



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Využití RGD peptidů značených galliem-68 pro zobrazování  
multiformního glioblastomu**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:

Michaela Holá

Studijní program:

B1501 Experimentální biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.

## Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Michaela Holá
<b>Název práce:</b>	Využití RGD peptidů značených galliem-68 pro zobrazování multifornního glioblastomu
<b>Typ práce:</b>	Diplomová
<b>Pracoviště:</b>	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2017

### Abstrakt:

Tato diplomová práce je zaměřena na hodnocení tří různých RGD peptidů (DOTA-c(RGDfK), NODAGA-c(RGDyK), NODAGA-c(RDGyK)<sub>2</sub>) které jsou modifikovány chelatačními činidly, prostřednictvím kterých je umožněno jejich radioaktivní značení galliem-68. RGD peptidy se akumulují v nádorech zvýšeně exprimujících integrin  $\alpha\beta3$  (marker angiogeneze). Tyto radioaktivně značené RGD peptidy by mohly být úspěšně použity pro *in vivo* zobrazování nádorů. Naše studie zahrnuje všechny relevantní fáze radiofarmaceutického testování, tj. optimalizace podmínek značení, testování radiochemické čistoty (HPLC, TLC), stanovení plazmatické stability, testování stability v různých chemických prostředích, stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda. Vhodné deriváty těchto peptidů byly použity pro *in vivo* zobrazování gliomů (buněčná linie U-87-MG) v laboratorních myších. Zobrazování bylo provedeno pomocí systému microPET/CT a výsledné hodnoty byly porovnány s daty biodistribučních studií *ex vivo*. Bylo zjištěno, že peptidy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) se kumulovaly v nádoru v mnohem větší míře, než tomu bylo u <sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK). Avšak retence v ledvinách byla u všech výše zmíněných peptidů totožná. Tudíž jsou tyto radiofarmaka vhodná pro zobrazování nádoru GMB.

**Klíčová slova:** glioblastom, integrin  $\alpha v \beta 3$ , angiogeneze, RGD peptidy, gallium-68, DOTA-c(RGDfK), DOTA-c(RGDfK), NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, PET, CT

**Počet stran:** 117

**Jazyk:** Čeština

## Bibliographical identification

<b>Author's first name and surname:</b>	Michaela Holá
<b>Title:</b>	Gallium-68 labelled RGD peptides evaluation for imaging of glioblastoma multiforme
<b>Type of thesis:</b>	Master
<b>Department:</b>	Institute of Molecular and Translational Medicine
<b>Supervisor:</b>	PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D.
<b>The year of presentation:</b>	2017

### Abstract:

The thesis is focused into critical evaluation of three different RGD peptides coupled with chelators to enable their radiolabelling with gallium-68. RGD peptides are accumulated in tumors overexpressing  $\alpha\beta3$  integrin (marker of angiogenesis). Such radiolabelled RGD peptides could be successfully used to image tumors *in vivo*. Our study involved all appropriate stages of radiopharmaceutical testing i.e. optimisation of labelling conditions, radiochemical purity tests (HPLC, TLC), plasma stability assays, testing of stability in various chemical environments, octanol-water partition coefficient determination. Suitable derivatives were used for *in vivo* imaging of gliomas (cell line U-87 MG) in mouse model. The imaging will be carried out in microPET/CT system and its results will be compared with *ex vivo* biodistribution study. The  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  peptides were found to accumulate in the tumor much greater than  $^{68}\text{Ga-DOTA-c(RGDfK)}$ . However, retention in the kidney was identical for all of the above-mentioned peptides. Therefore, these radiopharmaceuticals are suitable for imaging the GMB tumor.

**Keywords:** glioblastoma, integrins  $\alpha v \beta 3$ , angiogenesis, RGD peptides, gallium- 68, DOTA-c(RGDfK), NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK), PET, CT

**Number of pages:** 117

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedení PharmDr. Zbyňka Nového, Ph.D. s použitím citované literatury a dalších informačních zdrojů uvedených v seznamu literatury na konci práce.

V Olomouci, 12. 5. 2017

.....

Podpis

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Zbyňku Novému, Ph.D. za cenné rady, připomínky, a zvláště za velkou ochotu, trpělivost a vstřícnost během vypracování celé této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu PharmDr. Miloši Petříkovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při řešení problémových situací experimentální části týkající se této práce. Také bych chtěla poděkovat Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za zpřístupnění svého gama počítače. Na závěr velké díky patří mé rodině a příteli za jejich podporu během studia a vypracování této práce.

## OBSAH

Seznam zkratk a symbolů.....	10
Úvod .....	12
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Multiformní glioblastom .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	13
1.1.2 Etiologie.....	14
1.1.3 Klinický obraz.....	15
1.1.4 Diagnostika .....	15
1.1.5 Terapie GMB .....	17
1.1.5.1 Temozolomid.....	18
<b>1.2 Preklinické modely multiformního glioblastomu .....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Zavedené buněčné linie pro testování glioblastomu na myších .....	20
1.2.1.1 U-87 MG.....	20
1.2.2 Štěp odvozený z pacienta.....	23
1.2.3 Geneticky navržené lidské mozkové buňky .....	25
1.2.4 Geneticky upravená myš.....	26
<b>1.3 Monitorování multiformního glioblastomu pomocí RGD peptidů .....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Integrin $\alpha\beta 3$ .....	28
1.3.2 RGD peptidy a jejich funkce při monitorování GMB .....	30
1.3.2.1 DOTA-c(RGDfK).....	31
1.3.2.2 NODAGA-c(RGDyK).....	33
1.3.2.3 NODAGA-c(RGDyK) <sub>2</sub> .....	34
1.3.3 Chelátory užívané při značení RGD peptidů .....	36
1.3.3.1 DOTA .....	37
1.3.3.2 NODAGA .....	38
<b>1.4 PET zářič gallium-68 .....</b>	<b>40</b>
1.4.1 <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga generátor.....	40
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>43</b>
<b>3 Materiály a metody .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Materiály.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Chemikálie .....	44
3.1.2 Použité přístroje .....	45
3.1.3 Laboratorní zvířata.....	46
<b>3.2 Metody .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Radioaktivní značení.....	48
3.2.2 Testy stability.....	49
3.2.2.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (P).....	49
3.2.2.2 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s konkurenčním kationtem .....	49
3.2.2.3 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s konkurenčním chelátorem .....	49
3.2.2.4 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s fyziologickým pH .....	50
3.2.3 Stabilita v plazmatickém prostředí a vazba na plazmatické proteiny .....	50
3.2.3.1 Stanovení plazmatické stability .....	50
3.2.3.2 Stanovení vazby na plazmatické proteiny .....	50
3.2.4 Pasážování a kultivace a buněk U-87 MG.....	51
3.2.5 Studie <i>ex vivo</i> biodistribuce (sekční metoda).....	51
3.2.6 Testování degradace radiopeptidů <i>in vivo</i> stanovením jejich radiochemické čistoty v moči.....	53



3.2.7	PET/CT zobrazování biodistribuce radiofarmak .....	53
3.2.7.1	Dynamické PET skenování .....	54
3.2.7.2	Statické PET/CT skenování .....	55
3.2.8	Eutanázie zvířat .....	56
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Značení peptidů <sup>68</sup>Ga .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Testy stability .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Stabilita v plazmatickém prostředí a vazba na plazmatické proteiny .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>Studie ex vivo biodistribuce (sekční metoda) .....</b>	<b>63</b>
4.4.1	Biodistribuce ve zdravých myších .....	63
4.4.2	Biodistribuce v myších s nádorem .....	65
<b>4.5</b>	<b>Testování degradace radiopeptidů in vivo stanovením jejich radiochemické čistoty v moči .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>Biodistribuce monitorovaná pomocí PET .....</b>	<b>71</b>
4.6.1	Kvantifikace dat ze statického PET skenování nenádorových zvířat .....	71
4.6.2	Kvantifikace dat ze statického PET skenování nádorových zvířat .....	73
4.6.3	Kvantifikace dat z dynamického PET skenování nenádorových zvířat .....	76
4.6.4	Kvantifikace dat ze dynamického PET skenování nádorových zvířat .....	78
<b>4.7</b>	<b>Zobrazování pomocí PET/CT .....</b>	<b>80</b>
4.7.1	Dynamické skenování- normální zvířata .....	80
4.7.2	Dynamické skenování - nádorová zvířata .....	83
4.7.3	Statické zobrazení 2D – normální zvířata .....	86
4.7.4	Statické zobrazení 2D – nádorová zvířata .....	89
<b>4.8</b>	<b>Zobrazení 3D modelu statického skenování .....</b>	<b>92</b>
	<b>DISKUZE .....</b>	<b>96</b>
	<b>Závěr .....</b>	<b>105</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>106</b>

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

BBB	Hematoencefalická bariéra ( <i>angl.</i> brain blood barrier)
BCNU	Karmustin (bischloroethylnitrosomočovina)
CCNU	Lomustin (1-[2-chlorethyl]-3-cyklohexyl-1-nitrosomočovina)
Cdk 4	Cyklin-dependentní kináza 4
CNS	Centrální nervová soustava
CT	Počítačová tomografie ( <i>angl.</i> computed tomography)
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	Dietyltriamin pentaacetát
EC	Elektronový záchyt ( <i>angl.</i> electron capture)
ELC	Zavedené buněčné linie ( <i>angl.</i> established cell lines)
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
GBM	Multiformní glioblastom ( <i>angl.</i> glioblastoma multiforme)
GFAP	Gliární fibrilární kyselý protein
geHC	Geneticky navržené lidské buňky ( <i>angl.</i> genetically engineered human cells)
GEM	Geneticky modifikované myši ( <i>angl.</i> genetically engineered mice)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>angl.</i> high performance liquid chromatography)
LOH	Ztráta heterozygotnosti ( <i>angl.</i> loss of heterozygosity)
MGMT	O-6- methylguanin-DNA methyltransferáza
MTIC	5-(3-methyl-triazen-1-yl)-imidazol-4-karboxamid
MRI	Magnetická rezonance ( <i>angl.</i> magnetic resonance imaging)
NODAGA	1,4,7-triazacyklononan-1-glutarová kyselina-4,7-dioctová kyselina
PBS	Fosfátový pufr ( <i>angl.</i> phosphate buffered saline)

PDX	Štěp odvozený z pacienta ( <i>angl.</i> patient derived xenograft)
PET	Pozitronová emisní tomografie ( <i>angl.</i> positron emission tomography)
P.I.	Po podání ( <i>angl.</i> post injection)
PTEN	Homolog fosfatázy a tenzinu ( <i>angl.</i> phosphatase and tensin homolog)
SD	Směrodatná odchylka ( <i>angl.</i> standard deviation)
SNVs	Jedno-nukleotidové variace ( <i>angl.</i> single nucleotide variations)
SPECT	Jedno-fotonová emisní tomografie ( <i>angl.</i> single photon emission computed tomography)
RCHČ	Radiochemická čistota
TMZ	Temozolomid
WHO	Světová zdravotnická organizace ( <i>angl.</i> world health organization)
WT	Divoký typ ( <i>angl.</i> wild type)

## ÚVOD

Multiformní glioblastom neboli glioblastoma multiforme je jedním z mozkových nádorů. Glioblastom se chová výrazně zhoubně a prognóza pacientů s glioblastomem je taková, že pacienta není možno zcela vyléčit a od začátku léčby se dožije maximálně 5 let. Přesná příčina této formy rakoviny není známa. Častěji se vyskytuje u starších mužů nad 50 let, možný je i genetický předpoklad vzniku choroby kombinovaný s vlivy okolního prostředí. Výskyt bývá častější u pacientů s neurofibromatózou či s Li-Fraumeniho syndromem. I když se jedná o velmi agresivní onemocnění, díky včasné diagnostice a terapii lze zlepšit kvalitu a délku života pacienta s GBM.

V současné době jsou stále více v medicíně používány nukleární zobrazovací metody. Umožňují zobrazit strukturu orgánů a tkání a také poskytují informace o jejich funkci díky specifické biodistribuci radiofarmak. Zobrazovací technika PET/CT (pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie) je velice vhodná pro včasnou diagnostiku GBM. Dále je možno použít i magnetickou rezonanci (MRI).

Aby bylo možno zobrazit nádor pomocí PET/CT, je nutno aplikovat pacientovi radiofarmakum. Toto radiofarmakum je v našem případě složeno z peptidu, který se váže na buňku glioblastomu, dále z radionuklidu a z chelátoru, který váže tyto dvě složky koordinační vazbou. Radionuklid emituje pozitrony, které po anihilaci emitují gama fotony, jež jsou detekovány prstencem detektoru PET. zachycováno detektory PET. Zachycená data jsou následně vyhodnocena k vytvoření obrazového snímku biodistribuce radiofarmaka a zobrazení vnitřní stavby těla pacienta (data z CT skenu).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem RGD peptidů značených pozitronovým zářičem, gallium-68. Jedná se o peptidy  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  a  $^{68}\text{Ga-DOTA-c(RGDfK)}$ . Předmětem zájmu byla studie jejich biodistribuce v těle laboratorních myší a následné využití pro diagnostiku GBM. Jako modeloví „pacienti“ byly podrobeny testování laboratorní myši kmene SCID, kterým byla pod kůži aplikována buněčná linie U-87 MG k vytvoření modelového nádoru GBM. Práce se opírá o dosavadní studie, jež prokázaly, že je možno získat kontrastní obrázky za použití RGD peptidů a PET/CT, což dosvědčuje vhodnou biodistribuci těchto peptidů in vivo.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

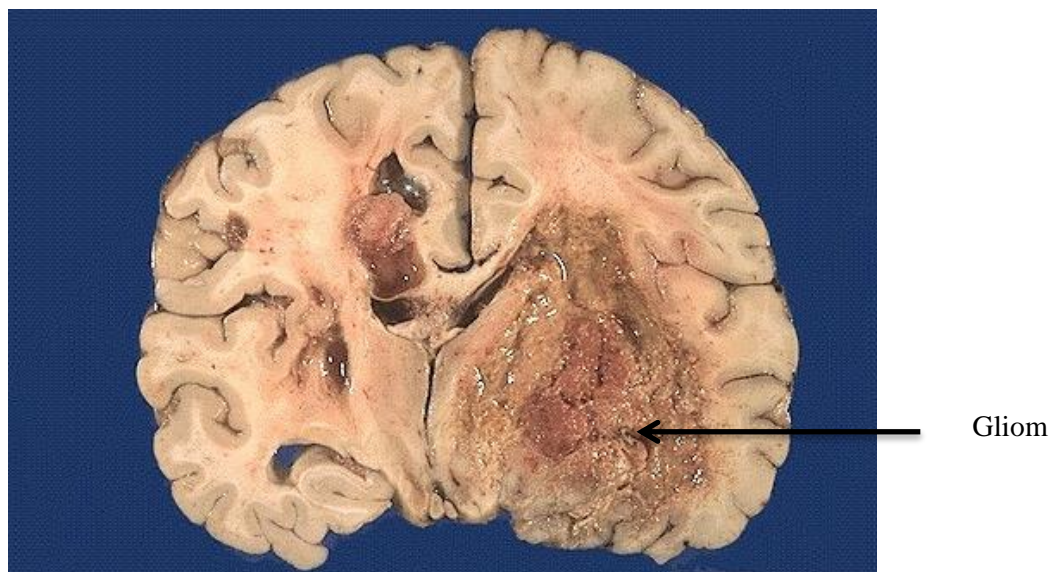
## 1.1 Multiformní glioblastom

Zhoubné nádory mozku vznikají většinou z gliie. Jedná se o podpůrný systém nervových buněk, který tvoří 90 % mozku. Těmto nádorům se proto říká gliomy a dosud jich bylo popsáno několik druhů.

Výskyt tohoto nádoru je poměrně nízký, jedná se o 2-3 případy na 100 000 lidí v Evropě a Severní Americe. Pacienti bez patřičné terapie umírají do 3 měsíců. Jestliže pacient podstoupí optimální léčbu, dožije se 12 měsíců v lepších případech 5 let. Dle Světové zdravotní organizace (WHO) se GBM řadí do IV. stupně mezi „high-grade“ gliomy (nádorové buňky gliomu rostou a rozšiřují se velice rychle, buňky se výrazně liší od okolí) Přestože je velká snaha vytvořit nové léčebné strategie, je multiformní glioblastom velmi agresivní onemocnění. I když pacienti podstoupí náročnou terapii, na následky tumoru většinou umírají (Ng et al., 2012).

### 1.1.1 Epidemiologie

Multiformní glioblastom (*angl.* glioblastoma multiforme, GBM) se řadí mezi nej malignější nádory mozku u dospělých pacientů. Je to díky jeho agresivně-invazivnímu růstu a velké odolnosti vůči terapii. Je známo, že v latentní fázi mají buňky gliomu vysokou variabilitu a schopnost abnormálně rychlého růstu. Vytváří se tak velký objem nově narostlých patologických buněk. Takto vzniklé gliomy se difúzí infiltrují do parenchymu centrálního nervového systému (CNS) (Campos et al., 2016).



**Obr. č. 1** Příčný řez mozkem napadeným multifonním glioblastomem. Parenchym napadený nádorem je jasně zbarvený do červena a má na délku přibližně 5 cm (Převzato z CNS Pathology Index).

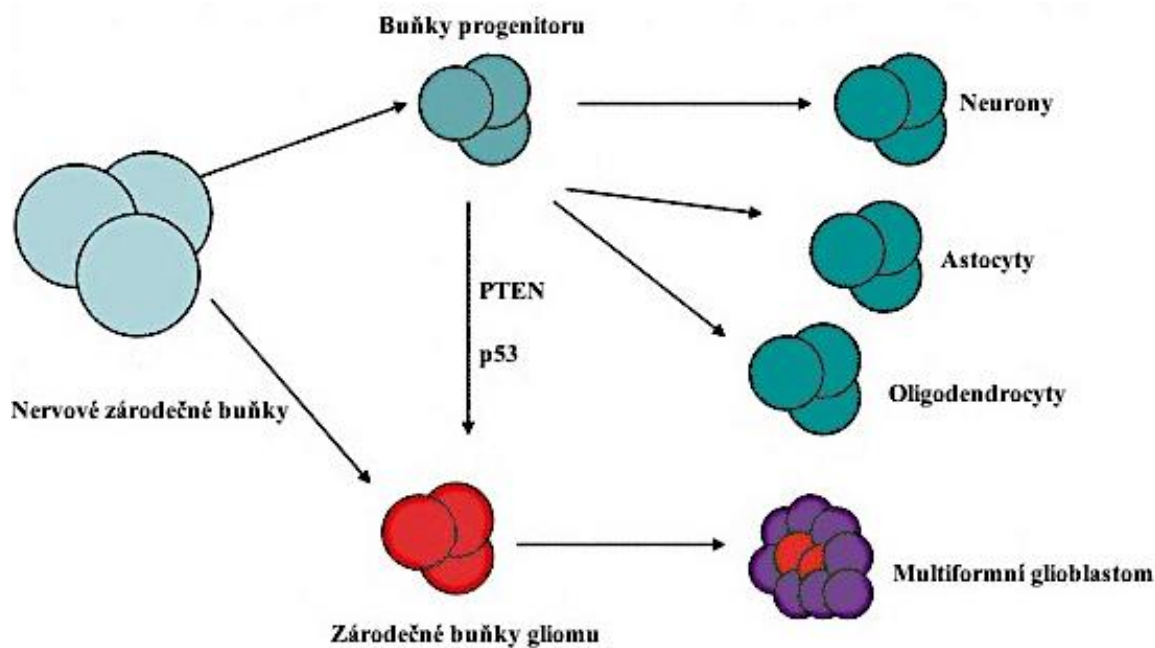
### 1.1.2 Etiologie

GBM vzniká nejčastěji jako následek rodinné zátěže či jako následek genetického syndromu (neurofibromatózy, Li-Fraumeni). K rozvoji astrocytomu ze zdravé buňky přispívá zejména ztráta heterozygotnosti (LOH). Ke všem následným mutacím dochází právě v přítomnosti LOH. Nejvýznamnější je mutace v tumor supresorovém genu *p53*, jehož funkcí je zejména kontrola buněčného cyklu, oprava DNA a kontrola angiogeneze. Výše zmíněný syndrom Li-Fraumeni je způsoben mutací v genu *p53*<sup>1</sup> a dochází při něm k vysoké incidenci nádorů v časném věku. Dále mutaci nebo delecí *PTEN*<sup>2</sup> genu s následnou inaktivací chromosomu 10q (Wang et al., 1997, Vogelstein et al., 2010).

Průkaz, že by používání mobilních telefonů mohlo GBM vyvolat, je sporný, ale ne nevratně vyloučený. Mnohé studie používání mobilních telefonů jako rizikový faktor nevyklučují. Záření z mobilních telefonů může být bráno jako významný rizikový faktor, a to převážně pro děti (Campos et al., 2016).

<sup>1</sup> p53 produkt tumorsupresorových genů, funguje jako transkripční faktor a v buňce má funkci senzoru poškození DNA

<sup>2</sup> PTEN homolog fosfatázy a tenzinu (*angl.* phosphatase and tensin homolog); nádorový supresor



**Obr. č. 2** Vznik GBM z nervových zárodečných buněk či v důsledku působení zmutovaných genů (*p53*, *PTEN*) na buňky progenitoru (Alexandru-Abrams et al., 2014).

