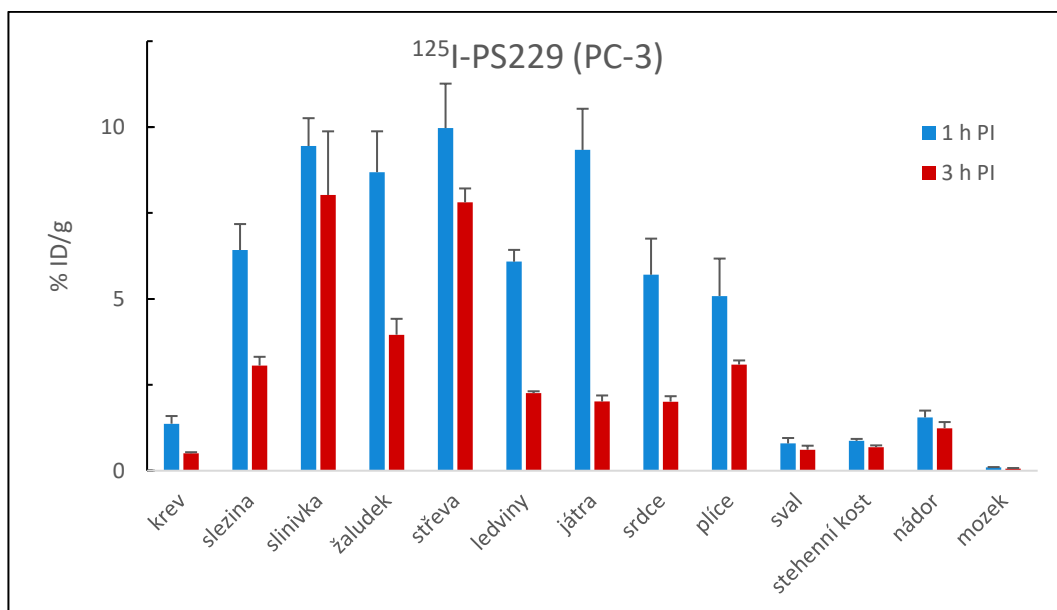
Graf 5. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS182 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



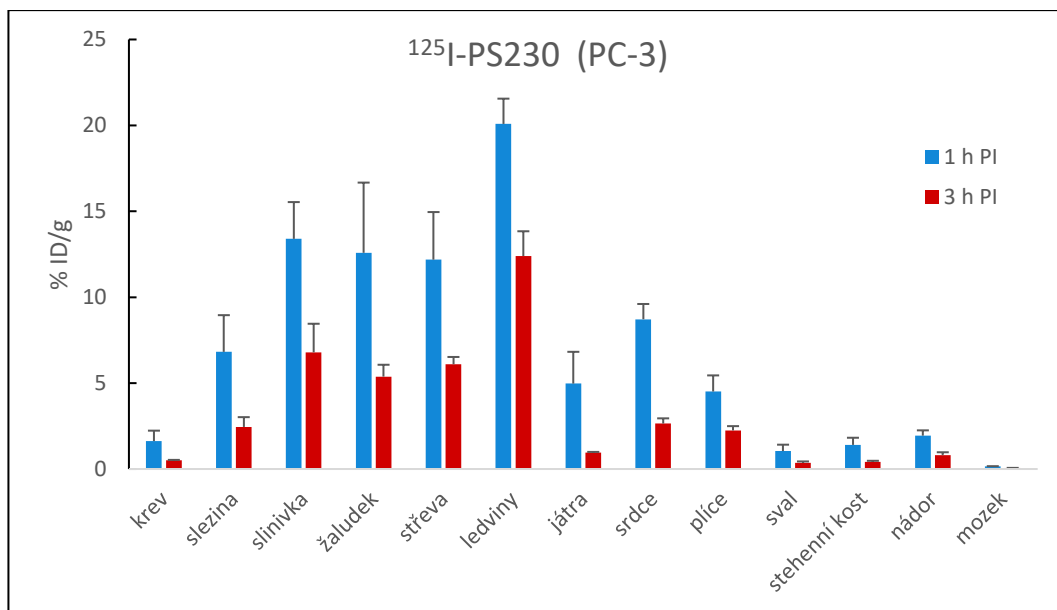
Graf 6. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS222 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



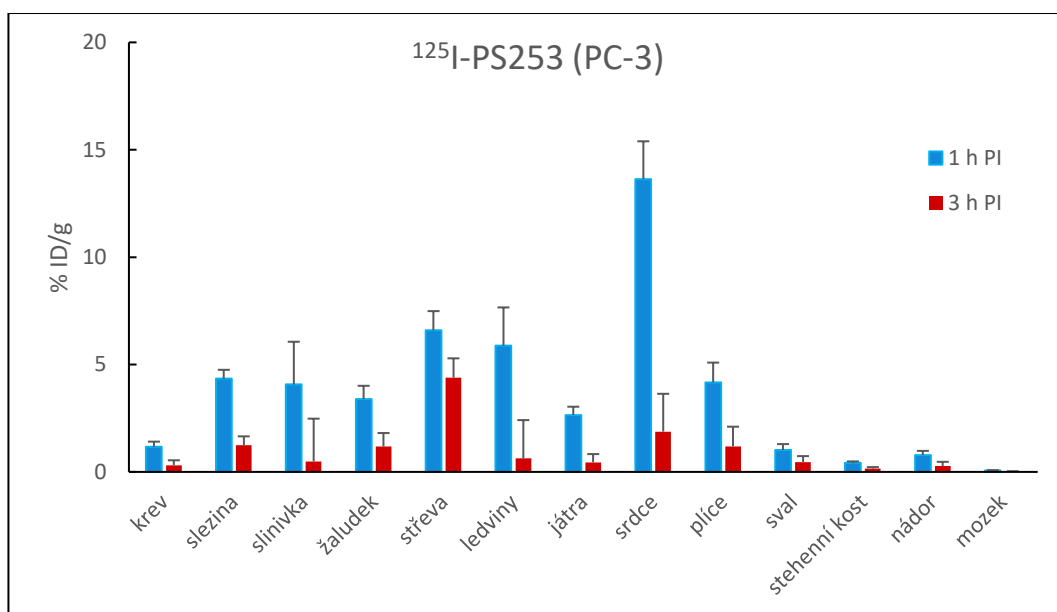
Graf 4. *Ex vivo* biodistribuce ^{123}I -PS229 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem U-87 MG po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od aplikace dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



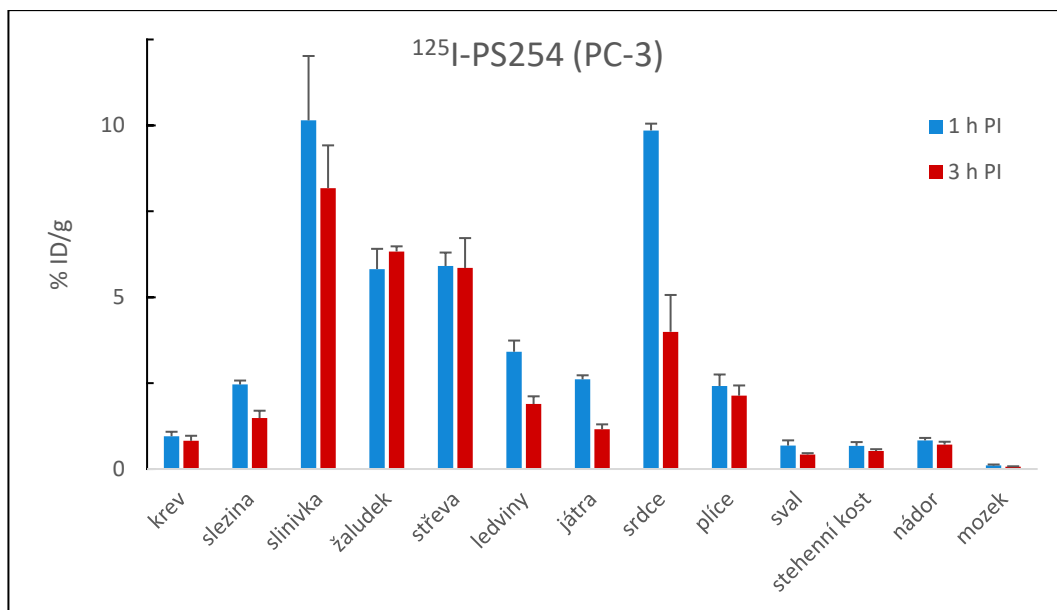
Graf 7. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS229 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



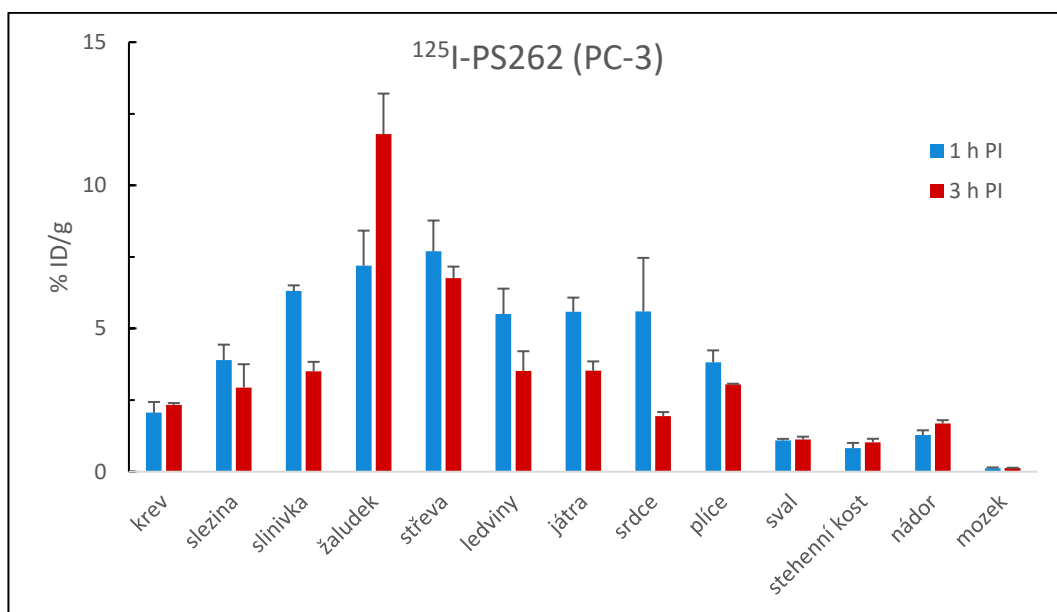
Graf 8. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS230 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



