

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Preklinický vývoj ^{68}Ga značených peptidů pro
zobrazování glioblastomu**

Bakalářská práce

Autor:	Jana Štěpánková
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.

O l o m o u c 2 0 1 5

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala samostatně pod odborným vedením PharmDr. Miloše Petříka, Ph.D. a že jsem uvedla veškeré použité literární a informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby byla má bakalářská práce zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování:

Předně bych ráda poděkovala PharmDr. Miloši Petříkovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za jeho vstřícnost, ochotu, cenné rady a připomínky. Rovněž děkuji Klinice nukleární medicíny FNOL za poskytnutí radiofarmak.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jana Štěpánková
Název práce:	Preklinický vývoj ^{68}Ga značených peptidů pro zobrazování glioblastomu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015

Abstrakt:

Tématem této bakalářské práce je testování peptidů značených radioaktivním izotopem ^{68}Ga pro potenciální využití k diagnostice multiformního glioblastomu (GBM) metodou pozitronové emisní tomografie. Multiformní glioblastom je nejčastěji se vyskytující a nejzávažnější typ mozkového nádoru. Včasná diagnostika a terapie mohou výrazně přispět ke zlepšení kvality a délky života osob s GBM. Některé ^{68}Ga značené peptidy se jeví jako potenciálně vhodná radiodiagnostika pro zobrazení glioblastomu. Vybrané ^{68}Ga značené peptidy jsem podrobila *in vitro* a *in vivo* testování. Výsledky *in vivo* experimentů jsem následně porovnávala s klinicky používanými radiofarmaky, konkrétně s ^{18}F -fluorodeoxyglukosou a ^{18}F -fluorothymidinem, a vyhodnotila jsem jejich potenciál pro radiodiagnostiku GBM.

Klíčová slova:	glioblastom, PET, CT, radiofarmaka, NODAGA-RGD dimer acetát, DOTA-substance P
Počet stran:	73
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jana Štěpánková

Title: Preclinical Development of ^{68}Ga Labelled Peptides for Glioblastoma Imaging

Type of thesis: Bachelor

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Supervisor: PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract:

The topic of this bachelor thesis is testing of peptides labelled with radioactive isotope ^{68}Ga for glioblastoma multiforme (GBM) imaging using positron emission tomography. Glioblastoma multiforme is the most common and serious type of brain tumor. Early diagnosis and therapy may significantly contribute to improve quality and length of life of people with GBM. Certain ^{68}Ga labelled peptides appears as potential radiodiagnostics for GBM imaging. Selected ^{68}Ga labelled peptides were tested *in vitro* and *in vivo*. The results of *in vivo* experiments were compared and evaluated with clinically used radiopharmaceuticals, namely ^{18}F -fluorodeoxyglucose and ^{18}F -fluorothymidine, and evaluated their potential for radiodiagnosis of GBM.

Keywords: glioblastoma multiforme, PET, CT, radiopharmaceuticals, NODAGA-RGD dimer acetate, DOTA-Substance P

Number of pages: 73

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1. Glioblastom.....	11
2.1.1. Zobrazovací metody pro diagnostiku GBM	12
2.1.1.1. Výpočetní tomografie	13
2.1.1.2. Magnetická rezonance.....	14
2.1.1.3. Pozitronová emisní tomografie	15
2.1.1.4. Jednofotonová emisní výpočetní tomografie	16
2.1.1.5. Hybridní systémy	17
2.1.2. Terapie GBM.....	18
2.2. Experimentální modely GBM.....	19
2.2.1. Buněčné linie glioblastomu	19
2.2.2. Zvířecí modely	20
2.3. Radiofarmaka.....	20
2.3.1. Radionuklidy	21
2.3.1.1. Typy radioaktivních přeměn	21
2.3.1.2. Výroba a získávání radionuklidů	22
2.3.1.3. Gallium-68	24
2.3.2. Experimentální radioaktivně značené látky pro diagnostiku GBM.....	25
2.3.2.1. RGD peptidy	25
2.3.2.2. Substance P	27
2.3.3. Klinicky používaná radiofarmaka pro diagnózu GBM	28
2.3.3.1. ¹⁸ F-fluorodeoxyglukosa.....	28
2.3.3.2. ¹⁸ F-fluorothymidin	28
3. Experimentální část	30
3.1. Cíle práce.....	30
3.2. Použité přístroje a chemikálie.....	30
3.3. Metodická část	31
3.3.1. Radioaktivní značení	31
3.3.2. Kontrola kvality značení.....	31
3.3.3. Testy stability	32
3.3.4. Rozdělovací koeficient.....	32
3.3.5. Vazba na proteiny.....	33
3.3.6. Testování <i>in vivo</i> stability v moči.....	33

3.3.7. PET/CT zobrazování laboratorních myší	33
3.3.8. <i>Ex vivo</i> biodistribuce laboratorních myší	34
3.4. Výsledky	35
3.4.1. NODAGA-RGD dimer acetát	35
3.4.1.1. Radioaktivní značení.....	35
3.4.1.2. Testy stability	36
3.4.1.3. Rozdělovací koeficient.....	36
3.4.1.4. Vazba na proteiny	36
3.4.1.5. Testování <i>in vivo</i> stability v moči	37
3.4.1.6. PET/CT zobrazování nenádorových myší	37
3.4.1.7. PET/CT zobrazování nádorových myší	39
3.4.1.8. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nenádorových myší.....	41
3.4.1.9. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nádorových myší	42
3.4.2. DOTA-substance P.....	43
3.4.2.1. Radioaktivní značení.....	43
3.4.2.2. Testy stability	45
3.4.2.3. Rozdělovací koeficient.....	45
3.4.2.4. Vazba na proteiny	45
3.4.2.5. Testování <i>in vivo</i> stability v moči	45
3.4.2.6. PET/CT zobrazování nenádorových myší	46
3.4.2.7. PET/CT zobrazování nádorových myší	48
3.4.2.8. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nenádorových myší.....	50
3.4.2.9. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nádorových myší	51
3.4.3. ¹⁸ F-fluorodeoxyglukosa	52
3.4.3.1. PET/CT zobrazování nenádorových myší	52
3.4.3.2. PET/CT zobrazování nádorových myší	54
3.4.3.3. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nenádorových myší.....	56
3.4.3.4. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nádorových myší	57
3.4.4. ¹⁸ F-fluorothymidin.....	58
3.4.4.1. PET/CT zobrazování nenádorových myší	58
3.4.4.2. <i>Ex vivo</i> biodistribuce u nenádorových myší.....	60
4. Diskuze	62
5. Závěr.....	66
6. Použitá literatura	70

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
BGO	germanát bismutu
CNS	centrální nervový systém
CT	výpočetní tomografie
DFO	desferrioxamin B
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
FDG	fluorodeoxyglukóza
FLT	fluorothymidin
fMR	funkční magnetická rezonance
GBM	multiformní glioblastom
GIT	gastrointestinální trakt
Gln	glutamin
Gly	glycin
GSO	gadolinium orthosilikát
HT	hnědý tuk
HU	Hounsfieldova jednotka
L	ledviny
Leu	leucin
LSO	lutecium orthosilikát
LT	laboratorní teplota
Lys	lysin
M	mozek
Met	methionin
MM	močový měchýř
MR	magnetická rezonance
N	nádor
NK	neurokinin
NMR	nukleární magnetická rezonance
NODAGA	1,4,7-triazacyklononan-1-glutarová kyselina-4,7-dioctová kyselina
NOTA	1,4,7-triazacyklononantrioctová kyselina
P	místo podání

p. i.	po podání
PBS	fosfátový pufr
PET	pozitronová emisní tomografie
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
r. o.	retroorbitálně
RGD	sekvence aminokyselin arginin – glycin – asparagová kyselina
RCHČ	radiochemická čistota
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
S	srdce
SD	směrodatná odchylka
SP	substance P
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
TFA	trifluoroctová kyselina
TK1	thymidin-kinasa 1
Tyr	tyrosin
WHO	Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Multiformní glioblastom (GBM) je nejzávažnějším typem mozkového nádoru. Úplné vyléčení pacienta s GBM je prakticky nemožné, pouze necelá dvě procenta pacientů přežijí tři roky od diagnózy tumoru. Terapie tohoto vysoce maligního onemocnění je v současné době založena na resekci nádoru, radioterapii a chemoterapii, přičemž rozsah a radikalita léčby závisí především na celkovém stavu pacienta. Tyto terapeutické postupy dokáží prodloužit život pacienta v průměru zhruba o 14 měsíců. Ačkoliv se jedná o onemocnění s velmi špatnou prognózou, včasná diagnostika a terapie dokáží často zlepšit kvalitu a délku života pacientů trpících GBM.

Pro diagnostiku multiformního glioblastomu se uplatňují zejména zobrazovací metody, a to výpočetní tomografie (CT), pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) a magnetická rezonance (MR). Jedná se o vysoce citlivé a neinvazivní metody, jejichž dostupnost se v posledních letech zvyšuje. S výhodou se používají zejména tzv. hybridní systémy, které kombinují více zobrazovacích technik, např. PET/CT a PET/MR, a které umožňují získat jak anatomická, tak funkční data v rámci jednoho vyšetření.

Pro vyšetření metodou pozitronové emisní tomografie je nutná aplikace radiofarmaka do těla pacienta. Účinnou složkou radiofarmaka je jeden nebo více radionuklidů. Radioaktivní izotopy emitují ionizující záření, které je zachyceno detektory a zpracováno na obrazový snímek. Radiofarmaka, která se v současnosti využívají k PET vyšetření v nukleární medicíně, a tedy i k diagnostice glioblastomu, jsou především látky značené pozitronovým zářičem ^{18}F . V případě diagnostiky GBM se v klinické praxi nejčastěji používají ^{18}F -fluorodeoxyglukosa a ^{18}F -fluorothymidin.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala studiem látek značených perspektivním pozitronovým zářičem ^{68}Ga . Předmětem mého studia byly ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát a ^{68}Ga -DOTA-substance P a jejich potenciální využití pro radiodiagnostiku multiformního glioblastomu. Na základě předchozích studií obdobných látek by se tyto experimentální látky měly hromadit v buňkách mozkového nádoru, čehož by se dalo využít k diagnostice GBM metodou PET. Pro srovnání jsem analogické *in vivo* experimenty prováděla i s ^{18}F -fluorodeoxyglukosou a ^{18}F -fluorothymidinem.

2. Teoretická část

2.1. Glioblastom

Glioblastom (GBM), někdy též označovaný jako multiformní glioblastom, je nejčastější a nej malignější nádor mozku, který bývá řazen mezi astrocytární nádory (1). Tyto tumory se vyvíjí z astrocytů, což jsou podpůrné buňky neuronů vykonávající řadu funkcí nezbytných pro správnou činnost centrálního nervového systému (2).

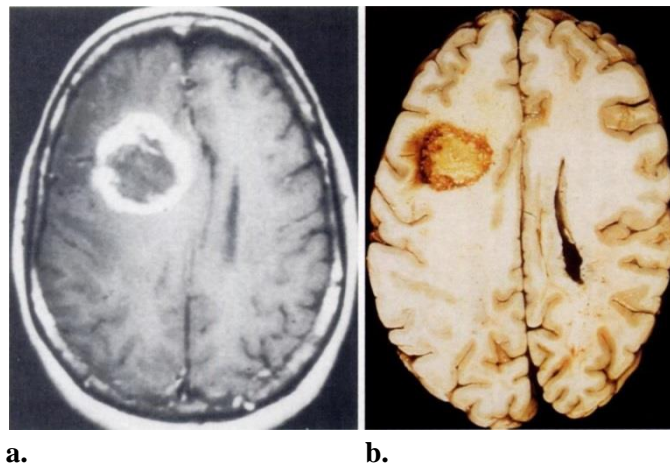
Multiformní glioblastom postihuje typicky dospělé jedince mezi 45. a 70. rokem života a častěji se vyskytuje u mužů (muži : ženy = 1,5 : 1). Glioblastom se může vyvíjet z různých typů mozkových nádorů, nejčastěji z difúzního astrocytomu nebo anaplastického astrocytomu (sekundární glioblastom), ale mnohem častěji se vyvíjí *de novo*, tedy bez průkazu předchozí existence (primární glioblastom). Glioblastomy většinou rostou v mozkové tkáni s epicentrem v bílé hmotě. Přestože se jedná o jeden z nejzhubnějších lidských nádorů, nemetastazuje (1).

Astrocytární nádory se dle klasifikace WHO dělí do čtyř stupňů závažnosti na základě jejich malignity (3). Stupeň I zahrnuje nádory, které rostou pomalu, a po jejich chirurgickém odstranění je velmi vysoká šance na úplné vyléčení. Tumory stupně II se většinou šíří do okolních tkání a navzdory jejich nízké proliferační aktivitě často recidivují. Buňky nádorů stupně III se poměrně rychle dělí a je u nich prokázána malignita. Nejzávažnější je IV. stadium. Nádorové buňky se velmi rychle a agresivně dělí, tkáň je náchylná k nekróze a nádor je infiltrován do okolní tkáně, což výrazně ztěžuje jeho úplné odstranění a vyléčení pacienta (4). Klasifikace astrocytárních nádorů podle jejich malignity je znázorněna v tabulce 1.

Tabulka 1. Klasifikace astrocytárních nádorů, WHO 2007 (5).

Stupeň malignity	Typ nádoru	Průměrná doba přežití
I	Pilocytický astrocytom	Dlouhodobě
II	Difúzní astrocytom	7-8 let
III	Anaplastický astrocytom	2 roky
IV	Multiformní glioblastom	1 rok

Anamnéza u primárního GBM je velice krátká, u 50 % pacientů kratší než 3 měsíce (1). Příznaky jsou převážně způsobeny nitrolební hypertenzí (zvýšení tlaku v dutině lebeční), což se nejčastěji projevuje bolestmi hlavy, nevolností a zvracením, poruchami psychiky a vědomí (5). Prvním klinickým příznakem často bývá epileptický záchvat. U sekundárních GBM je anamnéza delší, průměrně 4-5 let. Prognóza glioblastomu je velice špatná, pouze 1,8 % pacientů přežije tři roky od stanovení diagnózy (1).



Obrázek 1. Multifonní glioblastom ve spánkové oblasti mozku. (a) Snímek z magnetické rezonance (MR) s použitím kontrastní látky. (b) Fotografie zobrazující rozsáhlou oblast patologické tkáně (6).

2.1.1. Zobrazovací metody pro diagnostiku GBM

Ke zjištění lokalizace, rozsahu, popř. charakteru nádoru je k dispozici řada neuroradiologických zobrazovacích metod. Výpočetní tomografie (CT) umožňuje určit lokalizaci nádoru, jeho velikost a strukturu. Magnetická rezonance (MR) je v současnosti nejvyužívanější metodou pro diagnostiku mozkových nádorů (5). Snímky z MR se podobají snímkům z CT, avšak mají mnohem vyšší rozlišení, takže je možné rozeznat jednotlivé tkáně s daleko větší přesností (7). Hojně využívané jsou i metody založené na aplikaci radiofarmaka do těla pacienta. Konkrétně se jedná o pozitronovou emisní tomografii (PET) a jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT) (8). Obě techniky zpracovávají radioaktivní signál z radiofarmak kumulovaných v cílené tkáni (9). Často se využívají tzv. hybridní systémy, které představují kombinaci více zobrazovacích technik, např. PET/CT či PET/MR. Výhodou těchto systémů je současný záznam anatomického a funkčního skenování (8).

2.1.1.1. Výpočetní tomografie

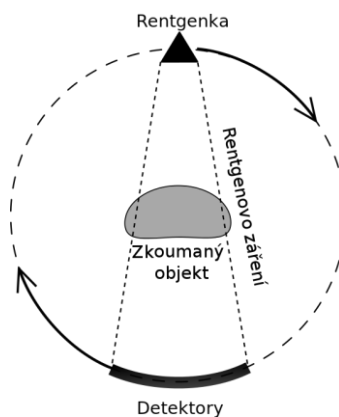
Výpočetní tomografie (CT) je jedna z nejběžnějších a nejvyužívanějších zobrazovacích metod jak pro výzkumné, tak pro klinické účely. Základním omezením této techniky je nízká schopnost rozlišit měkké tkáně. Zatímco kosti jsou na CT snímcích dostatečně kontrastní díky jejich vysoké hustotě (obsahují fosforečnan vápenatý), měkké tkáně mají nižší hustotu a jsou na snímcích málo kontrastní. Problém s rozlišením měkkých tkání řeší použití kontrastních látek, které často obsahují atomy jodu, zlata nebo barya. Tyto prvky absorbují rentgenové záření a tím zajišťují vyšší rozlišení získaných snímků (10).

Při vyšetření je pacient fixován na posuvném lůžku, které postupně prochází skenovacím stojanem, ten má podobu prstence se zdrojem rentgenového záření (rentgenkou) a souborem detektorů (11; 12). Pacient je prosvěcován rentgenovým zářením v určité rovině postupně bod po bodu. Záření, které prochází tělem pacienta, je z části absorbováno tkáněmi a detektory zaznamenávají míru zeslabení rentgenového záření. V počítači je pak signál z detektorů převeden na obrazové snímky (11). Absorpce záření tkáněmi závisí na denzitě daného materiálu, rozdíly v hustotě jsou na snímcích zobrazeny různými stupni šedi (12). Absorpční vlastnosti jednotlivých tkání v lidském těle jsou vyjádřeny relativně pomocí tzv. Hounsfieldových jednotek (HU) neboli CT čísel (11). Hodnota HU je definována vztahem (13):

$$HU = \frac{\mu - \mu_w}{\mu_w} \cdot k,$$

- kde μ je koeficient zeslabení tkáně
 μ_w je koeficient zeslabení vody
 k je smluvená konstanta o velikosti 1000.

Pro diagnostické využití je k dispozici rozsah 2000 CT čísel. Vzduch má hodnotu -1000 HU, voda 0 HU a kompaktní kostní tkáň +1000 HU (13).



Obrázek 2. Princip výpočetního tomografu (14).

2.1.1.2. Magnetická rezonance

Magnetická rezonance má výsadní postavení v diagnostice degenerativních onemocnění CNS, vrozených vad a v diagnostice nádorů mozku a míchy (11). Výhodou magnetické rezonance je, že se jedná o neinvazivní metodu a pacient není při vyšetření vystaven ionizujícímu záření (15). Dosud nebyly pozorovány žádné biologické účinky související s aplikací silného magnetického pole či radiofrekvenčního záření (13). Pomocí MR lze ve vysokém rozlišení zobrazit měkké tkáně, výsledkem snímání je velké množství snímků v různých rovinách. Hlavními nevýhodami MR jsou vysoké pořizovací a provozní náklady a omezená dostupnost zařízení. Vyšetření může být problematické pro pacienty trpící klaustrofobií. Při samotném skenování se pacient nachází ve vyšetřovacím „tunelu“ a doba vyšetření trvá v průměru 30-45 minut. Existuje několik kontraindikací omezujících použití magnetické rezonance. U těhotných žen by vyšetření MR mělo být aplikováno s velkou opatrností, a to především v průběhu prvního trimestru (15). Vyšetření dále není vhodné pro pacienty s kardiostimulátory či kovovými implantáty (13; 15). Ve srovnání s CT se u magnetické rezonance daleko více vyskytují nežádoucí artefakty snižující kvalitu výsledného snímku (15).

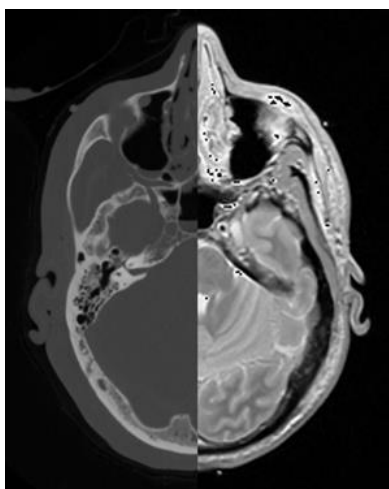
Magnetická rezonance patří mezi nejsložitější vyšetřovací techniky. Principem této metody je sledování změn chování buněk v lidském těle při působení silného magnetického pole. Konstrukce zobrazovacích systémů vychází z fenoménu jaderné magnetické rezonanční spektroskopie (NMR) (11), která je využívána pro strukturní analýzu organických látek.

Jádra atomů obsahují protony a neutrony. Protony neustále rotují kolem své osy, tento pohyb se označuje jako spin. Jelikož jsou protony kladně nabitě a pohybují se, vytváří ve svém okolí magnetické pole a vykazují magnetický moment. Podmínka, aby jádra byla v NMR pozorovatelná, je, že nukleonové číslo musí být liché (magnetické momenty se nevyruší). Charakteristickým příkladem je atom vodíku ^1H , který má v jádře jeden proton (11). V medicíně jsou dále využívány izotopy ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na a ^{31}P (13).

Za normálních okolností (mimo magnetické pole) jsou magnetické momenty jader prostorově neuspořádané. Vložíme-li jádra s nenulovým magnetickým momentem do vnějšího magnetického pole, zorientují se souhlasně (paralelně) či opačně (antiparalelně) vzhledem k vektoru magnetické indukce daného magnetického pole (13). Jádra v antiparalelním uspořádání mají nepatrně vyšší energii, proto se v tomto stavu nachází méně jak polovina všech jader. Nerovnoměrné rozdělení jader v obou energetických hladinách způsobí, že tkáň vykazuje celkový magnetický moment. Do tkáně se následně dodá energie

v podobě elektromagnetického impulzu o určité frekvenci, čímž se změní počet jader v paralelním a antiparalelním uspořádání a dojde k magnetické rezonanci (11).

Signál rezonujících jader je zpracován počítačovým programem a výsledkem prostorové rekonstrukce hustoty těchto jader je zobrazení řezu tkání – tomogram. Vlivem různé hustoty pozorovaných atomů (nejčastěji atomy vodíku ^1H) v různých tkáních poskytuje tato metoda vysoce kontrastní rozlišení jednotlivých typů měkkých tkání (13). Pro zlepšení kontrastu ve výsledném tomogramu se v MR používají kontrastní látky – sloučeniny s navázaným paramagnetickým prvkem, často gadoliniem, železem, manganem či chromem. Podáním kontrastní látky pacientovi lze zviditelnit i struktury, které nebyly v nativním snímku rozlišitelné (11).



Obrázek 3. Srovnání CT a MR. V levé části snímek z CT, v pravé části snímek z MR (16).