### 1.1.3 Klinický obraz

Z molekulární i histologické stránky se jedná o gliom s vysokým stupněm malignity. Běžně projevující se příznaky jsou pomalu se rozvíjející neurologický deficit, svalová slabost, generalizované symptomy nitrolební hypertenze a s tím spojené bolesti hlavy, nevolnost, nauzea. Neurologické symptomy mohou být všeobecné či fokální. Mohou odrážet umístění nádoru. Jedná se o hemiparézu, ztráta senzorických vjemů, ztráta zraku, afázii a další (Bruce et al., 2015).

### 1.1.4 Diagnostika

Diagnóza GMB se u pacienta provádí pomocí neurologických funkčních testů (testy reflexe, pohybu očí a úst, koordinace a ostražitost). Pokud tyto testy vykazují určité abnormality, je zde podezření na výskyt nádoru mozku. Pacient je následně podroben dalším vyšetřovacím testům, mezi nichž jsou zahrnuty zobrazovací metody. Mezi tyto metody patří magnetická rezonance (*angl.* magnetic resonance imaging, MRI), počítačová tomografie (*angl.* computerized tomography, CT) a diagnostické metody

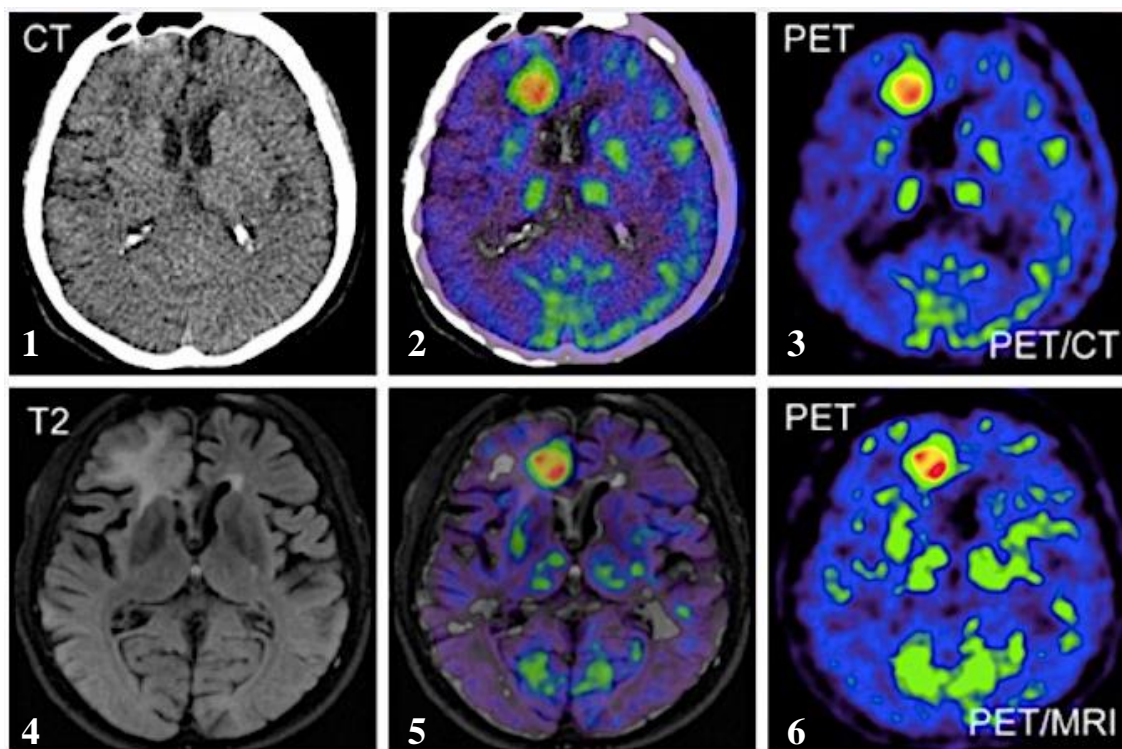
nukleární medicíny (pozitronová emisní tomografie, *angl.* pozitron emission tomography, PET) (Dhermain 2014).

Zobrazování pomocí MRI a CT vytváří detailní obraz mozku a páteře a umožňuje detekovat přítomnost nádoru. MRI skeny poskytují velmi detailní snímky multifornního glioblastomu; tyto skeny se obvykle provádějí za pomoci kontrastních činidel, které pomáhají odlišit nádor od fyziologické mozkové tkáně. CT je vhodná například pro zobrazení akutního krvácení či kalcifikací (Kupka et al., 2007).

Metody nukleární medicíny slouží ke kontrole růstu nádoru. Mezi zobrazovací vyšetření se v diagnostice nádorových lézí CNS řadí zejména pozitronová emisní tomografie (PET) doplněná počítačovou tomografií (CT). CT plně nenahradí význam PET vyšetření v diagnostice patologických ložiskových změn v mozku, ale při kontraindikaci PET vyšetření je však nenahraditelná. Výpočetní tomografie umožňuje nádor lokalizovat s určením jeho velikosti, struktury a vztahu nádoru k okolním tkáním a orgánům (Ollinger et al., 1997; Young et al., 2015). Před samotným PET vyšetřením je pacientovi podáno radiofarmakum (2-deoxy-2-fluoro-D-glukóza, FDG) obsahující radionuklid s velmi krátkým poločasem přeměny (řádově minuty či desítky minut). Jedná se o radionuklidy, které při své přeměně produkují pozitrony (Blois et al 2011; Bockisch et al., 2009).

K potvrzení diagnózy je následně prováděna chirurgická biopsie. Je extrahován a testován malý vzorek abnormálních buněk. Pro multifornní glioblastom jsou charakteristické nekrotické buňky či ty, které prošly procesem apoptózy (Bruce et al., 2015).





**Obr. č. 3** Zobrazování mozku pacienta pro zjištění nádorové léze. 1 snímek z CT, 2 fúze PET/CT, 3 PET snímek a; 4 MRI snímek, 5 je fúze MRI a PET, 6 PET snímek; snímky zobrazují multifonní glioblastom umístěný na pravé straně interhemisférické štěrby (Převzato a upraveno dle webové stránky scottdalesupplyonline).

### 1.1.5 Terapie GMB

Základním pilířem léčby GMB je radikální chirurgická resekce. Cílem chirurgického zákroku je redukovat nádorovou masu a snížit tak tlak na okolní strukturu. Resekce dále také slouží k získání materiálu pro histopatologickou diagnózu nádoru.

Po chirurgické intervenci je pacient podroben chemoterapii. Chemoterapeutická léčba je aplikována z důvodu zahubení zbylých nádorových buněk, které nebyly odstraněny během zákroku. Je podávána systémově perorálně či intravenózně. Ke zlepšení účinnosti jsou chemoterapeutická léčiva podávána intraarteriálně. Aplikace léčiva do tepny zásobující krví oblast postiženou nádorem zvýší koncentraci léku v nádoru. Umožňuje aplikaci nižší celkové dávky léčiva, a tedy i pokles nežádoucích účinků (Ramirez et al., 2013).

Používají se dva typy chemoterapie, a to konkomitantní<sup>3</sup> nebo adjuvantní<sup>4</sup> chemoterapie (viz níže temozolomid). Při konkominantní terapii se používá více léčiv nebo léčebných způsobů současně. Je nutno volit takové kombinace, aby se jejich účinek sčítal (Šlampa et al., 2010).

#### 1.1.5.1 Temozolomid

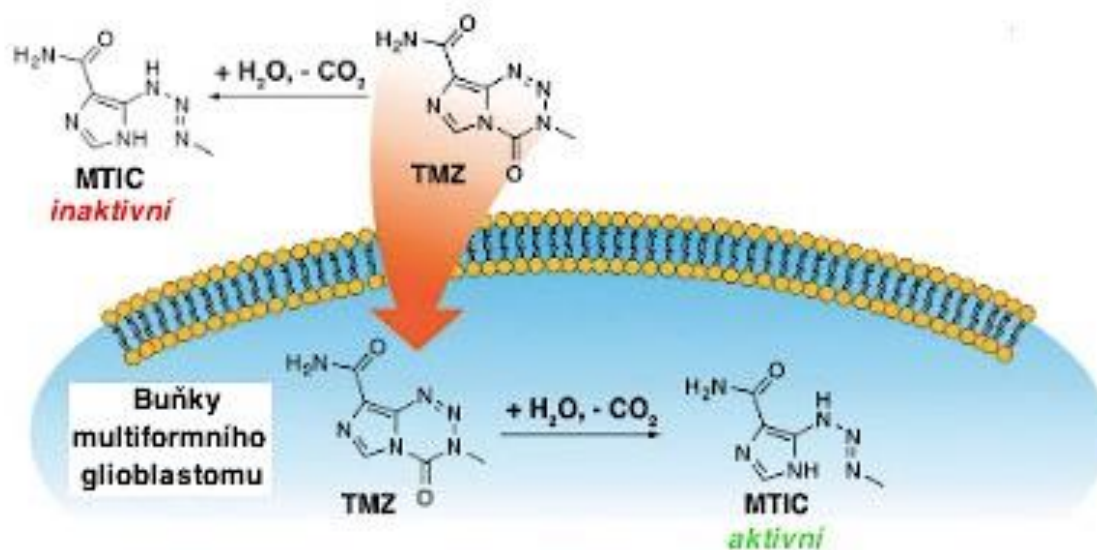
Během pozdních 90. let bylo vyvinuto léčivo temozolomid (TMZ). TMZ je podáván orálně, jelikož je dobře rozpustný a je stabilní v kyselém prostředí. TMZ nemá přímé účinky na GBM. Je to proléčivo, které snadno prochází přes hematoencefalickou bariéru (BBB angl. brain blood barrier). Když se TMZ v mozku dostane do nádorové buňky GBM, degraduje se hydrolytickou přeměnou na *5-(3-methyl-triazen-1-yl)-imidazol-4-karboxamid*, zkráceně MTIC. MTIC metyluje pozici O6 na zbytků *guaninu*, což působí cytotoxicky na buňky glioblastomu a nevratně poškozuje jeho DNA.

Bohužel může dojít k degradaci TMZ na MTIC již v krevním řečišti, a tudíž účinná látka neprojde hematoencefalickou bariérou. Z tohoto hlediska tedy není TMZ brán jako ideální léčivo v terapii GBM (Appel et al., 2012; Purchiaroni et al., 2014).

---

3 konkominantní terapie souvisí s použitím více léčiv či léčebných způsobů současně

4 adjuvantní terapie je pojem pro doplňující léčbu, která následuje po chirurgické resekci



**Obr. č. 4** Schématické znázornění osudu temozolomidu (TMZ) v hematoencefalickém prostředí; Aktivaci MTIC pomocí degradace TMZ (Appel et al., 2012).

U pacientů s GMB je také možno aplikovat symptomatickou léčbu. Záchvaty jsou kompenzovány léčivými jako jsou levetiracetam, fenytoin či karbamazepin. Nejvhodnější z těchto léčiv je levetiracetam, jelikož nepůsobí na systém cytochromu P450. Vazogenní edém mozku je kompenzován kortikoidy (Šlampa et al., 2010).

## 1.2 Preklinické modely multifornního glioblastomu

Vědci v oblasti GMB využívají myší modelové organismy pro výzkum léčiv a terapie GBM. Takto vytvořené modely jsou velmi důležité i pro objev a vývoj nových prediktivních biomarkerů, které mohou být použity pro vytvoření klasifikace podtypů této nemoci (Jacobs et al., 2011).

### 1.2.1 Zavedené buněčné linie pro testování glioblastomu na myších

Tyto buněčné linie (ECL, *angl.* established cell lines) byly vygenerovány z mutagenních astrocytů. Tyto technicky jednoduché, vysoce penetrující modely se v modelovém myším hostiteli prezentují rychle se rostoucími tumory s uniformní kinetikou růstu a krátkou latentní dobou.

Mezi běžně aplikované buněčné linie izolované z tkáně pacienta či chemicky indukované patří *C6*, *GL261*, *U251-MG*, *U-87 MG* a *CNS-1*. Využívají se pro výzkum zaměřený na patologické a genetické podobnosti s touto lidskou nemocí (Jacobs et al., 2011).

#### 1.2.1.1 U-87 MG

Tato buněčná linie U-87 MG byla izolována Janem Ponténem v roce 1966 z nádoru 44letého pacienta s rakovinou. Jedná se o buněčnou linii běžně používanou ve výzkumu gliomů. Profil DNA současné buněčné linie se liší od původních buněk, ze kterých byla odvozena. Nemusí tedy nezbytně odrážet terapeutickou odezvu primárního nádoru, ze kterého byl derivován (Wu et al., 2005).

Jedním z hlavních rysů genomu U-87 MG je velký počet chromozomálních abnormalit, které jsou typické pro nádorové buněčné linie a primární nádory. Dále jsou pro genom U-87 MG charakteristické jednonukleotidové variace (*angl.* single-nucleotide variations, SNVs), inserce/delece a translokace (Allen et al., 2016; Clark et al., 2010).

Používá se zejména ke zhodnocení nádorové angiogeneze a pro anti-angiogenní terapii. Prezentuje se různorodým profilem genové exprese v *in vivo* růstových podmínkách (Pontén et al., 1968; Yu et al., 2008).

**Tabulka č. 1** Charakteristické histologické markery, růst nádorových buněk a genetické charakteristiky GBM v modelu U-87-MG (Jacobs et al., 2011).

	Markery		Růst	
	Vimentin	Invazivní	Immunogenetický	
<b>Model U-87</b>	+	-	+	
	Genetické mutace a nadměrná exprese			
	<i>PTEN</i>	<i>p53</i>	<i>kRAS</i> <sup>5</sup>	<i>EGFR</i> <sup>6</sup>
	+	-	+	-

Z patologického hlediska se nádory vzniklé z modelových buněk U-87 MG vyznačují nepravidelnými jádérky a hojnou neovaskularizací. Na rozdíl od GBM vykazují tyto nádory nedifúzní, infiltrovaný růst. Reaktivní astrocyty ohraničuje pevná vrstva, kterou je možno vizualizovat pomocí *GFAP*<sup>7</sup>. Tento protein se barví pomocí imunochemických metod. Nádorová vaskulatura je podstatně homogennější než u GBM, což výrazně usnadňuje přístup systémovým léčivům. Nádory U-87 vykazují subpopulaci *CD133*<sup>8</sup> buněk, které jsou schopny tvořit neurosférické agregáty s vlastním rozmnožovacím potenciálem.

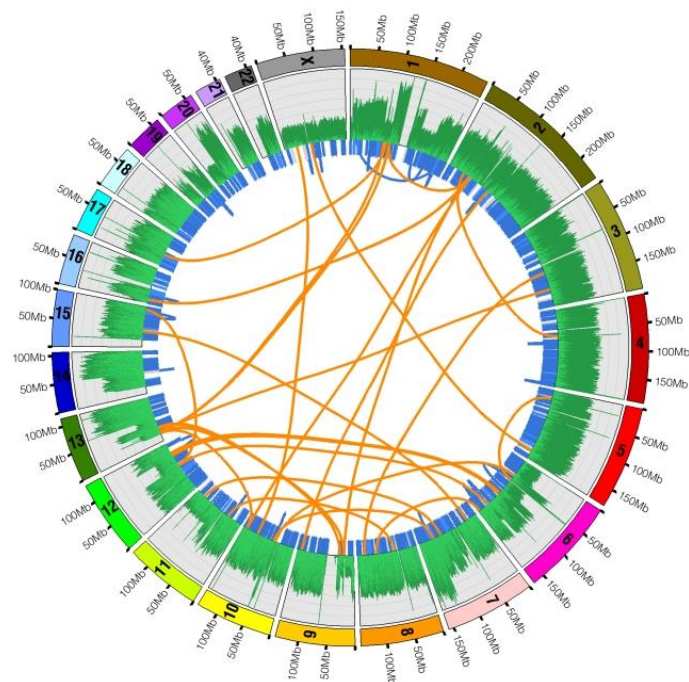
Bylo provedeno celogenomové sekvenování modelu U-87-MG. Z genetického pohledu se U-87 MG demonstruje wild-type nádorovým supresorem *p53* a dále mutantním *PTEN* (Jacobs et al., 2011).

<sup>5</sup> *kRAS* plní základní funkci v tkáňové signalizaci; mutace v tomto genu je základním krokem v rozvoji rakoviny

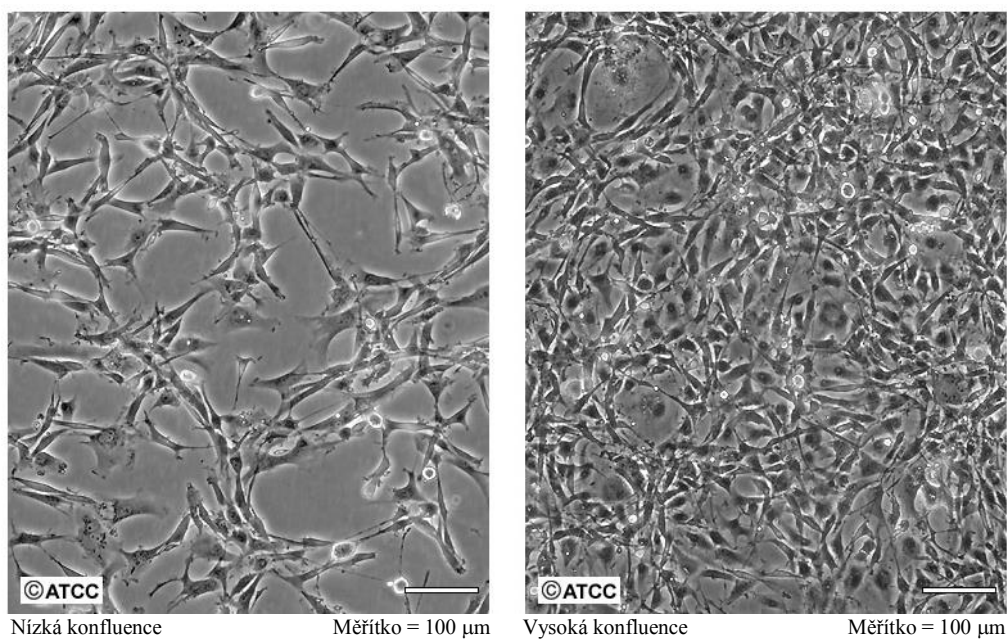
<sup>6</sup> *EGFR* neboli receptor pro epidermální růstový faktor; řadí se mezi transmembránové receptory

<sup>7</sup> *GFAP* je gliální fibrilární kyselý protein

<sup>8</sup> *CD133* je transmembránový glykoprotein jenž působí jako organizátor topologie buněčné membrány

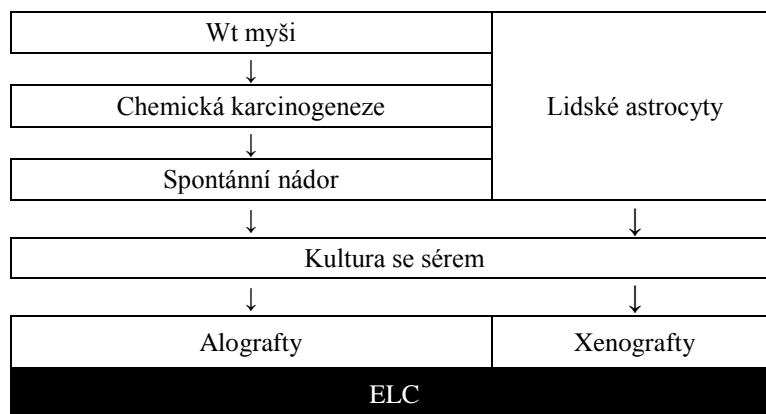


**Obr. č. 5** Strukturální variace detekovaná celogenomovým sekvenováním genu v U-87 MG. Oranžové čáry spojující dva chromozomy reprezentují 35 interchromozomálních translokací. Modré čáry kolem okraje představují mikrodelece a intrachromozomální translokace. Vnější histogram představuje sekvenční pokrytí (Clark et al., 2010).



**Obr. č. 6** Buněčná linie multiformního glioblastomu U87 MG, jenž byla v roce 1966 izolovaná J. Ponténem (Převzato a upraveno dle webové stránky firmy ATCC).

**Tabulka č. 2** Ze séra s kulturou náhodně vzrostlých astrocytů wild-type (wt) myši byly vygenerovány ECL modely. Modely vznikly působením chemických karcinogenů na imunokompetentní myši. Lidské ELC modely byly vytvořeny podobně jako myši. Lidské astrocyty byly transplantovány do imunodeficientní myši (Mc Neill et al., 2015).