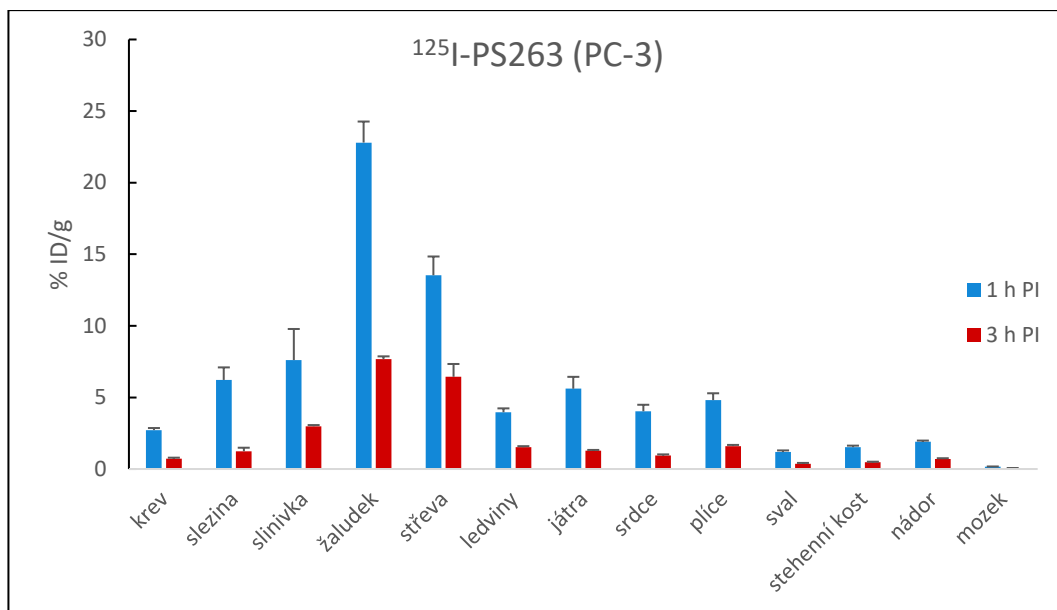
Graf 9. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS253 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



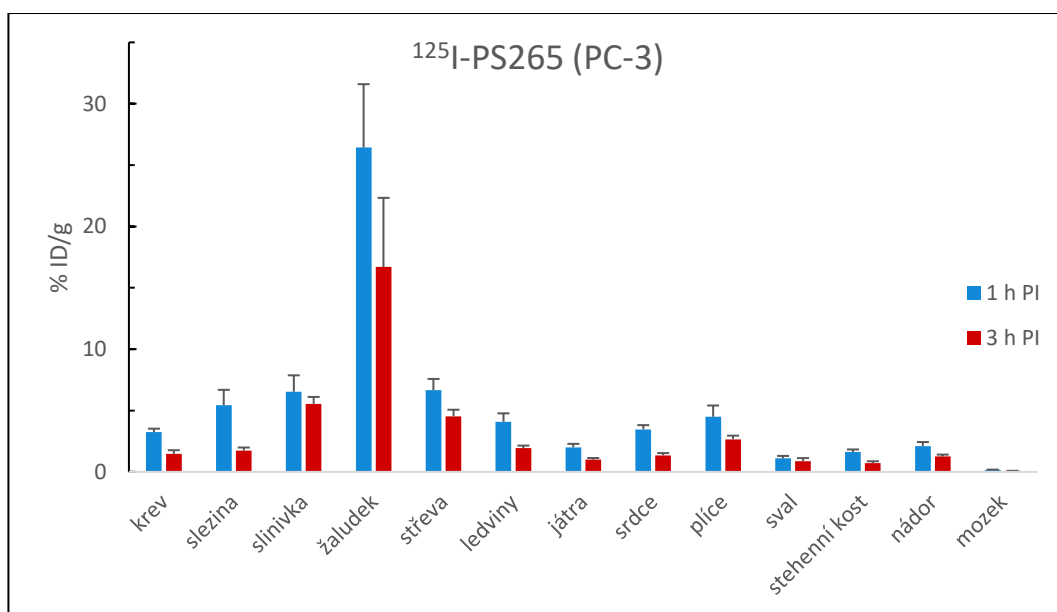
Graf 10. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS254 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



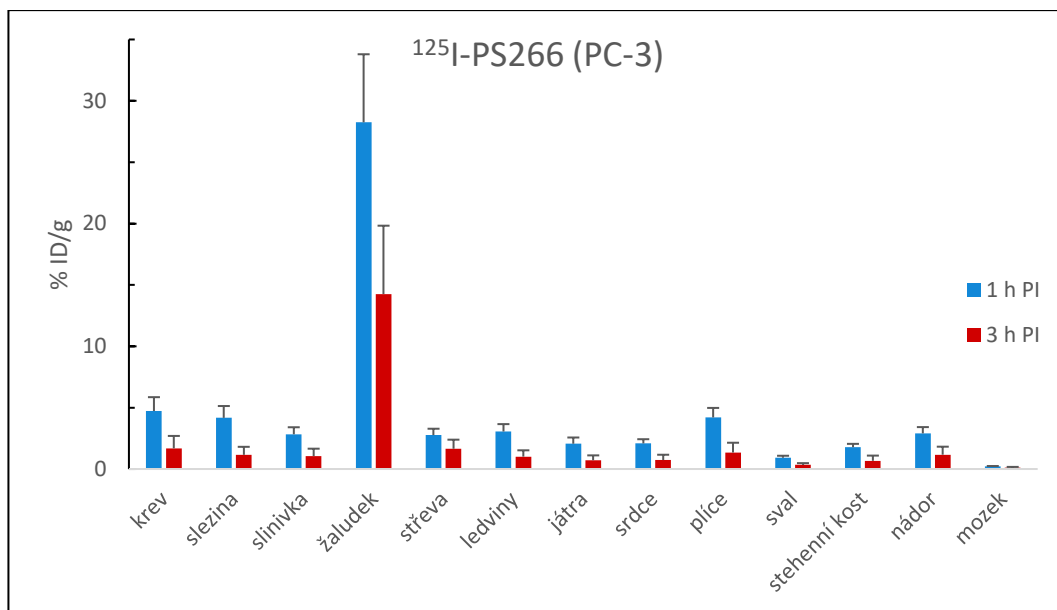
Graf 11. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS262 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



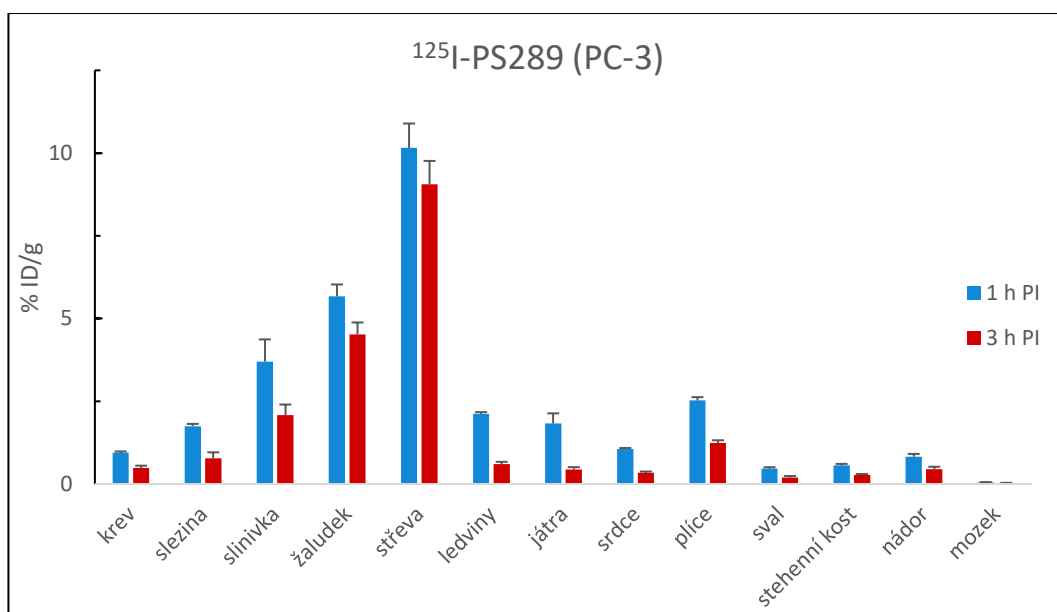
Graf 12. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS263 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