2.1.1.3. Pozitronová emisní tomografie

Pozitronová emisní tomografie je jednou z nejpokročilejších diagnostických radionuklidových metod. Zatímco u výpočetní tomografie (CT) se zdroj pronikavého záření nachází mimo tělo pacienta, u pozitronové emisní tomografie (PET) se takovýto zdroj nachází uvnitř těla pacienta (13).

Vyšetřovanému se před PET skenováním podá většinou intravenózně malé množství radiofarmaka, které je v závislosti na svých biologických vlastnostech distribuováno v těle pacienta. Radioaktivní záření je následně detekováno a počítačem zpracováno na snímky, které zachycují rozložení radioaktivity v organismu. Vyšetření pozitronovou emisní tomografií nezahrnuje zobrazení struktur, jedná se o detekci specifické funkce v různých oblastech těla (17).

Radiofarmaka používaná k PET vyšetření obsahují radionuklid, jehož jádro má přebytek protonů a při radioaktivní přeměně daného jádra jsou emitovány kladně nabitě elektrony neboli pozitrony (18). Takovéto radionuklidy označujeme jako pozitronové zářiče. Vyzařované pozitrony urazí v látkovém prostředí jen velmi krátkou vzdálenost, protože při setkání s opačně nabitými elektrony dochází ihned k anihilaci za vzniku dvou kvant záření gama o energii 511 keV. Dva vznikající paprsky gama záření se od místa vzniku šíří přesně v opačných směrech a jsou zachyceny dvěma protistojnými detektory v tzv. koincidenčním zapojení. Signál je zaznamenán a dále zpracován jen tehdy, dojde-li k němu na obou detektorech současně. Přístroje bývají realizovány tak, že jsou oba detektory mechanicky spojeny a mohou vykonávat rotační pohyb kolem těla pacienta (13). Data získaná z detektorů jsou využita pro rekonstrukci snímku, na kterém je patrná distribuce radionuklidu v požadovaném řezu těla pacienta (19).

Detektory pro PET systémy mají podobu krystalů z různých materiálů. Mezi materiály využívané pro výrobu scintilačních detektorů patří především jodid sodný dopovaný thaliem, germanát bismutu (BGO), fluorid barnatý, gadolinium orthosilikát (GSO) a lutecium orthosilikát (LSO) (18).

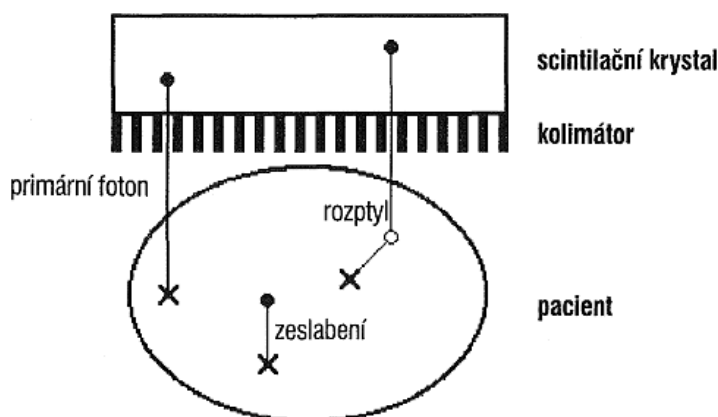
2.1.1.4. Jednofotonová emisní výpočetní tomografie

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) využívá obdobně jako PET radiofarmaka, avšak obě tyto metody se značně odlišují. Rozdíly jsou v používaných radionuklidech, přístrojovém vybavení, ve zpracování výsledků i klinických aplikacích (8). U PET vyšetření je nutné používat pozitronové zářiče, kdežto u metody SPECT se využívají běžné zdroje gama záření jako např. jód ^{131}I nebo technecium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (13).

Většinou se provádí statické SPECT vyšetření. Statické snímání zobrazuje rozložení radiofarmaka v cílové tkáni po určité době od podání látky, dynamická forma vyšetření zachycuje změny koncentrace radiofarmaka v dané tkáni s rostoucím časem. Dynamické skenování je také proveditelné, ale v klinické praxi se příliš neuplatňuje kvůli technické náročnosti metody.

Hlavními zdroji chyb při kvantitativním vyhodnocování SPECT snímků je zeslabení neboli atenuace záření jako důsledek fotoefektu a Comptonova rozptylu. Rozptýlené záření může tvořit až 60 % všech impulzů zaznamenaných při vyšetření. Jedná se o fotony, jejichž energie byla částečně pohlcena ještě v těle pacienta při Comptonově rozptylu a které se náhodně dostaly do směru, který jim umožnil projít kolimátorem až k detektoru. Takovýto

signál je pak nesprávně lokalizován do místa, ve kterém došlo k rozptylu, nikoli do místa vzniku záření. Rozptýlené záření snižuje kontrast snímku a zkresluje intenzitu zdroje. Část fotonů ze zdroje do detektoru vůbec nedorazí. Buďto v tkáni zaniknou důsledkem fotoefektu nebo jsou Comptonovým rozptylem vychýleny mimo detektor. Z toho vyplývá, že počet částic, které dorazí na detektor, je nižší než počet částic, které byly vyzářeny zdrojem. Výsledné snímky pak neodpovídají skutečné distribuci radionuklidu v tkáni, je proto nutná korekce na zeslabení a rozptyl záření (8).



Obrázek 4. Princip SPECT – schéma zobrazující nerozptýlené fotony absorbované v krystalu, fotoefekt a Comptonův rozptyl (8).

2.1.1.5. Hybridní systémy

V poslední době mají v medicíně široké uplatnění systémy kombinující více zobrazovacích metod – např. PET/CT a PET/MR. Hybridní systémy umožňují lépe popsat korelaci mezi strukturou a funkcí jednotlivých tkání. Tyto techniky našly využití v onkologii, neurologii a kardiologii (20).

Systémy kombinující pozitronovou emisní tomografii (PET) a výpočetní tomografii (CT), anebo magnetickou rezonanci (MR) se hojně uplatňují v diagnostice onkologických onemocnění. CT, resp. MR poskytuje informace o struktuře a anatomii, PET naopak podává informace o metabolismu jednotlivých oblastí v organismu.

Před vyšetřením je pacientovi intravenózně podáno radiofarmakum (často ^{18}F -fluorodeoxyglukosa) a po určité době od podání látky se provede vlastní snímání, které je zahájeno vyšetřením PET, následuje CT, resp. MR. Vyšetření PET/CT trvá v průměru kolem třiceti minut (17), doba vyšetření PET/MR se pohybuje v rozmezí 30-90 minut v závislosti na rozsahu vyšetření (buď se provádí snímání určité části těla pacienta, nebo je snímáno celé

tělo) (20). Výsledkem je velké množství řezů z obou typů skenování, jejichž vyhodnocování je časově velmi náročné. Na vyhodnocování snímků se podílejí specialisté z oblasti nukleární medicíny a radiologie.

Výhodou systému PET/CT, resp. PET/MR je zvýšení správnosti diagnostiky díky společnému vyhodnocování výsledků obou vyšetření na jednom místě v jeden čas. Také pro pacienta je toto kombinované vyšetření výhodnější a komfortnější, absolvuje dvě specializovaná vyšetření naráz a v případě PET/CT dokonce při nižší radiační zátěži (17).

2.1.2. Terapie GBM

Strategie léčby GBM závisí na charakteru nádoru, na jeho velikosti a umístění v mozku, dále na věku a celkovém stavu pacienta (5). Základní terapeutickou metodou u většiny mozkových nádorů je neurochirurgický zákrok (21). Primárním cílem chirurgických postupů je maximálně možná resekce nádoru, aniž by došlo k poškození funkčně důležitých oblastí mozku (5). Rozhodujícím prognostickým faktorem je radikalita zákroku (21). Radikální resekce je mnohem efektivnější, má pozitivní vliv na sledované prognostické faktory, tj. celkovou dobu přežití a čas do progresu onemocnění (5). Částečná resekce tumoru má vždy horší léčebné výsledky. Bezpečnost radikálního zákroku je zvýšena použitím moderních technologií, např. funkční magnetické rezonance (fMR), která je prováděna během výkonu.

Strategie léčby, zvláště pooperační, musí být určena multidisciplinárním týmem odborníků, který je zpravidla tvořen neurochirurgem, radiačním a klinickým onkologem, diagnostikem a neurologem.

Dalším léčebným postupem po resekci nádoru bývá radioterapie (cílené ozařování nádoru), která zlepšuje léčebné výsledky. Pokud to stav pacienta umožňuje, může být společně s radioterapií aplikována chemoterapie. Mezi cytostatika používaná při terapii multifonního glioblastomu patří např. temozolomid nebo deriváty nitrosourey (21).

Medián přežití pacientů, u kterých je aplikována radioterapie v kombinaci s chemoterapií, je 14,6 měsíců (22). V současnosti jsou široce zkoumány nové účinnější terapeutické strategie, které by zajistily zvýšení průměrné doby přežití pacientů nebo dokonce minimalizovaly riziko recidivy glioblastomu. Vysoký potenciál mají metody tzv. cílené biologické léčby a antiangiogenní léčby (23). Rovněž pro diagnostiku

glioblastomu jsou zkoumány efektivnější postupy a metody, např. využití nových radiofarmak pro diagnostiku GBM metodou pozitronové emisní tomografie.

2.2. Experimentální modely GBM

V *in vitro* podmínkách jsou kultivovány buněčné kultury. Buňky vyjmuté z organismu jsou pěstovány v prostředí média, které se svým složením a vlastnostmi velmi blíží tělním tekutinám, tj. krevní plazmě, lymfě, mozkomíšnímu moku atd. Jako buněčné linie jsou označovány také soubory buněk mající charakter nádorových buněk, takže neomezeně se dělí a lze je uchovávat libovolně dlouhou dobu. Buněčné kultury mají široké uplatnění v medicíně, jsou zkoumány např. možnosti regulace buněčného cyklu, objasnění procesů vedoucích ke vzniku nádorů a testování účinku nových léčiv a jiných chemických látek (24).

Spojovací článek mezi testováním na molekulární úrovni a zařazením diagnostické či terapeutické metody do klinické praxe představují laboratorní zvířata (25). Testování experimentálních látek na zvířecích modelech je nedílnou součástí preklinického vývoje nových léčiv. Využití *in vivo* modelů je důležité především pro zkoumání mechanismů nemocí, testování nových léčiv, diagnostických a terapeutických postupů (26).

2.2.1. Buněčné linie glioblastomu

Výběr konkrétní buněčné linie závisí na účelu daného experimentu. Je dostupná řada typů buněčných linií odpovídajících glioblastomu, např. A172, U-138 MG, LN-18, LN-229, U-87 MG, U-118 MG, T98G, DBTRG-05MG, M059K a M059J. Jako model primárního glioblastomu slouží buněčná linie U-87 MG (27).

Buněčnou linii U-87 MG izoloval švédský vědec Jan Pontén v roce 1966 z gliomu čtyřiceti čtyřletého bělocha, nicméně genomická sekvence této linie byla publikována až v roce 2010 (28; 29). U-87 MG buňky se využívají jako *in vivo* a *in vitro* model astrocytárního nádoru IV. stupně, čemuž podle klasifikace WHO z roku 2007 odpovídá multiformní glioblastom (28; 30). *In vivo* aplikace buněk linie U-87 MG slouží především ke studiu nových diagnostických a terapeutických postupů. Do zvířecího modelu se buňky zavádějí subkutánně či ortotopicky (31). V *in vitro* podmínkách se provádí zejména testování cytotoxického účinku na nádorové buňky během chemoterapie (30).

2.2.2. Zvířecí modely

Primární mozkové nádory jsou zkoumány na zvířatech ze dvou hlavních důvodů – výzkum napomáhá určit genetické změny vedoucí ke vzniku nádoru a umožňuje navrhnout vhodnou diagnostickou a terapeutickou metodu. Přestože se zvířatům často aplikují lidské nádorové linie, výsledky *in vivo* testování a jejich aplikace v klinické praxi se poněkud odlišují v důsledku několika faktorů: nádory ve zvířecích modelech nevykazují takové biologické vlastnosti jako nádory pacientů, odlišuje se biodistribuce v těle zvířete a v těle člověka, tumory v modelových zvířatech neodpovídají heterogenitě lidských onemocnění (32).

Pro *in vivo* testování multiformního glioblastomu se využívají zejména malí hlodavci (myši a potkani). Výhody těchto modelů spočívají v tom, že lze spolehlivě určit vývoj a rychlost růstu nádoru a také jeho lokalizaci v organismu. Ačkoliv testování nové terapie na malých zvířatech může být úspěšné, nedostatek větších zvířat (např. psů) pro studium GBM ztěžuje vyhodnocení účinku terapie u lidských pacientů. Zvířecí modely pro laboratorní testování mohou být různě modifikovány, využívají se např. imunodeficientní myši (nu/nu) kmene BALB/c (33).

Pro zobrazování malých laboratorních zvířat byla vyvinuta speciální zobrazovací zařízení, která jsou analogií přístrojů, jež se využívají v běžné klinické praxi pro pacienty. Jedná se především o zařízení mikro-CT, mikro-PET a mikro-SPECT (25). Při vyšetření laboratorních zvířat zmíněnými přístroji se podobně jako u pacientů aplikují kontrastní či radioaktivně značené látky. Testování experimentálních radiofarmak má význam pro zavedení nových efektivnějších diagnostických strategií do klinické praxe.

2.3. Radiofarmaka

Radiofarmakum představuje léčivý přípravek obsahující jeden nebo více radionuklidů a sloužící výhradně k lékařským účelům. Radiofarmaka jsou využívána pro diagnostické i terapeutické účely a napomáhají porozumět kinetice léčiva, jeho distribuci mezi jednotlivými tkáněmi, metabolismu či vylučování. Při výrobě, manipulaci a používání radiofarmak je nutné, na rozdíl od běžných léků, splňovat speciální požadavky na práci se zdroji ionizujícího záření (8).

Radiofarmaka jsou připravována ve formě parenterálních, perorálních, inhalačních nebo topických přípravků. V nukleární medicíně jsou nejvyužívanější parenterální přípravky,

které se podávají intravenózně. Do této skupiny patří pravé roztoky, koloidní disperze a suspenze. K perorálnímu podání jsou určeny roztoky či tuhé látky ve formě želatinových tobulek. Do skupiny inhalačních radiofarmak patří radioaktivní plyny a dispergované radioaktivně značené koloidní roztoky. Využití mají i topické přípravky pro lokální aplikaci (34).

Radiofarmaky mohou být jednoduché anorganické látky anebo složitější organické molekuly jako např. proteiny a peptidy. Radionuklid je v daném léčivu v iontové formě, případně může být vázán kovalentně či ve formě komplexu (8). Radionuklid – zdroj ionizujícího záření – je hlavní účinnou složkou radiofarmaka (34).

2.3.1. Radionuklidy

Radionuklidy jsou nestabilní izotopy, které se stabilizují samovolnou emisí nabitě částice nebo vyzářením fotonu. Stabilita případně nestabilita jádra souvisí se strukturálním uspořádáním nukleonů v jádře atomu (34). Radioaktivita je pak schopnost samovolné přeměny nestabilních jader radionuklidů na jádro jiného nuklidu za vzniku ionizujícího záření. Jádro, které se přeměňuje, označujeme jako mateřské a nově vznikající jádro jako dceřiné (8). Přeměna mateřského jádra na dceřiné může probíhat několika různými způsoby.

2.3.1.1. Typy radioaktivních přeměn

Přeměna α je charakteristická pro těžší jádra, jako jsou radon, uran, neptunium (19). Při této přeměně jsou vyzářovány tzv. α -částice, jedná se o jádra helia ${}^4_2\text{He}$, která jsou mimořádně stabilní díky vysoké vazebné energii. Záření α je monoenergetické, což znamená, že všechny α -částice emitované z jádra radionuklidu mají stejnou energii (34). Přestože mají heliová jádra poměrně vysokou energii, jejich dosah v tkáni je pouze okolo 0,03 mm (8).

K přeměně β^- dochází u jader s přebytkem neutronů oproti stabilnímu stavu. V jádře dochází k přeměně neutronu na proton za současného uvolnění β^- -částice (elektronu) a antineutrino. β^- -částice nese pouze podíl přeměnové energie, zbývající energii přenáší antineutrino. Záření β^- je tedy spojité, obsahuje energie v rozmezí 0- E_{max} (maximální energie je dána přeměnovou energií) (34). Dosah záření v tkáni je v průměru 1-4 mm. V nukleární medicíně je tato přeměna typická pro izotopy ${}^{131}\text{I}$, ${}^{133}\text{Xe}$ (8).

U jader, která se odchyľují od stabilního stavu nedostatkem neutronů nebo přebytkem protonů, dochází k přeměně protonu na neutron za vyzáření β^+ -částice (pozitronu) a neutrina. Obdobně jako u přeměny β^- je záření spojitě. V nukleární medicíně se využívají jako pozitronové zářiče např. ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C , ^{68}Ga .

Alternativou k přeměně β^+ je tzv. elektronový záchyt (34). Dochází při něm k zachycení elektronu z vnitřní slupky elektronového obalu jádrem. Elektron se spojí s protonem za vzniku neutronu a doprovodného γ -záření. Z radionuklidů používaných v nukleární medicíně je tento proces charakteristický pro tyto nuklidy – ^{67}Ga , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{57}Co .

Záření γ doprovází přeměny α a β . Vzniklé dceřiné jádro se nachází v excitovaném stavu a přebytečné energie se zbavuje ve formě elektromagnetického záření – γ -záření. Při této přeměně se nemění počet nukleonů v jádře. Excitované stavy jader mohou ležet na různých energetických hladinách, tedy i emitované γ -záření může mít různou energii. Pro jednotlivé radionuklidy je však energie γ -záření přesně definovaná, např. izotop jodu ^{131}I emituje γ -záření o energiích 364 keV, 637 keV, 723 keV a 284 keV (8).

Při vnitřní konverzi je γ -záření z části nebo zcela nahrazeno vyzářením elektronů (34). Emitované záření γ vyrazí z elektronového obalu elektron, který převezme veškerou energii fotonu a samotný foton zanikne. Energeticky obohacený elektron vyletí z atomu. Mezi elektrony emitovanými při β^- -přeměně a vnitřní konverzi je výrazný rozdíl. Při β^- -přeměně jsou elektrony emitované z jádra a mají spojitou oblast energií, kdežto elektrony vnitřní konverze jsou emitovány z elektronového obalu a mohou vytvořit několik skupin monoenergetických elektronů.

Některá jádra mohou v excitovaném stavu přetrvávat delší dobu, nacházejí se v tzv. metastabilním stavu. Při přechodu na základní energetickou hladinu je produkováno γ -záření. Tento jev se označuje jako jaderná izomerie. V nukleární medicíně je typická např. pro izotopy $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a $^{81\text{m}}\text{Kr}$ (8).

2.3.1.2. Výroba a získávání radionuklidů

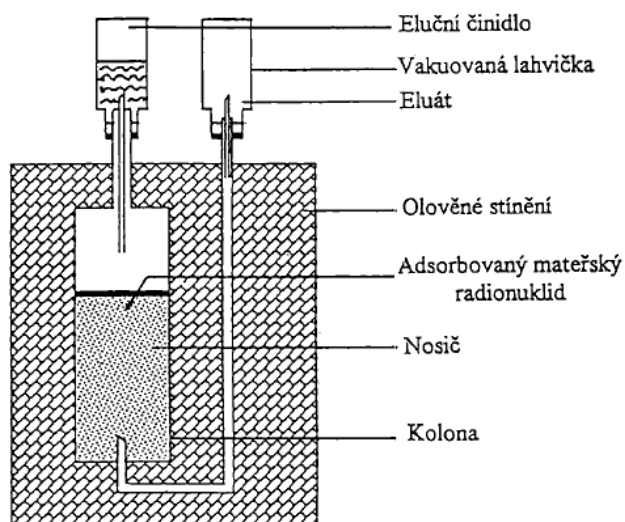
Radiofarmaka využívaná v lékařské praxi obsahují výhradně uměle připravené radioaktivní izotopy. Ty se připravují jadernými reakcemi v cyklotronech, jaderných reaktorech nebo se získávají ve formě tzv. dceřiných radionuklidů z radionuklidových generátorů (8).

V cyklotronu jsou kladně nabitě částice jako protony, deuterony nebo alfa částice urychleny ve vakuu působením elektrického pole (8; 19). Dráha urychlených částic je ovlivňována magnetickým polem tak, že se částice pohybují po kruhových drahách se zvětšujícím se poloměrem, vykonávají v podstatě spirálovitý pohyb (8; 34). Nakonec energeticky bohatší částice dopadají na vhodný terč, interagují s jádry a proběhne daná jaderná reakce (34). Ve větších množstvích se vyrábějí radionuklidy s delším poločasem přeměny, např. ^{111}In ($T_{1/2} = 6 \text{ h}$), ^{67}Ga ($T_{1/2} = 78 \text{ h}$), ^{123}I ($T_{1/2} = 13 \text{ h}$) nebo ^{201}Tl ($T_{1/2} = 74 \text{ h}$). Existují i menší cyklotrony, které slouží pro výrobu radioaktivních izotopů biogenních prvků s krátkým poločasem rozpadu. Tato zařízení jsou umístěna přímo na pracovištích, kde se připravené radionuklidy použijí pro značení radiofarmak. Nejvíce využívané jsou izotopy ^{18}F ($T_{1/2} = 110 \text{ min}$), ^{11}C ($T_{1/2} = 20 \text{ min}$), ^{13}N ($T_{1/2} = 10 \text{ min}$) a ^{15}O ($T_{1/2} = 2,1 \text{ min}$) (8).

V jaderných reaktorech probíhají řízené řetězové reakce, při kterých jsou stabilní jádra (štěpný materiál) ozařována neutrony a vznikají nové radioaktivní izotopy (8; 34). Primární význam jaderných reaktorů je získávání energie, avšak lze jich využít i pro výrobu radionuklidů (34). Jako jaderné palivo se nejčastěji používá obohacený uran ^{235}U nebo plutonium ^{239}Pu (19).

Radionuklidové generátory mají využití pro získávání krátkodobých radionuklidů přímo na pracovištích nukleární medicíny. Princip spočívá v radioaktivní přeměně mateřského radionuklidu s delším poločasem rozpadu na dceřiný prvek (8). V generátoru je umístěna skleněná nebo plastová kolona naplněná nosičem, na který je adsorbován mateřský prvek (19). Přírozenou radioaktivní přeměnou vzniká dceřiný prvek, který je z kolony vymýván vhodným rozpouštědlem, jelikož oba radioaktivní izotopy mají rozdílné vlastnosti (19; 34). Z generátoru je možné opakovaně eluovat dceřiný izotop po intervalu, který závisí na poločasu přeměny mateřského radionuklidu. Výhodou generátorů radionuklidů je fakt, že poskytují opakovaně radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu, které pro pacienta znamenají minimální radiační zátěž a zároveň umožňují kvalitní zobrazení (34). Příkladem radionuklidových generátorů mohou být $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ nebo $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Ru}$ generátor.