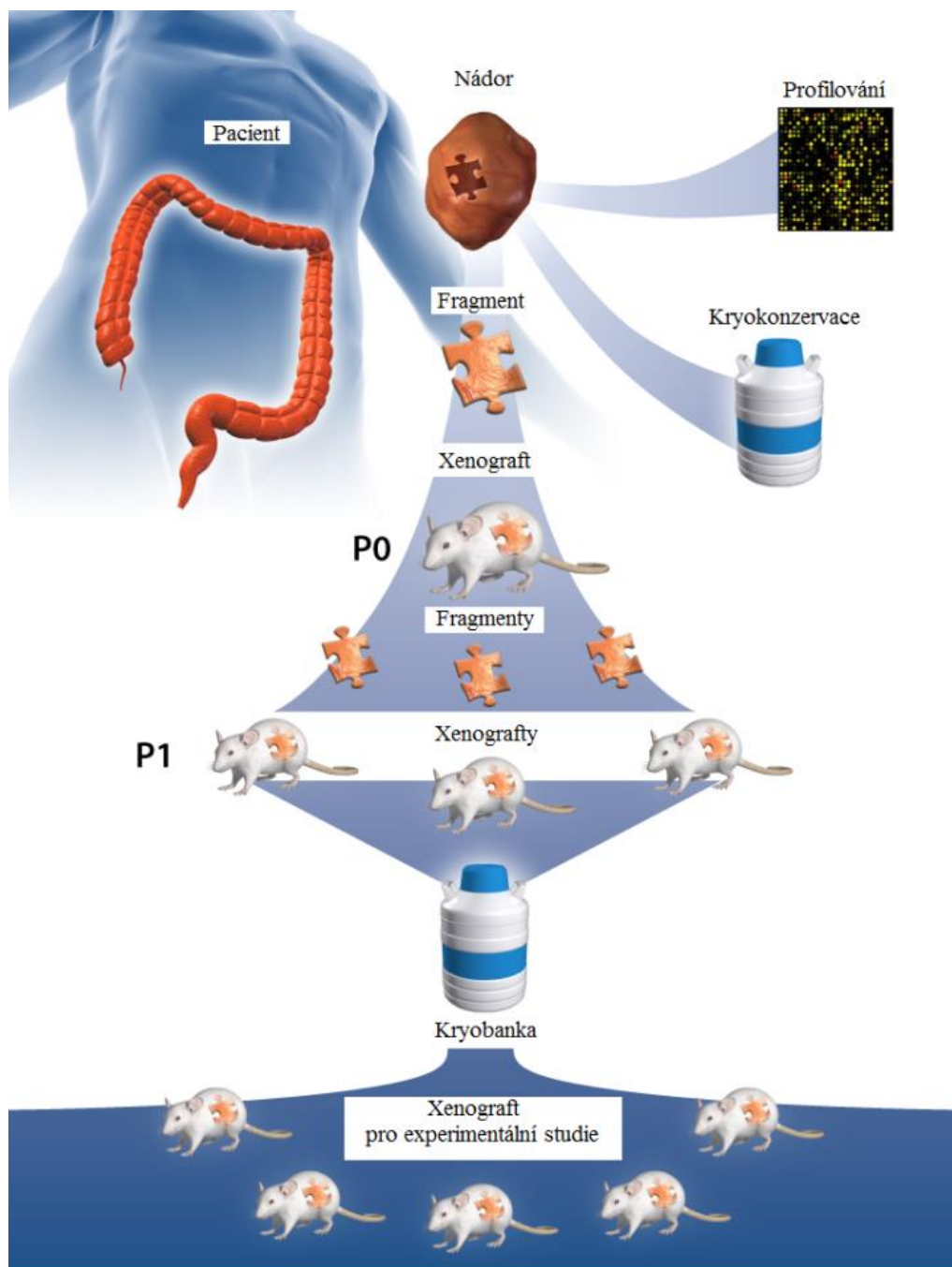


### 1.2.2 Štěp odvozený z pacienta

PDX je zkratka pro štěpy pocházející z buněk lidského pacienta vložené do myšího organismu (*angl.* patient derived xenograft). PDX se *in vivo* vyznačují vysokou penetrací, krátkou latentní dobou, rychlou a jednotnou růstovou kinetikou. Tyto buňky jsou kultivovány jako neadherentní sféroidy. Kultivují se v bezsérovém médiu a do pacienta jsou aplikovány ortoskopickou transplantací.

Na rozdíl od ELC jsou v PDX zachovány genomové rysy nádoru, ze kterého byly odvozeny. Také věrně rekapitulují histopatologické rysy GBM včetně invaze do mozkové tkáně.

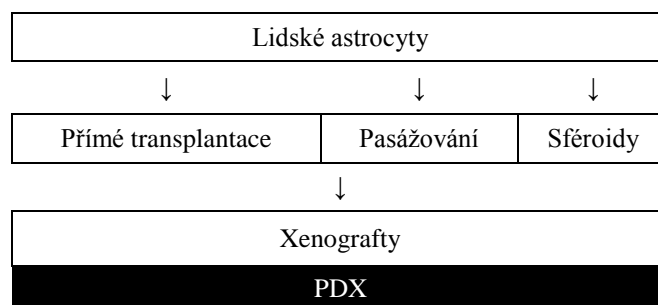
Vývoj této technologie byl rozhodující pro definování funkční heterogenity přítomné v lidských astrocytech a pro objevení biologických a terapeutických důsledků výskytu rakovinových kmenových buněk obsažených v tomto tumoru. Byla vypracována studie, kde se systematicky testovala léčiva a jejich působení na PDX. Tato studie přesněji definuje klinickou aktivitu nových léků a díky ní se vypracovávají prediktivní biomarkery pro genomicky rozdílné PDX modely (Huszthy et al., 2012; Mc Neill et al., 2015).



**Obr. č. 7** Model PDX. Postupné kroky vedoucí k vytvoření kolekce xenograftů odvozených z nádoru pacienta. Fragment pocházející z nádoru pacienta je transplantován do imunodeficientní myši: pasážování 0 (P0); Po úspěšné transplantaci je z P0 myši vyňat fragment a ten je vložen do další imunodeficientních myši: pasážování 1 (P1); Sběrka fragmentů z výsledných nádorů je následně zamrazena v tkáňové bance pro následující studie či může dojít k dalšímu pasážování (P2, P3, Pn) (Převzato a upraveno dle Constant et al., 2013).



**Tabulka č. 3** Soudobé lidské modely se skládají z xenograftů odvozených z pacienta (PDX). Jedná se o nádorové buňky z lidských astrocytů, které jsou buďto několikrát pasážovány či jsou kultivovány jako neadherentní sféroidy v médiu bez séra nebo jsou přímo injikovány do imunodeficientní myši (McNeill et, al, 2015).



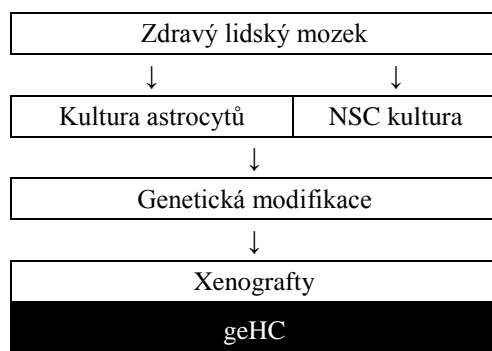
### 1.2.3 Geneticky navržené lidské mozkové buňky

Tyto modely vzniklé z geneticky navržených lidských mozkových buněk (geHC, *angl.* genetically engineered human cells) jsou považovány za inovaci v problematice GBM modelů. Mají překonat určité limitace výzkumu, které přinášejí jak ELC, tak i PDX.

*In vitro* nedochází ke vzniku genomových abnormalit. Za to *in vivo* se v závislosti na mutacích a buněčném původu mění tyto vlastnosti - penetrance, růstová kinetika a doba latence.

Tyto modely byly vygenerovány purifikací specifických buněčných typů, jako jsou astrocyty ze zdravé mozkové tkáně. Následně je navržen proces, který testuje tyto buňky různými technologiemi molekulární biologie a díky kterému je možno určit expresi specifických onkogenetických mutací v astrocytech. Na základě těchto modelů je umožněno přímé stanovení fenotypového dopadu asociovaných mutací na astrocyty ze specifických typů nervových buněk (Candolfi et al., 2007; McNeill et, al, 2015).

**Tabulka č. 4** Geneticky navržené modely zahrnují geneticky upravené lidské buňky (geHC). Jedná se buďto o astrocyty či o nervové kmenové buňky (NSC) odebrané ze zdravého lidského mozku, jež byly geneticky modifikovány onkogenetickými mutacemi a xenografovány do imunodeficientní myši (McNeill et, al, 2015).



#### 1.2.4 Geneticky upravená myš

Geneticky modifikované myši (GEM, *angl.* genetically engineered mice) vnesly revoluci do výzkumu GBM. Byly vyvinuty za účelem prozkoumat *de novo* tumorogenezi v nativním mikroprostředí mozku myši. Pro vyvolání tumorogeneze v modelech meduloblastomu je zapotřebí vícenásobných mutací (McNeill et al., 2015).

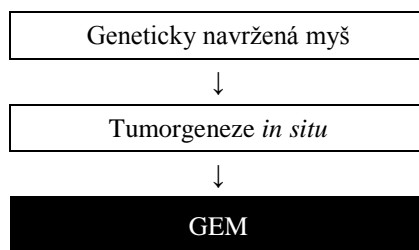
Tento model není příliš vhodný pro preklinický výzkum léčiv, jelikož tyto studie vyžadují složité a často neefektivní chovné programy pro vygenerování dostatečně velkých kohort. Byla vyvinuta odnož GEM, *RCAS/tva*<sup>9</sup> GEM linie. Při prvním *in vivo* experimentu s použitím *RCAS/tva* bylo prokázáno, že tento systém je schopen vnést a aktivovat nové geny v postnatálním savčím organismu. Byly vytvořeny transgenní myši za účelem specifického sledování infekce astrocytů *RCAS* virem. Do čerstvě narozené myši se intrakraniálně aplikovaly *DF-1* buňky, které produkují *RCAS/bFGF* vir. Buňky infikované tímto virem se vyznačují rychlým růstem, migrací a proliferací, ale nedochází k nárůstu gliomu. Virus *RCAS* začne kódovat gen *Cdk4*, a tím zaktivuje *EGFR* (mutace ovlivňující expresi či aktivitu tohoto receptoru vedou k tumorogenezi), dojde k narušení buněčného cyklu a tímto se otevře cesta ke zformování gliomu. Gen *Cdk4* je katalytická podjednotka z komplexu proteinových kináz, která je důležitá při formování buňky

<sup>9</sup> *Rcas/tva* - jedná se o inzerci transgenního genu *tva* do buněk či tkáně myšního modelu, za účelem snadné infekce cílové buňky/tkáně virem *RCAS*

v G1 fázi buněčného cyklu. Mutace *Cdk4* jsou spojeny s tumorogenezí a s řadou nádorových onemocnění. (Ahronian et al., 2014; Carrasco et al., 2015).

*RCAS/tva* systém byl vytvořen pro generování modelů pro velkou škálu lidských nádorů. *RCAS/tva* GEM obsahuje mnoho předem definovaných onkogenních alel, které jsou zavedeny do specifických neuronových buněčných typů transgenní myší linie. Díky tomuto jsou tyto modely mnohem přístupnější k preklinickému výzkumu léčiv (McNeill et al., 2015).

**Tabulka č. 5** Geneticky navržené modely se vytvářejí indukcí onkogenních mutací ve zdravých buňkách, které vedou k tumorogenezi *in situ* (McNeill et al., 2015).



### 1.3 Monitorování multiformního glioblastomu pomocí RGD peptidů

Při procesu angiogeneze dochází k expresi  $\alpha\beta3$  integrinu. Tento receptor se nachází na povrchu buněk GBM. V preklinických i klinických studiích bylo prokázáno, že radioaktivně značené RGD<sup>10</sup> peptidy a pozitronová emisní tomografie (PET) umožňují neinvazivní monitorování exprese  $\alpha\beta3$  integrinu. Pro tyto studie byly vytvořeny peptidy, jež se dají značit radioaktivním izotopem gallium-68. Jedná se např. o <sup>68</sup>Ga-NODAGA-RGD a <sup>68</sup>Ga-DOTA-RGD. Vývoj <sup>68</sup>Ga-RGD značených peptidů je velmi prospěšný v tom, že pravděpodobně zjednoduší zobrazovací techniky multiformního glioblastomu (Teixeira et al., 2005).

#### 1.3.1 Integrin $\alpha\beta3$

Integriny jsou heterodimerní transmembránové glykoproteiny sestávající se z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. U savců je známo 18  $\alpha$  a 8  $\beta$  podjednotek, které se kombinují za vzniku 24 funkčních heterodimerů. Pro vazbu extracelulárních ligandů integriny jsou důležité dvojmocné kationty ( $\text{Ca}^{2+}$  či  $\text{Mn}^{2+}$ ). Vysoká vazebná afinita ligandů k integrinům vede k tvorbě buněčných aktivačních signálů. Tyto signály mění terciární a kvartérní strukturu extracelulární oblasti integrinu za tvorby integrin-ligandového komplexu. Integriny se nacházejí na buněčném povrchu a svou vazbou na ligandy zprostředkovávají interakci mezi buňkami a extracelulární matrix (Xiong et al., 2002).

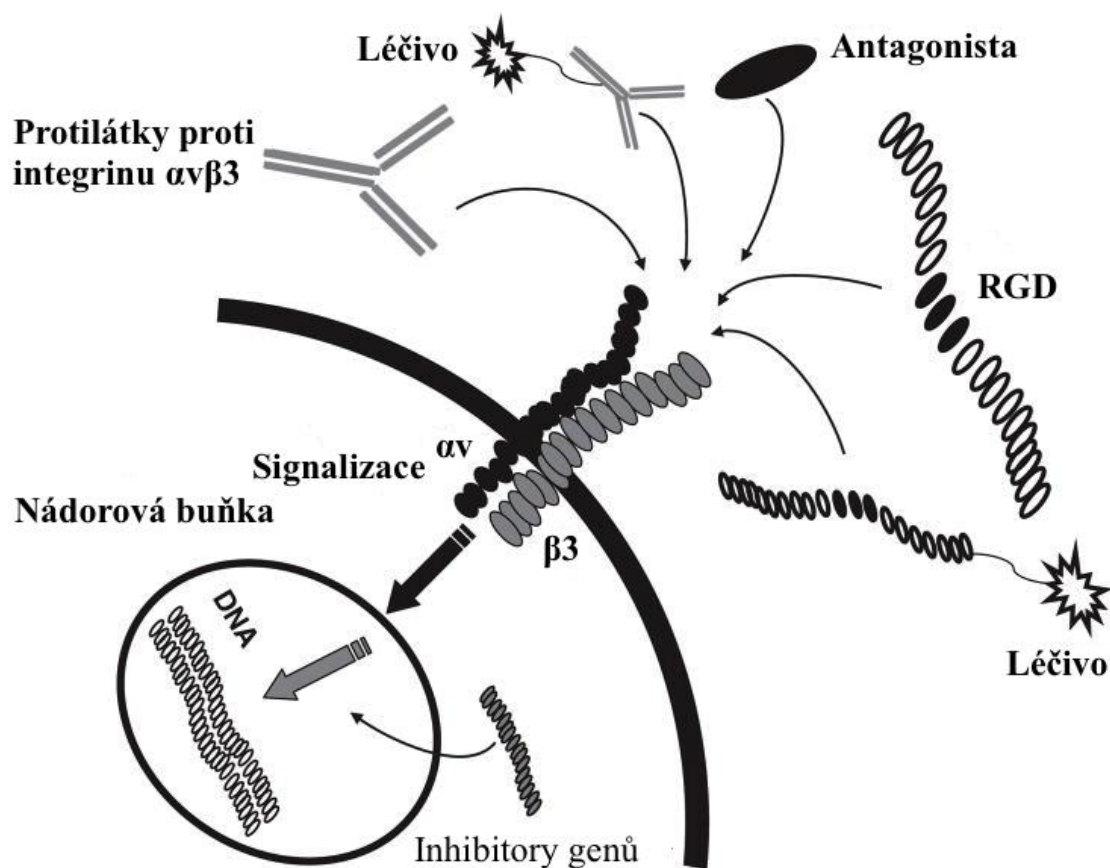
I když endotelové buňky exprimují mnoho různých integrinů, v oblasti angiogeneze<sup>11</sup> se zdá být nejdůležitější **integrin  $\alpha\beta3$** . Tento integrin je známý jako receptor vitronektinu. Skládá ze 125 kDa  $\alpha\text{v}$  a 105 kDa  $\beta3$  podjednotek. Ke zvýšené expresi integrinu  $\alpha\beta3$  dochází v nově tvořených cévách. Tvorba těchto cév je způsob reakce na celou řadu nádorů a jejich angiogenních faktorů. Také je tento integrin důležitým receptorem ovlivňujícím růst nádoru, místní invazivitu a metastatický potenciál. Je exprimován v některých nádorových buňkách jako je např. glioblastom. Proto je považován za jednu z nejvýznamnějších cílových struktur používaných při vývoji nových radiofarmak (Knetsch et al., 2010; Kumar, 2003).

---

<sup>10</sup> RGD R - L-arginin, G - glycin, D - L-asparagová kyselina

<sup>11</sup> Angiogeneze je proces novotvorby krevních kapilár

Integrin  $\alpha\beta3$  váže širokou škálu extracelulárních molekul, hlavně ty jejichž základní strukturou je arginin-glycin-asparagová kyselina (sekvence RGD). Aminokyselinová sekvence RGD je důležitým epitopem<sup>12</sup> pro vazbu mnoha extracelulárních proteinů na integrin  $\alpha\beta3$ . RGD peptidy modifikované chelátorem (jako např. DOTA, NODAGA) a označené  $^{68}\text{Ga}$  vykazují vysokou afinitu k integrinu  $\alpha\beta3$  (Haubner et al., 2014).



**Obr. č. 8** Znáornění mnoha možností vedoucích k inhibici integrinu  $\alpha\beta3$ . Zabránění signalizace integrinu jeho antagonistou může teoreticky vést k inhibici angiogeneze nádoru či zvýšit účinnost nádorových léčiv (Převzato a upraveno dle Liu et al., 2010).

<sup>12</sup> Epitop je malá oblast molekuly antigenu, kterou rozeznávají imunitní receptory. Jsou to obvykle deriváty tělu cizích proteinů.

### 1.3.2 RGD peptidy a jejich funkce při monitorování GMB

Peptidy obecně obsahují variabilní počet aminokyselin, jejich antigenicita je nízká a penetrace k tkáním a clearance jsou rychlé. Díky těmto znakům došlo k výraznému nárůstu aplikace peptidů značených radionuklidem v nukleární medicíně. Správně značený peptid je vhodný pro terapii pacientů s rozšířeným onemocněním, které není přístupné k operaci či je odolné k chemoterapii. Dále jsou tyto radiopeptidy v diagnostice využity ke kontrole příznaků daného onemocnění (Al-Nahhas et al., 2007).

RGD peptidy obsahují ve své struktuře sekvenci aminokyselin arginin (R) – glycin (G) – asparagovou kyselinu (D). Tato sekvence Arg-Gly-Asp je vhodná pro zobrazování struktury  $\alpha\beta_3$  integrinu, který je exprimován na povrchu angiogenních cév nebo na nádorových buňkách. RGD peptid slouží jako inhibitor integrin-ligandové interakce. Při absenci mediátoru, který zprostředkovává tvorbu apoptozomu, slouží jako induktor apoptózy (Wang et al., 2013).

Afinitní vlastnosti RGD peptidů mohou být ovlivněny jejich konformací. Jejich struktura může být lineární nebo cyklická. Cyklizace lineárních struktur RGD peptidů zvyšuje aktivitu a vazebnou specifitu k integrinům. Cyklická struktura a inkorporace D-aminokyseliny (např. D-fenylalanin, D-lysin, D-tyrosin) se vyznačuje pevnější strukturou, lepšími vazebnými vlastnostmi a vyšší stabilitou *in vivo*, která zabraňuje enzymatickému štěpení (Gaertner et al., 2012).

Také bylo provedeno několik studií, které se zabývaly polymerizací RGD peptidů a ovlivněním jejich afinity k receptorům na povrchu nádorových buněk. Bylo zjištěno, že stoupající multiplicita peptidů (dimer, trimer, atd.) zapříčiňuje vyšší afinitu k integrinům. Avšak v případě tetramerů je vazba k integrinům bivalentní i přesto, že obsahuje čtyři RGD sekvence (Shi, et al., 2011).

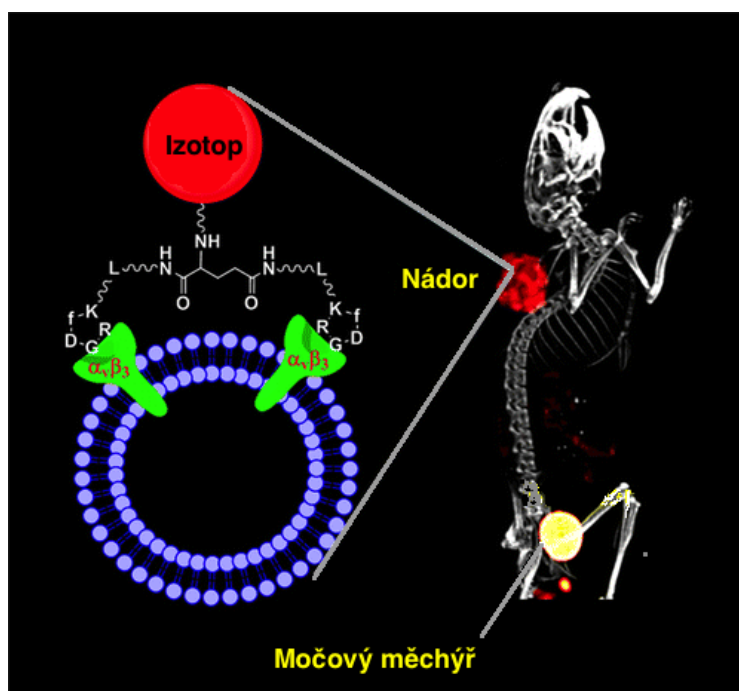
Díky těmto výše zmíněným vlastnostem se výzkum zaměřuje na cyklické pentapeptidy, jako jsou např. c(RGDf<sup>13</sup>V) obsahující aminokyseliny arginin, glycin, aspartát, D-fenylalanin a valin. Nahrazení valinu lysinem vzniká další RGD cyklický pentapeptid c(RGDfK). V neposlední řadě je výzkum zaměřen na testování c(RGDyK) skládající se z aminokyselin argininu, glycinu, aspartátu, D-tyrozinu a lysinu. (Enwerem et al., 2012).