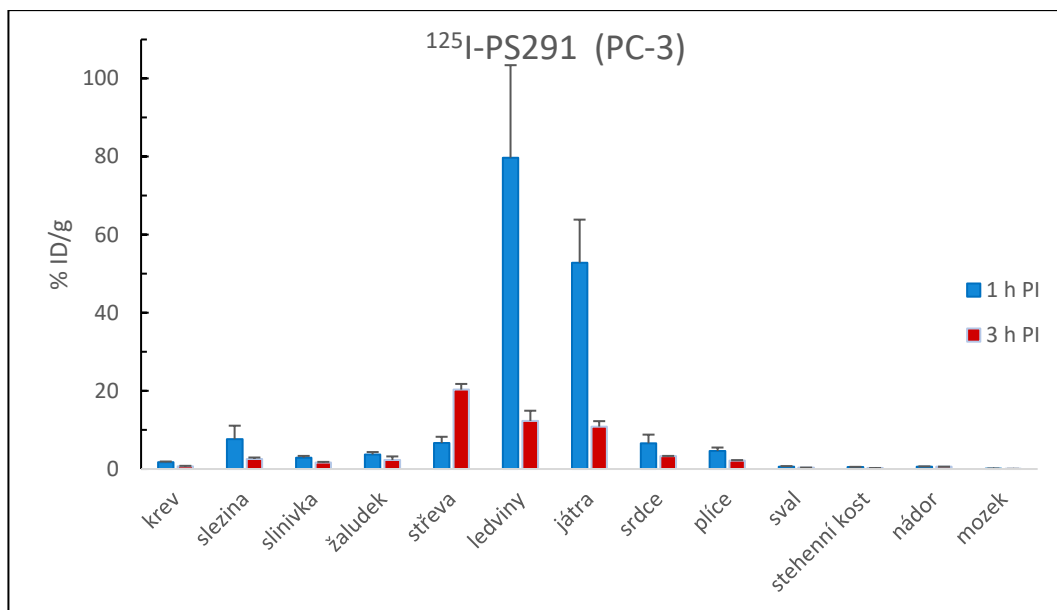
Graf 13. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS265 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



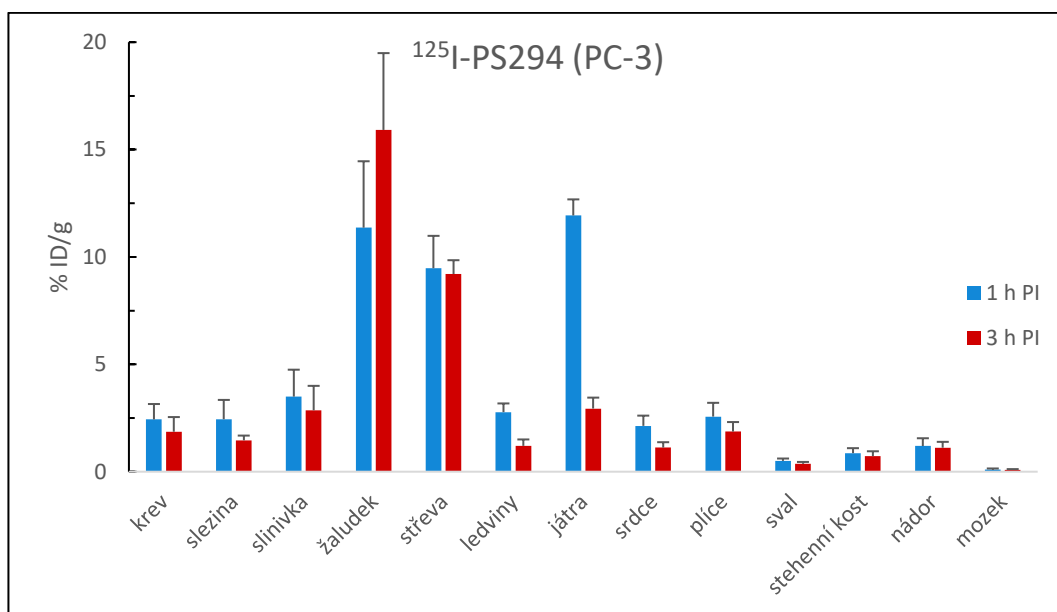
Graf 14. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS266 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



Graf 15. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS289 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.

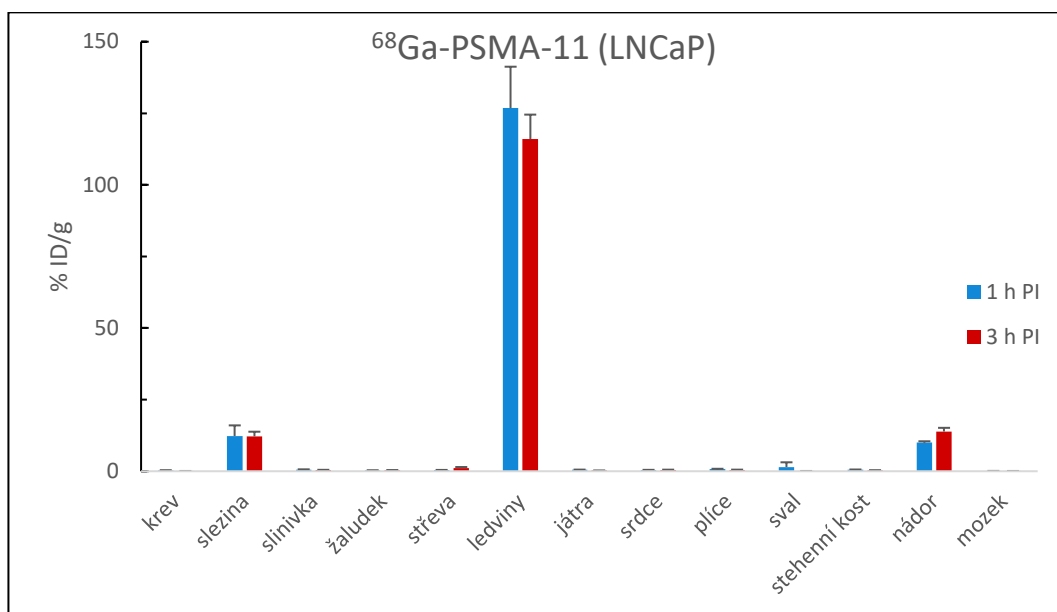


Graf 16. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS291 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



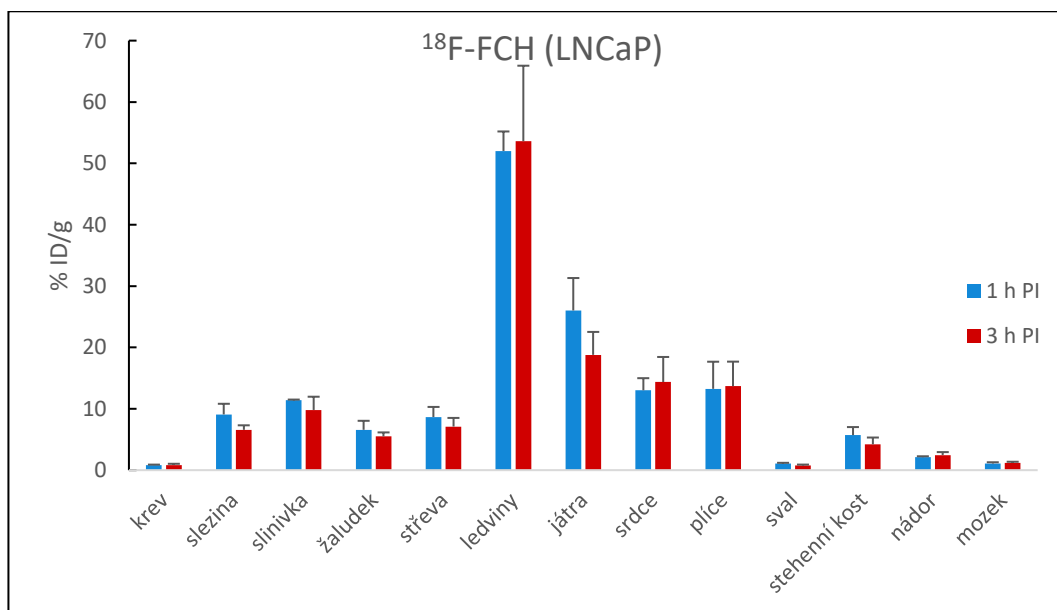
Graf 17. *Ex vivo* biodistribuce ^{125}I -PS294 v jednotlivých orgánech myšího modelu SCID s nádorem PC-3 po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.

4.3.2. ^{68}Ga -PSMA-11

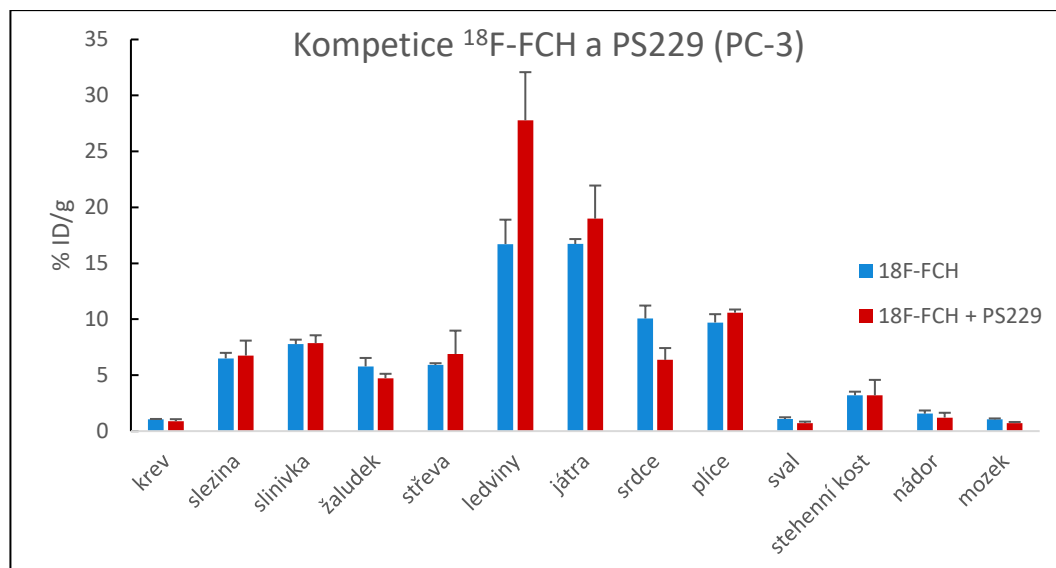


Graf 18. *Ex vivo* biodistribuce ^{68}Ga -PSMA-11 v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem LNCaP po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.