V současné době se v nukleární medicíně nejvíce využívá molybden-techneciový generátor $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Poločas rozpadu radionuklidu ^{99}Mo je 66 hodin a poločas rozpadu vznikajícího $^{99\text{m}}\text{Tc}$ je 6 hodin. Začíná se prosazovat germanium-galliový generátor $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, který výborně kombinuje mateřský prvek ^{68}Ge s dlouhým poločasem rozpadu 271 dní a dceřiný prvek ^{68}Ga s krátkým poločasem rozpadu 68 minut (19).



Obrázek 5. Schematické znázornění radionuklidového generátoru $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (34).

2.3.1.3. Gallium-68

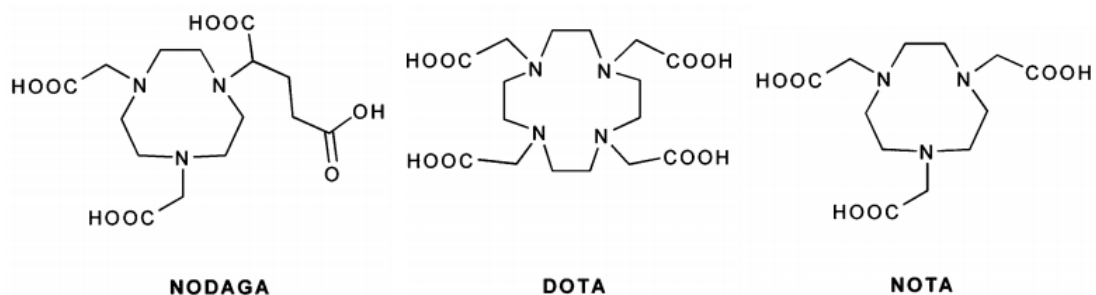
V klinické praxi jsou běžně využívány pro značení radiofarmak pozitronové zářiče produkované cyklotrony – ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N a ^{15}O . Alternativní variantou jsou radionuklidy produkované generátory, např. izotopy $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{82}Rb nebo ^{62}Cu (35). Výhodou generátorů je jejich relativně nízká cena a fakt, že radioaktivní izotop pro značení je prakticky neustále k dispozici (35; 36). V posledních letech se výrazně zvýšil zájem o aplikace ^{68}Ga pro PET vyšetření (37).

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor kombinuje mateřský prvek ^{68}Ge s dlouhým poločasem rozpadu ($T_{1/2} = 270,95$ dní) a dceřiný prvek ^{68}Ga s krátkým poločasem rozpadu ($T_{1/2} = 67,71$ min). V poslední době je hojně užívaný generátor se stacionární fází TiO_2 , na které je nanesen mateřský prvek. Jako eluční činidlo se využívá 0,1M HCl (35).

Gallium se nachází ve 13. skupině (III. A skupině) periodické tabulky prvků. Jeho chemické vlastnosti se velmi podobají železu Fe^{3+} (37). Ve vodných roztocích je jediným stabilním oxidačním stavem Ga^{3+} při kyselém pH. Ion Ga^{3+} patří mezi tvrdé Lewisovy kyseliny a stabilní komplexy vytváří s tvrdými Lewisovými bázemi, což jsou ligandy obsahující elektronově-donorní atomy kyslíku, dusíku nebo síry. Na Ga^{3+} komplexy jsou kladeny určité požadavky, aby mohly být využívány jako radiofarmaka. Je nutná termodynamická stabilita komplexů vůči hydrolyze a kinetická inertnost, aby nedocházelo k výměně ligandu s transferinem – proteinem obsaženým v lidském séru.

Většina chelatačních činidel, která tvoří komplexy s iontem Ga^{3+} jsou hexadentátní (šestivazné). Bylo však zjištěno, že i cheláty s koordinačním číslem 4 nebo 5 jsou v *in vivo* podmínkách stabilní. Ligandy, které umožňují kovalentní vazbu s cílovou molekulou a zároveň váží kovový ion, se označují jako bifunkční chelátory. Při výběru vhodného chelatačního činidla musí být zohledněny tři základní faktory: I) komplexace s radioaktivním izotopem kovu by měla být rychlá a s vysokým výtěžkem, II) vzniklý chelát by měl být dostatečně kineticky stabilní v rozmezí pH 4-8 (nesmí docházet k odštěpení kovu z komplexu) a III) je nutná inertnost vůči iontům krevního séra (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) (35).

Jedna z prvních molekul, která byla použita pro radioaktivní značení izotopem ^{68}Ga byl desferrioxamin (DFO). Tato molekula se ovšem neosvědčila jako vhodné chelatační činidlo, jelikož komplex ^{68}Ga -DFO byl stabilní pouze při koncentracích DFO $> 5 \mu\text{mol/l}$. Nejznámějším chelátorem, který vytváří stabilní komplexy s radioaktivními kovy, je DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina). Další hojně studovaná chelatační činidla jsou např. NODAGA (1,4,7-triazacyklononan-1-glutarová kyselina-4,7-dioctová kyselina) a NOTA (1,4,7-triazacyklononantrioctová kyselina). Uvedené cheláty se používají v konjugaci s vhodnými biologicky aktivními látkami, např. peptidy. (35).



Obrázek 6. Struktury běžných chelatačních činidel pro ^{68}Ga (38).

2.3.2. Experimentální radioaktivně značené látky pro diagnostiku GBM

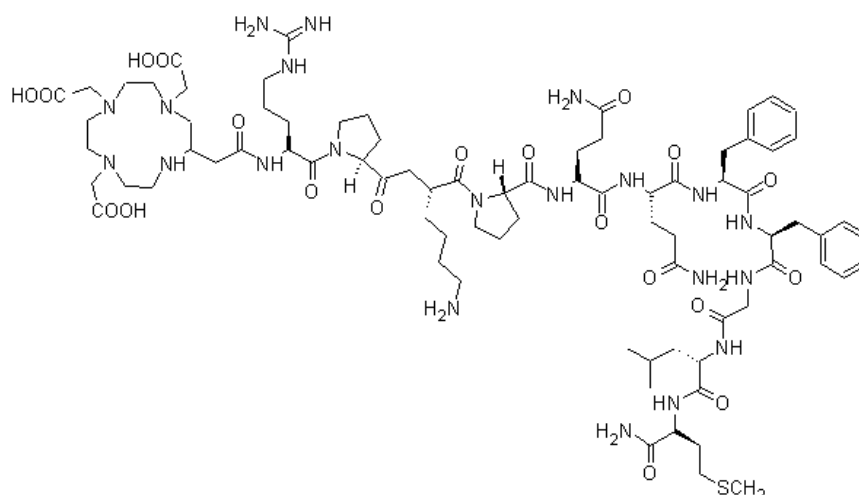
2.3.2.1. RGD peptidy

RGD peptidy obsahují ve své struktuře sekvenci aminokyselin arginin (R) – glycín (G) – asparagová kyselina (D). Tato sekvence je důležitá, jelikož vykazuje vysokou afinitu a selektivitu k integrinu $\alpha_v\beta_3$ (39). Jedná se o molekuly na povrchu aktivovaných endoteliálních buněk během angiogeneze indukované nádorem (39; 40).

2.3.2.2. Substance P

Tachykininy jsou peptidy syntetizované nervovými a gliovými buňkami centrálního a periferního nervového systému, byly však nalezeny i mimo nervový systém, konkrétně v endoteliálních, svalových a zánětlivých buňkách. Účastní se jak fyziologických, tak patologických procesů – např. přenosu vzruchu a nocicepce (vznik a transport signálu o bolesti). Tachykininy jsou charakteristické sekvencí Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂. Jejich biologická odezva je aktivována tachykininovými receptory NK1, NK2 a NK3. Nejdůležitějším zástupcem ze skupiny tachykininů je substance P, která představuje hlavní ligand pro receptor typu NK1. Přítomnost funkčních NK1 receptorů byla prokázána u maligních mozkových nádorů gliového původu (42). Bylo též zjištěno, že aktivita SP-NK1 receptorů se podílí na vzniku a rozvoji tumoru.

Substanci P tvoří sekvence Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂.



Obrázek 8. Struktura látky DOTA-substance P.

Substance P je zkoumána v různých oblastech. Provádějí se studie, jež se snaží využít selektivní antagonisty NK1 receptorů, blokovat jejich aktivitu a inhibovat tak růst nádoru (42). Jiná studie se zaměřila na význam substance P při astmatu a navržení nových terapeutických postupů pro léčbu tohoto chronického onemocnění (43). Substance P byla také testována na nádorových liniích jako potenciální radiofarmakum, např. na buněčné linii lidského astrocytárního nádoru U-373 MG. Závěrem studie bylo, že by substance P mohla sloužit k detekci aktivních NK1 receptorů u nádoru, tedy k diagnostice nádoru (44).

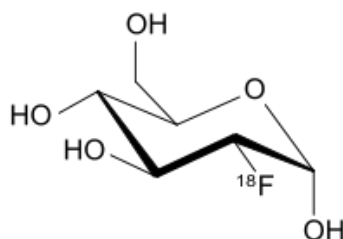
2.3.3. Klinicky používaná radiofarmaka pro diagnózu GBM

2.3.3.1. ^{18}F -fluorodeoxyglukosa

2- ^{18}F fluoro-2-deoxyglukosa (^{18}F -FDG) je nejběžnější PET radiofarmakum připravované v cyklotronu (19). ^{18}F -FDG se podává pacientům nitrožilně asi jednu hodinu před PET vyšetřením (aktivita 200-700 MBq, hodnota je upravena v závislosti na hmotnosti pacienta a citlivosti PET kamery) (8; 45).

^{18}F -fluorodeoxyglukosa se z krve dostává do extracelulární tekutiny a odtud je transportována do buněk obdobně jako běžná glukosa. Uvnitř buněk probíhá fosforylace za účasti enzymu hexokinasy a vzniká ^{18}F -FDG-6-fosfát, který již není v organismu metabolizován. Tím dochází v buňce ke kumulaci detekovatelného radionuklidu (8). Kompetice mezi ^{18}F -FDG a plazmatickou glukosou by mohla zhoršovat kontrast patologických tkání, je proto nutné před vyšetřením alespoň 6 hodin nejíst a dosáhnout tak nízké glykémie – obsah glukosy v krvi by měl být $< 8,3$ mmol/l (8; 45). Velký přísun tekutin je žádoucí kvůli snížení radiační zátěže močových cest, pacient však nesmí pít nápoje obsahující glukosu (45). ^{18}F -FDG se vysoce hromadí v šedé kůře mozkové, jelikož glukosa představuje pro mozek základní zdroj energie (8).

^{18}F -fluorodeoxyglukosa se primárně používá ke studiu metabolismu mozku a srdce, k diagnostice epilepsie a zobrazení většiny druhů zhoubných nádorů a jejich metastází (19; 45). ^{18}F -FDG je vhodná pro diagnostiku gliomů, jelikož v buňkách mozkových nádorů dochází ke zvýšení metabolismu glukosy a na základě rychlosti glykolýzy lze určit i stupeň malignity a rozlišit tak multifonní glioblastom (46).



Obrázek 9. Struktura látky ^{18}F -FDG (47).

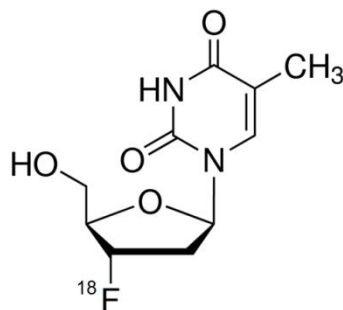
2.3.3.2. ^{18}F -fluorothymidin

3'-deoxy-3'- ^{18}F fluorothymidin (^{18}F -FLT) je radioaktivně značená forma pyrimidinové nukleové báze thymidinu (48). ^{18}F -FLT je v organismu fosforylován, reakci

v cytosolu buněk katalyzuje enzym thymidin kinasa-1 (TK1) (49). Fosforylovaný ^{18}F -fluorothymidin se hromadí uvnitř proliferujících buněk a asi 60 minut zůstává stabilní (49; 50).

^{18}F -FLT se podává intravenózně, aktivita podaná pacientovi by se měla pohybovat v rozmezí 150-600 MBq dle hmotnosti jedince a citlivosti PET kamery. ^{18}F -FLT se rychle kumuluje v cílových tkáních, PET-skenování se provádí po 15-30 minutách po podání radiofarmaka. Je důležité, aby pacient před a po vyšetření zvýšil příjem tekutin z důvodu snížení radiační zátěže močových cest. U přípravku nejsou známa žádná omezení, která by se týkala charakteru požitých jídel a nápojů. ^{18}F -FLT je metabolizován v játrech, transportován krví a nakonec vyloučen ledvinami. Nejvíce se hromadí v kostní dřeni, v ledvinách, močovém měchýři, v játrech a v nádorové tkáni s vysokou proliferační aktivitou.

^{18}F -fluorothymidin je vhodný pro diagnostiku maligních nádorů a určení stupně buněčné proliferace (50). Ve zdravém mozku je kumulace ^{18}F -FLT nízká, ale v proliferujících nádorových buňkách se ^{18}F -FLT ochotně hromadí dle rychlosti syntézy DNA (46). Na základě proliferační aktivity buněk je možné určit stupeň malignity nádoru (50) a rozpoznat tak i nejmalignější typ mozkového tumoru – multifonní glioblastom.



Obrázek 10. Struktura látky ^{18}F -FLT (51).

3. Experimentální část

3.1. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je na základě *in vitro* a *in vivo* experimentů posoudit potenciál dvou peptidů značených radioaktivním izotopem ^{68}Ga pro diagnostiku multiformního glioblastomu metodou pozitronové emisní tomografie. Konkrétně jsem se zabývala látkami NODAGA-RGD dimer acetát a DOTA-substance P. *In vivo* testování jsem podrobila i dvě klinicky používaná radiofarmaka, konkrétně ^{18}F -fluorodeoxyglukosu a ^{18}F -fluorothymidin. Výsledky *in vivo* experimentů studovaných ^{68}Ga značených peptidů jsem porovnávala s klinicky používanými radiofarmaky a vyhodnotila, zda jsou vhodné pro radiodiagnostiku GBM.

3.2. Použité přístroje a chemikálie

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor (Eckert & Ziegler, Berlín, Německo), vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), radiodetektor (Raytest, Straubenhardt, Německo), kolona Watrex Nucleosil 120 C18 5 μm 250x4 mm (Watres, Praha, Česká republika), PET/SPECT/CT systém pro malá laboratorní zvířata (Albira, Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, USA), automatický gama počítač (Wizard², PerkinElmer, USA), ionizační komora, centrifuga, analytické váhy, termoblok, vortex, třepačka.

NODAGA-RGD dimer acetát (ABX, Radeberg, Německo), DOTA-substance P (ABX, Radeberg, Německo), ^{18}F -fluorodeoxyglukosa (ÚJV Řež, Česká republika), ^{18}F -fluorothymidin (RadioMedic, Řež, Česká republika). Ostatní použité chemikálie jsou běžně komerčně dostupné ve vysoké čistotě: acetátový pufr ($c = 1,14 \text{ mol/l}$), HCl ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), roztok FeCl_3 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), roztok DTPA ($c = 6 \text{ mmol/l}$), acetonitril, fosfátový pufr, fyziologický roztok, isofluran, deionizovaná voda, trifluoroctová kyselina, oktanol.

3.3. Metodická část

3.3.1. Radioaktivní značení

Izotop gallia ^{68}Ga pro radioaktivní značení peptidů jsem získala z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru ve formě iontu $^{68}\text{Ga}^{3+}$ ($^{68}\text{GaCl}_3$). Jako eluční činidlo jsem použila 0,1M HCl. Eluát jsem odebírala po frakcích a frakci o přibližném objemu 1 ml s aktivitou 50-70 MBq jsem použila pro značení peptidů. Testovala jsem různá množství peptidů v reakční směsi, konkrétně 1, 5 a 10 μg . Reakční směs obsahovala testovaný peptid, 300 μl radioaktivního eluátu ^{68}Ga a 30 μl 1,1M acetátového pufru. Směs jsem nechala inkubovat při laboratorní teplotě, resp. při 95°C a v časových intervalech 15, 60 a 120 minut jsem provedla kontrolu kvality značení pomocí RP-HPLC. Ze získaných dat jsem vyhodnotila optimální reakční podmínky pro značení testovaných peptidů (množství peptidu, teplota inkubace, reakční doba) s ohledem na požadovanou radiochemickou čistotu $> 95\%$.

3.3.2. Kontrola kvality značení

Kontrolu kvality značení jsem prováděla pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu s radiodetekcí. Dle Českého lékopisu je pro látky značené izotopem gallia ^{68}Ga nutná radiochemická čistota minimálně 95% (52).

Chromatografické podmínky:

- kolona Watrex Nucleosil 120 C18 5 μm 250x4 mm (Watrex, Praha, Česká republika)
- průtoková rychlost: 1 ml/min
- gradientová eluce: 0-3 min ... 100% A
3-10 min ... 50% A + 50% B
10-13 min ... 20% A + 80% B
13-15 min ... 100% B
(A = 99,9% H_2O + 0,1% TFA; B = 99,9% ACN + 0,1% TFA)
- detekce: radiodetektor (Raytest, Straubenhardt, Německo)

3.3.3. Testy stability

Pro testování stability v lidském séru jsem smísila 100 μl značeného preparátu s 300 μl lidského séra a směs jsem nechala inkubovat v inkubátoru při teplotě 37°C. Po 30, 60 a 120 minutách jsem ze směsi odebrala vzorek o objemu 100 μl a přidala k němu 150 μl ACN. Vzniklou sraženinu jsem oddělila centrifugací (15 000 rpm, 3 min). Pomocí RP-HPLC jsem zanalyzovala supernatant.

K dalším testům, které ověřily stabilitu komplexu ^{68}Ga s peptidem v prostředí se zvýšenou koncentrací Fe^{3+} a konkurenčního chelátoru, jsem používala roztoky 0,1M FeCl_3 a 6mM DTPA. Ke 150 μl značeného preparátu jsem přidala 150 μl roztoku FeCl_3 , resp. DTPA a směs jsem nechala inkubovat při 37°C. Po 30, 60 a 120 minutách jsem odebrala vzorky pro analýzu na HPLC.

Pro testování stability značeného preparátu v prostředí o vyšším pH jsem do reakční směsi přidala dalších 100 μl 1,1M acetátového pufru pro úpravu pH na hodnotu 6-7 (kontrola pomocí pH papírku). Po 30, 60 a 120 minutách jsem odebrala vzorky a provedla RP-HPLC analýzu.

3.3.4. Rozdělovací koeficient

K celému objemu značeného preparátu (přibližně 400 μl) jsem přidala 600 μl PBS. Do zkumavky (eppendorfky) jsem odpipetovala 50 μl takto naředěného preparátu a přidala jsem 500 μl oktanolu a 450 μl PBS. Tímto postupem jsem připravila celkem šest vzorků a nechala je na třepačce protřepávat po dobu 20 minut. Následně jsem vzorky vložila do centrifugy (15 000 rpm, 1 min). Vzorky jsem odebrala jak z vodné, tak z oktanolové fáze. Následně jsem měřila radioaktivitu v jednotlivých vzorcích pomocí automatického gama počítáče. Ze získaných dat jsem vypočítala rozdělovací koeficient ($\log P$) testovaných peptidů. Jedná se o dekadický logaritmus podílu radioaktivity v oktanolové (%) a vodné fázi (%):

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

3.3.5. Vazba na proteiny

Testováním vazby na proteiny se ověřilo, jak se dané peptidy váží na proteiny v lidském séru. Z hlediska možné aplikace v nukleární medicíně je žádoucí, aby vazba na krevní proteiny byla co nejnižší a látka v organismu nesetrvávala delší dobu, než je nutné pro vyšetření. Stanovení vazby na proteiny ^{68}Ga značených peptidů bylo prováděno s využitím gelové chromatografie. Na gelové koloně se zadržují nízkomolekulární látky (intaktní testovaný komplex) a naopak v eluátu jsou přítomny látky vysokomolekulární (látky navázané na krevní proteiny).

10 μl značeného preparátu jsem smísila se 190 μl lidského séra a směs jsem nechala inkubovat při 37°C. Současně jsem připravila směs 10 μl značeného preparátu a 190 μl PBS, kterou jsem rovněž nechala inkubovat při 37°C a pracovala s ní analogicky jako se směsí obsahující sérum. Po 30, 60 a 120 minutách jsem odebrala 25 μl vzorku, nanasla jej na předpřipravenou gelovou kolonu a centrifugovala (2 000 g, 2 min). Následně jsem pomocí automatického gama počítače změřila radioaktivitu na gelové kolonce a v eluátu a vyhodnotila vazbu na proteiny testovaných peptidů.

3.3.6. Testování *in vivo* stability v moči

Laboratorním myším, kterým byly podány látky ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát a ^{68}Ga -DOTA-substance P, byla 30 a 90 minut po podání testované látky odebrána moč. Vzorky moči byly zanalyzovány pomocí RP-HPLC. Účelem bylo zjistit, zda se dané látky v organismu metabolizují nebo jsou vylučovány v nezměněné formě.

3.3.7. PET/CT zobrazování laboratorních myší

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se zákonem 246/1992 Sb., se souhlasem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-18933/2013-1 a MSMT-22421/2013-12) a se souhlasem Odborné komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Veškeré experimenty byly prováděny na myších samicích kmene BALB/c (Anlab, Praha, Česká Republika).

Před aplikací testované látky zvířeti bylo vždy po radioaktivním značení (v případě peptidů ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát a ^{68}Ga -DOTA-substance P) ověřeno, zda se pH

preparátu pohybuje v rozmezí 6-7, a byla provedena kontrolní analýza značení pomocí RP-HPLC. Klinicky používané látky ^{18}F -FDG a ^{18}F -FLT jsem získala z Kliniky nukleární medicíny Fakultní nemocnice Olomouc a před podáním zvířeti nebyly tyto látky dále upravovány.