---

<sup>13</sup> Malé písmeno označuje D-aminokyselinu. Velkým písmenem se značí L-aminokyseliny tj. ty přirozeně se vyskytující (Cheres, 2007).

Cyklické RGD peptidy c(RGDfK) a c(RDGyK) jsou často používány pro radioaktivní značení. D-tyrozin je více hydrofilní než D-fenylalanin, tudíž je vyloučení c(RDGyK) renální cestou rychlejší než v případě c(RGDfK). Díky tomuto faktoru je pro diagnostické vyšetření c(RGDyK) vhodnější než c(RGDfK) (Eo et al., 2016).

Z velké škály radioizotopů byl vybrán ke studiu RGD peptidů izotop  $^{68}\text{Ga}$  pro jeho výhodné fyzikální a chemické vlastnosti. RGD deriváty značené  $^{68}\text{Ga}$  mají velký potenciál pro časnou a neinvazivní detekci v sledování nádorových metastáz a terapeutické odpovědi nádoru (Eo et al., 2016).



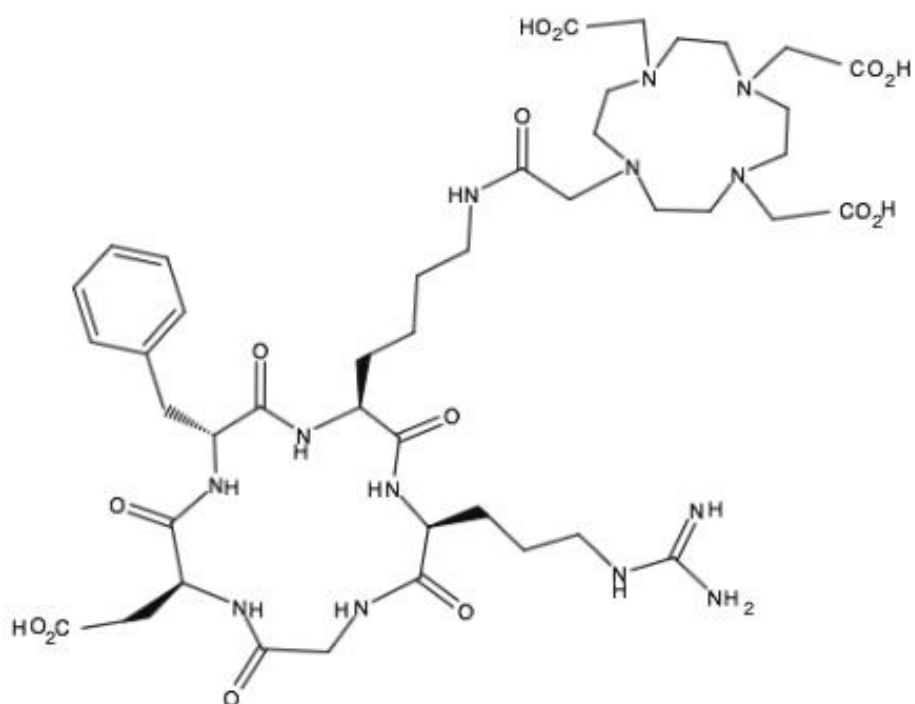
**Obr. č. 9** Fúzovaný snímek PET/CT znázorňující akumulaci RGDfK peptidu značeného radioizotopem v nádoru a močovém měchýři laboratorní myši (Gaertner et al., 2012).

### 1.3.2.1 DOTA-c(RGDfK)

Struktura pentapeptidu c(RGDfK) se skládá ze sekvence cyklo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val). Tento peptid je vhodný pro radioaktivní značení izotopy emitující částice  $\beta^+$  jako jsou  $^{64}\text{Cu}$  či  $^{68}\text{Ga}$ . Díky této vlastnosti je možno vizualizovat biologickou distribuci toho peptidu pomocí zobrazovací metody PET.

Liší se oproti c(RGDyK) přítomností fenylalaninu namísto tyrosinu, tímto způsobem může být ovlivněna farmakokinetika tohoto peptidu. Následkem je pak případná vyšší retence DOTA-c(RGDfK) v ledvinách a játrech (Domnanich et al., 2016). Decristoforo spolu

s kolegy ve své studii porovnávali *in vitro* afinitu DOTA-cyclo-RGDfK peptidů značených  $^{68}\text{Ga}$  a  $^{111}\text{In}$  k integrinu  $\alpha\text{v}\beta3$ . Výsledky ukazovaly velmi vysokou afinitu  $^{68}\text{Ga}$  značeného DOTA-RGD peptidu k receptorům integrinu  $\alpha\text{v}\beta3$  (Decristoforo et al., 2008). A také Yoshimoto et al. ve své studii potvrdili, že je DOTA-c(RGDfK) značený izotopem  $^{68}\text{Ga}$  vhodným radiofarmakem pro vizualizaci nádorových buněk buněčné linie U-87 MG glioblastomu (Yoshimoto et al., 2008).



**Obr. č. 10** Strukturní vzorec DOTA-c(RGDfK)-acetátu.



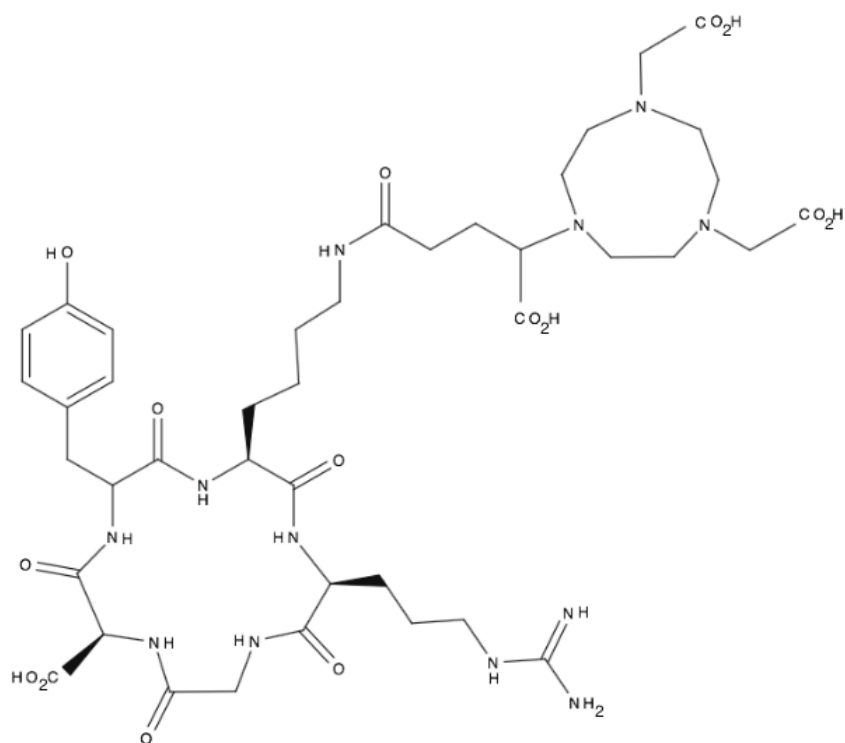
### 1.3.2.2 NODAGA-c(RGDyK)

V uplynulých letech bylo dosaženo významného pokroku v oblasti vývoje radioaktivně značených cyklických RGD peptidů pro detekci nádorových lézí. Vzhledem k vysoké specifitě tohoto radiofarmaka je možné jej dobře detekovat pomocí pozitronové emisní tomografie (PET).

NODAGA-c(RGDyK) ve formě trifluoracetátu je peptid obsahující aminokyselinovou sekvenci Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys. Tento synteticky vytvořený peptid se aktivně podílí na modulaci buněčné adheze. Je schopen se specificky vázat na integrin  $\alpha v \beta 3$  (Shi, et al., 2011).

Jedná o monomer, což zapříčiňuje jeho nižší afinitu k  $\alpha v \beta 3$  integrinům ve srovnání s multimerními peptidy. Avšak Gaertner et al., 2012 prokázal, že vizualizace nádoru buněčné linie U-87 MG laboratorních myší při PET/CT zobrazování nevykazuje snížené hodnoty akumulace radiofarmaka vůči dimerním strukturám (Gaertner et al., 2012).

Velkou výhodou je pro monomery jejich malá molekulová hmotnost. Díky této vlastnosti se vyznačují rychlejší renální clearancí v porovnání s multimery (Yoshimoto et al., 2008).



**Obr. č. 11** Strukturální vzorec NODAGA-c(RGDyK).

### 1.3.2.3 NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>

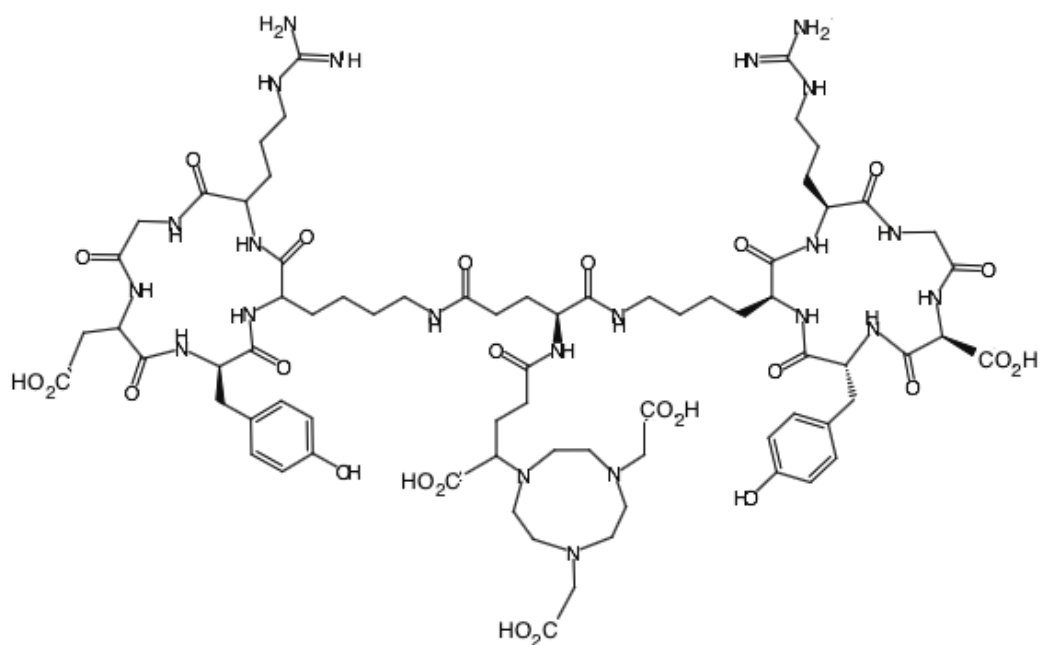
NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> je peptid, jenž je modifikován chelátorem NODAGA. Jedná se o cyklický pentapeptid (RGDyK) obsahující aminokyselinovou sekvenci Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys (Oxboel et al., 2012).

Tento c(RGDyK)<sub>2</sub> se selektivně váže na strukturu  $\alpha\beta_3$  integrinu, který je nadměrně exprimován na buňkách gliomu. Jelikož se jedná o dimerní strukturu, projevuje se vyšší afinitou k receptoru a je schopen vázat se na více receptorů najednou. Navázaný RGD dimer vyvolává statickou vazbu druhého volného dimeru na receptor: vazba jedné RGD jednotky na integrin významně ovlivňuje vazbu dalších RGD jednotek. Díky tomuto faktoru je možno zvýšit vazebnou asociaci na integrin či redukovat disociaci RGD peptidu z receptorů (Dijkgraaf et al., 2012).

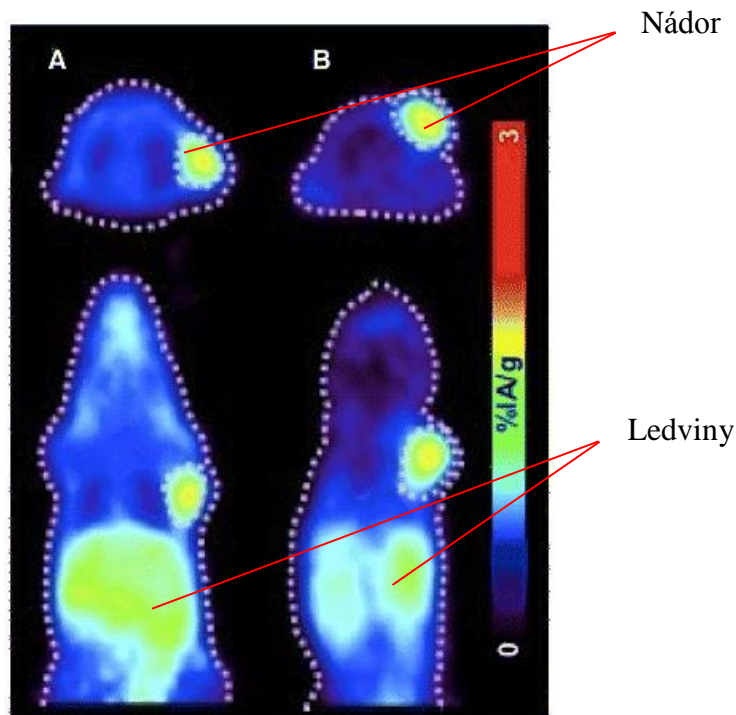
Testy multimerních RGD peptidů v klinických studiích *in vivo* prokázaly, že se c(RGDyK)<sub>2</sub> vyznačuje dobře predikovatelnou farmakokinetikou. Biodistribuční testy prokázaly zvýšenou retenci c(RGDyK)<sub>2</sub> v nádorových buňkách a dynamickou renální

exkreci, která je zapříčiněna jeho hydrofilními vlastnostmi (Cao et al., 2011; Yoshimoto et al., 2008).

Při PET/CT skenování biodistribuce tohoto radiofarmaka *in vivo* vzniká obraz, na němž je vyobrazen výrazný kontrast nádorové tkáně vůči fyziologické tkáni. Jedná se o vhodné radiofarmakum pro PET/CT zobrazování nádoru a kvantifikaci angiogeneze (Dijkgraaf et al., 2012; Oxboel et al., 2014).



Obr. č. 12 Strukturální vzorec NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>.



**Obr. č. 13** Transversální (horní část) a koronární (spodní část) miniPET zobrazení  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) (A) a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) (B) v myším modelu nesoucím nádorovou buněčnou linii U-87-MG; 1 hodina p.i. (Dummont et al., 2011).

### 1.3.3 Chelátory užívané při značení RGD peptidů

Základním a velmi důležitým komponentem radiofarmak na bázi radioaktivního kovu je chelátor vázající tento radiokov. Jelikož se radioizotopy v roztoku vyskytují ve volné formě kationtů, je potřeba je z roztoku navázat použitím chelatačního činidla. Jedná se o ligandový systém, který váže iont radiokovu do těsné a stabilní koordinační vazby. Vazbou na vhodný chelátor se též předejde případné transchelataci a hydrolyze izotopu. Tudiž jestliže je radiofarmakum aplikováno do těla pacienta, transportuje se k cílové molekule, aniž by došlo k uvolnění radioaktivního izotopu z radiofarmaka (Price et al., 2014).

Díky široké škále a znalostem fyzikálních vlastností iontů radioaktivních kovů je možno jimi označená radiofarmaka použít pro pozitronovou emisní tomografii (PET).

Ligandy, které se obvykle používají ke konstrukci radiofarmak, jsou bifunkční chelátory (BFCs). Jedná se o chelátory s reaktivními funkčními skupinami, které se kovalentně konjugují s cílenými vektory (peptidy, nukleotidy, protilátky). Při běžné biokonjugaci

se používají funkční skupiny (karboxylové kyseliny či aktivované estery), které katalyzují párování amidů, thiomocoviny či thiolu (Zhang et al., 2014).

### 1.3.3.1 DOTA

DOTA neboli 1,4,7,10-tetraazacyclododekát-1,4,7,10-tetraacetátová kyselina je bifunkční chelatační činidlo, který je schopno tvořit stabilní komplexy s radioizotopy, jako jsou  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{In}$  či  $^{68}\text{Ga}$ .

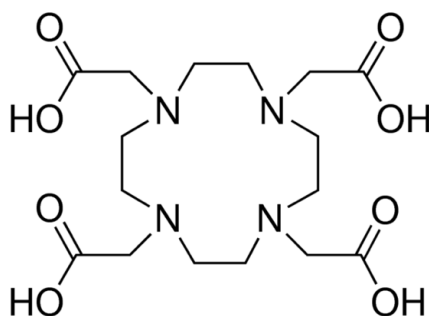
Kinetika vychytávání  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidů je rychlá a v souladu s poločasem  $^{68}\text{Ga}$ . Malá velikost těchto molekul vykazuje žádoucí vlastnosti, jako jsou příznivá farmakokinetika s vysokou a specifickou absorpcí  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-peptidů na povrchové receptory glioblastomu (Breeman et al., 2011).

Do procesu komplexace  $^{68}\text{Ga}$  do struktury DOTA jsou zahrnuty čtyři atomy dusíku z makrocyclické struktury a dva atomy kyslíku karboxylových skupin. Zbývá pouze jedna karboxylová skupina, která se nepodílí na komplexaci  $^{68}\text{Ga}$ . Tato volná karboxylová skupina zapříčiňuje zvýšení hydrofility tohoto komplexu.

Avšak cyklododekanový kruh DOTA chelátoru není ideální pro vazbu  $^{68}\text{Ga}$ . Je známo, že iontový poloměr  $\text{Ga}^{3+}$  je příliš malý, aby se optimálně vešel do hnízda chelátoru DOTA. Toto může být vysvětlení nepříznivé biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RGD (Haubner et al., 2014; Knetsch et al., 2011).

Hlavní nevýhodou tohoto chelatačního činidla je, že je nutno při jeho radiochemickém značení zvýšit teplotu na 85 - 95 °C. Výhodami jsou jeho inertnost vůči kyselé disociaci jeho bočních řetězců a celková konstantní stabilita *in vivo* (Price et al., 2014).

Je považován za nejčastěji používané chelatační činidlo v oblasti radiofarmacie.



**Obr. č. 14** Strukturální vzorec chelátoru DOTA

### 1.3.3.2 NODAGA

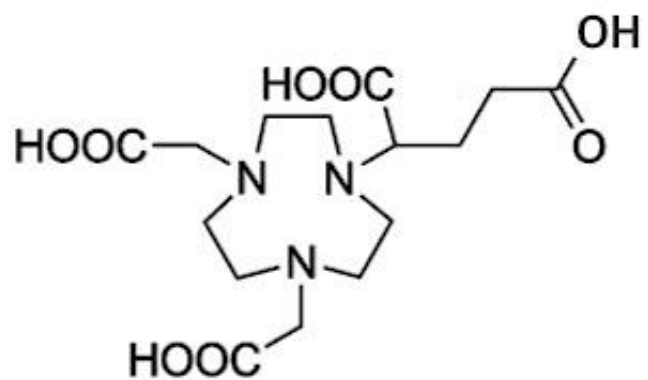
Chelátor NODAGA je bifunkční chelatační činidlo, které se ve struktuře obsahuje sekvenci 1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymethyl-1,4,7-triazacyklononan a je derivátem chelatačního činidla NOTA (Haubner et al., 2016).

Funkcionalizovaný chelátor NODAGA je vhodný pro konjugaci proteinů nebo peptidů. Používá se pro radioaktivní značení somatostatinu (Ghosh et al., 2015).

Chelátor NODAGA se vyznačuje vhodnějším prostorovým uspořádáním pro vazbu  $\text{Ga}^{3+}$  iontu než DOTA, jelikož obsahuje menší triazacyklononanové hnízdo pro ukotvení izotopu  $^{68}\text{Ga}$ . Vytváří stabilní komplexy s  $^{68}\text{Ga}$  již za pokojové teploty během 5-10 minut s radiochemickou čistotou  $>96\%$  a tento komplex je inertní i vůči vysoké koncentraci kyseliny dusičné v roztoku (Ghosh et al., 2015).

Chelátor NODAGA je zvláště výhodný kvůli své vysoké hydrofilitě, která zapříčiňuje rychlou renální exkreci. Díky tomuto faktoru nedojde k akumulaci radioaktivity v gastrointestinálním traktu a v ledvinách (Oxoboel et al., 2012).

Bylo prokázáno, že  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD má *in vitro* vysokou afinitu k integrinu  $\alpha\beta_3$ . *In vivo* sledování biodistribuce tohoto komplexu prokázalo, že se vysoce akumuluje v místě nádoru a v ledvinách, kde se vylučuje (Cai et al., 2013).



Obr. č. 15 Struktura chelátoru NODAGA.