4.3.3. ^{18}F -FCH



Graf 19. *Ex vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem LNCaP po 1 (3 myši) a 3 hodinách (3 myši) od podání dávky. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou.



Graf 20. Kompetice ^{18}F -FCH a PS229. *Ex vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH (3 myši, 3 h PI) a ^{18}F -FCH + PS229 (3 myši, 3 h PI; premedikace 1 mg PS229 1 h před podáním ^{18}F -FCH) v jednotlivých orgánech myšního modelu SCID s nádorem PC-3. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou. Výrazný rozdíl: ledviny, srdce, mozek.

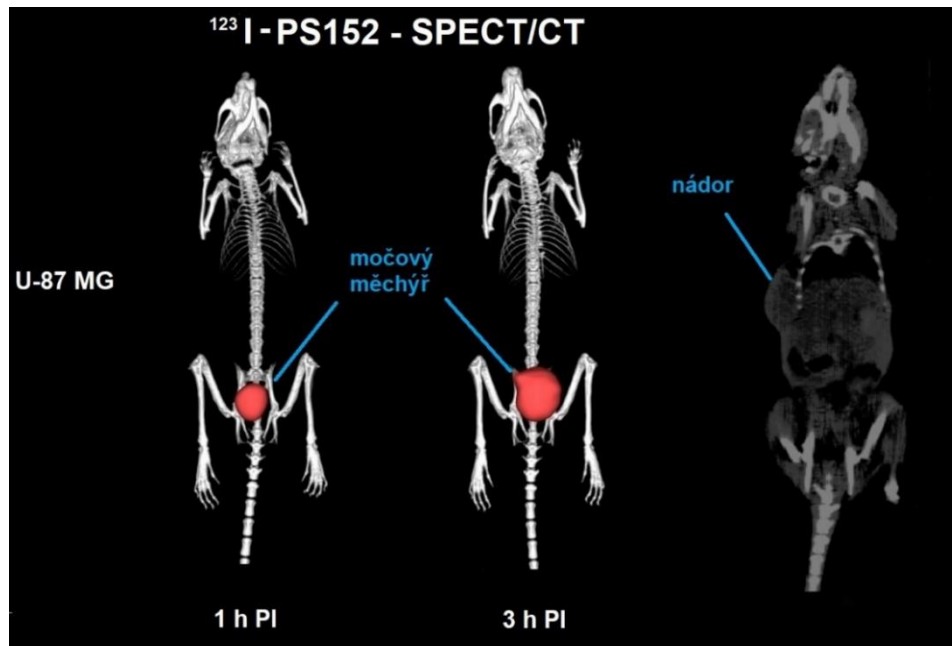
4.3.4. Poměr nádor/krev (% ID/g)

Tab. 6. Hodnoty poměru nádor/krev (% ID/g) jednotlivých testovaných radiofarmak po 1 a 3 hodinách od podání dávky získané z dat *ex vivo* distribučních studií. Červeným písmem jsou vyznačeny analogy cholinu s podobnými nebo lepšími hodnotami v porovnání s ^{18}F -FCH.

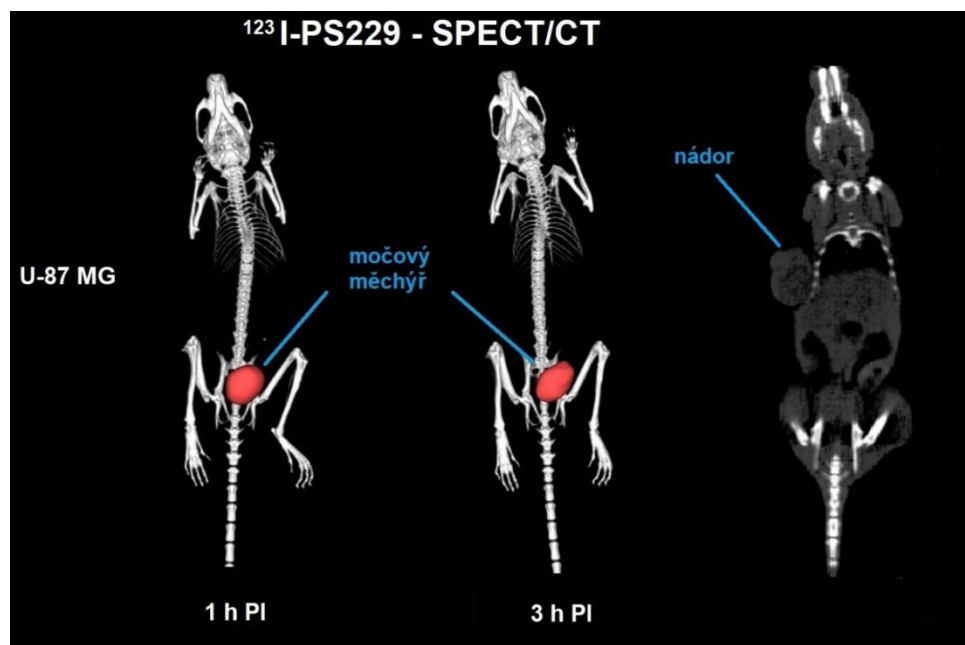
testovaná látka	typ nádoru	nádor/krev		testovaná látka	typ nádoru	nádor/krev	
		1 h PI	3 h PI			1 h PI	3 h PI
^{18}F -FCH	PC-3	-	1,47	^{125}I -PS263	PC-3	0,70	0,96
^{125}I -PS182	PC-3	0,72	0,72	^{125}I -PS265	PC-3	0,65	0,86
^{125}I -PS222	PC-3	0,5	0,86	^{125}I -PS266	PC-3	0,61	0,69
^{125}I -PS229	PC-3	1,13	2,44	^{125}I -PS289	PC-3	0,87	0,92
^{123}I -PS229	U-87 MG	1,58	4,16	^{125}I -PS291	PC-3	0,35	0,83
^{125}I -PS230	PC-3	1,19	1,59	^{125}I -PS294	PC-3	0,49	0,60
^{125}I -PS253	PC-3	0,67	0,90	^{68}Ga -PSMA-11	LNCaP	38,40	186,14
^{125}I -PS254	PC-3	0,87	0,86	^{18}F -FCH	LNCaP	2,54	2,93
^{125}I -PS262	PC-3	0,62	0,72	^{18}F -FCH + PS229	PC-3	-	1,37

4.4. Biodistribuce *in vivo* (PET/SPECT/CT)

4.4.1. SPECT/CT zobrazování ^{123}I -PS152 a ^{123}I -PS229 (nádor U-87 MG)

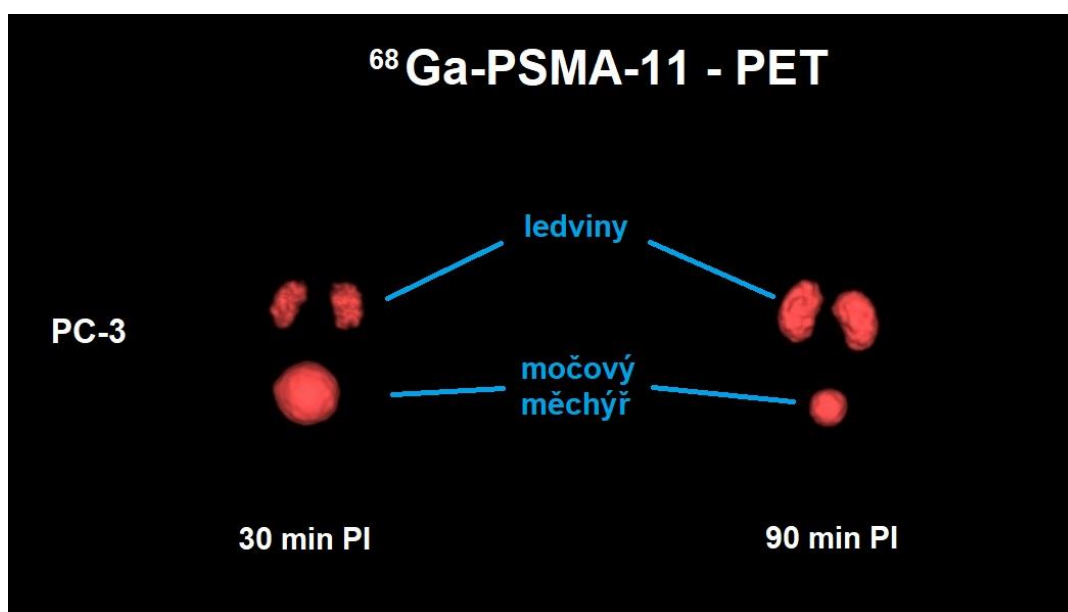


Obr. 22. *In vivo* biodistribuce ^{123}I -PS152 u myšího modelu SCID s nádorem U-87 MG (pravý bok) po 1 a 3 hodinách od podání dávky. Vpravo je zobrazen koronární řez (CT) s vyznačeným nádorem. Nastavení SPECT: single FOV 80, offset 40. Nastavení CT: bed good Hd/Hv 110 min, offset 30. Váha myši: 25,7 g.