Příslušné radiofarmakum bylo myším aplikováno retroorbitálně, aktivita jedné dávky se pohybovala v rozmezí 4-9 MBq. Skenování bylo provedeno pomocí zobrazovacího systému PET/SPECT/CT pro malá laboratorní zvířata. Během celého vyšetření byly laboratorní myši udržovány v celkové anestezii (k tomuto účelu bylo používáno inhalační anestetikum isofluran). Pro každou látku jsem provedla dva typy vyšetření – dynamické a statické zobrazování. Při dynamickém skenování se během 90 minut zaznamenával pouze radioaktivní signál pomocí PET. Data pro jeden snímek byla shromažďována po dobu 5 minut. Celkem tedy bylo získáno 18 snímků zachycujících distribuci radioaktivně značené látky v laboratorní myši v čase. Statické skenování zahrnovalo vyšetření PET i CT a provádělo se po 30 a 90 minutách od podání radioaktivně značené látky.

Po vyšetření byla data zrekonstruována pomocí softwaru Albira Reconstructor (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, USA) a jednotlivé snímky byly upravovány v počítačových programech PMOD (PMOD Technologies Ltd., Curych, Švýcarsko) a VolView (Kitware Inc., New York, USA).

3.3.8. *Ex vivo* biodistribuce laboratorních myší

Preparáty peptidů značených ^{68}Ga (opět kontrola pH a kvality značení před aplikací laboratorním zvířatům) byly naředěny 600 μl fyziologického roztoku. Látky ^{18}F -FDG a ^{18}F -FLT nebyly upravovány. Připravené roztoky byly retroorbitálně aplikovány myším, jedna látka byla podána vždy šesti laboratorním myším. Aktivita jedné dávky se pohybovala v rozmezí 1-2 MBq.

Po 30 minutách od podání látky byly usmrceny tři laboratorní myši a následně 90 minut p. i. byly usmrceny zbývající tři laboratorní myši. Každé myši byly odebrány následující orgány: krev, slezina, slinivka, žaludek (vyprázdněný), střeva, ledviny, játra, srdce, plíce, sval, kost, u nádorových zvířat byl navíc odebrán i nádor. Jednotlivé orgány byly zváženy a následně byla proměřena radioaktivita v orgánech pomocí automatického gama počítáče. Naměřená data byla vyhodnocena jako procento podané dávky na gram orgánu (%ID/g).

Kultivace nádorů u laboratorních myší byla prováděna následovně. Laboratorním myším bylo subkutánně aplikováno $5 \cdot 10^6$ U-87 MG buněk na pravý bok a průběžně byl sledován růst nádoru. Experimentální zvířata s velikostí nádoru 100-300 mm³ (zhruba měsíc po subkutánní aplikaci nádorových buněk) byla používána pro zobrazování pomocí PET/CT a pro *ex vivo* biodistribuční studie.

3.4. Výsledky

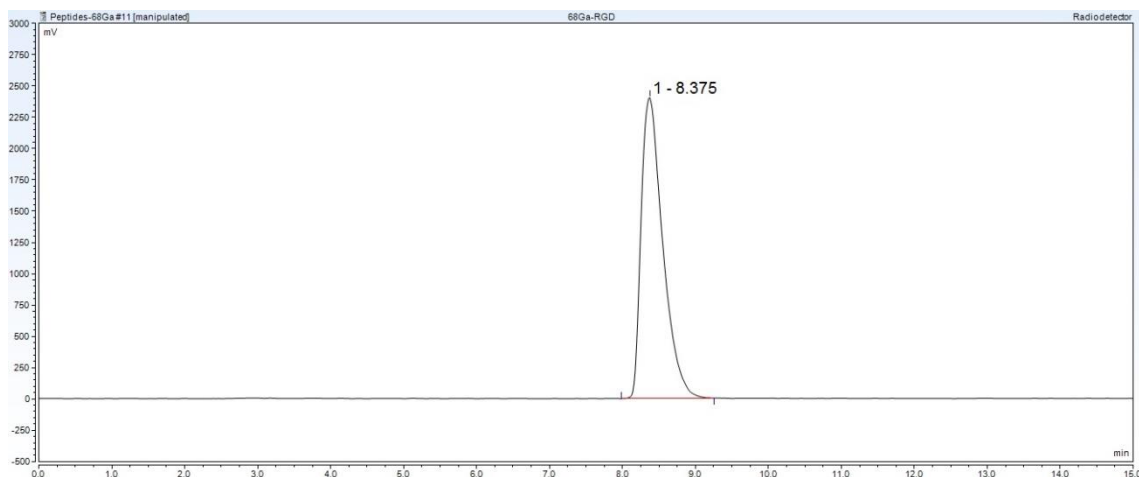
3.4.1. NODAGA-RGD dimer acetát

3.4.1.1. Radioaktivní značení

Vysoká radiochemická čistota byla naměřena u preparátů obsahujících 5 a 10 µg RGD peptidu. Radiochemická čistota preparátu s obsahem peptidu 1 µg nevyhovovala požadované hodnotě. Pro další experimenty jsem tedy zvolila následující podmínky radioaktivního značení: 5 µg peptidu a inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky optimalizace podmínek radioaktivního značení NODAGA-RGD dimer acetátu. Z radiochromatogramu na obrázku 11 je patrné, že retenční čas RGD peptidu v daném chromatografickém systému je 8,4 min.

Tabulka 2. Optimalizace podmínek radioaktivního značení NODAGA-RGD dimer acetátu.

množství peptidu (µg)	teplota	reakční doba (min)	RCHČ (%)
1	LT	15	6,4
		60	9
		120	13
5	LT	15	99,9
		60	99,8
		120	99,3
10	LT	15	99,9
		60	99,9
		120	99,5



Obrázek 11. Radiochromatogram ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

3.4.1.2. Testy stability

Komplex ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát projevili vysokou stabilitu v testovaných prostředích, konkrétně v koncentrovaných roztocích FeCl_3 a DTPA, v lidském séru a v prostředí s vyšším pH. V tabulce 3 jsou shrnuty hodnoty radiochemické čistoty zjištěné metodou RP-HPLC.

3.4.1.3. Rozdělovací koeficient

Hodnota rozdělovacího koeficientu ($\log P$) pro ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát uvedená v tabulce 3 je průměrnou hodnotou ze šesti měření. Výsledná hodnota $\log P \pm \text{SD}$ činí $-3,39 \pm 0,17$.

3.4.1.4. Vazba na proteiny

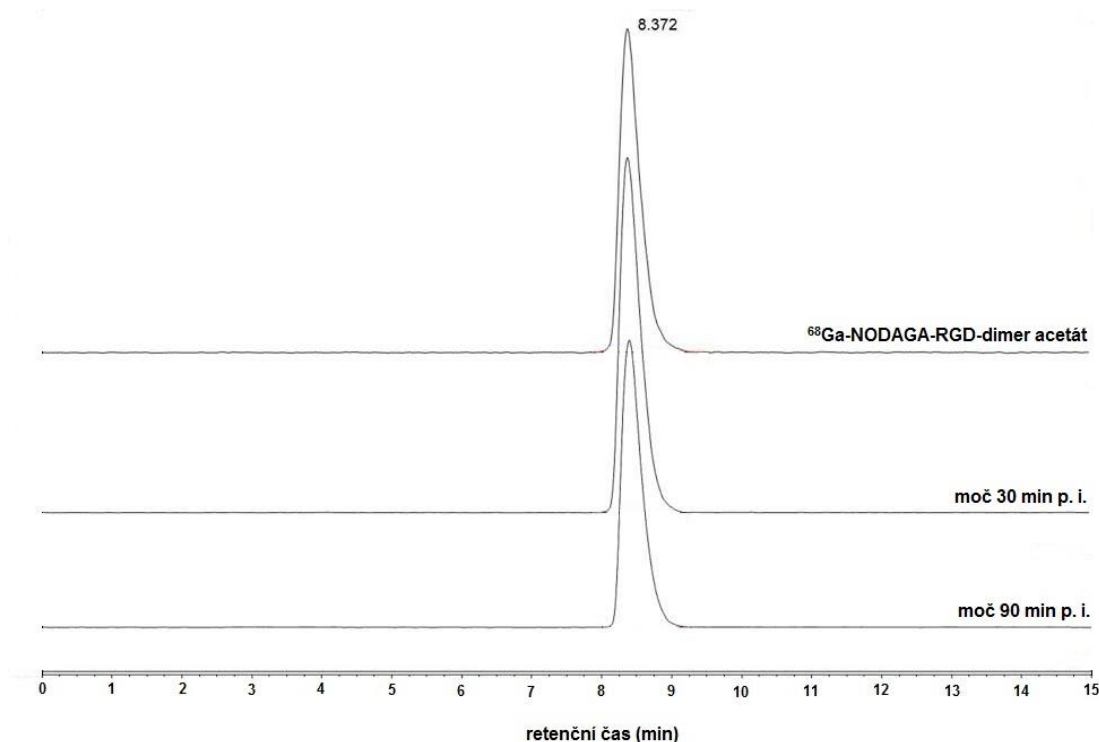
Z dat naměřených automatickým gama počítačem jsem vyhodnotila procentuální obsah radioaktivity na koloně a v eluátu. Rozhodující byla hodnota aktivity v eluátu, která vystihuje vazbu radioaktivního komplexu na krevní proteiny. Hodnota pro ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát byla i po 120 minutách nízká (3,97 %). Výsledky měření po 30, 60 a 120 minutách jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Výsledky *in vitro* testování ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Log P \pm SD	Doba inkubace (min)	Vazba na proteiny (%)	Stabilita v lidském séru (%)	Stabilita v 0,1M FeCl_3 (%)	Stabilita v 6mM DTPA (%)	Stabilita po zvýšení pH (%)
-3,39 \pm 0,17	30	4,25	99,9	99,9	99,8	99,9
	60	2,00	99,9	99,9	99,7	99,9
	120	3,97	99,9	99,7	99,8	99,9

3.4.1.5. Testování *in vivo* stability v moči

Na obrázku 12 jsou zobrazeny radiochromatogramy ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu a moči laboratorních myší odebrané 30 a 90 minut po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu. Z obrázku je patrné, že se retenční časy píků na všech třech radiochromatogramech shodují (8,4 min).



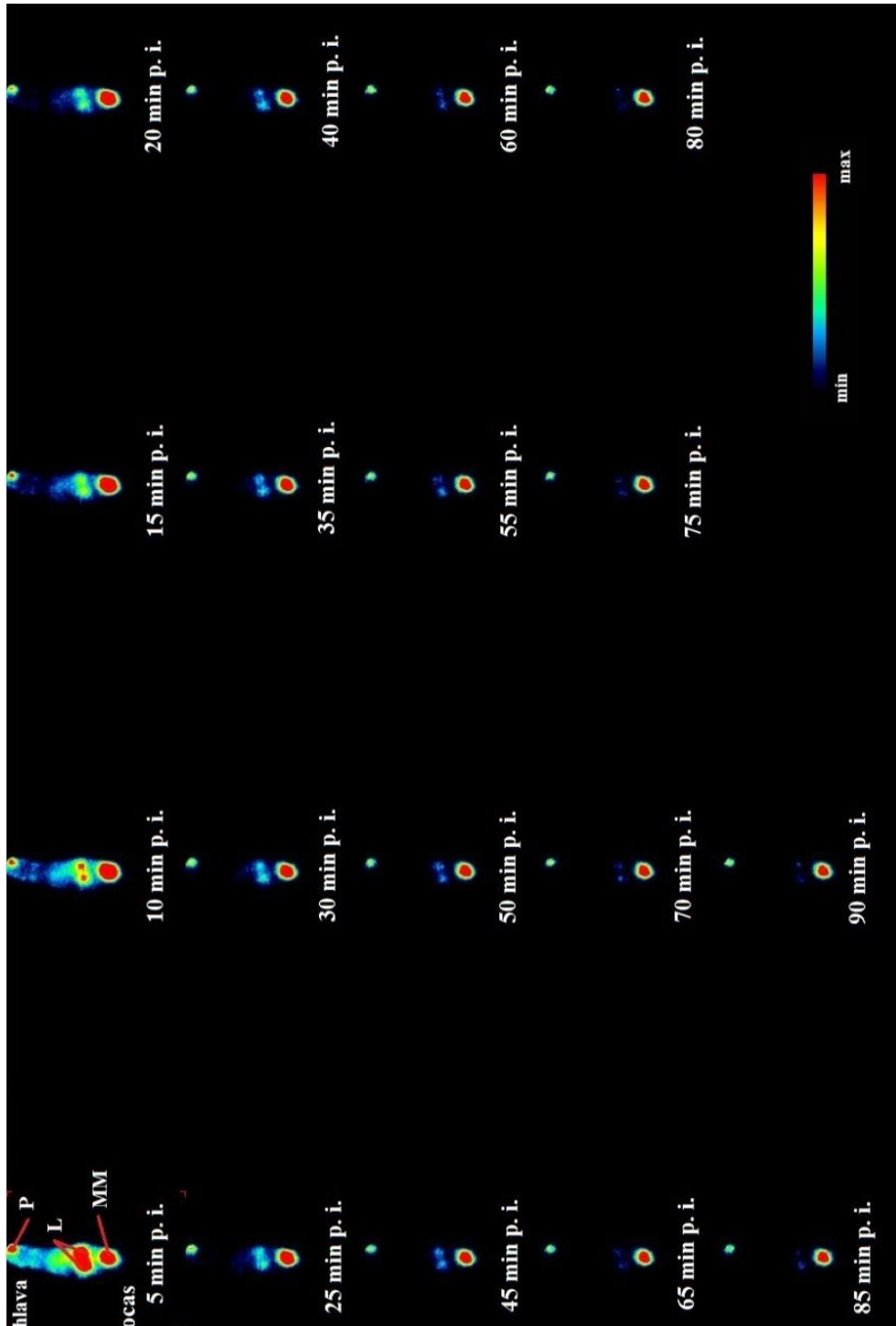
Obrázek 12. Radiochromatogramy vyjadřující *in vivo* stabilitu ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

3.4.1.6. PET/CT zobrazování nenádorových myší

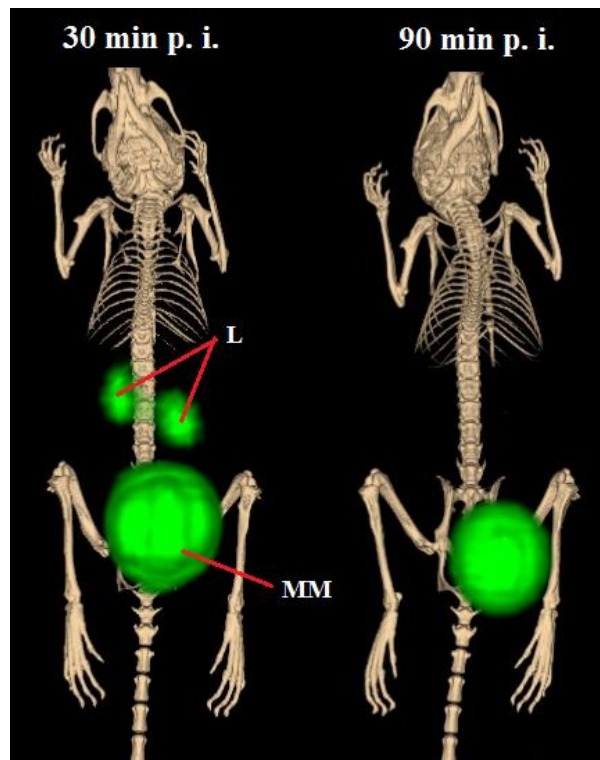
Dynamické PET vyšetření poukazuje na to, že se ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát poměrně rychle dostává z krve přes ledviny do močového měchýře. V žádném jiném orgánu

se nekumuluje. Po 90 minutách od podání látky je již téměř veškerá radioaktivita soustředěna v močovém měchýři (viz obrázek 13).

Výsledky statického PET/CT vyšetření korelují s výsledky dynamického PET skenování. Na obrázku 14 jsou po 30 minutách od podání látky dobře viditelné ledviny a močový měchýř, po 90 minutách od podání je výrazný radioaktivní signál pouze v močovém měchýři.



Obrázek 13. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, P = místo podání).

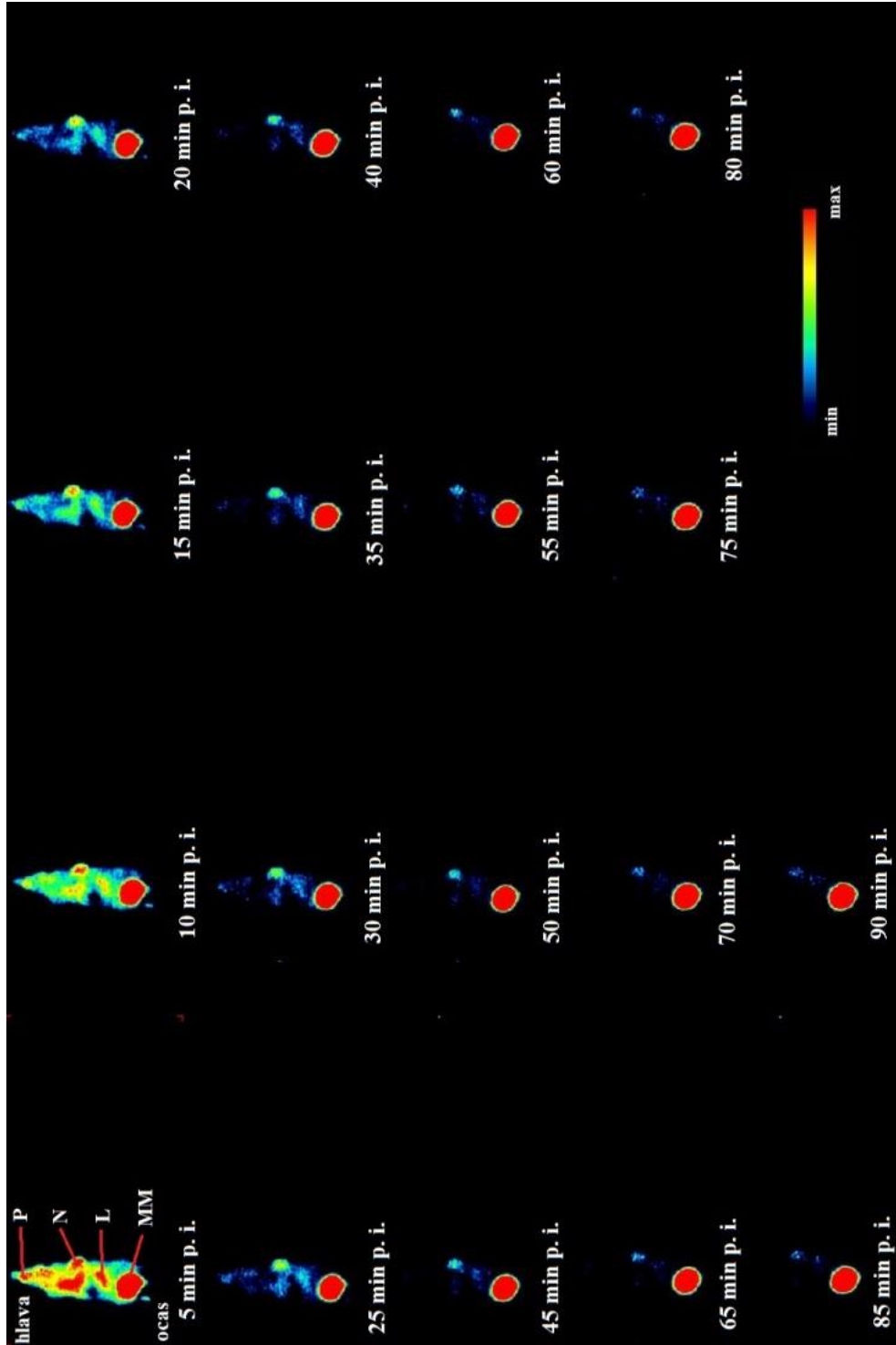


Obrázek 14. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu (L = ledviny, MM = močový měchýř).

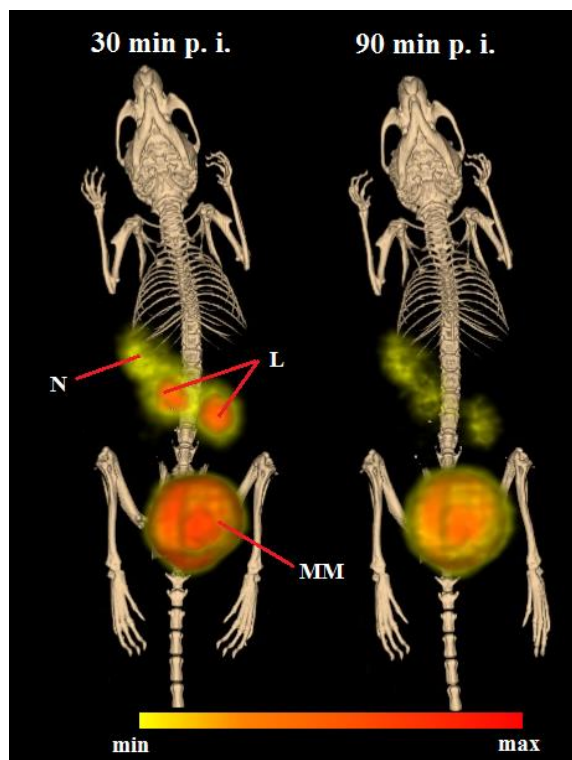
3.4.1.7. PET/CT zobrazování nádorových myší

Na snímcích dynamického PET vyšetření (viz obrázek 15) lze pozorovat, že se ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát kumuluje v nádoru. Dobře pozorovatelný radioaktivní signál v oblasti nádoru je možné identifikovat zhruba 15-60 minut od podání látky. 90 min p. i. není nádor na snímku již příliš výrazný, téměř veškerá radioaktivita je soustředěna v oblasti močového měchýře.

Snímky ze statického PET/CT vyšetření doplňují výsledky z dynamického PET zobrazování. Na obrázku 16 je možné vidět, že 30 min p. i. je radioaktivní signál v nádoru dostatečně výrazný, dále je možné pozorovat kumulaci radioaktivity v ledvinách a močovém měchýři. 90 minut p. i. je nejvýraznější močový měchýř, radioaktivní signál v ledvinách a nádoru je méně výrazný.