## 1.4 PET zářič gallium-68

Jedná se o jeden z nejvyužívanějších radionuklidů, který se používá v preklinických studiích glioblastomu.  $^{68}\text{Ga}$  je radionuklid emitující pozitrony o energii 1,92 MeV. K jeho získání není potřeba cyklotron, ale je generován pomocí generátoru  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . Fyzikální poločas přeměny činí pouhých ( $T_{1/2}$ ) 67,71 minut, takže  $^{68}\text{Ga}$  není vhodné pro přepravu.  $^{68}\text{Ga}$  je díky svým vhodným emisním vlastnostem používán k diagnostice nádorových lézí v nukleární medicíně. Je užíván v zobrazovací metodě PET. Díky relativně krátkému poločasu přeměny a emisi pozitronů radioizotopu  $^{68}\text{Ga}$  je možno vytvářet 3D PET skeny (Bach et al., 2013).

Peptidy značené  $^{68}\text{Ga}$  jsou uznávány jako nová třída radiofarmak vyznačující se rychlou farmakokinetikou *in vivo*. Tímto izotopem je možno značit bivalentní chelatační činidla jako jsou DOTA či NODAGA (viz kapitola 2.3.3). Proto se v klinické praxi skenování pomocí  $^{68}\text{Ga}$  používá čím dál častěji. Umožňuje lékařům určit diagnózu, stadium nemoci a také sledovat odezvu léčby u onkologických pacientů (Převzato z The Carcinoid Cancer Foundation, 20. 3. 2017).

Mezi nejvýznamnější radiofarmaka značená galliem-68 se řadí  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC (Banerjee & Popmer, 2013). Dále se  $^{68}\text{Ga}$  používá ke značení polyetylenglykolem (PEG) modifikovaných látek. PEG deriváty zlepšují terapeutický účinek proteinů a peptidů v souvislosti s *in vivo* stabilitou a farmakokinetikou (Blom et al., 2012).

### 1.4.1 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor

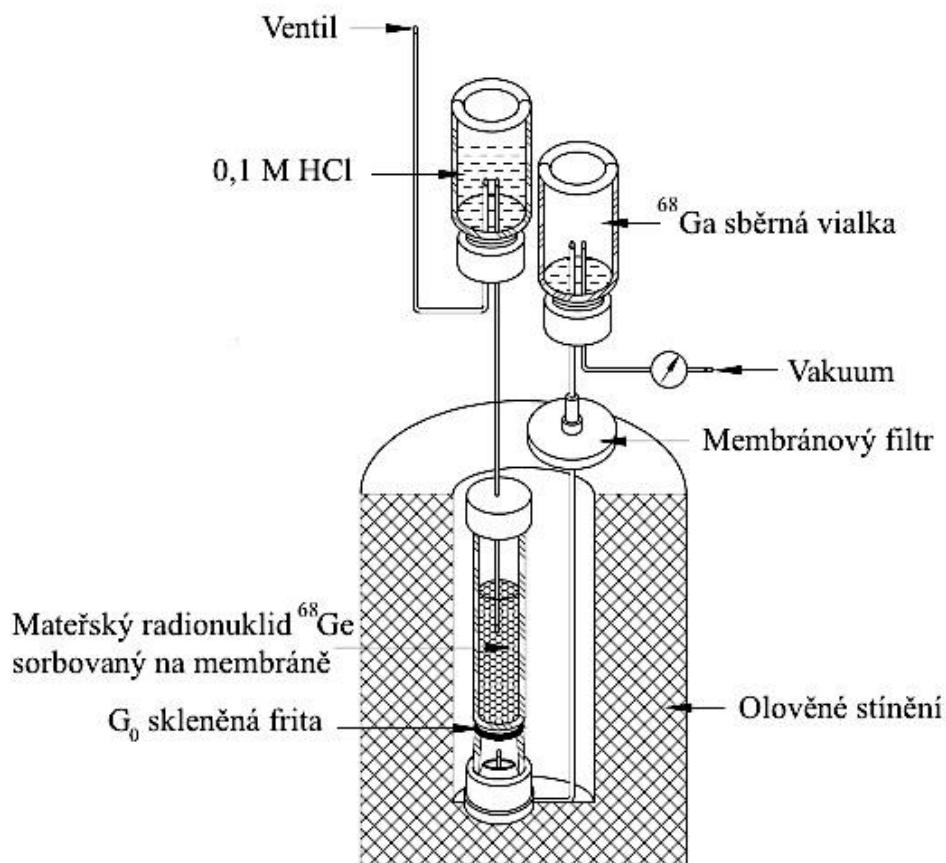
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor je zařízení sloužící k produkci pozitron emitujícího izotopu gallia-68 ve formě  $\text{Ga}^{3+}$  ( $^{68}\text{GaCl}_3$ ) z rozkládajícího se germánia-68. Mateřský izotop  $^{68}\text{Ge}$  má poločas přeměny 271 dní. Je snadno používán k výrobě  $^{68}\text{Ga}$  z  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru v klinickém prostředí (Al-Nahhas et al., 2007; Bach et al., 2013).

Tento generátor funguje podobně jako generátor  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , na principu iontové chromatografie. Skleněná kolona obsahuje stacionární fázi, která je složena z nekovového oxidu ciničitého či z oxidu titaničitého. Její funkcí je na svůj sorbent absorbovat  $^{68}\text{Ge}$ . Mobilní fázi protékající kolonou je solvent, který je schopný eluovat gallium-68. K produkci  $^{68}\text{Ga}$  dochází díky elektronovému záchytu imobilizovaného  $^{68}\text{Ge}$ .

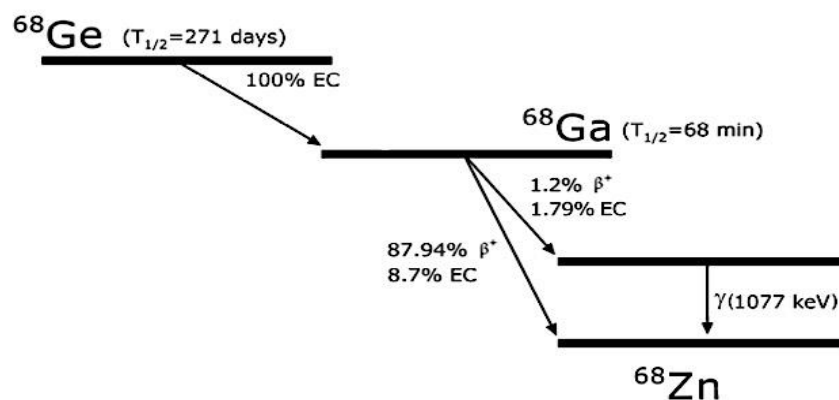


Použití nekovových kolon umožňuje přímé značení  $^{68}\text{Ga}$  bez prepurifikace (Loch et al., 1980).

V současné době je  $^{68}\text{Ga}$  snadno eluováno 0,05 M, 0,1 M nebo 1,0 M kyselinou chlorovodíkovou z generátoru s použitím nekovové stacionární fáze z oxidu cíničitého.



**Obr. č. 16** Schématický diagram  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru (Převzato a upraveno dle Dash et al., 2013).



**Obr. č. 17** Zjednodušené schéma rozpadu  $^{68}\text{Ge}$  na  $^{68}\text{Ga}$  (elektronový záchyt, *angl.* electron capture, EC) a následně na stabilní formu  $^{68}\text{Zn}$ ; při přeměně radioizotopu  $^{68}\text{Ga}$  dochází k emisi částic  $\beta^+$  (kladně nabitě pozitrony) a k elektronovému záchytu, pozitrony při střetu s elektrony anihilují, dochází k jejich zánikua vznikají 2 fotony  $\gamma$  záření s energií 511 keV  
(Převzato z Zimmerman et al., 2017).

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je na základě *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* experimentů posoudit potenciál tří RGD peptidů značených radioaktivním izotopem  $^{68}\text{Ga}$  pro diagnostiku multiformního glioblastomu metodou pozitronové emisní tomografie. Konkrétně jsme se zabývali látkami NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK) a DOTA-c(RGDfK).

*In vitro* testování bylo zaměřeno na detekci stability peptidů v nefyziologických i fyziologických podmínkách.

Při *in vivo* a *ex vivo* testování byla výše zmíněná radiofarmaka podrobena testování jejich biodistribuce v těle laboratorních myší.

## 3 MATERIÁLY A METODY

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Chemikálie

Byly použity tři chelátorem modifikované peptidy RGD; DOTA-c(RGDfK), NODAGA-c(RGDyK), NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> (čistota  $\geq 95$  %; ABX-Advanced biochemical compounds, Německo). Pro přípravu pufru byl použit trihydrát octanu sodného (CH<sub>3</sub>COONa.3 H<sub>2</sub>O, Emsure, Německo) a LC-MS voda (Sigma Aldrich, ČR). Pro eluci <sup>68</sup>Ga z generátoru byla použita 0,1 M kyselina chlorovodíková (HCl, Sigma Aldrich, USA)

Chemikálie potřebné pro přípravu mobilních fází pro RP-HPLC byly trifluoroctová kyselina (čistota  $\geq 99$  %; Sigma Aldrich, ČR) a destilovaná voda. Pro promývání nástřikové mikrostřičky byl použit 96 % ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O VWR Chemicals, ČR) a voda.

Ke kultivaci buněk bylo použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) s přidavkem 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FCSi), 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % pyruvátu sodného a s 1 % antibiotik (10 IU/ml penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin). Vše Sigma-Aldrich, USA.

Pro enzymatické odloučení buněk ze dna kultivační láhve sloužil přípravek tripLE (tříkrát modifikovaný trypsin, Sigma-Aldrich, USA), pro oplach buněk bylo použito PBS. Jako vehikulum pro buňky U-87 MG v průběhu implantace byl použit Matrigel Matrix (Corning, USA) ve směsi s kultivačním médiem (DMEM+10 % FBS, Sigma-Aldrich, USA) v poměru 1:1.

Chemikálie, které se použily při testování *in vitro* stability značeného peptidu, bylo PBS a oktanol pro stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (log P), při stanovení stability v prostředí konkurenčního kationtu byl použit 0,1 M chlorid železitý (FeCl<sub>3</sub>), při stanovení stability v prostředí konkurenčního chelátoru byl použit 6 mM dietyltriainin pentaacetát (DTPA). Dále byla při stanovení plazmatické stability a vazby na plazmatické proteiny použita lidská plazma (Transfúzní odd. FNOL). Všechny zmíněné blíže neurčené chemikálie byly pořízeny od firmy Lachema, a.s. (ČR), Sigma-Aldrich (USA) či Roth (Německo).

Pro úpravu pH roztoku RGD peptidu byl použit acetátový pufr (1,14 M octan sodný trihydrát)

Jako inhalační anestetikum byl použit isofluran ve formě přípravku Forane (Abbott, USA), pro inhalaci byl užit medicínální kyslík Respirox (SIAD, ČR). K zabránění vysychání očí u zvířat během anestézie byl použit Ophthalmol-Azulen (Zentiva, ČR).

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA.

### **3.1.2 Použité přístroje**

Pro eluci izotopu gallia-68 byl použit  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor (Eckert & Ziegler, Berlín, Německo), měření radioaktivity radiofarmak bylo prováděno pomocí měřiče aktivity (Veenstra Instruments, Nizozemí). Pro značení DOTA-c(RGDfK) bylo zapotřebí zvýšené teploty, čehož bylo dosaženo pomocí termostatu (Major Science, USA). Celá příprava značení RGD peptidů probíhala v odstíněné digestoři (Veenstra, Nizozemí).

K analýze čistoty bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) UltiMate 3000 URP-HPLC (Dionex, Německo) s detektorem radioaktivity (Raytest GmbH, Německo) a kolona Watrex Nucleosil 120 C18 5  $\mu\text{m}$  250x4 mm (Watrex, ČR). Získaná data byla zpracovávána pomocí programu Chromeleon 7.1 systém (Dionex, USA).

Při stanovení vazby na plazmatické proteiny byla použita kolona illustra MicroSpin G-50 s náplní Sephadex G-50 s frakcionačním rozsahem 1,5-30 kDa (GE Healthcare, Velká Británie). Odstředovací metody probíhaly pomocí centrifugy Smart 15 (Hanil BioMed Inc., Gwangju, Korea), vážení chemikálií bylo prováděno pomocí analytických vah Radwag (AS 220.3Y, Polsko) a homogenizace chemikálií byla provedena na vortexu Genius 3 (IKA, Sigma Aldrich, USA). Testované peptidy byly při stanovení stability značeného peptidu inkubovány v inkubátoru Trigon-plus (Thermo Fisher Scientific, USA) a pro srážecí reakce byla použita třepačka Orbital Shaker (SGM Lab Solution, Indie).

Buňky byly uchovávány v inkubátoru (Merci, ČR), zahřívány ve vodní lázni (Memmert WPE, Německo) a centrifugace buněk probíhala v centrifuze Z 326 (Hermle, Německo).

Laboratorní myši byly zobrazovány přístrojem Albira micro-PET/CT/SPECT (Carestream, USA), anestetikum bylo podáváno systémem pro inhalační anestezii pro malá zvířata

(Summit Anesthesia Support, USA).

Na měření radioaktivity vzorků byl použit automatický gama počítač 2480 Wizard<sup>2</sup> (PerkinElmer, Rakousko).

### 3.1.3 Laboratorní zvířata

K experimentální části práce byly využity laboratorní myši (samice) kmene SCID (Harlan, USA). Váha laboratorních myši se pohybovala mezi 20-25 g. Myši byly chovány v klecích v SPF zvěřinci s dostatkem krmiva a vody. Pro pokusy bylo použito 20 myši na nenádorové zobrazování a 20 myši na nádorové zobrazování radiofarmak (využití šesti myši pro každý radiopeptid ve dvou skenovacích časech - 30 a 90 minut po podání radiopeptidu; dvě myši sloužily jako záloha). Stáří myši stanoveno v době vstupu do experimentu činilo u nenádorových 7 týdnů a u nádorových 16 týdnů.

**Kmen SCID** (SCID, těžká kombinovaná imunodeficiencie; *angl.* severe combined immunodeficiency) se vyznačuje velkým omezením v produkci a funkci T a B lymfocytů. Mutací je narušena rekombinace genů s antigenním receptorem, a to způsobuje pozastavení vývoje lymfocytů v jejich rané fázi. V některých případech ale byla sledována generace několika klonů funkčních B a T buněk u myši tohoto kmene. Myši ve věku 10 až 14 měsíců jsou i přes danou mutaci schopny produkovat malé množství svých vlastních lymfocytů či mohou být lymfocyty nahrazeny normálními lymfocyty jiné zdravé myši nebo mohou být rekonstruovány i lidskými lymfocyty. Díky této vlastnosti jsou vhodné pro alogenní či xenogenní transplantaci (Bosma et al., 1991). Jsou tedy běžně využívány jako modelové organismy pro výzkum základní biologie imunitního systému, pro transplantační strategii či pro výzkum následků nemocí na savčí systém. Kromě toho jsou také užitečné pro testování bezpečnosti nových vakcín nebo terapeutických látek v imunokompromitovaných jedincích (Ito et al., 2001).



**Obr. č. 18** Laboratorní samičí myši kmene SCID v kleci s krmivem a vodou; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UPOL; foto Michaela Holá.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Radioaktivní značení

Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 1 µg, 5 µg a 10 µg zkoumaného RGD peptidu (koncentrace 1 mg/ml) a smícháno s 30 µl acetátového pufru. Následně byla provedena eluce gallia-68 z generátoru  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  ve formě iontů  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  ( $^{68}\text{GaCl}$ ). Získaný  $^{68}\text{Ga}$ -eluát (celkové získané množství 1 ml) byl v množství 300 µl připipetován ke směsi acetátového pufru a jednoho ze tří zkoumaných peptidů. Následně byla tato směs inkubována 5, 10 či 15 minut (NODAGA-modifikované peptidy byly inkubovány při pokojové teplotě, DOTA-modifikovaný peptid při 90 °C). Byla provedena kontrola kvality značení stanovením radiochemické čistoty pomocí HPLC. Ze získaných dat byly vyhodnoceny optimální reakční podmínky pro značení testovaných peptidů, tj. množství peptidu, teplota inkubace a reakční doba s ohledem na požadovanou radiochemickou čistotu ( $\geq 95\%$ ). Rychlost průtoku mobilní fáze při HPLC analýze byla 1 ml/min, složení mobilní fáze probíhalo dle tabulky č. 6. Radiochemická čistota značených peptidů byla měřena před každým použitím značeného peptidu.

**Tabulka č. 6** Gradientová eluce HPLC pro analýzu peptidů. Mobilní fáze A (99,9%  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% kyselina trifluoroctová), mobilní fáze B (99,9% acetonitril + 0,1% kyselina trifluoroctová).

Čas (minuty)	Složení mobilní fáze
0 - 3	100% A
3 - 10	50% A + 50% B
10 - 13	20% A + 80% B
13 - 15	100% A



### 3.2.2 Testy stability

#### 3.2.2.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (P)

Byl připraven označený preparát –  $^{68}\text{Ga}$ -RGD peptid ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), k preparátu bylo napipetováno 600  $\mu\text{l}$  PBS. Do mikrozkušavky bylo přidáno 450  $\mu\text{l}$  PBS a 500  $\mu\text{l}$  oktanolu, do zkumavky dále bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  směsného vzorku. Takto bylo připraveno celkem šest vzorků. Takto připravené vzorky byly protřepány po dobu 20 minut při 1000 rpm. Následně byly vzorky zcentrigovány při 15 000 rpm po dobu 1 minuty ve vyvážené centrifuze. Po zcentrifugování bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  vzorku z oktanolové a 50  $\mu\text{l}$  vodné fáze. Aktivita vzorků byla změřena pomocí gama počítače. Ze získaných dat byl vypočítán rozdělovací koeficient ( $\log P$ ) testovaných peptidů. Jedná se o dekadický logaritmus podílu radioaktivity (jednotka CPM, počet za minutu, *angl.* counts per minute) v oktanolové (%) a vodné fázi (%):

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

#### 3.2.2.2 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s konkurenčním kationtem

Byl připraven označený preparát ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), do nové mikrozkušavky bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  značeného preparátu, který byl následně smísen se 150  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{FeCl}_3$  o koncentraci 0,1 mmol/l. Směs byla následně inkubována při 37 °C v inkubátoru po dobu 30, 60 či 120 minut. Průběžně byl odebrán vzorek pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC.

#### 3.2.2.3 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s konkurenčním chelátorem

Byl připraven označený preparát ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), do nové mikrozkušavky bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  značeného preparátu, který byl následně smísen se 150  $\mu\text{l}$  roztoku DTPA o koncentraci 6 mmol/l. Směs byla následně inkubována při 37 °C v inkubátoru po dobu 30, 60 či 120 minut. Průběžně byl odebrán vzorek pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC.

#### 3.2.2.4 Stanovení stability radiopeptidu v prostředí s fyziologickým pH

Byl připraven označený preparát ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), do preparátu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  acetátového pufru s koncentrací 1,1 mol/l. Bylo zkontrolováno pH pomocí pH papírku (pH se pohybovalo okolo 7). Směs byla inkubována při 37 °C v inkubátoru. Ze směsi se v časech 30, 60 či 120 minut průběžně odebralo 10  $\mu\text{l}$ , vzorek se zředil 50-100  $\mu\text{l}$  vody dle aktivity a následně byl odebrán určitý objem pro analýzu radiochemické čistoty na HPLC.

### 3.2.3 Stabilita v plazmatickém prostředí a vazba na plazmatické proteiny

#### 3.2.3.1 Stanovení plazmatické stability

Byl připraven označený preparát ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), do 100  $\mu\text{l}$  značeného preparátu bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  lidské plazmy. Vše bylo pečlivě zamícháno. Následně bylo odebráno do čisté mikrozkušavky 100  $\mu\text{l}$  směsného preparátu (plazma + značený preparát) pro analýzu (vzorek reprezentující čas 0 minut), tento vzorek byl smíchán s 200  $\mu\text{l}$  acetonitrilu. Poté by vzorek protřepán na třepače při 450 rpm po dobu 1 minuty. Následně byl vzorek zcentrifugován při 15 000 rpm po dobu 3 minut. Byl opatrně odebrán supernatant. Podle aktivity byl odebrán určitý objem jako vzorek pro HPLC a byla zjištěna jeho radiochemická čistota. Původní směsný preparát (plazma + značený peptid) byl inkubován v inkubátoru při teplotě 37 °C a v časech 30, 60, 120 minut a bylo vždy odebráno 100  $\mu\text{l}$  pro stanovení RCHČ. Analýza radiochemické čistoty probíhala stejně jako u prvního vzorku (0 minut).