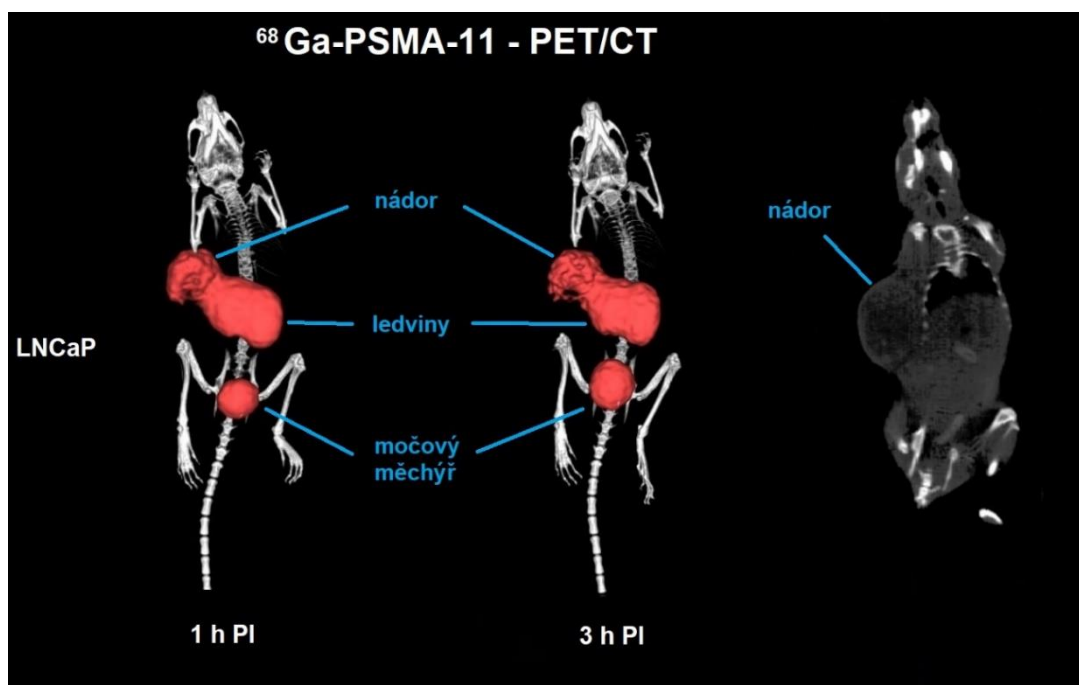
Obr. 23. *In vivo* biodistribuce ^{123}I -PS229 u myšího modelu SCID s nádorem U-87 MG (pravý bok) po 1 a 3 hodinách od podání dávky (3D snímky SPECT/CT). Vpravo je zobrazen koronární řez (CT) s vyznačeným nádorem. Nastavení SPECT: single FOV 80 min, offset 40. Nastavení CT: bed good Hd/Hv 110 min, offset 30. Váha myši: 25,8 g.

4.4.2. PET zobrazování ^{68}Ga -PSMA-11 (nádor PC-3)



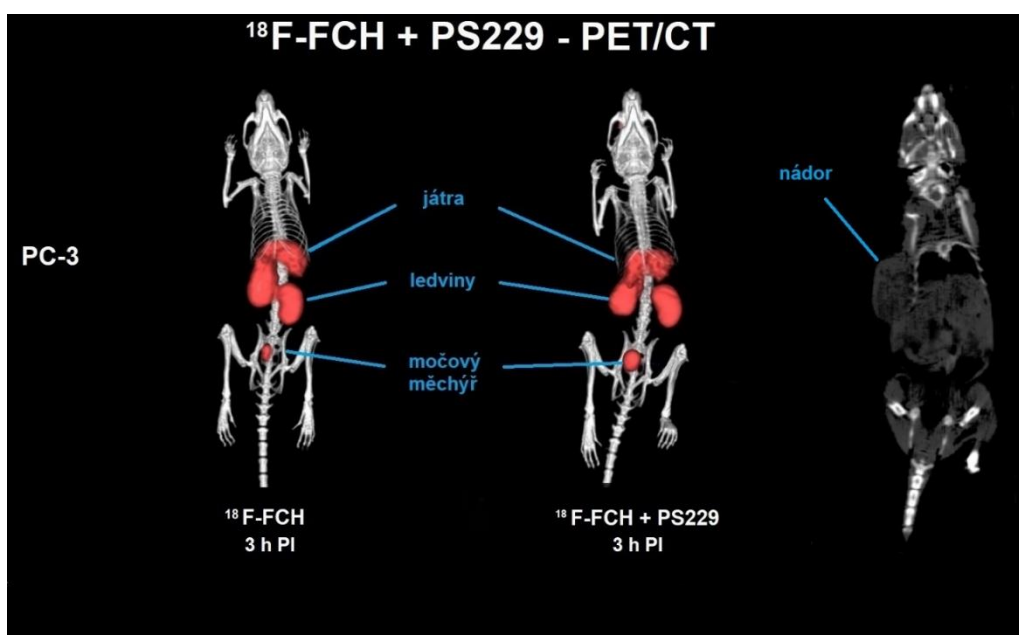
Obr. 24. *In vivo* biodistribuce ^{68}Ga -PSMA-11 u myšního modelu SCID s nádorem PC-3 (pravý bok) po 30 a 90 minutách od podání dávky (3D snímky PET). Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Váha myši: 23,2-28,2 g.

4.4.3. PET/CT zobrazování ^{68}Ga -PSMA-11 (nádor LNCaP)



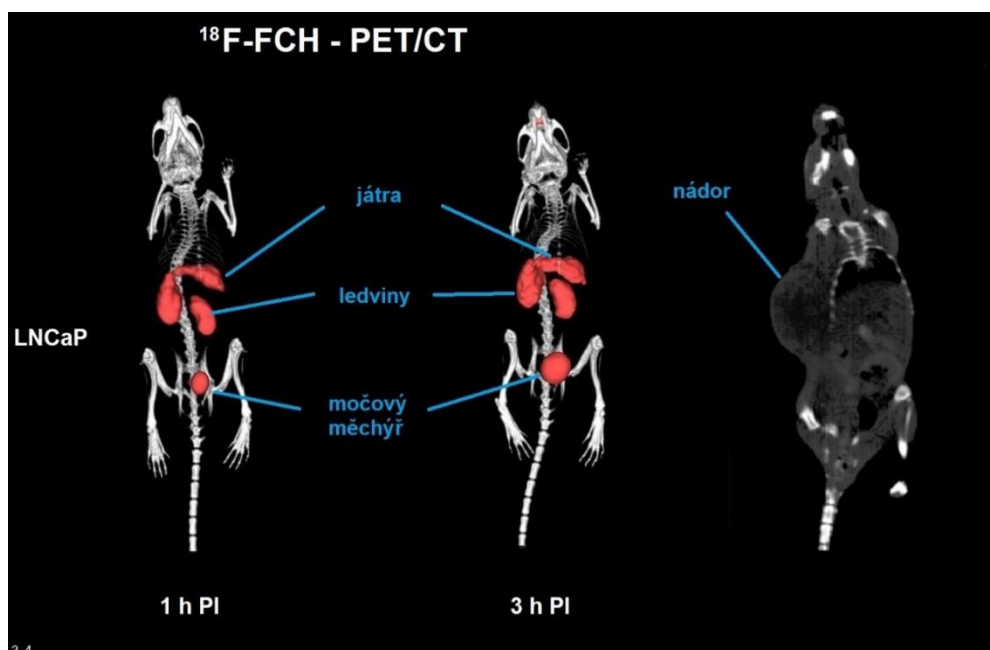
Obr. 25. *In vivo* biodistribuce ^{68}Ga -PSMA-11 u myšního modelu SCID s nádorem LNCaP (pravý bok) po 1 a 3 hodinách od podání dávky (3D snímky PET/CT). Vpravo je zobrazen koronární řez (CT) s vyznačeným nádorem. Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Nastavení CT: bed good Hd/Hv 110 min, offset 20. Váha myši: 18,2-20,1 g.

4.4.4. PET zobrazování – kompetice ^{18}F -FCH a PS229 (nádor PC-3)



Obr. 26. *In vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH a ^{18}F -FCH + premedikace PS229 (1 mg PS229 1 h před podáním ^{18}F -FCH) u myšního modelu SCID s nádorem PC-3 (pravý bok) po 3 hodinách od podání dávky (3D snímky PET/CT). Vpravo je zobrazen koronární řez (CT) s vyznačeným nádorem. Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Nastavení CT: bed good Hd/Hv 110 min, offset 20. Váha myši: 21-28 g.

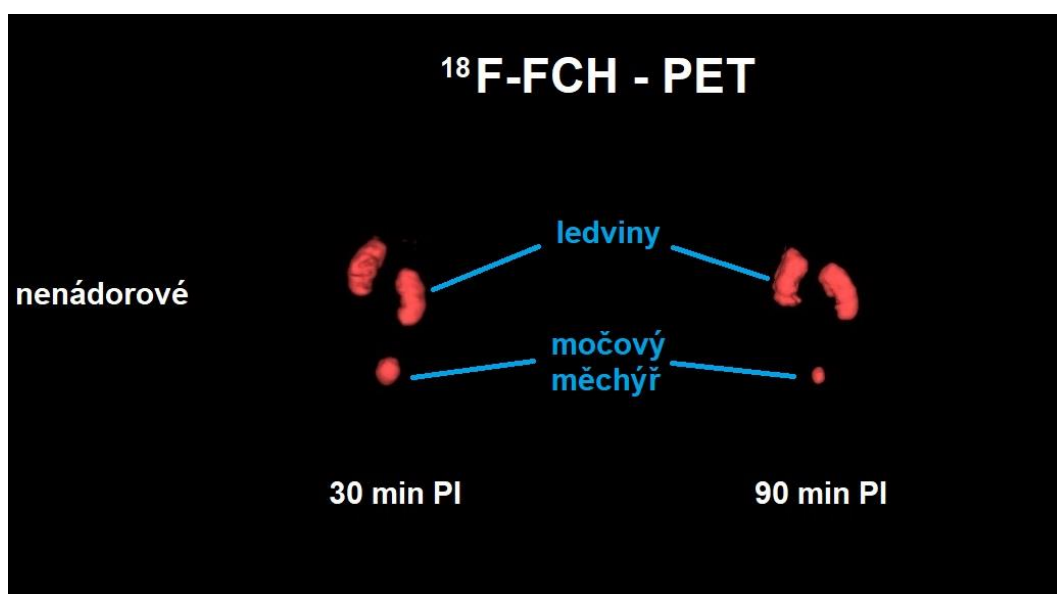
4.4.5. PET/CT zobrazování ^{18}F -FCH (nádor LNCaP)