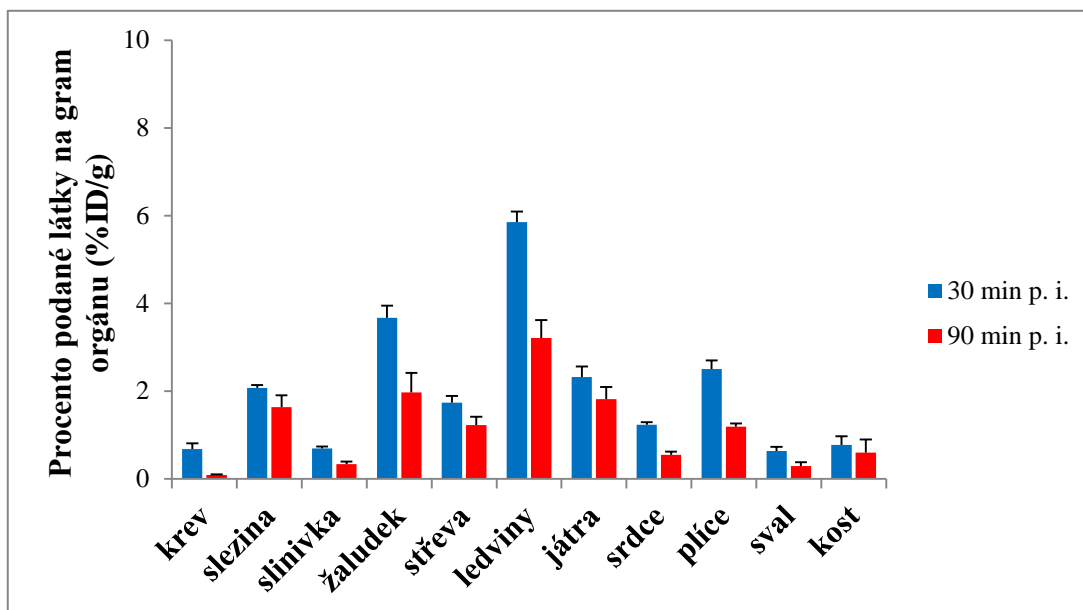
Obrázek 15. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu; koronální řezy (MM = močovný měchýř, N = nádor, L = ledviny, P = místo podání).



Obrázek 16. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu (N = nádor, L = ledviny, MM = močový měchýř).

3.4.1.8. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší

30 minut po podání ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu byla naměřena nejvyšší radioaktivita v ledvinách ($5,85 \pm 0,24$ %ID/g). V krvi byla naměřena radioaktivita $0,68 \pm 0,13$ %ID/g, což poukazuje na to, že se značená látka z krve velice rychle dostává do ledvin a následně do močového měchýře. 90 min p. i. klesla hodnota radioaktivity v krvi na $0,09 \pm 0,01$ %ID/g, nejvyšší radioaktivita byla naměřena opět v ledvinách ($3,21 \pm 0,41$ %ID/g). Zjištěná data pro jednotlivé orgány jsou zobrazena v grafu 1. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

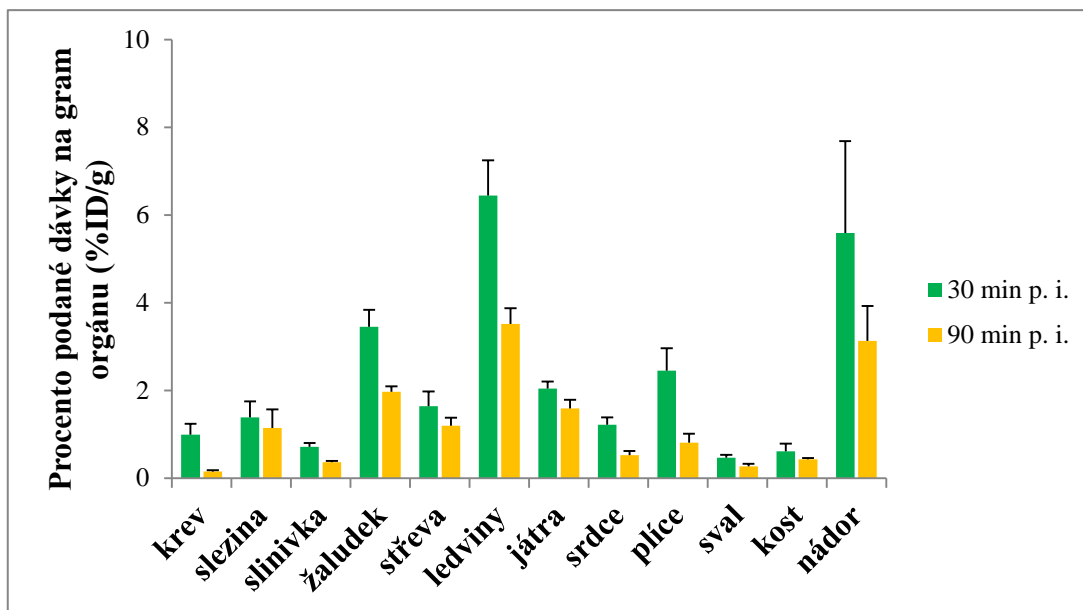


Graf 1. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

3.4.1.9. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší

30 minut p. i. byla nejvyšší radioaktivita zaznamenána v ledvinách ($6,44 \pm 0,80$ %ID/g). Poměrně vysoká hodnota radioaktivity byla naměřena i u nádoru, a to sice $5,59 \pm 2,10$ %ID/g. Hodnota radioaktivity naměřené v krvi činila $1,00 \pm 0,24$ %ID/g. Po 90 minutách od aplikace značené látky zvířeti klesla radioaktivita v ledvinách na hodnotu $3,52 \pm 0,36$ %ID/g, pro nádor byla zjištěna hodnota $3,13 \pm 0,79$ %ID/g a pro krev $0,15 \pm 0,02$ %ID/g. Hodnoty pro všechny sledované orgány jsou zpracovány v grafu 2. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

Ze získaných dat jsem vypočítala také následující poměry: nádor – sval, nádor – krev, nádor – ledviny. Poměr radioaktivity v nádoru a ve svalu vyjadřuje kumulaci látky v nádoru vzhledem k pozadí, za které považujeme sval. Zvyšující se hodnota poměru radioaktivit v nádoru a v krvi v čase vypovídá o specifické kumulaci látky v cílové tkáni. Testovaný peptid se vylučuje přes ledviny do moči, takže je radioaktivita v ledvinách poměrně vysoká. Nicméně stabilní hodnota poměru nádor – ledviny v čase poukazuje na to, že nedochází k nežádoucí kumulaci radioaktivity v ledvinách. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.



Graf 2. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Tabulka 4. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát.

poměr	30 min p. i.	90 min p. i.
nádor - krev	5,62	20,21
nádor - sval	11,94	11,66
nádor - ledviny	0,87	0,89

3.4.2. DOTA-substance P

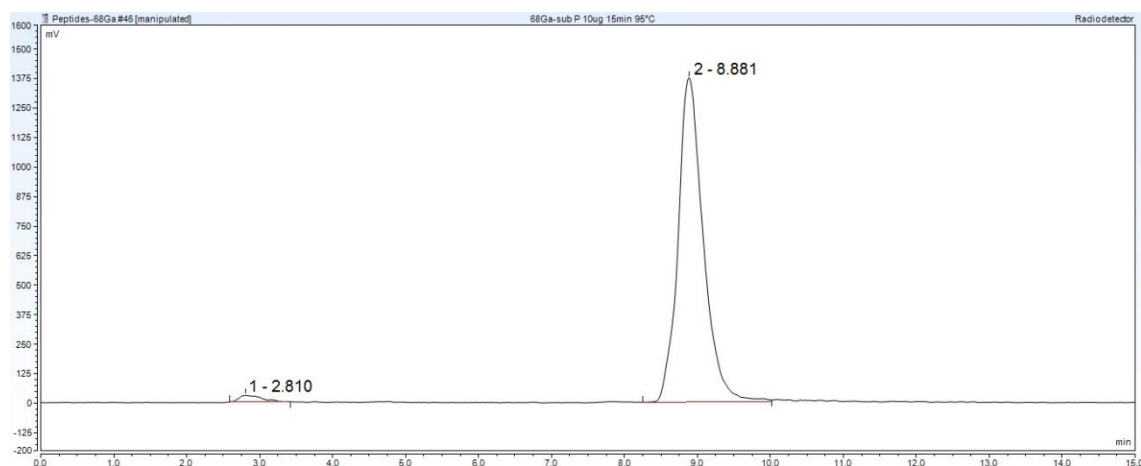
3.4.2.1. Radioaktivní značení

Hodnota radiochemické čistoty zjištěná analýzou RP-HPLC byla při laboratorní teplotě pro všechna testovaná množství peptidu nevyhovující (< 95%). V následných experimentech jsem proto zvolila vyšší reakční teplotu, konkrétně 95°C, radiochemická čistota poté dosahovala vyhovujících hodnot. Množství 1 µg peptidu nebylo pro radioaktivní značení vhodné, jelikož nesplnilo limit radiochemické čistoty ani při vyšší reakční teplotě, 5 µg vyhovovalo požadované hodnotě RCHČ, avšak pro následující experimenty jsem zvolila množství 10 µg, pro které byly hodnoty RCHČ nejvyšší. Výsledky radioaktivního značení jsou shrnuty v tabulce 5. Za optimální podmínky pro radioaktivní značení DOTA-substance P jsem zvolila množství peptidu 10 µg a inkubaci při teplotě 95°C po dobu

15 minut. Retenční čas ^{68}Ga -DOTA-substance P při RP-HPLC byl 8,9 min (viz obrázek 17). Pík s retenčním časem 2,8 min odpovídá izotopu ^{68}Ga , který není vázán v komplexu s peptidem.

Tabulka 5. Optimalizace podmínek radioaktivního značení ^{68}Ga -DOTA-substance P.

množství peptidu (μg)	teplota	reakční čas (min)	RCHČ (%)
1	LT	15	2,4
		60	2,8
		120	5,2
	95°C	15	13,9
		60	24,4
		120	30,6
5	LT	15	5,0
		60	24,7
		120	41,5
	95°C	15	95,1
		60	96,0
		120	95,5
10	LT	15	8,0
		60	33,2
		120	42,8
	95°C	15	96,3
		60	97,2
		120	97,5



Obrázek 17. Radiochromatogram ^{68}Ga -DOTA-substance P.

3.4.2.2. Testy stability

V lidském séru projevil komplex ^{68}Ga -DOTA-substance P vysokou stabilitu, v koncentrovaných roztocích FeCl_3 a DTPA byl však méně stabilní. Radiochemická čistota v obou prostředích v čase klesala. Při pH 6-7 byl komplex stabilní. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6.

3.4.2.3. Rozdělovací koeficient

Výsledná hodnota rozdělovacího koeficientu (log P) pro ^{68}Ga -DOTA-substanci P činila $-3,03 \pm 0,33$ (průměrná hodnota z měření šesti vzorků).

3.4.2.4. Vazba na proteiny

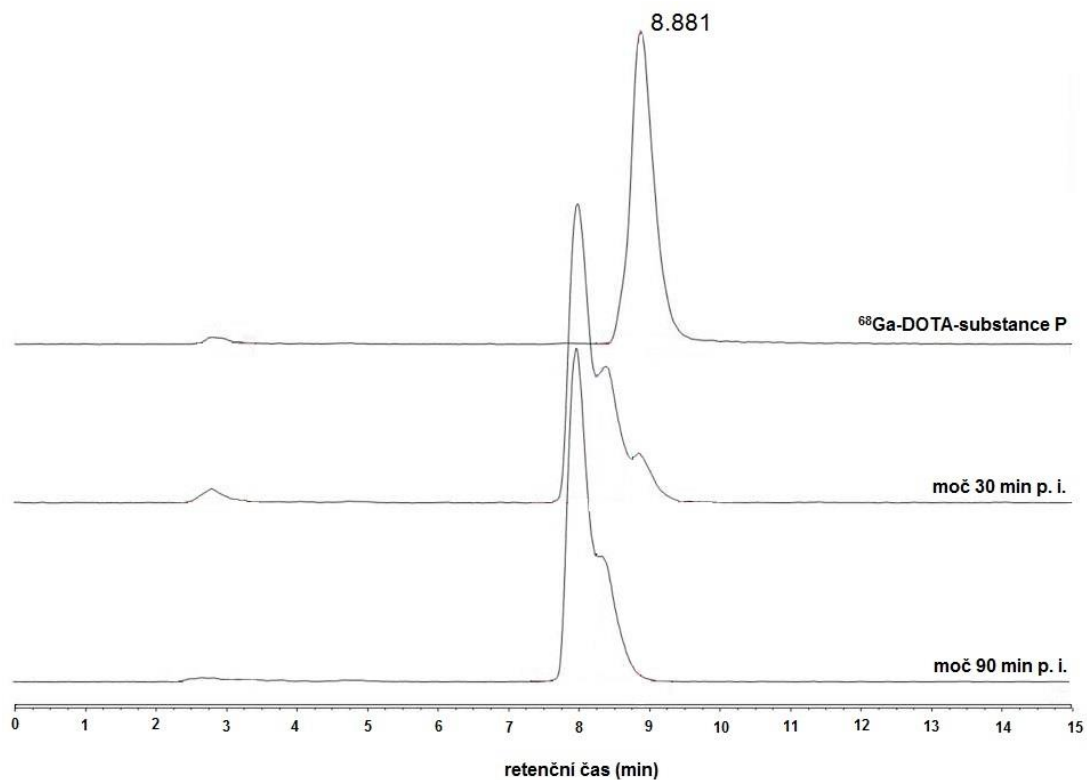
Z dat naměřených automatickým gama počítačem jsem vyhodnotila procentuální obsah radioaktivity na koloně a v eluátu. Procentuální hodnota vyjadřující aktivitu v eluátu byla po 120 minutové inkubaci téměř 30 %. Jednotlivé hodnoty naměřené po 30, 60 a 120 minutách jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Výsledky *in vitro* testování ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Log P \pm SD	Doba inkubace (min)	Vazba na proteiny (%)	Stabilita v lidském séru (%)	Stabilita v 0,1M FeCl_3 (%)	Stabilita v 6mM DTPA (%)	Stabilita po zvýšení pH (%)
$-3,03 \pm 0,33$	30	22,35	98,2	88,4	73,4	98,2
	60	24,49	98,2	85,1	63,1	98,1
	120	29,21	98,0	78,8	56,1	98,1

3.4.2.5. Testování *in vivo* stability v moči

Z radiochromatogramů ^{68}Ga -DOTA-substance P a vzorků moči získaných z laboratorních myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P (viz obrázek 18) je patrné, že je značená látka v organismu degradována. Rozkládá se na dvě složky s retenčními časy 8,0 min a 8,3 min. Upravením podmínek analýzy, případně dalšími postupy by se dalo zjistit, o jaké látky se jedná. Tento fakt však nebyl předmětem zájmu mého testování.

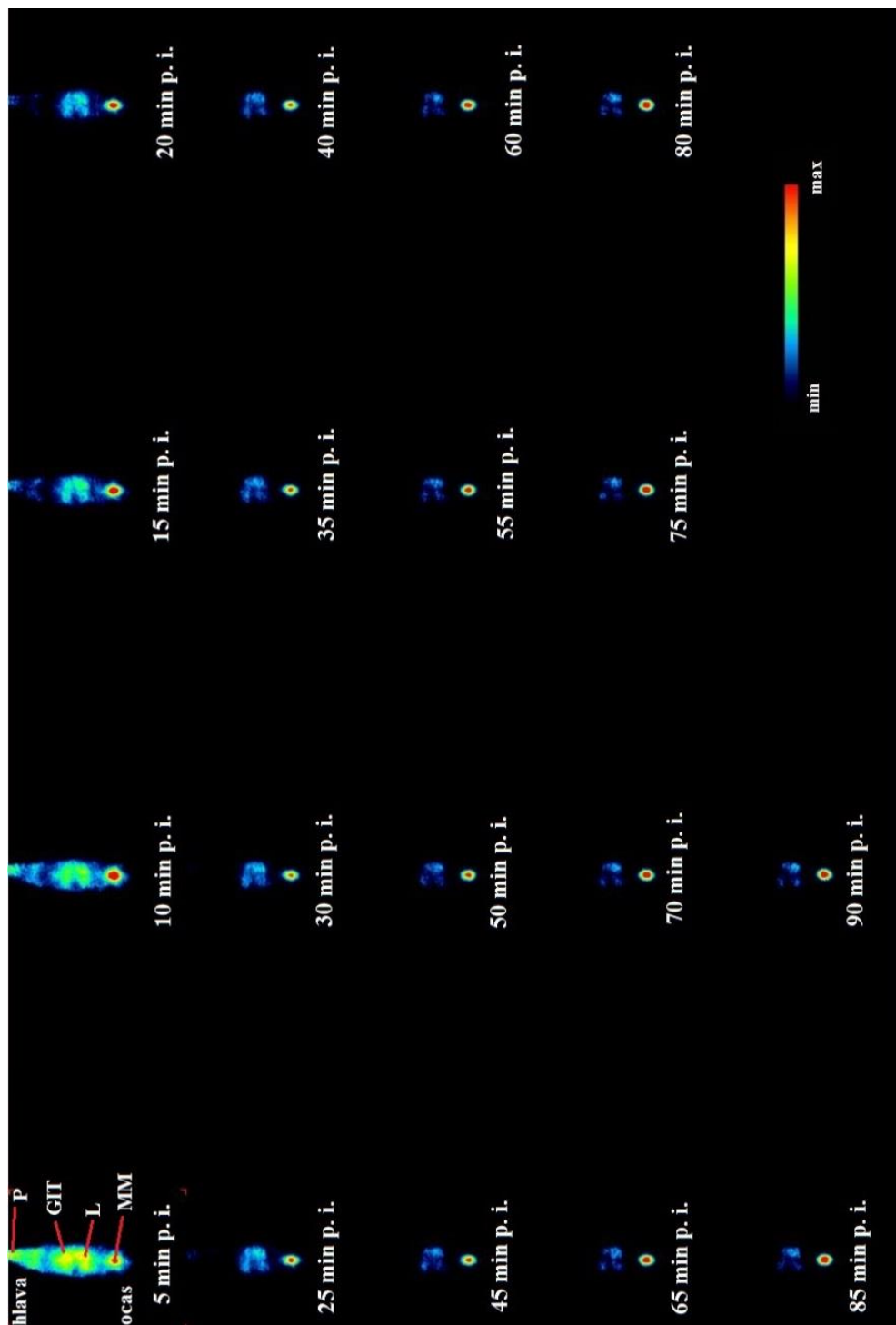


Obrázek 18. Radiochromatogramy vyjadřující *in vivo* stabilitu ^{68}Ga -DOTA-substance P.

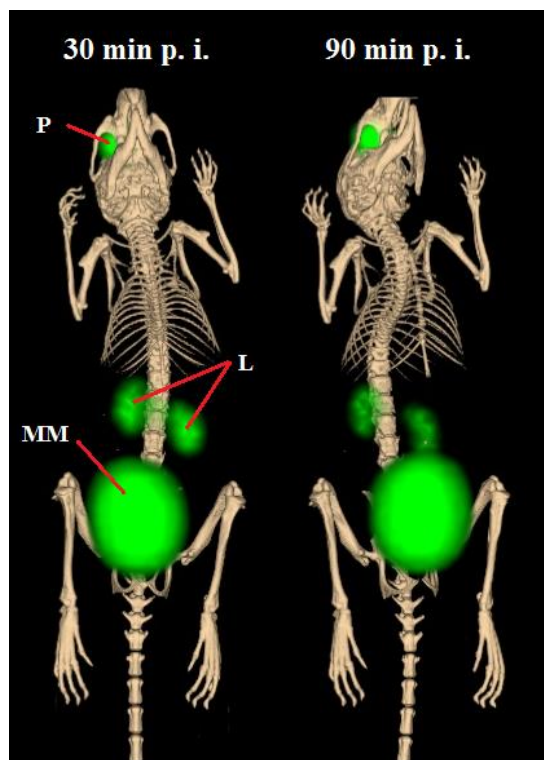
3.4.2.6. PET/CT zobrazování nenádorových myší

Snímky z dynamického PET zobrazování na obrázku 19 ukazují, že se látka ^{68}Ga -DOTA-substance P dostává poměrně rychle krví do ledvin a dále do močového měchýře. Ze snímku je patrná i určitá kumulace radioaktivity v gastrointestinálním traktu. U nenádorových myší je tedy po podání ^{68}Ga -DOTA-substance P nejvyšší kumulace radioaktivity v ledvinách, močovém měchýři a v GIT.

Na snímcích ze statického PET/CT vyšetření (viz obrázek 20) jsou patrná místa s nejvyšší radioaktivitou odpovídající dynamickému PET skenování. Jak po 30 minutách, tak po 90 minutách od podání ^{68}Ga -DOTA-substance P je možné pozorovat dosti výraznou kumulaci radioaktivity v močovém měchýři, dále pak v ledvinách a v místě podání. 90 min p. i. je aktivita v ledvinách nižší a naopak signál močového měchýře je intenzivnější než po 30 minutách od podání látky.



Obrázek 19. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, GIT = gastrointestinální trakt, P = místo podání).