#### 3.2.3.2 Stanovení vazby na plazmatické proteiny

Byl připraven označený preparát ( $\geq 99$  % radiochemická čistota), z něj bylo odebráno do nové mikrozkušavky 10  $\mu\text{l}$  označeného preparátu a připipetováno 190  $\mu\text{l}$  lidské plazmy=směsný vzorek. Jako kontrolní vzorek pro ověření funkce separační kolony byl použit stejný objem označeného preparátu a 190  $\mu\text{l}$  PBS. Následně byla připravena gelová kolona (ilustra MicroSpin G-50 Column) tak, že byl koloně odňat výtokový špunt, bylo uvolněno víčko kolony, kolona byla vložena do 2 ml mikrozkušavky a byla zcentrifugována při 2 000 g po dobu 3 minut. Ze směsného vzorku bylo odebráno 25  $\mu\text{l}$

a tento objem byl napipetován na připravenou gelovou kolonu. Kolona byla následně zcentrifugována při 2 000 g po dobu 1 minuty. Výsledný eluát a použitá kolona byly následně měřeny na gama počítací. Z naměřených aktivit (A) byla pomocí níže uvedeného vzorce vypočtena vazba značeného peptidu na bílkoviny plazmy.

$$\% \text{ vazby} = (A_{\text{eluátu}} / A_{\text{celková}}) \times 100$$

Směsný preparát byl následně inkubován v inkubátoru při teplotě 37 °C a v časech 30, 60, 120 minut byly odebírány další vzorky pro separaci na gelové koloně. Následná analýza probíhala stejně jako u prvního vzorku.

### **3.2.4 Pasážování a kultivace a buněk U-87 MG**

Při kultivaci a pasážování byla potřeba dodržovat pravidla sterilní manipulace v laminárním boxu.

Samotné pasážování bylo prováděno, pokud byly buňky konfluentní z 60 - 70 %.

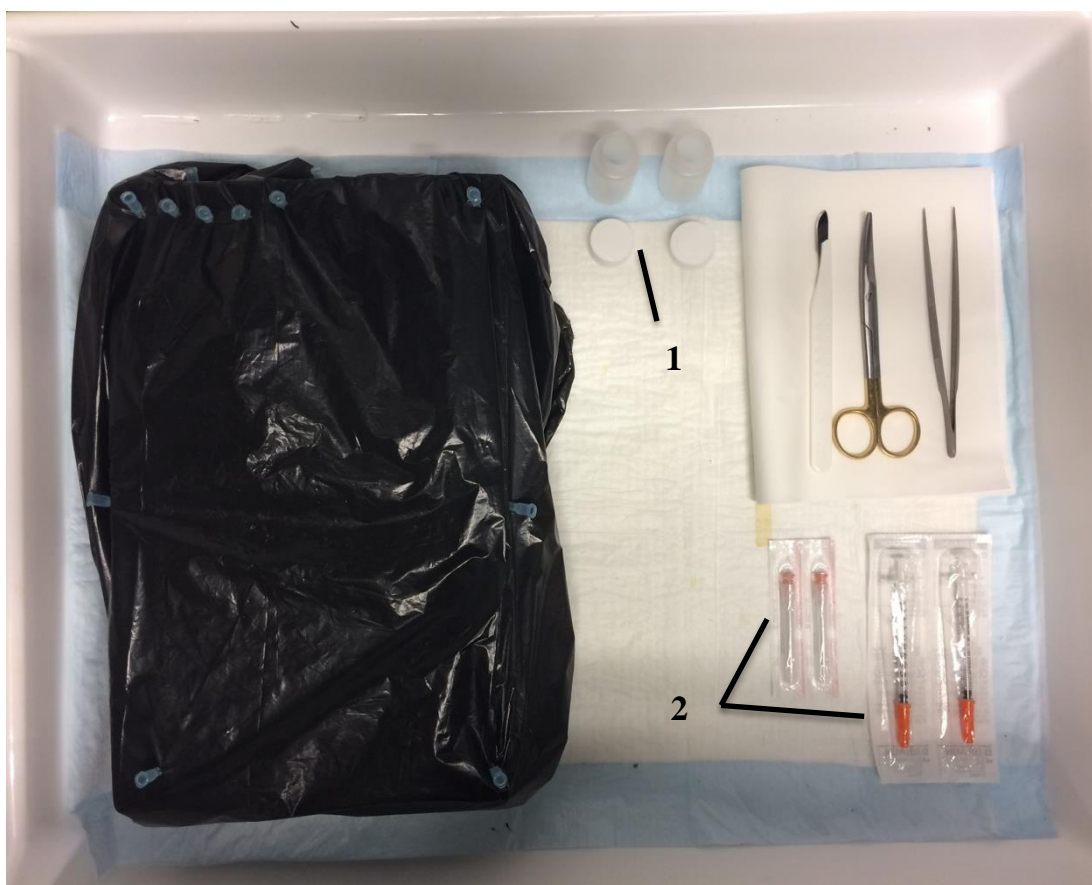
Tvorba nádorů u laboratorních myší byla prováděna následovně. Laboratorním myším bylo subkutánně aplikováno  $5 \times 10^6$  U-87 MG buněk ve směsi s Matrigelem (1:1) na pravý bok a průběžně byl sledován růst nádoru. Experimentální zvířata s velikostí nádoru 100-300 mm<sup>3</sup> (tj. zhruba jeden až dva měsíce po subkutánní aplikaci nádorových buněk) byla používána pro zobrazování pomocí PET/CT a pro *ex vivo* biodistribuční studie.

### **3.2.5 Studie *ex vivo* biodistribuce (sekční metoda)**

Preparáty peptidů značených <sup>68</sup>Ga (opět kontrola správného pH a kvality značení před aplikací laboratorním zvířatům) byly naředěny 600 μl fyziologického roztoku. Připravené roztoky byly retroorbitálně aplikovány myším, jedna látka byla podána vždy šesti laboratorním myším. Aktivita jedné dávky se pohybovala v rozmezí 3-5 MBq.

Po 30 minutách od podání látky byly tři laboratorní myši uvedeny do anestezie a usmrceny přerušením míchy v oblasti krční páteře, následně jim byla z *arteria carotis* odebrána krev. Myši byly přichyceny k podložce a byly jim odebrány následující orgány: krev, slezina,

slinivka, žaludek (manuálně vyprázdněný), střeva, ledviny, játra, srdce, plíce, sval, stehenní kost, u nádorových zvířat byl navíc odebrán i nádor. Jednotlivé orgány byly zváženy a následně byla změřena jejich radioaktivita pomocí automatického gama počítáče. Změřeny byly i standardy podaného preparátu. Naměřená data byla vyhodnocena jako procento podané dávky na gram orgánu (%ID/g). Stejný postup byl proveden 90 min p.i. u zbylých tří myši.



**Obr. č. 19** Ilustrační znázornění pracovní plochy pro zhotovení preparátů pro studii *ex vivo* biodistribuce. Zprava se nachází podložka, na kterou je možno myš lehce přichytit a usnadnit tak preparaci; scintilační láhve (1), které slouží pro uchování preparátů (orgánů) během měření na gama počítáči; nástroje k preparaci (skalpel, nůžky, pinzeta); sterilní jehly a injekční stříkačky (2) pro odběr krve myši bezprostředně po eutanázii; foto: Michaela Holá.

### **3.2.6 Testování degradace radiopeptidů *in vivo* stanovením jejich radiochemické čistoty v moči**

Laboratorním myším, kterým byly podány testované  $^{68}\text{Ga}$ -RGD-peptidy, byla 30 a 90 minut po podání testované látky odebrána moč. Vzorky moči byly přímo analyzovány pomocí RP-HPLC stejnou metodikou jako v předešlých kapitolách. Účelem bylo zjistit radiochemickou čistotu vylučovaného peptidu pro posouzení míry jeho metabolizace *in vivo*.

### **3.2.7 PET/CT zobrazování biodistribuce radiofarmak**

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 SCID (Anlab, Praha, Česká Republika).

Laboratorní myši byly podrobeny dvěma typům PET/CT skenování. Nejprve byl proveden dynamický PET sken (ihned po aplikaci značeného preparátu), který trval 90 min (tj. 18 na sebe plynule navazujících 5 minutových PET akvizic). V jiný den byl na stejném zvířeti vykonán statický PET sken 30 a 90 min p.i. (po podání) v délce 10 minut s plynule navazujícím CT snímáním (proud 400  $\mu\text{A}$ , napětí 45 kV), které sloužilo k získání dat pro budoucí fúzi PET a CT obrazů. Před zahájením skenování se nastavil příslušný offset, tj. odsazení lůžka.

Skenování zvířat probíhalo pomocí programu Albira Acquirer a rekonstrukci výsledných dat zprostředkoval program Albira Reconstructor. Pro samotné vyhodnocení obrazu byl použit program  $\pi$ -MOD ( $\pi$ -MOD Technologies, Švýcarsko), díky němuž byly zpracovávány kinetické modely tak, že byly označeny jednotlivé VOI (objem zájmu, *angl.* volume of interest). Program VolView (Kitware, USA) umožnil vytvořit 3D snímky a 3D animace.

Data vyhodnocená programem  $\pi$ -MOD byla vyjádřena v procentech podané dávky na gram tkáně (% id/g). Tato hodnota vychází z níže uvedeného vzorce, který zahrnuje

objemovou aktivitu  $C$  [mCi/cm<sup>3</sup>] daného VOI, objem VOI jako  $V$  [cm<sup>3</sup>] a hmotnost  $W$  [g] tkáně vybraného VOI. Podaná dávka radioaktivity je označena  $D_{inj}$  [mCi].

$$\% id/g = C * \frac{V}{W} * \frac{1}{D_{inj}} * 100$$

Přepočítání mezi standardizovanou hodnotou vychytávání (SUV) a % id/g:

$$SUV = \frac{\% id/g * W}{100}$$

Tělesnou hmotnost vyznačuje  $W$ [g]. Jednotkou SUV je kg/ml.

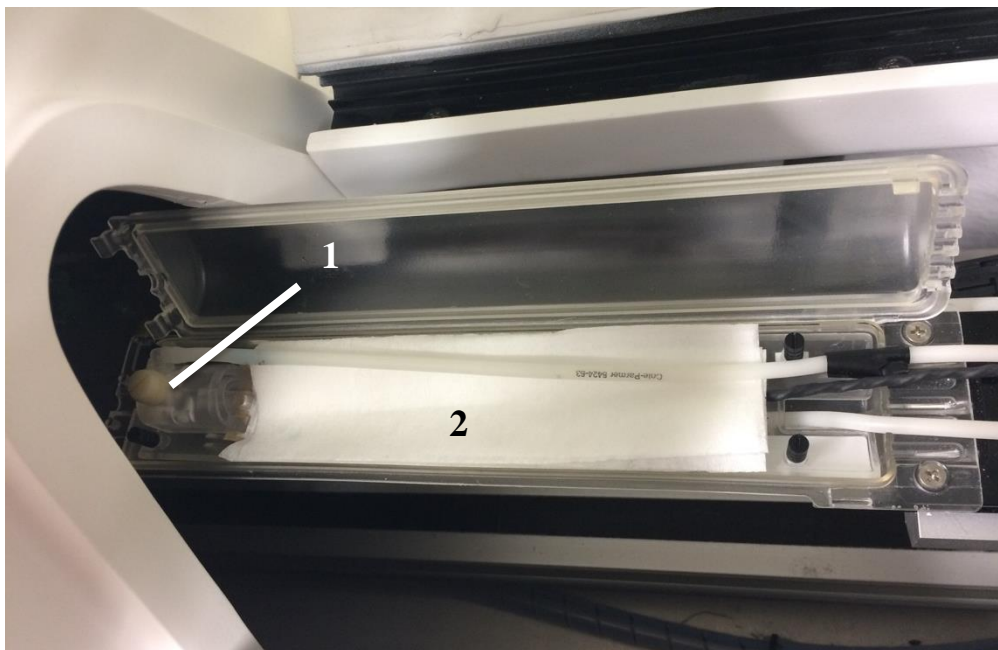
### 3.2.7.1 Dynamické PET skenování

Byl připraven značený radiopeptid, který byl smíchán se 100 µl 1,14 M acetátovým pufrům a výsledný objem byl doplněn do 1 ml fyziologickým roztokem. Bylo zkontrolováno pH roztoku (pH 6-7), byla připravena dávka do sterilní injekční stříkačky (100-150 µl), změřena radioaktivita dávky (3-5 MBq) a aplikována retroorbitálně<sup>14</sup> dříve narkotizované laboratorní myši (PET sken byl prováděn na třech myších zároveň).

V programu Albira Acquirer byly nastaveny parametry pro dynamický sken (PET dynamic scan 90 min - 18 frames, nastavení offsetu 80 mm). Myš byla vložena do lůžkového prostoru Albira micro-PET/CT/SPECT. Proti vysychání rohovky jí byla aplikována mast Ophthalm-Azulen. Po celou dobu anestezie byl průtok kyslíku pro inhalaci udržován mezi 1,5 a 2 l/min a hladina isofluranu byla nastavena na 2 %. Po ukončení akvizice obrazů byla provedena rekonstrukce dat a analýza rozložení daného RGD peptidu v jednotlivých orgánech laboratorní myši. Toto skenování bylo provedeno se všemi zkoumanými RGD peptidy (<sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK), <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK), <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>).

---

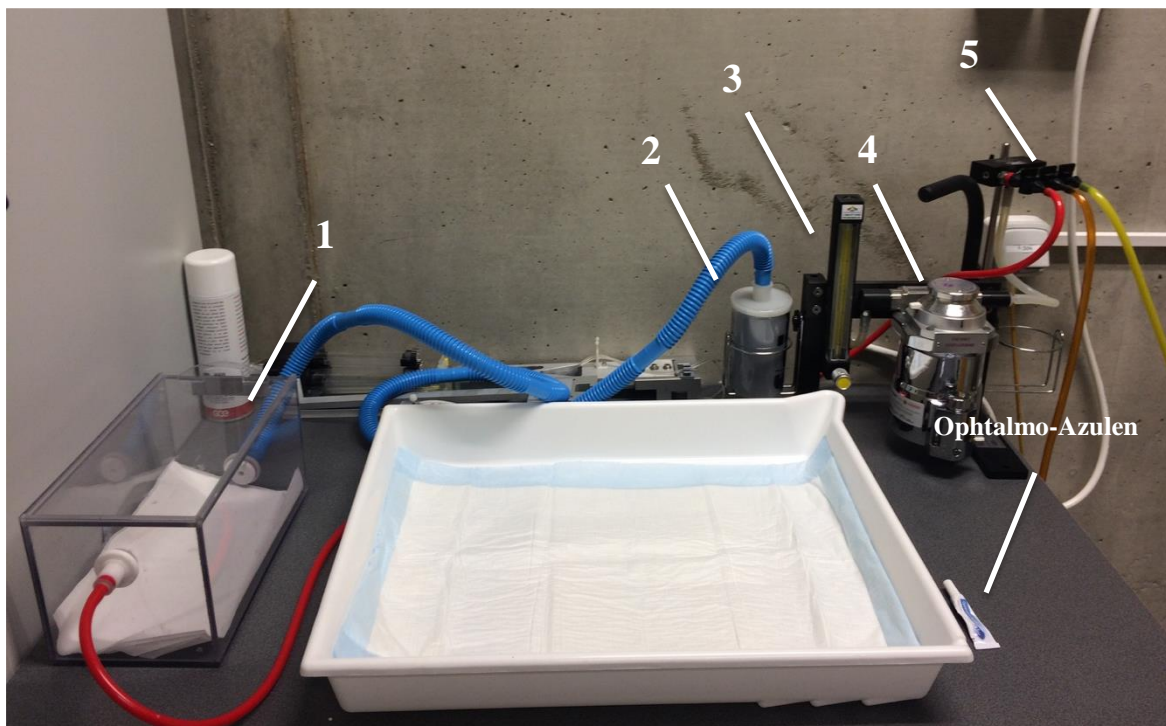
<sup>14</sup> Retroorbitální aplikace je rovnocenná alternativa k intravenóznímu podání do ocasní žíly. Aplikace je prováděna do retroorbitálního sinu lokalizovaného za okem (Kim et al., 2011)



**Obr. č. 20** Lůžkový prostor Albira micro-PET/CT/SPECT. Přívod anestetika (1), místo pro uložení myši (2); foto Michaela Holá.

### 3.2.7.2 Statické PET/CT skenování

Byl připraven značený radiopeptid, který byl smíchán se 100  $\mu$ l 1,14 M acetátovým puforem a výsledný objem byl doplněn do 1 ml fyziologickým roztokem. Bylo zkontrolováno pH roztoku (pH 6-7), byla připravena dávka do sterilní injekční stříkačky (100-150  $\mu$ l), změřena radioaktivita dávky (3-5 MBq) a aplikována retroorbitálně dříve narkotizované laboratorní myši. Myš se krátce po aplikaci preparátu uložena do chovné klece, kde se spontánně probudila. 30 minut po aplikaci značeného peptidu jí byla šetrně odebrána moč pro HPLC analýzu. Myš byla uvedena do anestezie a vložena do lůžkového prostoru Albira micro-PET/CT/SPECT. V programu Albira Acquirer byly nastaveny parametry pro statický sken (PET single 10 min, nastavení offsetu 20 mm, CT bed good High dose/High voltage 110 mm/30 min). Po ukončení akvizice byla provedena rekonstrukce dat a analýza rozložení daného  $^{68}\text{Ga}$ -RGD peptidu v jednotlivých orgánech laboratorní myši. Stejný postup byl proveden i v čase 90 min p. i.. Toto statické skenování bylo provedeno se všemi RGD peptidy (NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK), DOTA-c(RGDfk)).



**Obr. č. 20** Schéma zařízení pro inhalační anestezii. Je složeno z boxu (1), kde dochází k úvodní anestezii zvířete, pracovní plochy pro aplikaci látek, výstupního filtru pohlcujícího nespotřebovaný isofluoran (2), regulátoru průtoku kyslíku (3), odpařovače isofluranu s regulátorem jeho koncentrace (4) a regulátoru výstupu anestetika do boxu či PET/CT systému (5);

foto: Michaela Holá.

### 3.2.8 Eutanázie zvířat

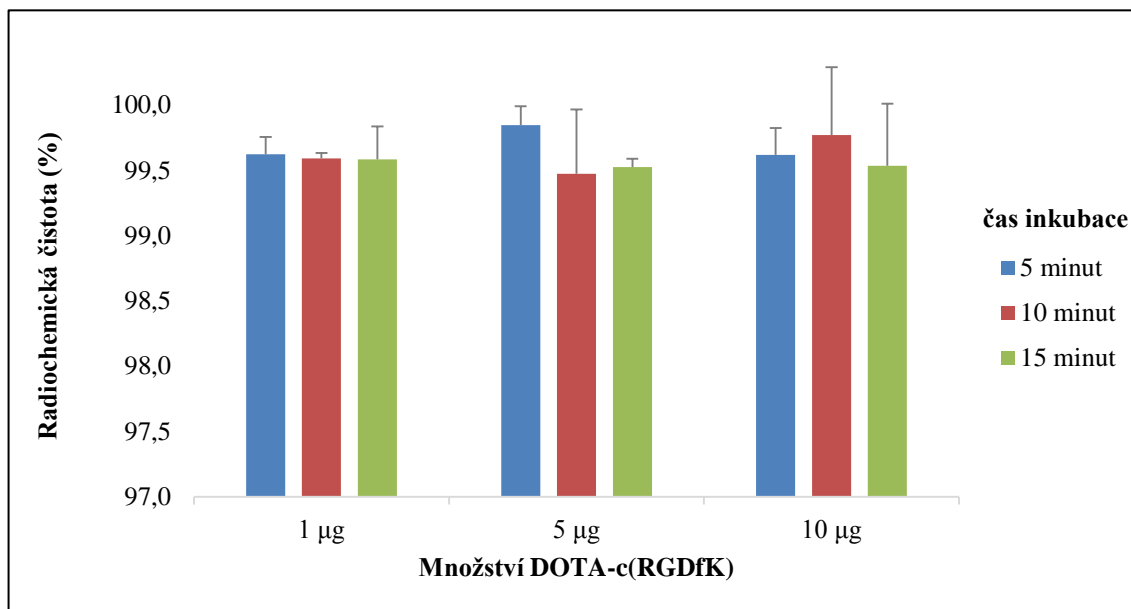
Eutanázie nenádorových i nádorových myší byla provedena vždy až po skončení všech pokusů, tzn. po experimentech na PET/CT. V případě sekční metody byly myši v celkové anestezii usmrceny během experimentu. Utracené laboratorní myši byly následně umístěny do skladu s radioaktivním odpadem na dobu nezbytnou pro pokles úrovně radioaktivity pod stanovenou mez.