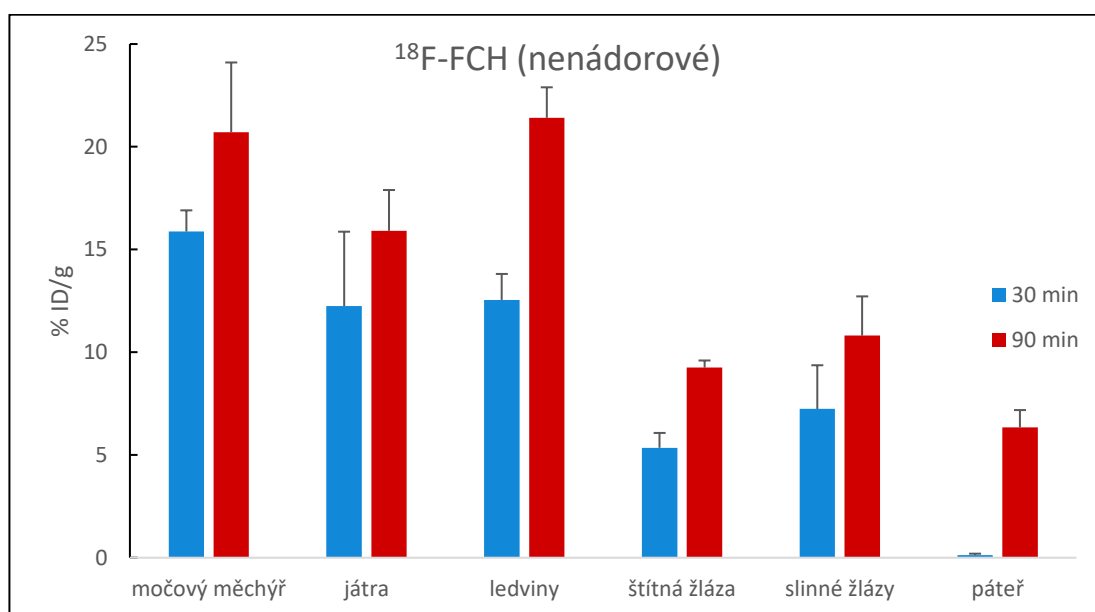
Obr. 27. *In vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH u myšního modelu SCID s nádorem LNCaP (pravý bok) po 1 a 3 hodinách od podání dávky (3D snímky (PET/CT)). Vpravo je zobrazen koronární řez (CT) s vyznačeným nádorem. Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Nastavení CT: bed good Hd/Hv 110 min, offset 20.

Váha myši: 18,2-20,1 g.

4.4.6. PET zobrazování ^{18}F -FCH (nenádorové) + kvantifikace



Obr. 28. *In vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH u nenádorových SCID myší po 30 a 90 minutách od podání dávky (3D snímky PET). Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Váha myší: 25,2-28 g.



Graf 21. *In vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH v jednotlivých orgánech nenádorových SCID myší (3) po 30 a 90 minutách od podání dávky. Kvantifikace byla provedena pomocí PET v programu PMOD (VOI – volume of interest). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetické průměry procenta podané dávky na gram orgánu (% ID/g) s uvedenou kladnou směrodatnou odchylkou. Nastavení PET: single 10 min, offset 0. Váha myší: 25,2-28 g.

5. Diskuze

V rámci experimentální části této diplomové práce bylo pomocí *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* experimentů zjištěno, zda jsou nová analoga cholinu (radioaktivně značená jodem) vhodná jako radiofarmaka pro diagnostiku karcinomu prostaty. Testování byla podrobena i v klinikách již používaná radiofarmaka ^{18}F -FCH a ^{68}Ga -PSMA-11, aby bylo možné porovnat výsledky.

In vitro testování bylo provedeno s ^{68}Ga -PSMA-11, v současné době nejmodernějším radiofarmakem pro diagnostiku/terapeutiku karcinomu prostaty. Nejprve byly stanoveny optimální podmínky pro radioaktivní značení ($5\mu\text{l}$ PSMA-11, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 5 minut), které se lišily od hodnot uvedených v literatuře (Wang et al. 2018) pouze v teplotě ($95\text{ }^\circ\text{C}$). Poté byly provedeny testy stability v různých prostředích, které ukázaly vysokou stabilitu ^{68}Ga -PSMA-11 v lidské plazmě a prostředí zvýšeného pH i po 120 minutách inkubace ($37\text{ }^\circ\text{C}$). Stabilita v prostředí konkurenčního chelátoru (DTPA) byla ovlivněna jen mírně a v prostředí nadbytku konkurenčního kovu (FeCl_3) byla pozorována výrazná nestabilita komplexu ^{68}Ga -PSMA-11. Byla stanovena také vazba na proteiny (kolem 30 %), kterou teplota v inkubátoru $37\text{ }^\circ\text{C}$ zvýšila o $\pm 5\%$ a doba inkubace neměla vliv. Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda prokázal hydrofilní charakter ^{68}Ga -PSMA-11, který je vhodný pro transport v krvi. Poslední *in vitro* testování s ^{68}Ga -PSMA-11 bylo stanovení akumulace v buněčných liniích PC-3, LNCaP a BJ (negativní kontrola). Nejvyšší akumulaci ^{68}Ga -PSMA-11 vykazovala linie LNCaP, a proto byla použita pro *in vivo* testování. Nejvyšší akumulaci ^{68}Ga -PSMA-11 v linii LNCaP ukazují i výsledky Wang et al. (2018) nebo Price et al. (2002). Vyšší akumulace ^{68}Ga -PSMA-11 v buněčné linii LNCaP je způsobena vyšší expresí mRNA pro PSMA (Laider et al. 2005).

In vitro testování analog cholinu bylo provedeno formou kompetiční studie s ^3H -cholinem na linii PC-3. Výsledky byly vyjádřeny jako hodnota IC50, která společně s ADME testy (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece) rozhodla, zda je testovaná látka vhodná pro *in vivo* studie. Čím nižší byla hodnota IC50, tím byl analog účinnější ve vytěšňování ^3H -cholinu při akumulaci v buňkách PC-3. Celkově byla zjištěna hodnota IC50 pro 32 analog cholinu, z nichž 11 mělo výsledky srovnatelné s ^{18}F -FCH (viz Tab. 5.). Naměřená hodnota IC50 ^{18}F -FCH = 3×10^{-6} mol/l byla srovnatelná s hodnotou IC50 neznačeného cholinu = $7,3 \times 10^{-6}$ mol/l, kterou v literatuře uvádí Müller et al. (2009).

Další fází testování byly *ex vivo* biodistribuční studie na myším modelu SCID. Cílem bylo zjistit akumulaci testovaných látek v jednotlivých orgánech (zejména v nádoru) po 1 a 3 hodinách od podání dávky (PC-3, LNCaP a U-87 MG). Testována byla radiofarmaka ^{68}Ga -PSMA-11, ^{18}F -FCH a analoga cholinu značená jodem (^{125}I , ^{123}I). Míra akumulace v nádorové tkáni byla vyjádřena jako poměr akumulace nádor/krev (% podané dávky na gram) a výsledky byly porovnány mezi sebou (viz Tab. 6.). Nejlepší výsledky akumulace nádor/krev mělo radiofarmakum ^{68}Ga -PSMA-11 (LNCaP), u kterého byla naměřena vysoká akumulace v ledvinách, a dále jen v nádoru a slezině, což je důsledkem vysoké afinity ^{68}Ga -PSMA-11 k PSMA, jehož zvýšená exprese je specifická zejména pro karcinom prostaty (Silver et al. 1997). S vysokým rozdílem mělo druhé nejlepší výsledky akumulace nádor/krev radiofarmakum ^{18}F -FCH (LNCaP). V modelu PC-3 byla akumulace nádor/krev ^{18}F -FCH o polovinu nižší než u modelu LNCaP. *Ex vivo* biodistribuce ^{18}F -FCH odpovídala výsledkům *in vivo* biodistribuce (u lidských pacientů) uvedených v literatuře (Price et al. 2002). Potvrdilo se, že je ^{18}F -FCH distribuován z krevního oběhu nejvíce do ledvin a jater, kde se drží i po 3 hodinách od podání dávky, což v praxi u lidských pacientů limituje maximální aktivitu podané dávky (Degrado et al. 2002). Biodistribuce analog cholinu se lišila v závislosti na chemickém složení látky. Porovnáním akumulace mezi 1 a 3 hodinami působení ukázalo, že se nová analoga cholinu vylučují z ledvin rychleji než ^{18}F -FCH. Byla u nich však zaznamenána obecně vyšší akumulace ve slinivce, žaludku a střevech. Všechna analoga cholinu značená ^{125}I byla testována na PC-3 modelu a pouze analoga ^{125}I -PS229 a ^{125}I -PS230 ukázala srovnatelné výsledky akumulace nádor/krev ve srovnání s ^{18}F -FCH (PC-3).

Na základě výsledků *ex vivo* biodistribuce byl jako nejlepší kandidát pro *in vivo* zobrazování zvolen analog cholinu PS229 značený ^{123}I (lepší zobrazovací vlastnosti oproti ^{125}I). Pomocí SPECT/CT byl získán 3D snímek a byla posouzena distribuce ^{123}I -PS229 v těle laboratorní myši SCID tentokrát s nádorem U-87 MG (glioblastom). Tato buněčná linie není odvozena od karcinomu prostaty, ale je charakteristická expresí cholinových transportérů (Li et al. 2013). Detekce nádoru však byla neúspěšná, stejně jako u dalšího zvoleného kandidáta ^{123}I -PS152. U obou látek byla na snímcích zobrazena převládající akumulace v močovém měchýři. Nádor se nepodařilo vizualizovat i pomocí v klinice používaného radiofarmaka ^{18}F -FCH (LNCaP, PC-3). Snímky PET/CT s ^{18}F -FCH ukázaly převládající akumulaci v ledvinách, močovém měchýři a játrech. Ve své bakalářské práci (2014) se Hana Adámková snažila o zobrazování glioblastomu (U-87 MG) pomocí ^{18}F -FCH a také nezaznamenala úspěch. Ebenhan et al. (2009)

testovali zobrazování ^{18}F -FCH na několika myších nádorových modelech (včetně DU-145) a došli k závěru, že je ^{18}F -FCH nevhodný pro zobrazování nádorů u zvířat kvůli velmi slabé detekci nádorů, což se naší studií potvrdilo.