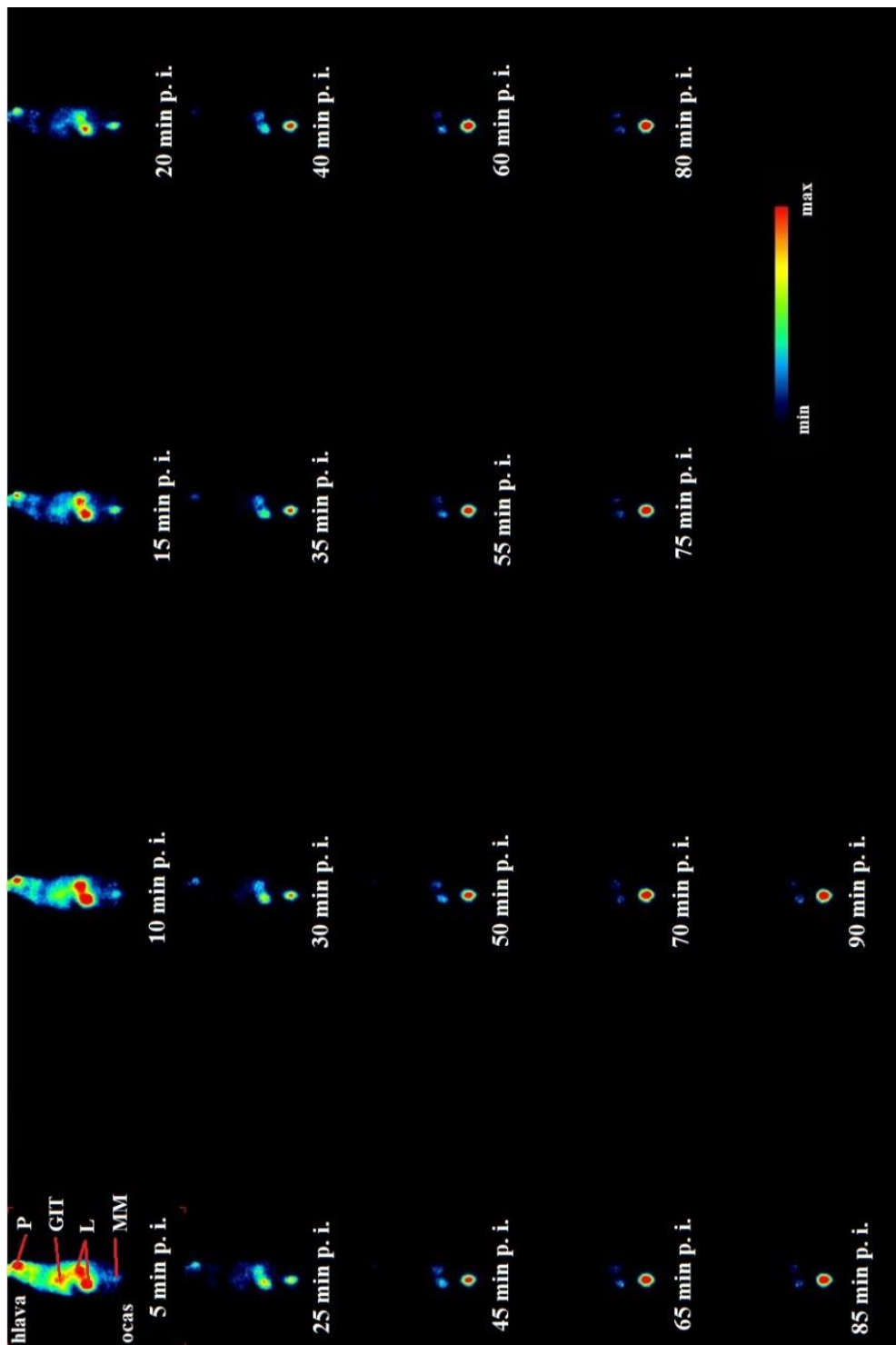


Obrázek 20. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P (P = místo podání, L = ledviny, MM = močový měchýř).

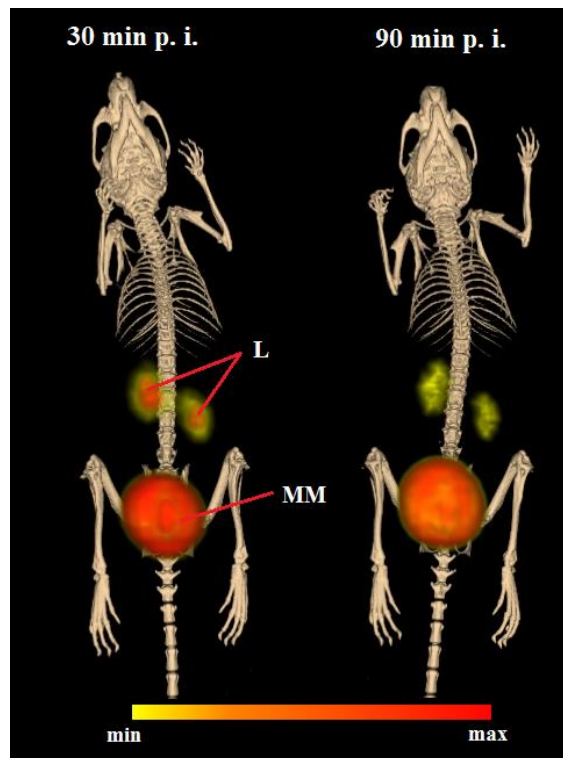
3.4.2.7. PET/CT zobrazování nádorových myší

Na snímcích z dynamického PET vyšetření na obrázku 21 není vůbec pozorovatelná retence radioaktivity v nádoru, ^{68}Ga -DOTA-substance P se v něm tedy nekumuluje. Výrazný radioaktivní signál je ihned po podání zejména v ledvinách, močovém měchýři, místě podání a v gastrointestinálním traktu. 90 min p. i. je radioaktivita soustředěna zejména v oblasti močového měchýře a nepatrně i v ledvinách.

Na obrázku 22 jsou snímky ze statického PET/CT vyšetření. Výrazná akumulace radioaktivity je patrná v ledvinách a močovém měchýři, a to jak 30 minut, tak 90 minut od podání značené látky. Radioaktivní signál v nádoru není na snímcích patrný.



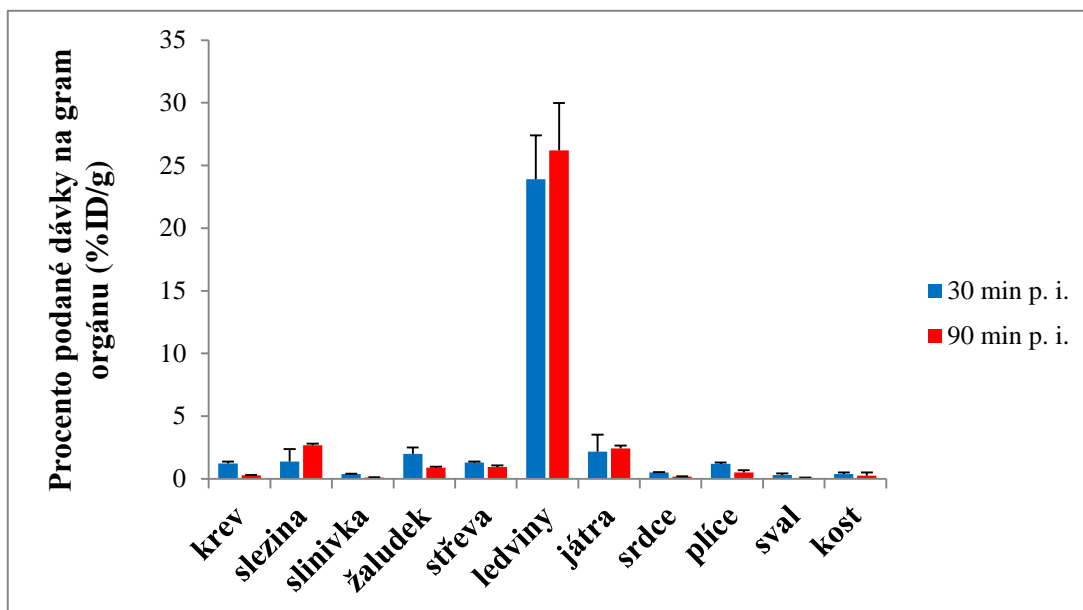
Obrázek 21. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, P = místo podání, GIT = gastrointestinální trakt).



Obrázek 22. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P (L = ledviny, MM = močový měchýř).

3.4.2.8. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší

V grafu 3 jsou zobrazeny výsledky *ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší pro radioaktivně značený peptid ^{68}Ga -DOTA-substance P 30 minut a 90 minut po aplikaci. Nejvýraznější je kumulace radioaktivity v ledvinách s hodnotami $23,90 \pm 3,51$ %ID/g 30 min p. i. a $26,21 \pm 3,77$ %ID/g 90 min p. i. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

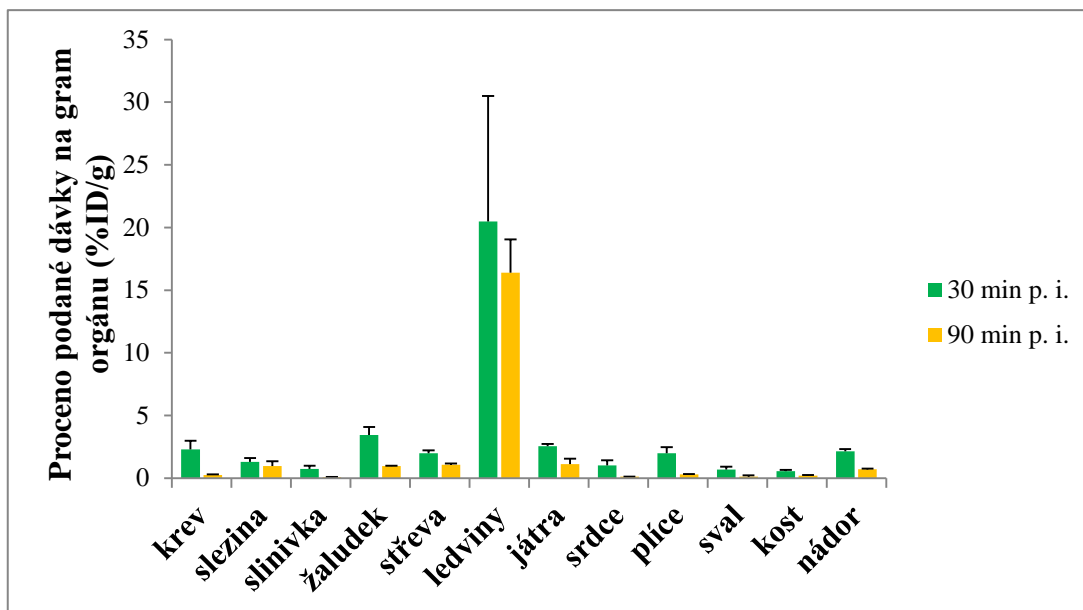


Graf 3. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P.

3.4.2.9. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší

Výsledky *ex vivo* biodistribuce ^{68}Ga -DOTA-substance P u nádorových myší 30 minut a 90 minut po aplikaci opět poukazují na vysokou kumulaci radioaktivity v ledvinách (viz graf 4), přes které se látka vylučuje z krve do močového měchýře. Hodnota radioaktivity v ledvinách činí $20,49 \pm 10,00$ %ID/g 30 min p. i., resp. $16,40 \pm 2,65$ %ID/g 90 min p. i. V nádoru je dle grafu 4 patrná přítomnost radioaktivity, která je však dosti nízká (odpovídající hladině radioaktivitě v krvi), a proto není pozorovatelná na snímcích z PET vyšetření. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

Tabulka 8 zobrazuje výsledky poměrů kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům (krev, sval, ledviny). Hodnota poměru radioaktivit nádor – krev je velmi nízká, což svědčí o tom, že se peptid v nádoru specificky nekumuluje. Poměr radioaktivit nádor – sval vyjadřuje retenci látky v nádoru vzhledem k pozadí. Výsledky poukazují na to, že se radioaktivita zadržuje více v nádoru než ve svalu (pozadí). Hodnoty poměru radioaktivit nádor – ledviny jsou nízké, což vypovídá o vysoké kumulaci ^{68}Ga -DOTA-substance P v ledvinách.



Graf 4. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Tabulka 7. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{68}Ga -DOTA-substance P.

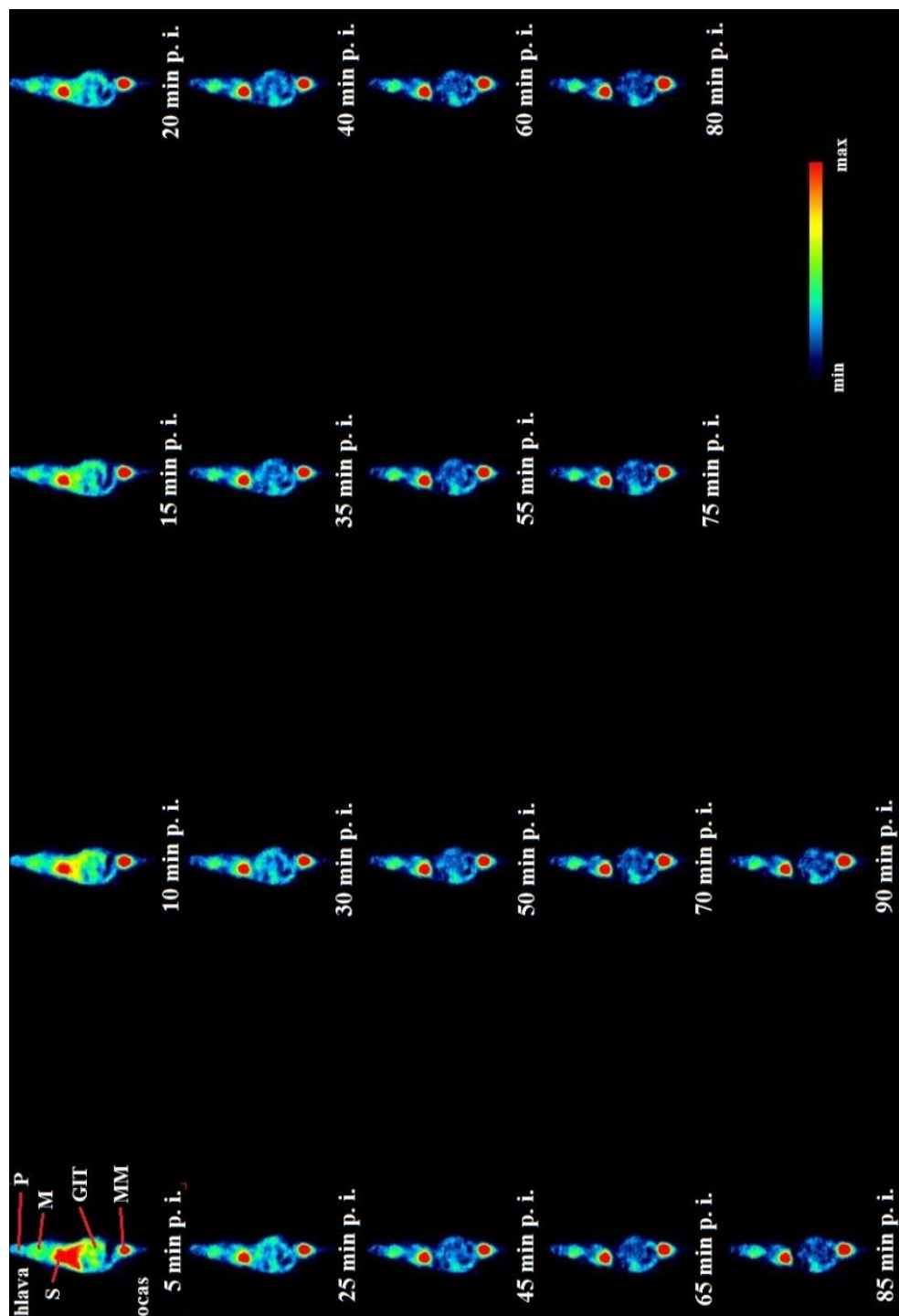
poměr	30 min p. i.	90 min p. i.
nádor - krev	0,93	2,84
nádor - sval	3,10	6,45
nádor - ledviny	0,10	0,04

3.4.3. ^{18}F -fluorodeoxyglukosa

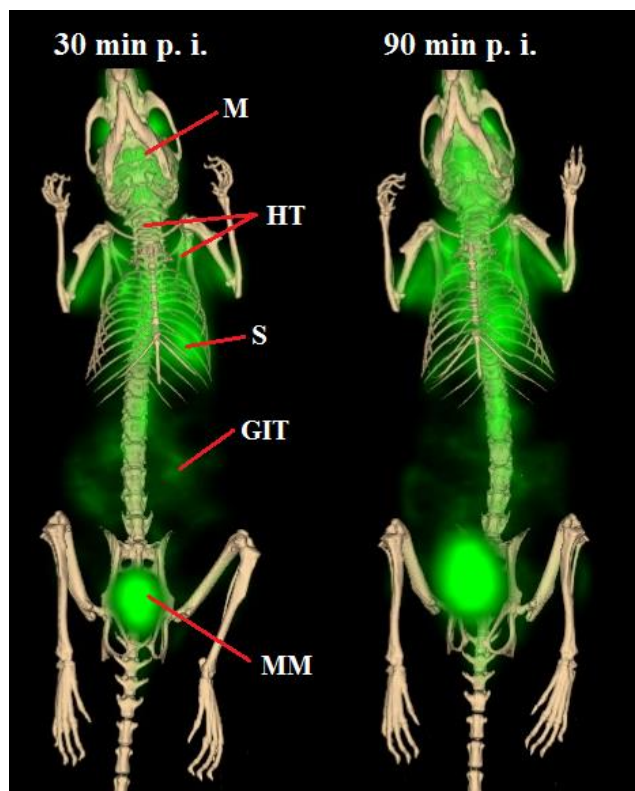
3.4.3.1. PET/CT zobrazování nenádorových myší

Na obrázku 23 lze pozorovat snímky z dynamického PET skenování pro ^{18}F -fluorodeoxyglukosu v nenádorové myši. Kumulace radioaktivity je prakticky ihned po podání výrazná především v oblasti srdce, mozku, gastrointestinálního traktu a močového měchýře. Látka se opět vylučuje přes ledviny do moči, ovšem na exkreci se podílí i gastrointestinální trakt. Ledviny nejsou na obrázku příliš dobře viditelné, jelikož nebylo možné vybrat snímek takového řezu, který by zachycoval všechna místa s vysokou radioaktivitou současně. Po 90 minutách od podání ^{18}F -FDG je zachycena nejvyšší radioaktivita v srdci a močovém měchýři, výrazně radioaktivní jsou i oblasti mozku a gastrointestinálního traktu.

Na snímcích ze statického PET/CT skenování (viz obrázek 24) lze opět pozorovat nejvýraznější oblasti, ve kterých se ^{18}F -fluorodeoxyglukosa kumulovala, a to sice mozek, srdce, oblast hrudníku a krku (retence v hnědém tuku), gastrointestinální trakt a močový měchýř. 90 min p. i. je radioaktivita v srdci a močovém měchýři vyšší než 30 min p. i., naopak radioaktivita v oblasti GIT klesá.



Obrázek 23. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{18}F -FDG; koronární řezy (MM = močový měchýř, P = místo podání, GIT = gastrointestinální trakt, M = mozek, S = srdce).

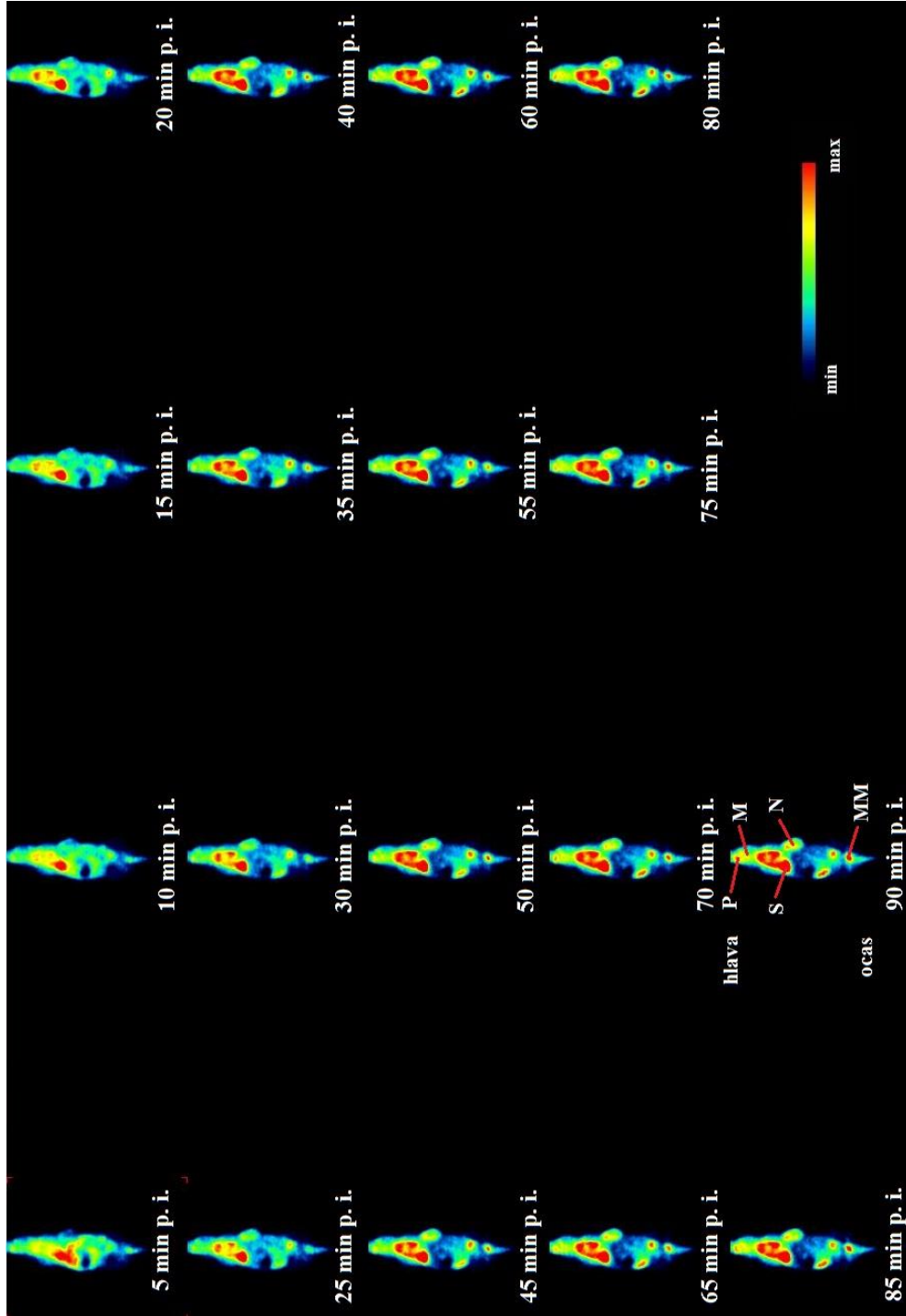


Obrázek 24. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG (M = mozek, S = srdce, GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř, HT = hnědý tuk).