Experimenty byly prováděny v souladu se všemi právními normami pro práci s laboratorními zvířaty (Zákon na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb.) platnými v České Republice a s vnitřními předpisy Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

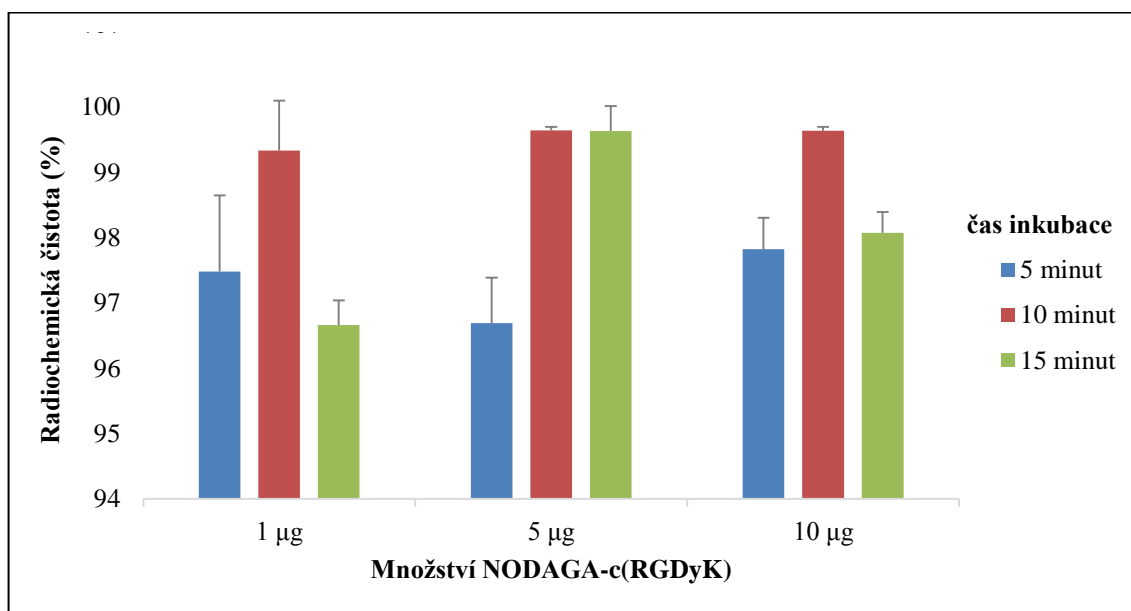


## 4 VÝSLEDKY

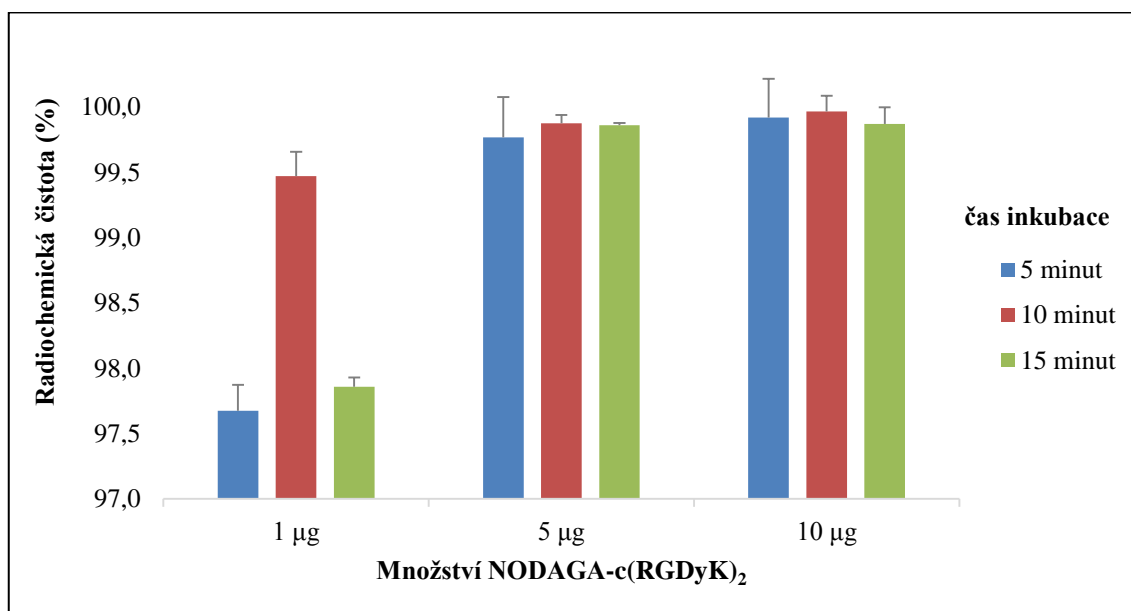
### 4.1 Značení peptidů $^{68}\text{Ga}$



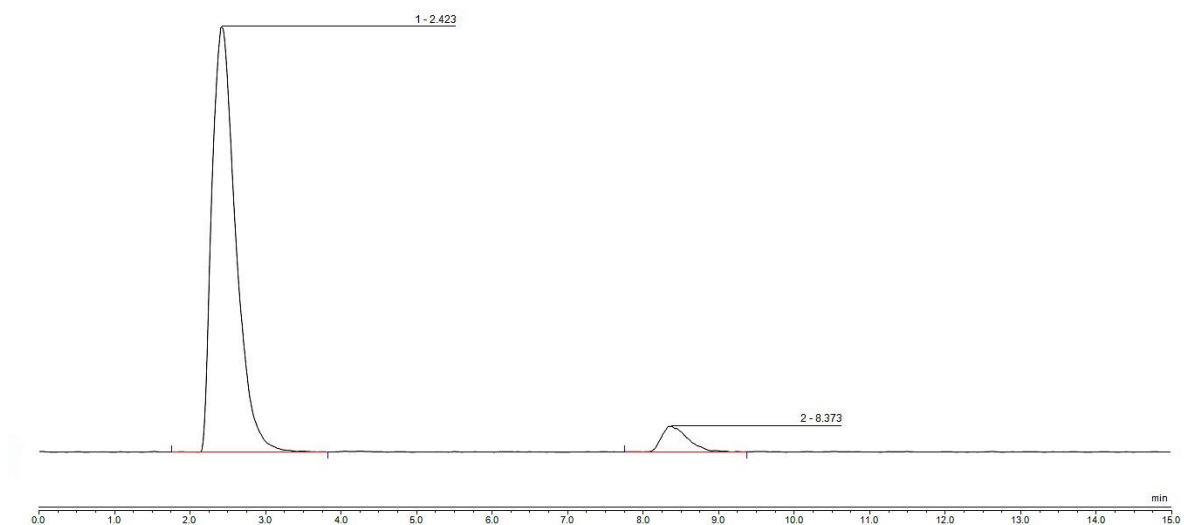
**Graf č. 1** Značení  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) galliem-68 za různých reakčních podmínek: Radiochemická čistota označených vzorků  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) v závislosti na délce inkubace peptidu s radioizotopem a množství peptidu. Data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).



**Graf č. 2** Značení  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  galliem-68 za různých reakčních podmínek. Radiochemická čistota označených vzorků  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  v závislosti na délce inkubace peptidu s radioizotopem a množství peptidu. Data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).



**Graf č. 3** Značení NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> galliem-68 za různých reakčních podmínek. Radiochemická čistota označených vzorků  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$  v závislosti na délce inkubace peptidu s radioizotopem a množství peptidu. Data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).



**Graf. č. 4** Ilustrační adiogram vyjadřující nezdařilé radiochemické značení NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> izotopem <sup>68</sup>Ga. První pík znázorňuje 93 % volného radioizotopu gallium-68; druhý pík vymezuje 7 % komplexu <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>; detekce byla provedena pomocí radiodetektoru na HPLC; tento obrázek slouží pro doplnění informací obsažených v diskuzi.

## 4.2 Testy stability

**Tabulka č. 10** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

Log P $\pm$ SD	Doba inkubace (min)	Stabilita v 0,1 M FeCl <sub>3</sub> (%)	Stabilita v 6mM DTPA (%)	Stabilita po zvýšení pH (%)
-3,429 $\pm$ 0,109	30 min	97,04 $\pm$ 1,24	99,39 $\pm$ 0,43	99,60 $\pm$ 0,23
	60 min	96,76 $\pm$ 1,21	99,39 $\pm$ 0,54	99,51 $\pm$ 0,13
	120 min	95,83 $\pm$ 1,04	99,06 $\pm$ 0,57	99,49 $\pm$ 0,20

**Tabulka č. 11** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

Log P $\pm$ SD	Doba inkubace (min)	Stabilita v 0,1 M FeCl <sub>3</sub> (%)	Stabilita v 6mM DTPA (%)	Stabilita po zvýšení pH (%)
-3,047 $\pm$ 0,624	30 min	99,24 $\pm$ 0,44	99,65 $\pm$ 0,07	99,82 $\pm$ 0,05
	60 min	98,56 $\pm$ 0,60	99,20 $\pm$ 0,37	99,78 $\pm$ 0,12
	120 min	98,94 $\pm$ 0,42	99,23 $\pm$ 0,32	99,72 $\pm$ 0,22

**Tabulka č. 12** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

Log P	Doba inkubace (min)	Stabilita v 0,1 M FeCl <sub>3</sub> (%)	Stabilita v 6mM DTPA (%)	Stabilita ve fyziologickém pH (%)
-3,341 $\pm$ 0,131	30 min	98,66 $\pm$ 0,82	99,39 $\pm$ 0,43	99,83 $\pm$ 0,11
	60 min	99,22 $\pm$ 0,19	99,39 $\pm$ 0,54	99,74 $\pm$ 0,18
	120 min	99,17 $\pm$ 0,18	99,06 $\pm$ 0,57	99,62 $\pm$ 0,21

### 4.3 Stabilita v plazmatickém prostředí a vazba na plazmatické proteiny

**Tabulka č. 13** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK). V tabulce je zobrazena stabilita značeného proteinu v lidské plazmě (v podobě RCHČ) a míra vazby na plazmatické proteiny s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

<b>Doba inkubace (min)</b>	<b>Stabilita v plazmatickém prostředí (%)</b>	<b>Vazba na proteiny (%)</b>
0 min	99,48 $\pm$ 0,13	1,91
30 min	99,23 $\pm$ 0,18	2,39
60 min	99,14 $\pm$ 0,19	2,65
120 min	98,81 $\pm$ 0,33	3,29

**Tabulka č. 14** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK). V tabulce je zobrazena stabilita značeného proteinu v lidské plazmě (v podobě RCHČ) a míra vazby na plazmatické proteiny s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

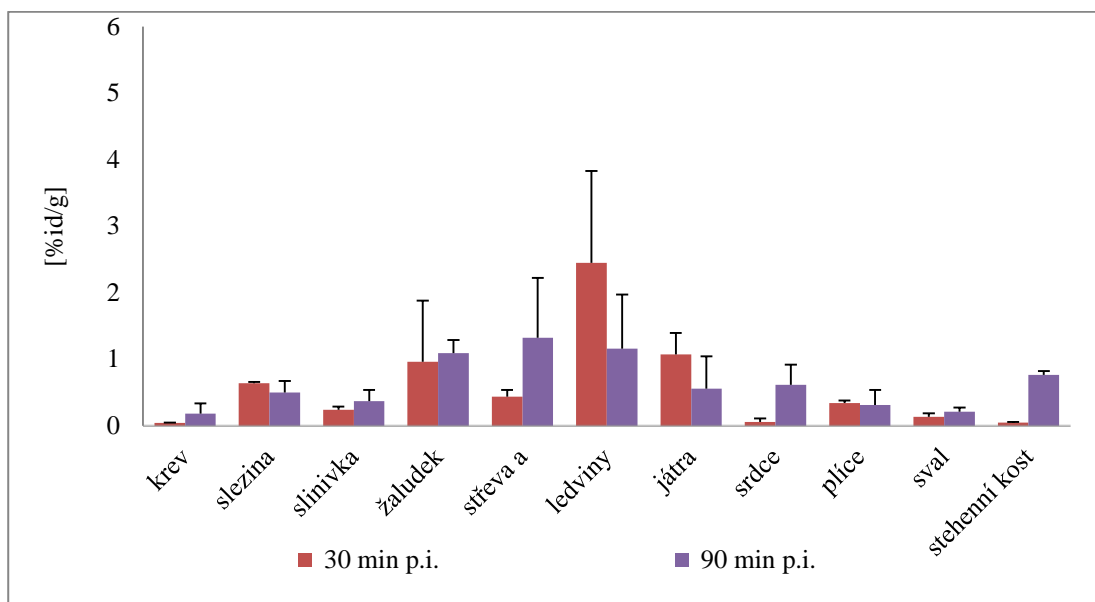
<b>Doba inkubace (min)</b>	<b>Stabilita v plazmatickém prostředí (%)</b>	<b>Vazba na proteiny (%)</b>
0 min	99,70 $\pm$ 0,12	2,12
30 min	99,61 $\pm$ 0,04	2,74
60 min	99,52 $\pm$ 0,13	1,31
120 min	99,43 $\pm$ 0,09	3,21

**Tabulka č. 15** Výsledky *in vitro* testování  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>. V tabulce je zobrazena stabilita značeného proteinu v lidské plazmě (v podobě RCHČ) a míra vazby na plazmatické proteiny s vyznačenými směrodatnými odchylkami  $\pm$  SD; uvedená data jsou radiochemické čistoty preparátu po inkubaci v příslušných prostředích; data jsou ve formě průměru s vyznačenými směrodatnými odchylkami (n=3).

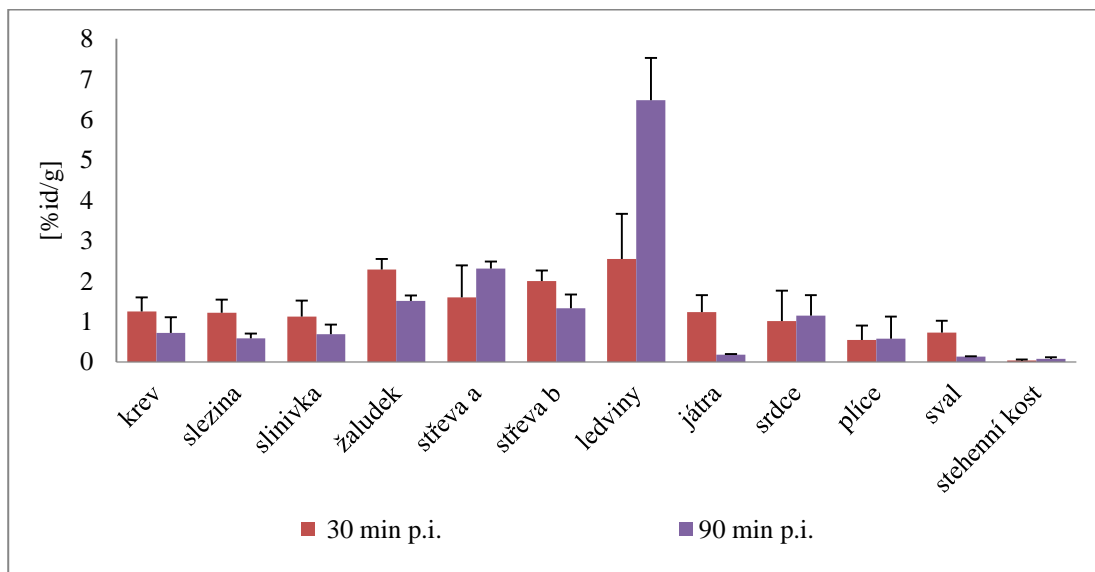
<b>Doba inkubace (min)</b>	<b>Stabilita v plazmatickém prostředí (%)</b>	<b>Vazba na proteiny (%)</b>
0 min	99,68 $\pm$ 0,22	2,20
30 min	99,51 $\pm$ 0,17	1,74
60 min	99,31 $\pm$ 0,11	1,89
120 min	99,02 $\pm$ 0,33	3,40

#### 4.4 Studie ex vivo biodistribuce (sekční metoda)

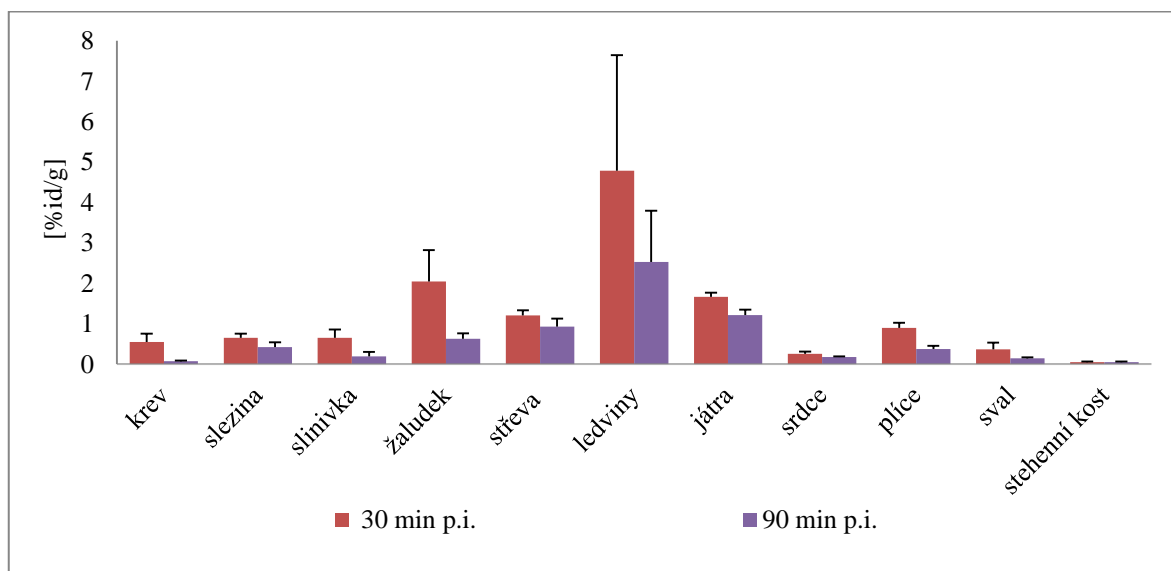
##### 4.4.1 Biodistribuce ve zdravých myších



**Graf č. 5** Ex vivo biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v jednotlivých orgánech zdravé laboratorní myši, 30 a 90 minut po aplikaci. Vynesená data jsou aritmetické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.



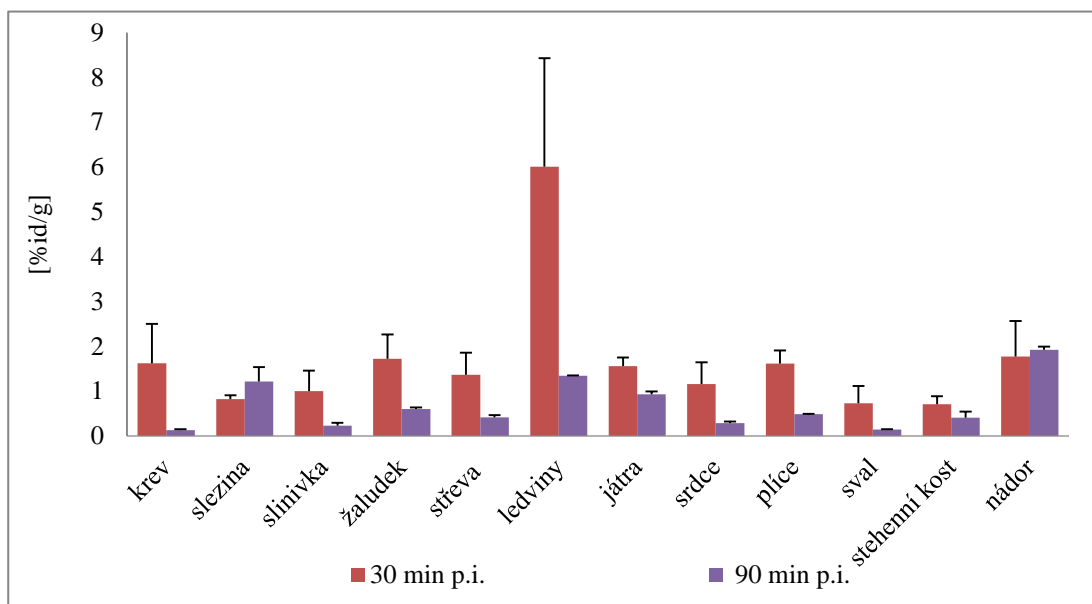
**Graf č. 6** *Ex vivo* biodistribuce <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) v jednotlivých orgánech zdravé laboratorní myši; 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně s aktivitou 8,5 MBq; vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.



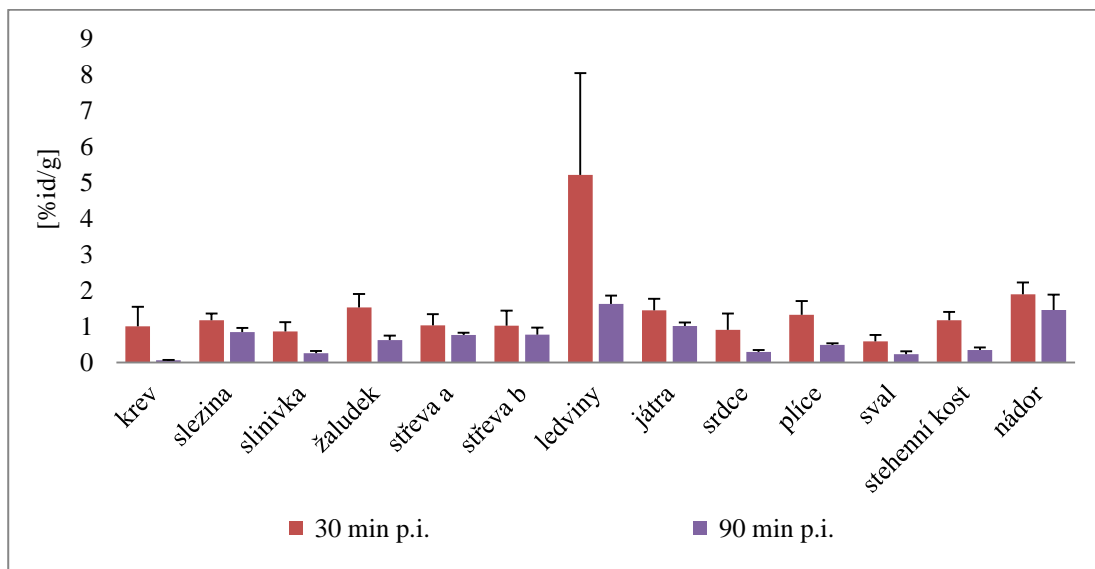
**Graf č. 7** *Ex vivo* biodistribuce <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> v jednotlivých orgánech zdravé myši; 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně s aktivitou 9,8 MBq; vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.