Byla studována také kompetice ^{18}F -FCH a PS229 (*ex vivo* a *in vivo*), kdy se po 3 hodinách od podání dávky sledoval rozdíl mezi biodistribucí samotného ^{18}F -FCH a biodistribucí ^{18}F -FCH s premedikací PS229 (1 hod. před podáním ^{18}F -FCH). Experiment byl proveden na buněčné linii PC-3 (nádor opět nezobrazen). Výsledky *ex vivo* ukázaly výrazný rozdíl u ledvin, srdce a mozku. Premedikace PS229 pozitivně ovlivnila akumulaci ^{18}F -FCH v ledvinách a naopak snížila akumulaci ^{18}F -FCH v srdci a mozku.

Pro srovnání s *ex vivo* daty byla provedena také kvantifikace ^{18}F -FCH *in vivo* (PET data) v tkáních s nejvyšší akumulací u nenádorového modelu. Výsledky ukázaly, že kromě močového měchýře, jater a ledvin se ^{18}F -FCH akumuluje v menší míře také ve štítné žláze, slinných žlázách a v páteři (po 90 minutách od podání dávky).

Nádor se podařilo zobrazit pouze pomocí ^{68}Ga -PSMA-11 na modelu LNCaP metodou PET/CT. Nádor byl detekován na 3D snímcích po 1 i 3 hodinách od podání dávky. Akumulace ^{68}Ga -PSMA-11 byla zobrazena také v ledvinách a močovém měchýři. Z naměřených dat vyplývá, že je komplex ^{68}Ga -PSMA-11 v těle stabilní a vylučuje se pomocí ledvin. Zobrazení ^{68}Ga -PSMA-11 na modelu PC-3 nebylo úspěšné kvůli nízké expresi PSMA v buněčné linii PC-3.

Získaná data ukazují, že vybraní kandidáti analog cholinu mají srovnatelné výsledky s ^{18}F -FCH. V porovnání s ^{68}Ga -PSMA-11 je však jejich účinnost nízká.

Pro další *in vivo* zobrazování nových analog cholinu na myších modelech by bylo možné vyzkoušet detekci aktivity pomocí kolimátorů s více otvory, které zajišťují vyšší citlivost. Pro vylepšení kontrastu nádor/pozadí *in vivo* PET/SPECT/CT zobrazování analog cholinu by mohla být předmětem dalšího zkoumání uměle vyvolaná zvýšená exprese transportérů cholinu, které jsou exprimovány v testovaných buněčných liniích.

6. Závěr

Tato práce se zabývala preklinickým testováním nových analog cholinu značených jodem pro potenciální využití v diagnostice karcinomu prostaty pomocí SPECT/PET/CT zobrazování. Analoga cholinu byla podrobena *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo* testování a výsledky byly porovnány s v klinice již používanými radiofarmaky ^{68}Ga -PSMA-11 a ^{18}F -FCH.

Ze všech testovaných analog cholinu byly PS229 a PS152, na základě *in vitro* (IC50) a *ex vivo* výsledků (biodistribuce) srovnatelných s ^{18}F -FCH, zvoleny jako nejlepší kandidáti pro *in vivo* zobrazování na myším modelu SCID. Vizualizace nádorů pomocí těchto analog cholinu nebyla úspěšná (U-87 MG), stejně jako pomocí radiofarmaka ^{18}F -FCH (LNCaP, PC-3). Pro lepší vizualizaci by byla nutná vyšší citlivost detekce $\mu\text{PET/SPECT/CT}$ systému.

Úspěšná vizualizace nádoru (LNCaP) pomocí *in vivo* zobrazování se podařila pouze za použití radiofarmaka ^{68}Ga -PSMA-11, které je v současnosti nejlepší volbou v diagnostice/terapii pokročilého stádia karcinomu prostaty. Byla zaznamenána vysoká stabilita i specifická ^{68}Ga -PSMA-11.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ACCORSI, R. Brain Single-Photon Emission CT Physics Principles. American Journal of Neuroradiology, 2008, 29(7), 1247.

ADÁMKOVÁ, H. Zobrazování myšního modelu glioblastoma multiforme pomocí PET/CT systému. Olomouc, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

BALIK, M. M. AND M. M. BRODAK Lokalizovany karcinom prostaty - diagnostika a lecba. Urologie pro praxi, 2011, 12(2), 105-110.

BARWICK, T. PET/CT imaging in prostate cancer. Cancer Imaging, 2015, 15(Suppl 1), O15.

BEHESHTI, M., R. HAIM S FAU - ZAKAVI, M. ZAKAVI R FAU - STEINMAIR, P. STEINMAIR M FAU - WALDENBERGER, et al. Impact of 18F-choline PET/CT in prostate cancer patients with biochemical recurrence: influence of androgen deprivation therapy and correlation with PSA kinetics. The Journal of Nuclear Medicine, 2013, 54(6), 833-840.

BEHESHTI, M., A. REZAEI, H. GEINITZ, W. LOIDL, et al. Evaluation of Prostate Cancer Bone Metastases with 18F-NaF and 18F-Fluorocholine PET/CT. The Journal of Nuclear Medicine, 2016, 57, 55S-60S.

BOUCHELOUCHE, K., S. T. TAGAWA, S. J. GOLDSMITH, B. TURKBAY, et al. PET/CT Imaging and Radioimmunotherapy of Prostate Cancer. Seminars in nuclear medicine, 2011, 41(1), 29-44.

BUHMEIDA, A., S. PYRHÖNEN, M. LAATO AND Y. COLLAN Prognostic factors in prostate cancer. Diagnostic Pathology, 2006, 1, 4.

CHALLAPALLI, A., W. A. SHARMA R FAU - HALLETT, K. HALLETT WA FAU - KOZLOWSKI, L. KOZLOWSKI K FAU - CARROLL, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of deuterium-substituted 18F-fluoromethyl-[1, 2-2H4]choline in healthy volunteers. The Journal of Nuclear Medicine, 2014, 55(2), 256-263.

CHEN, F.-Z. AND X.-K. ZHAO Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. Iranian Red Crescent Medical Journal, 2013, 15(4), 279-284.

CHRISTINA, A., SCHNITZER, J. E., Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging. Int J Nanomedicine. 2010, 5, 653-659.

COOPERBERG, M. R. AND J. M. CHAN Epidemiology of prostate cancer. World Journal of Urology, 2017, 35(6), 849-849.

CUCCURULLO, V., G. D. DI STASIO AND L. MANSI Nuclear Medicine in Prostate Cancer: A New Era for Radiotracers. World journal of nuclear medicine, 2018, 17(2), 70-78.

CUNNINGHAM, D. AND Z. YOU In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. Journal of Biological Methods, 2015, 2(1), e17.

CUZICK, J., M. A. THORAT, G. ANDRIOLE, O. W. BRAWLEY, et al. Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. The Lancet. Oncology, 2014, 15(11), e484-e492.

- DANIYAL, M., Z. A. SIDDIQUI, A. M., H. M. ASIF, et al. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(22), 9575-9578.
- DEGRADO, T. R., R. E. COLEMAN, S. WANG, S. W. BALDWIN, et al. Synthesis and evaluation of 18 F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: initial findings in prostate cancer. *Cancer Res*, 2001, 2001, 61.
- DEGRADO, T. R., R. E. REIMAN, D. T. PRICE, S. WANG AND R. E. COLEMAN Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry of 18F-Fluorocholine. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2002, 43(1),92-96.
- DEHN, T. Prostate Cancer Treatment. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 2006, 88(5), 439-444.
- EBENHAN, T., M. HONER, S. M. AMETAMEY, P. A. SCHUBIGER, et al. Comparison of 18F- tracers in various experimental tumor models by PET Imaging and Identification of an early response biomarker for the novel microtubule stabilizer patupilone. *Molecular Imaging and Biology*, 2009, 11, 308-321.
- EDER, M., M. EISENHUT, J. BABICH AND U. HABERKORN PSMA as a target for radiolabelled small molecules. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2013, 40(6), 819-823.
- FAGONE, P. AND S. JACKOWSKI Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, 1831(3), 523-532.
- FARWELL, M. D., D. A. PRYMA AND D. A. MANKOFF PET/CT imaging in cancer: Current applications and future directions. *Cancer*, 2014, 120(22), 3433-3445.
- FERDINANDO, C., G. GIANPASQUALE AND C. ORAZIO SCHILLACI AND GIUSEPPE LUCIO Bio-Distribution, Imaging Protocols and Diagnostic Accuracy of PET with Tracers of Lipogenesis in Imaging Prostate Cancer: a Comparison between 11C-Choline, 18FFluoroethylcholine and 18F-Methylcholine. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21(32), 4738-4747.
- FRANC, B. L., C. ACTON PD FAU - MARI, B. H. MARI C FAU - HASEGAWA AND B. H. HASEGAWA Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *Journal of Nuclear Medicine*, 2008, 49(10), 1651-1663.
- FRIGERIO, B., G. FRANSSSEN, E. LUISON, A. SATTA, et al. Full preclinical validation of the 123I-labeled anti-PSMA antibody fragment ScFvD2B for prostate cancer imaging. *Oncotarget*, 2016, 8(7), 10919-10930.
- GAO, H., J. M. KORN, S. FERRETTI, J. E. MONAHAN, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nature Medicine*, 2015, 21, 1318.
- GOPINATHAN, A. AND D. A. TUVESON The use of GEM models for experimental cancer therapeutics. *Disease models & mechanisms*, 2008, 1(2-3), 83-86.
- GRAY, P. J. AND J. A. EFSTATHIOU Proton Beam Radiation Therapy for Prostate Cancer—Is the Hype (and the Cost) Justified? *Current Urology Reports*, 2013, 14(3), 199-208.
- GRIFFETH, L. K. Use of PET/CT scanning in cancer patients: technical and practical considerations. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 2005, 18(4), 321-330.