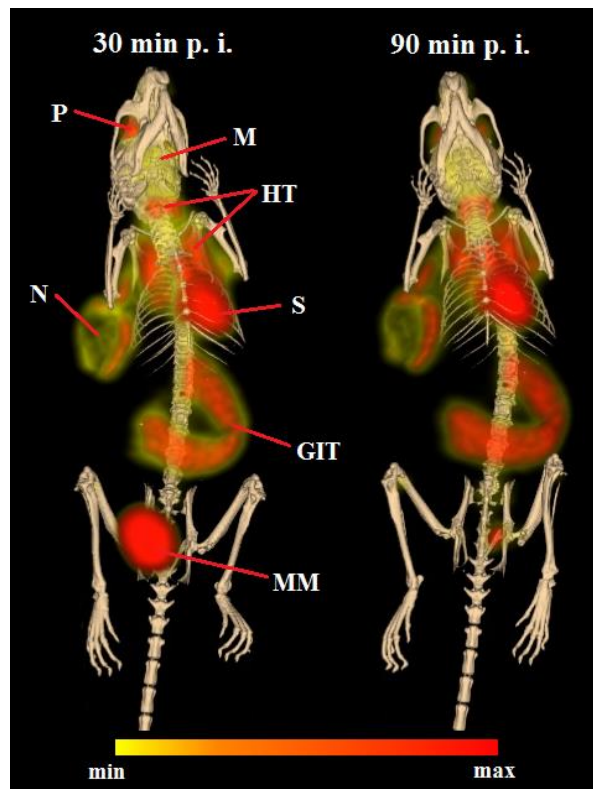
3.4.3.2. PET/CT zobrazování nádorových myší

Obrázek 25 zachycuje výsledky devadesátiminutového dynamického PET vyšetření nádorové myši, které byla r. o. aplikována ^{18}F -FDG. Kumulace radioaktivity v nádoru je dobře pozorovatelná již 30 minut po aplikaci. Avšak ideální je provádět vyšetření 45-60 minut od podání radiofarmaka, kdy je kumulace látky v nádoru vysoká a tumor je na PET snímcích dobře rozlišitelný.

Na obrázku 26 jsou zobrazeny vybrané snímky ze statického PET/CT zobrazování nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG. Akumulace radioaktivity v nádoru je výrazná a velice dobře identifikovatelná a to jak 30, tak 90 minut od podání látky. Relativně vysoká radioaktivita byla zachycena také v oblasti mozku, srdce, GIT, močového měchýře a v hnědém tuku, což koreluje s výsledky statického vyšetření nenádorových myší.



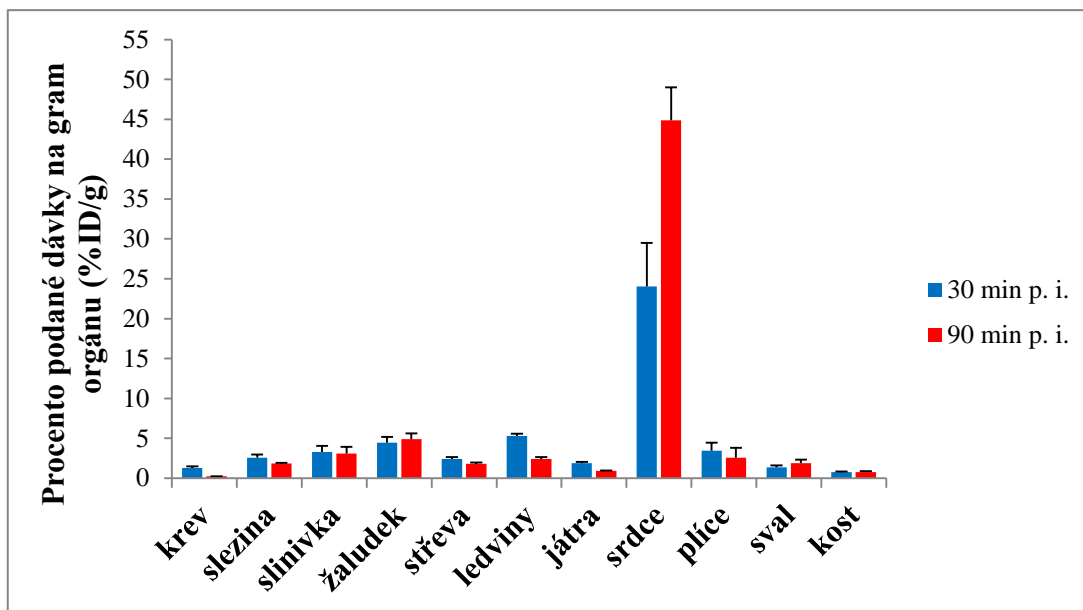
Obrázek 25. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{18}F -FDG; koronární řezy (MM = močový měchýř, P = místo podání, M = mozek, S = srdce).



Obrázek 26. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG (P = místo podání, M = mozek, S = srdce, N = nádor, GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř, HT = hnědý tuk).

3.4.3.3. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší

Z grafu 5 je patrné, že nejvyšší radioaktivita byla naměřena u srdce, konkrétně hodnoty $24,03 \pm 5,45$ %ID/g 30 min p. i. a $44,86 \pm 4,15$ %ID/g 90 min p. i. Orgánem s druhou nejvyšší naměřenou radioaktivitou byly ledviny. 30 min p. i. byla zjištěna hodnota $5,28 \pm 0,28$ %ID/g a 90 min p. i. zhruba poloviční hodnota $2,42 \pm 0,24$ %ID/g. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

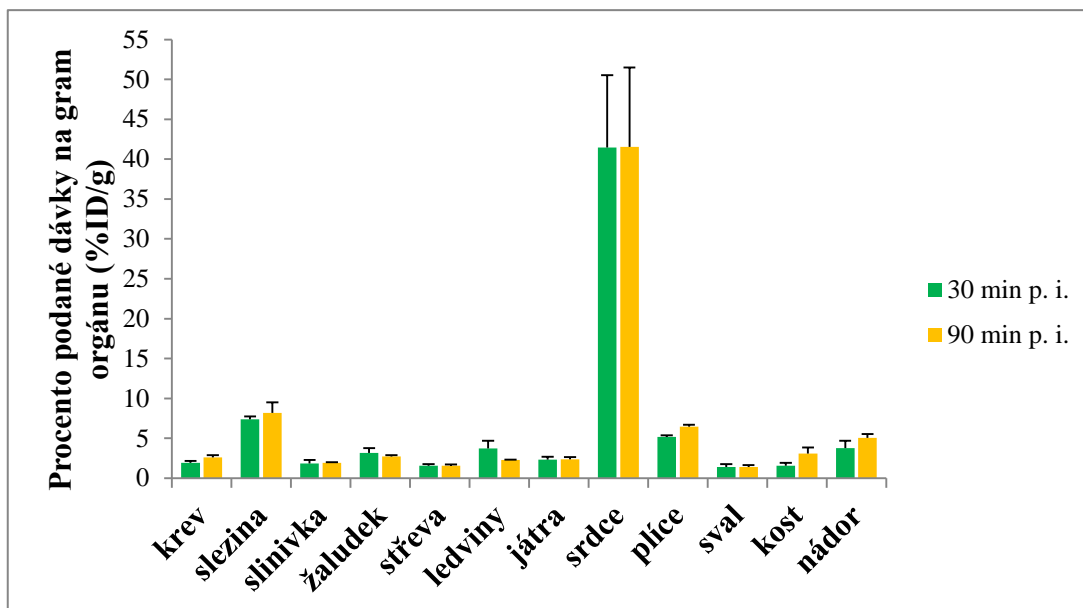


Graf 5. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG.

3.4.3.4. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší

Výsledky *ex vivo* biodistribuce u nádorových myší po aplikaci ^{18}F -fluorodeoxyglukosy jsou znázorněny v grafu 6. Z naměřených hodnot dominují opět hodnoty radioaktivity pro srdce: $41,45 \pm 9,09$ %ID/g 30 min p. i. a $41,54 \pm 9,96$ %ID/g 90 min p. i. Hodnota radioaktivity pro nádor naměřená 30 min p. i. činí $3,77 \pm 0,92$ %ID/g. 90 minut po podání ^{18}F -FDG byla v nádoru zjištěna vyšší radioaktivita, konkrétně $5,05 \pm 0,50$ %ID/g. V každém časovém intervalu byla naměřená data získána ze skupiny tří zvířat.

V tabulce 8 jsou shrnuty poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům. Poměr radioaktivit nádor – krev hovoří ve prospěch nádoru a vyjadřuje míru specifického vychytávání dané látky z krve cílovou tkání (nádorem). Hodnota podílu radioaktivit nádor – sval je dostatečně vysoká a vyjadřuje kumulaci radiofarmaka v nádoru vzhledem k pozadí. Porovnání hodnot radioaktivit pro nádor a pro srdce poukazuje na to, že se látka v poměrně velké míře hromadí v srdci.



Graf 6. Ex vivo biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG.

Tabulka 8. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{18}F -fluorodeoxyglukosa.

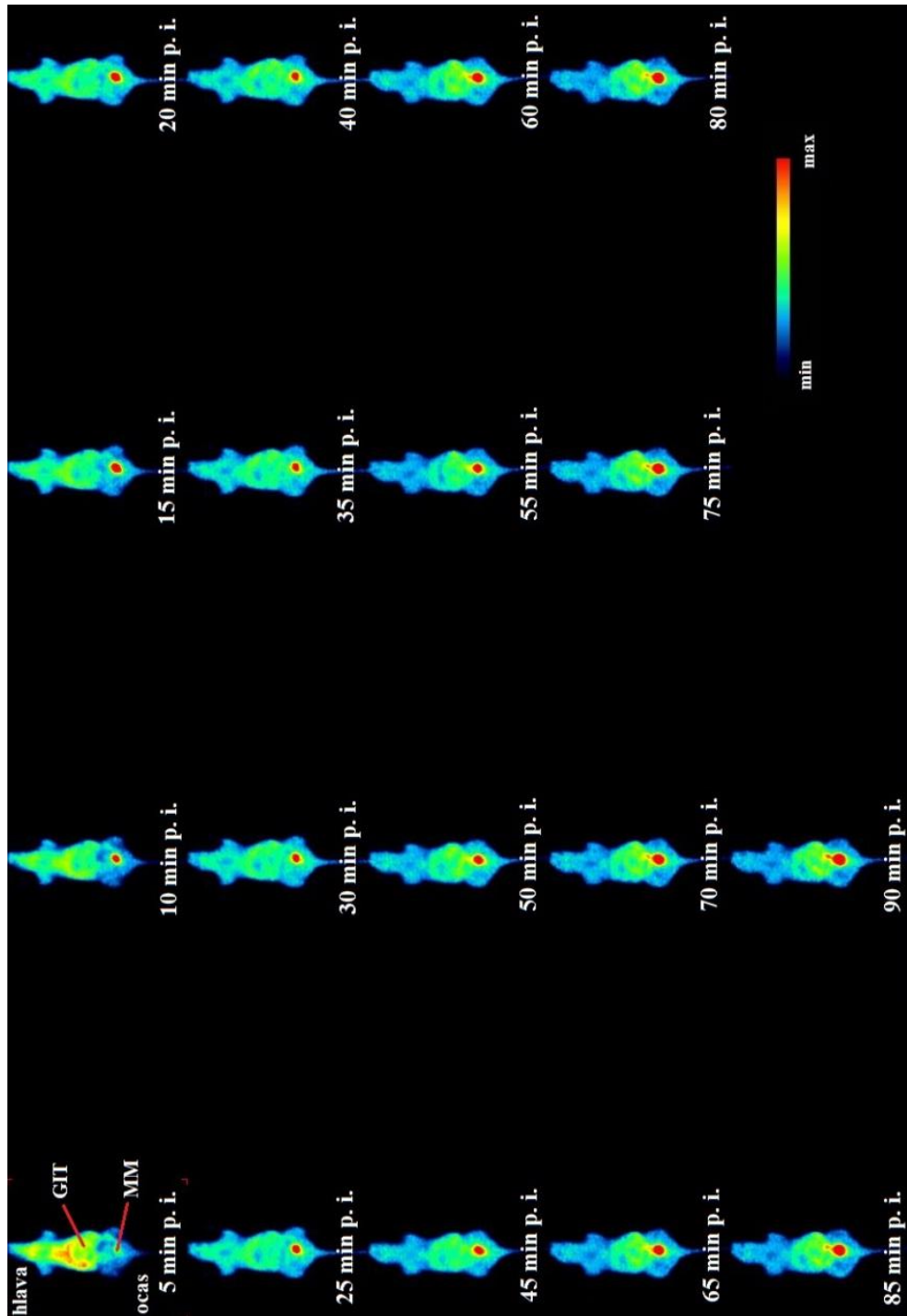
poměr	30 min p. i.	90 min p. i.
nádor - krev	1,96	1,95
nádor - sval	2,67	3,58
nádor - srdce	0,09	0,12

3.4.4. ^{18}F -fluorothymidin

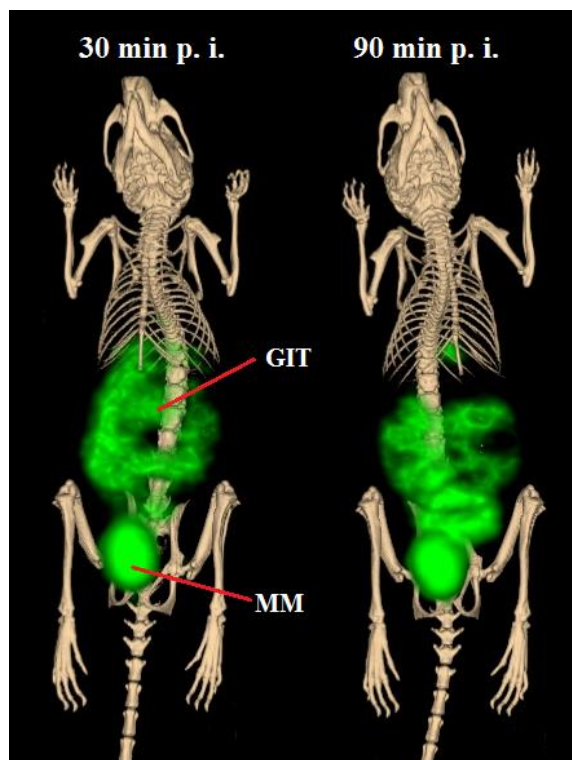
3.4.4.1. PET/CT zobrazování nenádorových myší

Ze snímků dynamického PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{18}F -FLT na obrázku 27 je patrná zvýšená retence radioaktivity v krevním oběhu po celých devadesát minut. Výraznou kumulaci radioaktivity je pak možné pozorovat v oblasti gastrointestinálního traktu a močového měchýře.

Obrázek 28 zachycuje snímky ze statického PET/CT zobrazení ^{18}F -FLT v nenádorové myši 30 a 90 min p. i. Relativně vysoká radioaktivita byla detekována v gastrointestinálním traktu a v močovém měchýři. Obě tyto oblasti jsou výrazně radioaktivní i po 90 minutách od retroorbitálního podání ^{18}F -FLT.



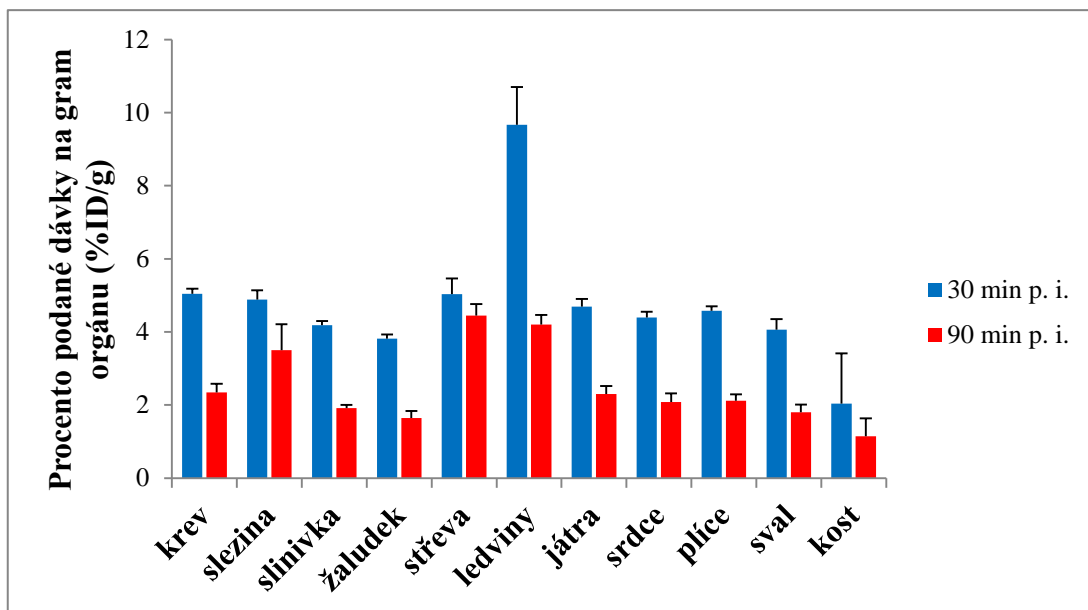
Obrázek 27. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{18}F -FLT; koronární řezy (MM = močový měchýř, GIT = gastrointestinální trakt).



Obrázek 28. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FLT (GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř).

3.4.4.2. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší

V grafu 7 jsou zpracována data charakterizující *ex vivo* biodistribuci u nenádorových myší pro látku ^{18}F -fluorothymidin. Pro krev byly zjištěny hodnoty $5,04 \pm 0,14$ %ID/g 30 min p. i. a $2,34 \pm 0,23$ %ID/g 90 min p. i., které potvrzují vyšší zadržování radioaktivity v krevním oběhu. Nejvyšší hodnoty radioaktivity byly opět naměřeny pro ledviny, konkrétně $9,67 \pm 1,03$ %ID/g 30 min p. i. a $4,20 \pm 0,27$ %ID/g 90 min p. i. Hodnota radioaktivity ve střevech byla stanovena po 30 minutách od podání látky jako $5,03 \pm 0,43$ %ID/g a po 90 minutách od podání látky jako $4,45 \pm 0,31$ %ID/g. Ze získaných dat plyne, že radioaktivita ve střevech s časem příliš neklesá, což koreluje s obrázky z dynamického a statického skenování.



Graf 7. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FLT.

4. Diskuze

Multiformní glioblastom (GBM) patří mezi nejzávažnější typy mozkových nádorů. Vyvíjí se z astrocytů (podpůrné buňky CNS), proto jej řadíme do skupiny astrocytárních tumorů. Existují dvě formy GBM rozlišené na základě toho, jaký má nádor vývoj. Vyvíjí-li se z jiného typu mozkového nádoru, označujeme jej jako sekundární glioblastom, častější jsou však případy, kdy se nádor vyvine bez průkazu předchozí existence (tzv. *de novo*), pak je glioblastom označován jako primární (1). Dle klasifikace nádorů na základě jejich malignity podle Světové zdravotnické organizace z roku 2007 se GBM řadí mezi tumory IV., tedy nejzávažnějšího stupně (5).

Velký význam pro včasnou diagnostiku multiformního glioblastomu, která hraje klíčovou roli v následné prognóze tohoto onemocnění, mají zobrazovací metody. V současnosti je trendem používání tzv. hybridních systémů, konkrétně PET/CT nebo PET/MR. Výpočetní tomografie, resp. magnetická rezonance podávají informace o anatomii a pozitronová emisní tomografie podá informace o distribuci radiofarmaka v organismu (20).

Radiofarmaka používaná v onkologii k diagnostice a terapii jsou navržena tak, aby se specificky kumulovala v nádorových tkáních. V neuroonkologii se využívají např. látky ^{18}F FDG, ^{18}F FLT, ^{11}C -methionin a ^{18}F -tryptofan. Tyto látky mají však určitá omezení a nevýhody. Například použití ^{18}F -fluorodeoxyglukosu může vést jak k falešně pozitivním, tak k falešně negativním výsledkům, protože metabolismus ^{18}F FDG v nádoru není zcela specifický a může se vyskytovat i při zánětech či infekcích. Z tohoto důvodu se testují jak nové radionuklidy, tak nové biologicky aktivní látky, které by bylo možné radioaktivně označit a které by vedly ke zpřesnění výsledků vyšetření (53).

Základní podmínky, které musí radionuklid pro radioaktivní značení léčiva splňovat, je vhodný poločas rozpadu s ohledem na plánované použití, snadná dostupnost a jednoduché a rychlé značení v případě radiofarmak, která jsou připravována na oddělení nukleární medicíny. V poslední době je pro přípravu nových radiodiagnostik široce zkoumán zejména izotop ^{68}Ga s poločasem rozpadu 68 minut, který lze získat z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru. Předmětem testování zůstávají především rozličné biologicky aktivní látky vhodné pro radioaktivní značení tímto izotopem.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na studium dvou peptidů značených izotopem ^{68}Ga , konkrétně RGD-dimer acetátu s chelátorem NODAGA a substance-P s chelátorem DOTA. NODAGA-RGD-dimer acetát obsahuje sekvenci aminokyselin arginin – glycin – asparagová kyselina, která vykazuje velkou afinitu k integrinu $\alpha_v\beta_3$

na povrchu aktivovaných nádorových buněk (39). DOTA-substance P interaguje s tachykininovými receptory typu NK1, jejichž aktivita souvisí se vznikem a vývojem nádoru (42). V rámci své bakalářské práce jsem provedla řadu *in vitro* a *in vivo* experimentů se záměrem vyhodnotit potenciál testovaných látek pro radiodiagnostiku glioblastomu a výsledky jsem porovnávala s klinicky používanými radiofarmaky, jmenovitě s ^{18}F -fluorodeoxyglukosou a ^{18}F -fluorothymidinem.

Radioaktivní značení obou testovaných peptidů bylo relativně snadné a rychlé, avšak ^{68}Ga se do komplexu s NODAGA-RGD-dimer acetátem vázalo lépe než do komplexu s látkou DOTA-substance P. Radioaktivního značení o vysoké radiochemické čistotě (> 95%) pro NODAGA-RGD-dimer acetát se dosáhlo po 15 minutách při laboratorní teplotě, kdežto u látky DOTA-substance P bylo potřeba reakční směs 15 minut inkubovat při teplotě 95°C. Lišilo se také množství peptidů potřebných pro vyhovující RCHČ. Pro radioaktivní značení NODAGA-RGD dimer acetátu jsem používala množství 5 μg , kdežto u DOTA-substance P bylo zapotřebí dvojnásobné množství.

^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát prokázal vysokou stabilitu ve všech testovaných prostředích, kterými byly koncentrované roztoky FeCl_3 a DTPA, lidské sérum a prostředí s vyšším pH (pH = 6-7). ^{68}Ga -DOTA-substance P byla velmi stabilní v prostředí lidského séra a v roztoku s vyšším pH, ale v roztocích FeCl_3 , resp. DTPA probíhal postupný rozklad komplexu. V koncentrovaném roztoku FeCl_3 docházelo pravděpodobně k výměně iontu $^{68}\text{Ga}^{3+}$ za ion Fe^{3+} a v roztoku DTPA docházelo k transchelataci $^{68}\text{Ga}^{3+}$ z komplexu s peptidem do komplexu s DTPA. ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát tedy při *in vitro* testování jevil mnohem vyšší stabilitu než ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Hodnota rozdělovacího koeficientu (log P) pro ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát byla stanovena jako $-3,39 \pm 0,17$ a pro ^{68}Ga -DOTA-substanci P jako $-3,03 \pm 0,33$. Oba testované peptidy prokázaly hydrofilní vlastnosti a z tohoto pohledu byly vhodné pro jejich zamýšlené použití.

Jelikož se jedná o látky, které by se mohly potenciálně aplikovat pacientům, bylo důležité ověřit také jejich vazbu na krevní proteiny. ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát vykazoval výborné výsledky, procentuální vyjádření vazby na proteiny daného peptidu činilo pouze 3,97 % po 120 minutové inkubaci. U látky ^{68}Ga -DOTA-substance P byla vazba na proteiny několikanásobně vyšší (29,21 % po 120 minutách inkubace) ve srovnání s ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetátem.

Výsledky analýz vzorků moči odebraných laboratorním myším 30 min p. i. a 90 min p. i. měly odhalit, zda jsou testované peptidy v organismu metabolizovány. U látky

^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát se retenční časy všech tří píků (radiochromatogram aplikované látky, moči odebrané 30 min p. i. a moči odebrané 90 min p. i., viz obrázek 12) shodovaly (8,4 min), z čehož vyplývá, že látka není v těle degradována a vylučuje se močí v nezměněné podobě. Z radiochromatogramů na obrázku 18 lze usoudit, že ^{68}Ga -DOTA-substance P se na rozdíl od ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu v těle velmi rychle rozkládá a vznikají dva metabolity.

Nedílnou součástí této práce byly také *in vivo* experimenty, jejichž cílem bylo určit biodistribuci studovaných látek v laboratorních myších. U látky ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát aplikované nenádorovým myším byly výrazným orgánem, ve kterém se kumuloval radioaktivní komplex, ledviny, přes něž se látka poměrně rychle vylučovala do močového měchýře. Právě v oblasti močového měchýře byla pozorovatelná vysoká akumulace radioaktivity, a to zejména 90 minut po podání látky (viz obrázky 13, 14). U ^{68}Ga -DOTA-substance P byly v nenádorových myších zjištěny obdobné výsledky, navíc byla v krátkém časovém intervalu po podání látky zjištěna kumulace radioaktivity v gastrointestinálním traktu, který se pravděpodobně částečně podílí na vylučování tohoto peptidu (viz obrázek 19).

Pro porovnání *in vivo* chování studovaných látek v laboratorních myších byla k zobrazování hybridním systémem PET/CT aplikována také klinicky používaná radiofarmaka ^{18}F FDG a ^{18}F FLT. Na vylučování ^{18}F -fluorodeoxyglukosy se podílí ledviny a GIT, proto byla v těchto oblastech zjištěna vysoká retence radioaktivity (viz obrázky 23, 24). Látka se rovněž kumulovala v metabolicky aktivních tkáních – v hnědém tuku, v oblasti srdce a mozku, což by mohlo být omezujícím faktorem při diagnostice mozkového nádoru. Naproti tomu ^{18}F -fluorothymidin se zadržoval především v oblasti GIT a močového měchýře (viz obrázky 27,28).

Výsledky biodistribuce testovaných látek v nádorových myších ukázaly, že ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát se výrazně kumuloval v nádoru, což je zřetelně viditelné na obrázcích 15 a 16. Po 90 minutách od podání látky je již akumulace radioaktivity v nádorové tkáni méně výrazná, ideální doba pro vyšetření je tedy zhruba po 15-60 minutách od podání látky. Na snímcích z dynamického (obrázek 21) ani statického (obrázek 22) skenování není patrná kumulace ^{68}Ga -DOTA-substance P v nádoru. Nehromadění této látky v nádoru neodpovídá teoretickým předpokladům, nicméně plně podporuje výsledky získané ze studia *in vitro* a *in vivo* stability této látky. ^{68}Ga -DOTA-substance P je v organismu velmi rychle metabolizována, což zabraňuje její potenciální kumulaci v nádorové tkáni.

^{18}F -FDG se v nádoru zadržovala a nádor byl dobře rozlišitelný (viz obrázky 25, 26). U laboratorních myší byl nádor aplikován subkutánně na pravý bok. Otázkou je, zda by byl

nádor dostatečně kontrastní při ortotopické aplikaci nádoru, protože ^{18}F -fluorodeoxyglukosa se ve velké míře kumuluje v mozku. U ^{18}F -FLT nebylo provedeno zobrazování nádorových myší z důvodu nedostatku laboratorních myší s dostatečně vyvinutým nádorem v termínu dodání ^{18}F -FLT. Nicméně, ^{18}F -fluorothymidin byl jako radiodiagnostikum pro multiformní glioblastom studován mimo jiné v rámci bakalářské práce studentky Hany Adámkové v roce 2014 (54). Na základě tohoto testování se ^{18}F -FLT jevil jako vhodnější radiofarmakum pro diagnostiku GBM než ^{18}F -FDG, jelikož retence ^{18}F -FLT v nádorové tkáni byla dostatečně vysoká a kumulace radioaktivity v mozku byla podstatně nižší než retence ^{18}F -FDG.

Data získaná z *ex vivo* biodistribučních experimentů plně korespondovala s výsledky získanými pomocí PET/CT zobrazování. Z *ex vivo* biodistribučních dat pro nenádorové myší dominovaly hodnoty akumulované radioaktivity v ledvinách, a to jak u ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu, tak u ^{68}Ga -DOTA-substance P. Avšak u peptidu ^{68}Ga -DOTA-substance P byla kumulace radioaktivity v ledvinách několikanásobně vyšší než u ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu. Pro ^{18}F -fluorodeoxyglukosu byla nejvyšší hodnota radioaktivity naměřena u srdce, hodnoty kumulované radioaktivity pro ledviny jsou srovnatelné s hodnotou pro ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát. Hodnoty pro ^{18}F -fluorothymidin jsou vyšší než pro ostatní testované látky z důvodu vysoké retence radioaktivity v krevním oběhu. Nejvyšší hodnota radioaktivity byla zaznamenána opět v ledvinách.

U *ex vivo* experimentů na nádorových myších bylo zjištěno, že hodnota akumulované radioaktivity pro nádor 30 min p. i. u látky ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát je přibližně dvakrát vyšší než pro látku ^{68}Ga -DOTA-substance P. Tato data potvrzují informace z PET/CT skenování. ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát se v nádoru kumuluje v poměrně velké míře a umožňuje identifikaci nádoru na PET snímcích, kdežto na snímcích z PET vyšetření pro ^{68}Ga -DOTA-substanci P není nádor pozorovatelný kvůli nízké retenci látky v tumoru způsobenou velmi nízkou *in vivo* stabilitou této látky. U ^{18}F -FDG je hodnota radioaktivity v nádoru o něco nižší než u látky ^{68}Ga -NODAGA-RGD-dimer acetát, ale naopak vyšší než u látky ^{68}Ga -DOTA-substance P. Tato radioaktivita kumulovaná v tumoru je dostačující k identifikaci nádoru na snímcích z PET zobrazování. Pro ^{18}F -FLT nebylo provedeno měření radioaktivity v jednotlivých orgánech a nádoru, jelikož nebyl k dispozici dostatek laboratorních myší s dostatečně vyvinutým nádorem v termínu dodání ^{18}F -FLT.

5. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem prováděla preklinické testování ^{68}Ga značených peptidů NODAGA-RGD dimer acetátu a DOTA-substance P, které by mohly být v budoucnu využívány pro efektivnější diagnostiku multiformního glioblastomu pomocí pozitronové emisní tomografie. Preklinické testování zahrnovalo jak *in vitro*, tak *in vivo* experimenty.

Radioaktivní značení bylo relativně snadno proveditelné u obou testovaných peptidů, avšak ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát se jevil jako mnohem stabilnější než komplex ^{68}Ga -DOTA-substance P, což se projevilo v rozdílném *in vivo* chování obou peptidů. ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát se u nádorových myší kumuloval v nádoru v mnohem vyšší míře než metabolicky degradovaná ^{68}Ga -DOTA-substance P. Díky zvýšené akumulaci radioaktivity v nádorové tkáni umožňoval ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát zřetelné zobrazení nádoru pomocí pozitronové emisní tomografie. Na základě výsledků získaných z *in vitro* a *in vivo* experimentů ^{68}Ga značených peptidů se jevil jako vhodný kandidát pro radiodiagnostiku multiformního glioblastomu zejména ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát.

Součástí mé bakalářské práce bylo rovněž porovnání *in vivo* chování ^{68}Ga značených peptidů s klinicky používanými radiofarmaky, konkrétně s ^{18}F -fluorodeoxyglukosou a ^{18}F -fluorothymidinem. ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát prokázal výhodnější farmakokinetické vlastnosti v porovnání s ^{18}F -FDG a ^{18}F -FLT, což potvrdilo vysoký potenciál ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu pro diagnostiku multiformního glioblastomu metodou pozitronové emisní tomografie.

Radiofarmaka značená izotopem ^{68}Ga našla v posledních letech významné uplatnění v nukleární medicíně a mnoho látek značených tímto radioizotopem má velký potenciál pro využití v klinické praxi. Výhodou těchto radiofarmak je relativně jednoduché a rychlé radioaktivní značení a krátký poločas rozpadu radionuklidu snižující radiační zátěž vyšetřovaných pacientů. Komplex ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát lze podle získaných dat považovat za další z řady nadějných potenciálních radiofarmak značených izotopem ^{68}Ga . Na základě této studie se ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát jevil jako perspektivní radiodiagnostikum pro diagnostiku multiformního glioblastomu v klinické praxi.

Seznam obrázků

Obrázek 1. Multifonní glioblastom ve spánkové oblasti mozku. **(a)** Snímek z magnetické rezonance (MR) s použitím kontrastní látky. **(b)** Fotografie zobrazující rozsáhlou oblast patologické tkáně (6).

Obrázek 2. Princip výpočetního tomografu (14).

Obrázek 3. Srovnání CT a MR. V levé části snímek z CT, v pravé části snímek z MR (16).

Obrázek 4. Princip SPECT – schéma zobrazující nerozptýlené fotony absorbované v krystalu, fotoefekt a Comptonův rozptyl (8).

Obrázek 5. Schematické znázornění radionuklidového generátoru $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (34).

Obrázek 6. Struktury běžných chelatačních činidel pro ^{68}Ga (38).

Obrázek 7. Struktura látky NODAGA-RGD dimer acetát.

Obrázek 8. Struktura látky DOTA-substance P.

Obrázek 9. Struktura látky ^{18}F -FDG (47).

Obrázek 10. Struktura látky ^{18}F -FLT (51).

Obrázek 11. Radiochromatogram ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Obrázek 12. Radiochromatogramy vyjadřující *in vivo* stabilitu ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Obrázek 13. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, P = místo podání).

Obrázek 14. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu (L = ledviny, MM = močový měchýř).

Obrázek 15. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu; koronální řezy (MM = močový měchýř, N = nádor, L = ledviny, P = místo podání).

Obrázek 16. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu (N = nádor, L = ledviny, MM = močový měchýř).

Obrázek 17. Radiochromatogram ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Obrázek 18. Radiochromatogramy vyjadřující *in vivo* stabilitu ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Obrázek 19. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, GIT = gastrointestinální trakt, P = místo podání).

Obrázek 20. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P (P = místo podání, L = ledviny, MM = močový měchýř).

Obrázek 21. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P; koronální řezy (MM = močový měchýř, L = ledviny, P = místo podání, GIT = gastrointestinální trakt).

Obrázek 22. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P (L = ledviny, MM = močový měchýř).

Obrázek 23. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{18}F -FDG; koronární řezy (MM = močový měchýř, P = místo podání, GIT = gastrointestinální trakt, M = mozek, S = srdce).

Obrázek 24. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG (M = mozek, S = srdce, GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř, HT = hnědý tuk).

Obrázek 25. Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{18}F -FDG; koronární řezy (MM = močový měchýř, P = místo podání, M = mozek, S = srdce).

Obrázek 26. Statické PET/CT vyšetření nádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG (P = místo podání, M = mozek, S = srdce, N = nádor, GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř, HT = hnědý tuk).

Obrázek 27. Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{18}F -FLT; koronární řezy (MM = močový měchýř, GIT = gastrointestinální trakt).

Obrázek 28. Statické PET/CT vyšetření nenádorové myši 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FLT (GIT = gastrointestinální trakt, MM = močový měchýř).

Seznam grafů

Graf 1. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Graf 2. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Graf 3. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Graf 4. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Graf 5. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG.

Graf 6. *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FDG.

Graf 7. *Ex vivo* biodistribuce u nenádorových myší 30 min a 90 min po aplikaci ^{18}F -FLT.

Seznam tabulek

Tabulka 1. Klasifikace astrocytárních nádorů, WHO 2007 (5).

Tabulka 2. Optimalizace podmínek radioaktivního značení NODAGA-RGD dimer acetátu.

Tabulka 3. Výsledky *in vitro* testování ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetátu.

Tabulka 4. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{68}Ga -NODAGA-RGD dimer acetát.

Tabulka 5. Optimalizace podmínek radioaktivního značení ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Tabulka 6. Výsledky *in vitro* testování ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Tabulka 7. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{68}Ga -DOTA-substance P.

Tabulka 8. Poměry kumulace radioaktivity v nádoru k vybraným orgánům pro látku ^{18}F -fluorodeoxyglukosa.

6. Použitá literatura

1. **Kozler, P et al.** *Intrakraniální nádory*. 1. Praha : Galén, 1998.
2. **Sofroniew, MV a Vinters, HV.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010, 119, stránky 7-35.
3. **American Brain Tumor Association.** American Brain Tumor Association. [Online] 2014. [Citace: 7. Leden 2015.] <http://www.abta.org/secure/glioblastoma-brochure.pdf>.
4. **Louis, DN et al.** The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007, 114, stránky 97-109.
5. **Fadrus, P, Lakomý, R, Hübnerová, P et al.** Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie. *Interní med.* 2010, 12, stránky 376-381.
6. **Rees, JH et al.** From the Archives of the AFIP. Glioblastoma Multiforme: Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics.* 1996, 16, stránky 1413-1438.
7. **Janota, J.** Magnetická rezonance. *Practicus.* 2008, 7, stránky 34-36.
8. **Kupka, K, Kubinyi, J, Šámal, M et al.** *Nukleární medicína*. 1. Praha : P3K, 2007.
9. **Ollinger, JM a Fessler, JA.** Positron-Emission Tomography. *IEEE Signal Process. Mag.* 1997, 97, stránky 43-55.
10. **Wathen, CA et al.** In vivo X-Ray Computed Tomographic Imaging of Soft Tissue with Native, Intravenous, or Oral Contrast. *Sensors.* 2013, 13, stránky 6957-6980.
11. **Navrátil, L, Rosina, J et al.** *Medicínská biofyzika*. 1. Praha : Grada, 2005.
12. **Peterová, V.** CT – základy vyšetření, indikace, kontraindikace, možnosti, praktické zkušenosti. *Med. Pro Praxi.* 2010, 7, stránky 90-94.
13. **Hrazdira, I a Mornstein, V.** *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. Brno : Neptun, 2001.
14. **Wikimedia Commons.** Princip CT. *Wikimedia Commons.* [Online] 2009. [Citace: 20. Únor 2015.] http://cs.wikipedia.org/wiki/Počítačová_tomografie.
15. **Erkonen, WE a Smith, WL.** *Radiology: The Basics and Fundamentals of Imaging*. 3. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
16. **Savage, N.** Path Found to a Combined MRI and CT Scanner. *IEEE Spectrum.* [Online] 2013. [Citace: 28. Únor 2015.] <http://spectrum.ieee.org/biomedical/imaging/path-found-to-a-combined-mri-and-ct-scanner>.
17. **Bělohávek, O a Fencl, P.** Hybridní zobrazování výpočetní a pozitronovou emisní tomografií. *Interní med.* 2004, 2, stránky 61-63.
18. **Sharp, PF, Gemmell, HG a Murray, AD.** *Practical Nuclear Medicine*. 3. London : Springer-Verlag, 2005.

19. **Saha, GB.** *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 6. New York : Springer Science+Business Media, 2010.
20. **Torigian, DA et al.** PET/MR Imaging: Technical Aspects and Potential Clinical Applications. *Radiology*. 2013, 267, stránky 26-44.
21. **Šlampa, P, Burkoň, P a Komínek, L.** Glioblastom přehled léčby. *Postgrad. med.* 2010, 7, stránky 760-765.
22. **Dubrow, R et al.** Time trends in glioblastoma multiforme survival: the role of temozolomide. *Neuro-Oncology*. 2013, 15, stránky 1750-1761.
23. **Franceschi, E et al.** Treatment options for recurrent glioblastoma: pitfalls and future trends. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009, 9, stránky 613-619.
24. **Kočárek, E, Pánek, M a Novotná, D.** *Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v cytogenetice*. 2. Praha : Karolinum, 2010.
25. **Sánchez, F et al.** ALBIRA: A small animal PET/SPECT/CT imaging system. *Med Phys*. 2013, 40, 051906.
26. **Xie, Q et al.** A highly invasive human glioblastoma pre-clinical model for testing therapeutics. *J Transl Med.* 2008, 6, stránky 77-90.
27. **ATCC.** Brain Tumor Cell Lines. *ATCC*. [Online] 2011. [Citace: 5. Duben 2015.]
28. **ATCC.** U-87 MG (ATCC® HTB-14™). *ATCC*. [Online] 2014. [Citace: 7. Únor 2015.] https://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=cz&slp=1#.
29. **Clark, MJ et al.** U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLoS Genet.* 2010, 6, stránky 1-16.
30. **abcam.** U-87 MG (Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line) Nuclear Lysate (ab14903). *abcam*. [Online] 2012. [Citace: 7. Únor 2015.] <http://www.abcam.com/u-87-mg-humanglioblastoma-astrocytoma-epithelial-like-cell-line-nuclear-lysateab14903.html>.
31. **Dearling, JLJ et al.** Specific uptake of ^{99m}Tc-NC100692, an αvβ3-targeted imaging probe, in subcutaneous and orthotopic tumors. *Nucl Med Biol.* 2013, 40, stránky 788-794.
32. **Huszthy, PC et al.** In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro-Oncology*. 2012, 14, stránky 979-993.
33. **Candolfi, M et al.** Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol.* 2007, 85, stránky 133-148.
34. **Lázniček, M a Komárek, P.** *Základy radiofarmacie*. 1. Praha : Karolinum, 1998.
35. **Fani, M, André, JP a Maecke, HR.** ⁶⁸Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging.* 2008, 3, stránky 53-63.

36. **Velikyan, I.** Prospective of ^{68}Ga -Radiopharmaceutical Development. *Theranostics*. 2014, 4, stránky 47-80.
37. **Petrik, M et al.** In vitro and in vivo evaluation of selected ^{68}Ga -siderophores for infection imaging. *Nucl Med Bio*. 2012, 39, stránky 361-369.
38. **Zeglis, BM a Lewis, JS.** A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Trans*. 2011, 40, stránky 6168-6195.
39. **Oxboel, J et al.** Comparison of two angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl Med Bio*. 2014, 41, stránky 259-267.
40. **Knetsch, PA et al.** [^{68}Ga]FSC-(RGD)₃ a trimeric RGD peptide for imaging $\alpha_v\beta_3$ integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold—synthesis and evaluation. *Nucl Med Biol*. 2015, 42, stránky 115-122.
41. **Zitzmann, S, Ehemann, V a Schwab, M.** Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD)-Peptide Binds to Both Tumor and Tumor-Endothelial Cells in Vivo. *Cancer Research*. 2002, 62, stránky 5139-5143.
42. **Łazarczyk, M, Matyja, E a Lipkowski, A.** Substance P and its receptors – a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies. *Folia Neuropathol*. 2007, 45, stránky 99-107.
43. **Bom, AT et al.** Substance P in Long-Lasting Asthma. Immunoinflammatory pathways. *Allergy Clin Immunol Int*. 2006, 18, stránky 1-7.
44. **Mozaffari, S et al.** Synthesis and Preliminary Evaluation of a New $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Labeled Substance P Analogue as a Potential Tumor Imaging Agent. *IJPR*. 2015, 14, stránky 97-110.
45. **SÚKL. PŘÍBALOVÁ INFORMACE: INFORMACE PRO UŽIVATELE 2-[^{18}F]-FDG. SÚKL.** [Online] 2010. [Citace: 21. Březen 2015.] <http://www.sukl.cz/download/pil/PI3142.pdf>.
46. **Fougère, C et al.** Molecular imaging of gliomas with PET: Opportunities and limitations. *Neuro-Oncology*. 2011, 13, stránky 806-819.
47. **Wikimedia Commons.** Chemical structure of fludeoxyglucose (^{18}F) [^{18}F -FDG]. *Wikimedia Commons*. [Online] 2009. [Citace: 21. Březen 2015.] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fludeoxyglucose_18-F_skeletal.svg.
48. **Barthel, H et al.** 3'-Deoxy-3'-[^{18}F]Fluorothymidine as a New Marker for Monitoring Tumor Response to Antiproliferative Therapy in Vivo with Positron Emission Tomography. *CanRes*. 2003, 63, stránky 3791-3798.
49. **Schiepers, C et al.** ^{18}F -fluorothymidine kinetics of malignant brain tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007, 34, stránky 1003-1011.

50. **RadioMedic.** PŘÍBALOVÁ INFORMACE: INFORMACE PRO UŽIVATELE 3'-[18F]FLT, INJ. *RadioMedic.* [Online] 2010. [Citace: 21. Březen 2015.] http://www.radiomedic.biznysweb.cz/domain/radiomedic/files/nove_spc_pil/PIL_FLT.pdf.
51. **Sigma-Aldrich.** 3'-Deoxy-3'-fluorothymidine. *Sigma-Aldrich.* [Online] 2015. [Citace: 21. Březen 2015.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/361275?lang=en&ion=CZ>.
52. **Ministerstvo zdravotnictví ČR.** *Český lékopis 2009 - Doplněk 2013.* 1. Praha : Grada, 2013.
53. **Doležalová, I, Bolčák, K a Kuba, R.** Využití pozitronové emisní tomografie (PET) v neurologii. *Neurol. praxi.* 2014, 15, stránky 16-21.
54. **Adámková, H.** *Zobrazování myšího modelu glioblastoma multiforme pomocí PET/CT systému.* Olomouc, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.