- GRÖNBERG, H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 2003, 361(9360), 859-864.
- GU, C. N., C. H. HUNT, V. T. LEHMAN, G. B. JOHNSON, et al. Benign fibrous dysplasia on [11C]choline PET: a potential mimicker of disease in patients with biochemical recurrence of prostate cancer. *Annals of Nuclear Medicine*, 2012, 26(7), 599-602.
- HARA, T. 18F-fluorocholine: a new oncologic PET tracer. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2001, 42(12), 1815-1817.
- HARA, T., H. KOSAKA N FAU - KISHI AND H. KISHI Development of (18)F-fluoroethylcholine for cancer imaging with PET: synthesis, biochemistry, and prostate cancer imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2002, 43(2), 187-199.
- HARA, T., N. KOSAKA N FAU - SHINOURA, T. SHINOURA N FAU - KONDO AND T. KONDO PET imaging of brain tumor with [methyl-11C]choline. *The Journal of Nuclear Medicine*, 1997, 38(6), 842-847.
- HELPAP, B. AND L. EGEVAD Modified Gleason grading. An updated review. *Histology and histopathology*, 2009, 24(5), 661-666.
- HENSLEY, P. J. AND N. KYPRIANOU Modeling prostate cancer in mice: limitations and opportunities. *Journal of andrology*, 2012, 33(2), 133-144.
- HOROSZEWICZ, J. S., S. S. LEONG, E. KAWINSKI, J. P. KARR, et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *American Association for Cancer Research*, 1983, 43(4), 1809-1818.
- HOU, X. AND W. DING. Chapter 46 - Isotopes of Iodine in Thyroid and Urine: Source, Application, Level and Determination. In V.R. PREEDY, G.N. BURROW AND R. WATSON eds. *Comprehensive Handbook of Iodine*. San Diego: Academic Press, 2009, 437-448.
- HSING, A. W. AND A. P. CHOKKALINGAM Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 2006, 11, 1388-1413.
- HUGHES, C., A. MURPHY, C. MARTIN, O. SHEILS, et al. Molecular pathology of prostate cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 2005, 58(7), 673-684.
- IGLESIAS-GATO, D., P. WIKSTRÖM, S. TYANOVA, C. LAVALLEE, et al. The Proteome of Primary Prostate Cancer. *European Urology*, 2016, 69(5), 942-952.
- INAZU, M. Coline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy, *Biopharm. Drug Dispos.*, 2014, 35, 431-449
- ITTMANN, M., J. HUANG, E. RADAELLI, P. MARTIN, et al. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*, 2013, 73(9), 2718-2736.
- KHALIL, M. M., J. L. TREMOLEDA, T. B. BAYOMY AND W. GSELL Molecular SPECT Imaging: An Overview. *International journal of molecular imaging*, 2011, 2011, 796025.
- KOLOMBO, I., M. PORSOVA, I. ZEMANOVA, et al. Prostatický specifický antigen (PSA) a digitální rektální vyšetření (DRE) v diagnostice karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi*, 2008, 9(2), 83-88.
- KOMURA, K., C. J. SWEENEY, T. INAMOTO, N. IBUKI, et al. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *International Journal of Urology*, 2017, 25(3), 220-231.

KORANDA, P., M. KAMÍNEK, J. PTÁČEK, M. MYSLIVEČEK, et al. Nukleární medicína. Edtion ed. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci., 2017.

KUDLACKOVA, S., F. ZATURA AND Z. TUDOS Cilena biopsie prostaty pomoci magneticke rezonance - 1. cast. Urologie pro praxi, 2017, 18(2), 69-72.

KWEE, S. A., T. R. DEGRADO, J. N. TALBOT, F. GUTMAN, et al. Cancer Imaging With Fluorine-18–Labeled Choline Derivatives. Seminars in Nuclear Medicine, 2007, 37(6), 420-428.

LAIDER, P., J. DULÍNSKA, M. LEKKA, J. LEKKI Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer line PC-3. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 435(1), 1-14.

LARSSON, S. A. Gamma camera emission tomography. Development and properties of a multi-sectional emission computed tomography system. Acta radiologica. Supplementum, 363, 1980, 1-75.

LÁZNÍČEK, M. AND P. KOMÁREK Základy radiofarmacie. Praha: Karolinum. 1998, 34-37.

LI, J., Y. GUO, Y. KUANG, S. AN, H. MA AND C. JIANG Choline transporter-targeting and co-delivery system for glioma therapy. Biomaterials, 2013, 34(36), 9142-9148.

MARTIN, N. E., L. A. MUCCI, M. LODA AND R. A. DEPINHO Prognostic Determinants in Prostate Cancer. Cancer journal (Sudbury, Mass.), 2011, 17(6), 429-437.

MCBRIDE, W. J., H. SHARKEY RM FAU - KARACAY, C. A. KARACAY H FAU - D'SOUZA, E. A. D'SOUZA CA FAU - ROSSI, et al. A novel method of 18F radiolabeling for PET. The Journal of Nuclear Medicine, 2009, 50(6), 991-998.

METTLER, F. A. AND M. J. GUIBERTEAU. 1 - Radioactivity, Radionuclides, and Radiopharmaceuticals. In F.A. METTLER AND M.J. GUIBERTEAU eds. Essentials of Nuclear Medicine Imaging (Sixth Edition). Philadelphia: W.B. Saunders, 2012, 1-21.

MÜLLER, A., K. HOLZAPFEL, CH. SEIDL, U. TREIBER, B. J. KRAUSE Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging., 2009, 36(9), 1434-1442.

NANNI, C., R. SCHIAVINA, S. BOSCHI, V. AMBROSINI, et al. Comparison of 18F-FACBC and 11C-choline PET/CT in patients with radically treated prostate cancer and biochemical relapse: preliminary results. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2013, 40(1), 11-17.

OH, J.-R. AND B.-C. AHN False-positive uptake on radioiodine whole-body scintigraphy: physiologic and pathologic variants unrelated to thyroid cancer. American journal of nuclear medicine and molecular imaging, 2012, 2(3), 362-385.

PARK, S. I., S. J. KIM, L. K. MCCAULEY AND G. E. GALLICK Pre-clinical mouse models of human prostate cancer and their utility in drug discovery. Current protocols in pharmacology, 2010, Chapter 14, Unit 14.15.

PASCALE, M., C. N. AZINWI, B. MARONGIU, G. PESCE, et al. The outcome of prostate cancer patients treated with curative intent strongly depends on survival after metastatic progression. BMC Cancer, 2017, 17, 651.

PRICE, D., R. COLEMAN, R. LIAO, C. ROBERTSON, T. POLASCIK AND T. DEGRADO Comparison of [18f]Fluorocholine and [18f]Fluorodeoxyglucose for Positron Emission

Tomography of Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, 2002, 168(1), 273-280.

RISBRIDGER, G. P., R. TOIVANEN AND R. A. TAYLOR Preclinical Models of Prostate Cancer: Patient-Derived Xenografts, Organoids, and Other Explant Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018, 8(8).

SAJJAD, M., BARS, E., NABI, H. A. Optimization of ^{124}I production via $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ reaction, *Applied Radiation and Isotopes*, 2006, 64 (9), 965-970.

SEEVERS, R. H., COUNSELL, R. E. Radioiodination techniques for small organic molecules, *Chem. Rev.*, 1982, 82(6), 575-590

SCHMITZ, J. The production of [^{124}I]iodine and [^{86}Y]yttrium. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2011, 38 (Suppl 1): 4-9.

SILVER, D. A., I. PELLICER, W.R. FAIR, W. D. W. HESTON AND C. CORDON-CARDO Prostate-specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. *Clinical Cancer Research*, 1997, 3(1), 81-85.

SOBEL, R. E. AND M. D. SADAR Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines - Part 1. *The Journal of Urology*, 2005, 173(2), 342-359.

SPICK, C., K. HERRMANN AND J. CZERNIN Evaluation of Prostate Cancer with ^{11}C -Acetate PET/CT. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2016, 57, 30S-37S.

SU, H.-C., Y. ZHU, G.-W. LING, S.-L. HU, et al. Evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled PSMA-SPECT/CT imaging in prostate cancer patients who have undergone biochemical relapse. *Asian Journal of Andrology*, 2017, 19(3), 267-271.

TAI, S., Y. SUN, J. M. SQUIRES, H. ZHANG, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 2011, 71(15), 1668-1679.

VALI, R., W. LOIDL, C. PIRICH, W. LANGESTEGGER, et al. Imaging of prostate cancer with PET/CT using (18)F-Fluorocholine. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2015, 5(2), 96-108.

VALKENBURG, K. C. AND B. O. WILLIAMS Mouse models of prostate cancer. *Prostate cancer*, 2011, 2011, 895238.

VAN AUDENHAEGE, K., R. VAN HOLEN, S. VANDENBERGHE, C. VANHOVE, et al. Review of SPECT collimator selection, optimization, and fabrication for clinical and preclinical imaging. *Medical physics*, 2015, 42(8), 4796-4813.

VAN DER VELDT, A., E. SMIT AND A. LAMMERTSMA Positron Emission Tomography as a Method for Measuring Drug Delivery to Tumors in vivo: The Example of [^{11}C]docetaxel. *Frontiers in Oncology*, 2013, 3, 208.

VELDSCHOLTE, J., C. RIS-STALPERS, G. G. J. M. KUIPER, G. JENSTER, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human INCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, 173(2), 534-540.

WANG, Y., G. SHAO, J. WU, et al. Preparation of ^{68}Ga -PSMA-11 with a Synthesis Module for Micro PET-CT Imaging of PSMA Expression during Prostate Cancer Progression. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 2018, 8046541.