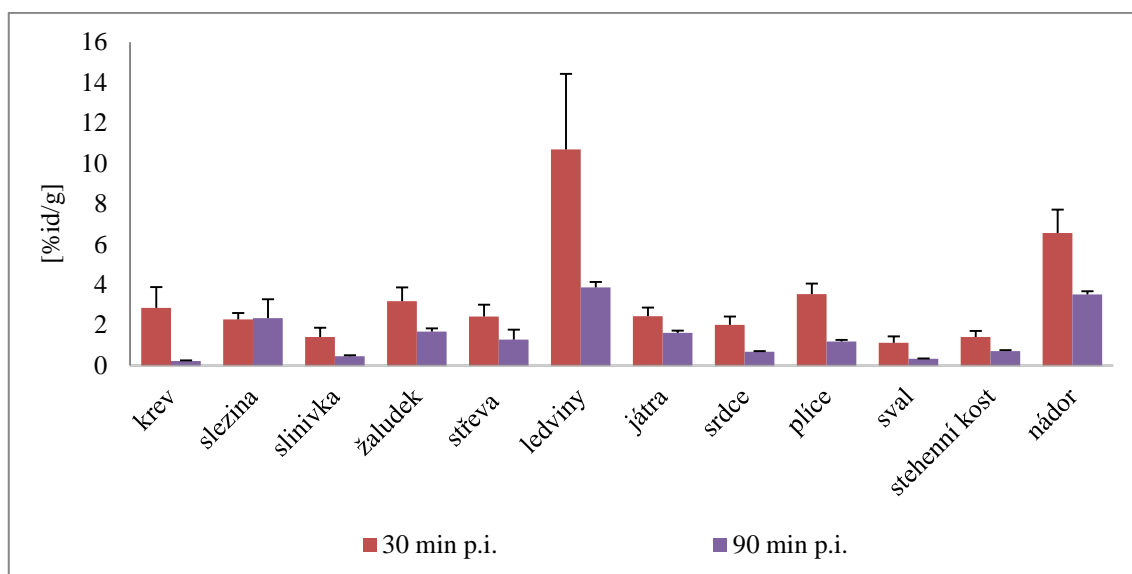
#### 4.4.2 Biodistribuce v myších s nádorem



**Graf č. 8** *Ex vivo* biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v jednotlivých orgánech, svalu a kosti laboratorní myši s nádorem (nádorová linie U-87 MG); 30 a 90 minut po aplikaci. Vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

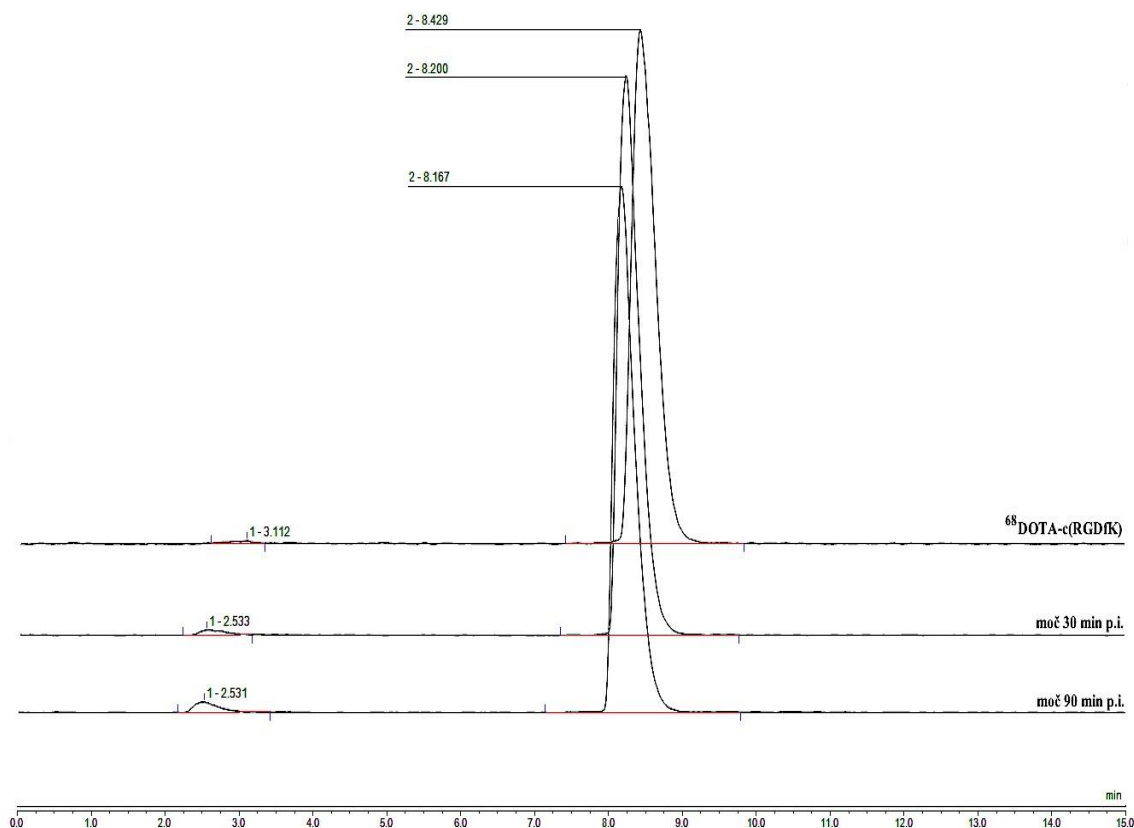


**Graf č. 9** *Ex vivo* biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v jednotlivých orgánech, svalu a kosti laboratorní myši s nádorem (nádorová linie U-87 MG); 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně s aktivitou 11,1 MBq Vynesena data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

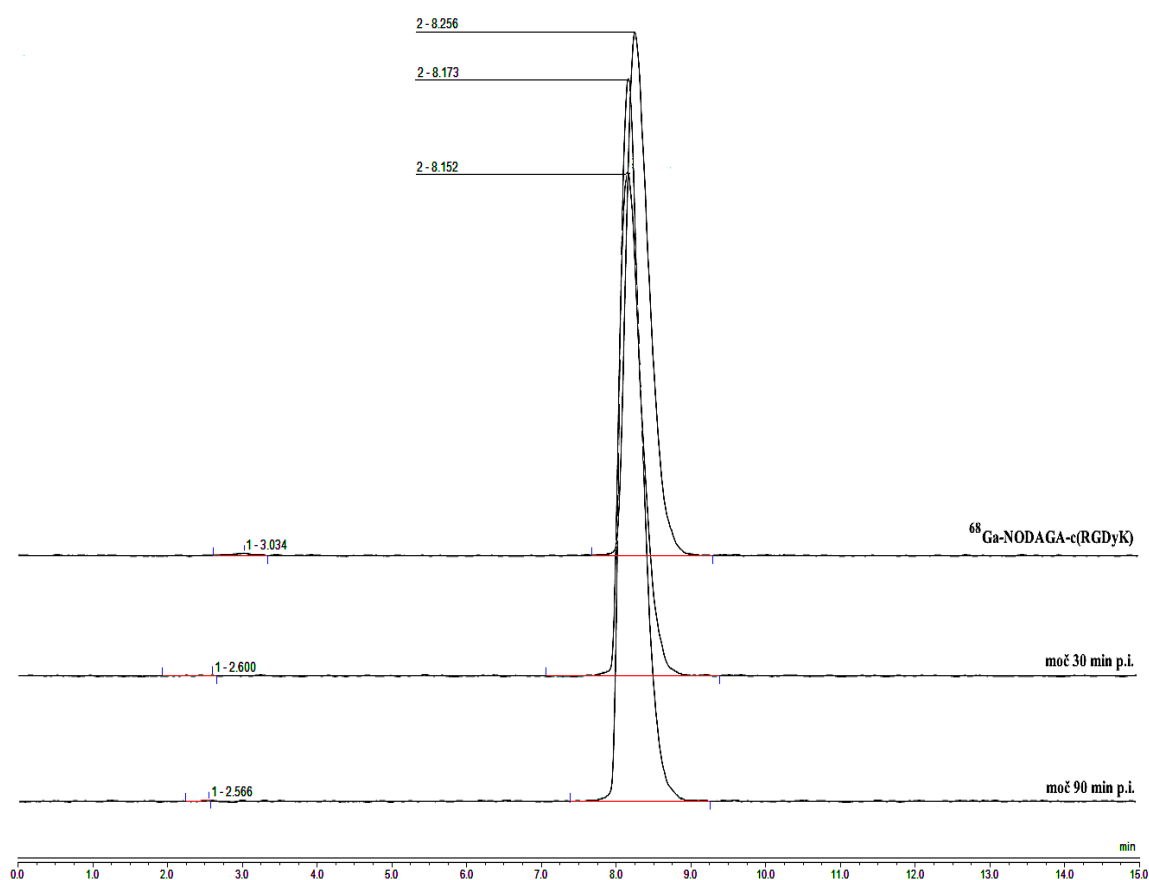


**Graf č. 10** *Ex vivo* biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) $_2$  v jednotlivých orgánech, svalu a kosti laboratorní myši s nádorem (nádorová linie U-87 MG); 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně s aktivitou 10,3 MBq Vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou i zápornou směrodatnou odchylkou; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

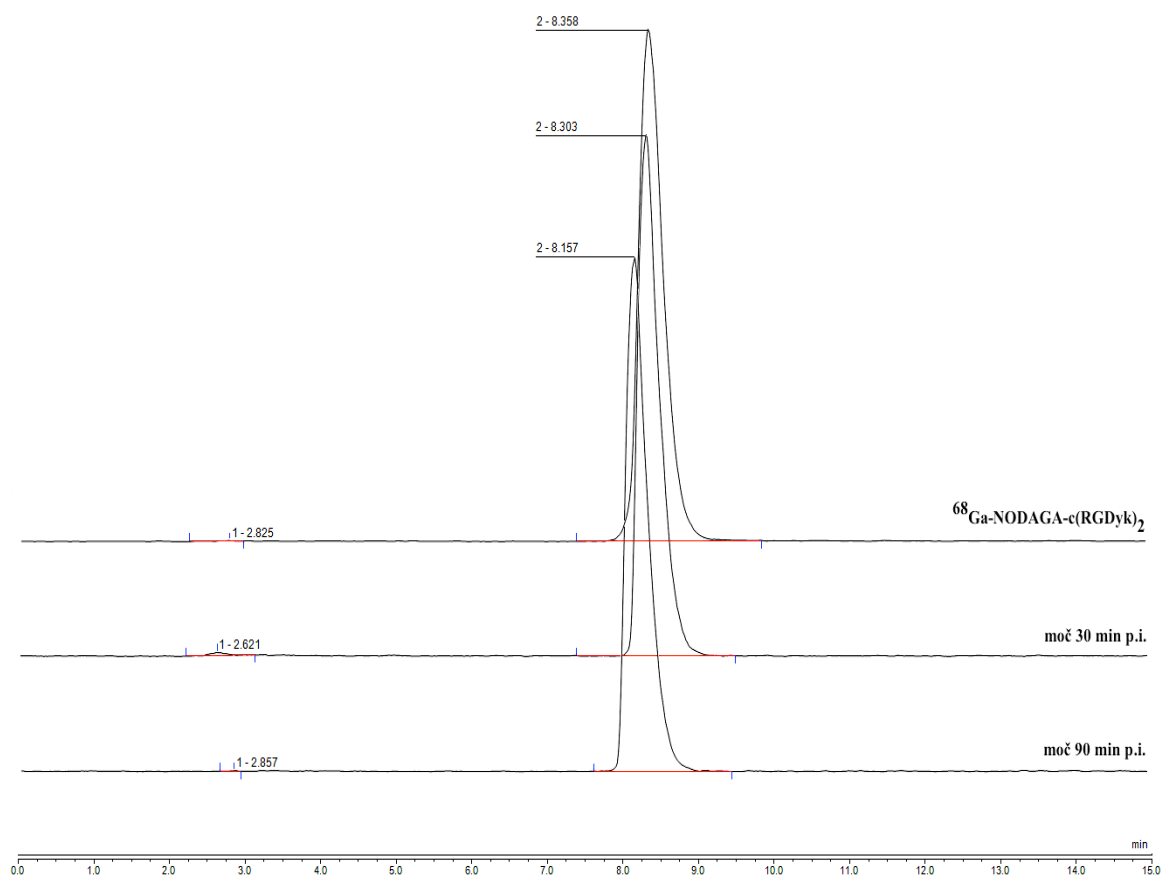
#### 4.5 Testování degradace radiopeptidů *in vivo* stanovením jejich radiochemické čistoty v moči



**Graf. č. 11** Radiochromatogram vyjadřující *in vivo* stabilitu <sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK). Horní křivka obsažena v grafu znázorňuje kontrolu čistoty <sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK) před jeho aplikací zvířeti. Střední křivka znázorňuje radiochemickou čistotu <sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK), která byla stanovena z vyloučené moči 30 min p.i. pomocí HPLC. Spodní křivka znázorňuje radiochemickou čistotu <sup>68</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK), která byla stanovena z vyloučené moči 90 min p.i.; první pík ve všech třech záznamech znázorňuje <1 % nenavázaného <sup>68</sup>Ga; druhý pík představuje 99 % aktivity <sup>68</sup>Ga vázané na RGD peptid.



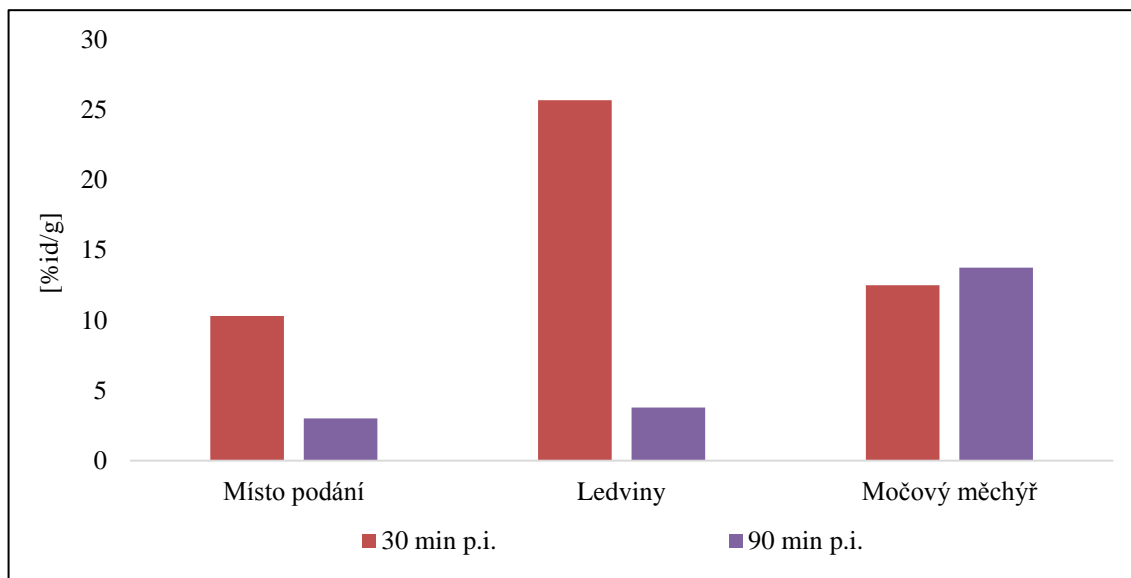
**Graf. č. 12** Radiochromatogram vyjadřující *in vivo* stabilitu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$ . Horní křivka obsažena v grafu znázorňuje kontrolu čistoty  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  před jeho aplikací zvířeti. Střední křivka znázorňuje radiochemickou čistotu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$ , která byla stanovena z vyloučené moči 30 min p.i. pomocí HPLC. Spodní křivka znázorňuje radiochemickou čistotu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$ , která byla stanovena z vyloučené moči 90 min p.i.; první pík ve všech třech záznamech znázorňuje <1 % nenasázaného  $^{68}\text{Ga}$ ; druhý pík představuje 99 % aktivity  $^{68}\text{Ga}$  vázané na RGD peptid.



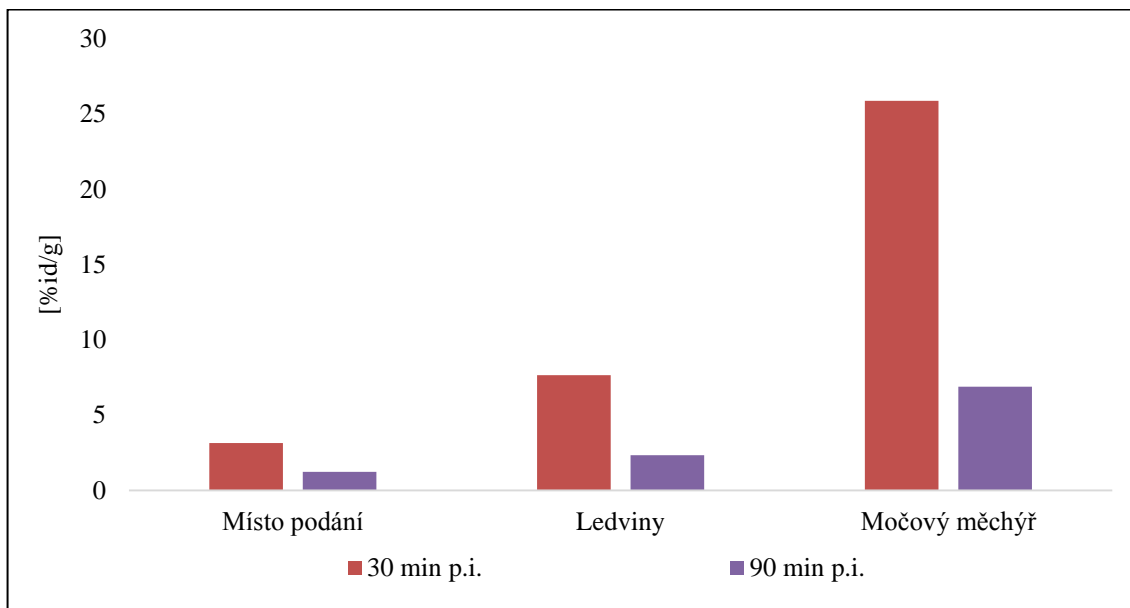
**Graf. č. 13** Radiochromatogram vyjadřující *in vivo* stabilitu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$ . Horní křivka obsažena v grafu znázorňuje kontrolu čistoty  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$  před jeho aplikací zvířeti. Střední křivka znázorňuje radiochemickou čistotu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$ , která byla stanovena z vyloučené moči 30 min p.i. pomocí HPLC. Spodní křivka znázorňuje radiochemickou čistotu  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$ , která byla stanovena z vyloučené moči 90 min p.i.; první pík ve všech třech záznamech znázorňuje <1 % nenavázaného  $^{68}\text{Ga}$ ; druhý pík představuje 99 % aktivity  $^{68}\text{Ga}$  vázané na RGD peptid.

## 4.6 Biodistribuce monitorovaná pomocí PET

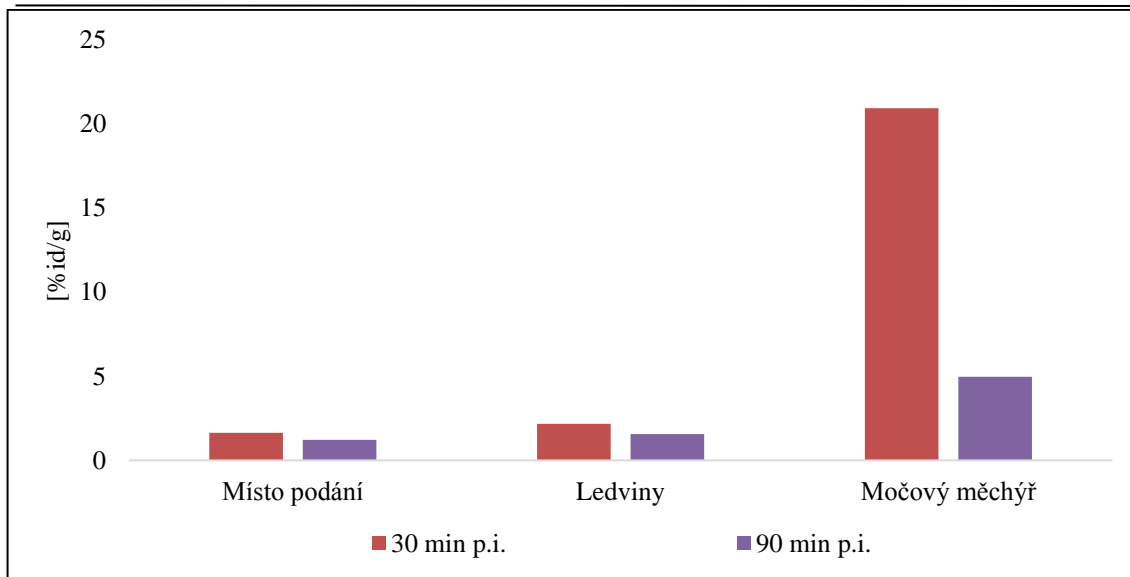
### 4.6.1 Kvantifikace dat ze statického PET skenování nenádorových zvířat



**Graf č. 14** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) ve zdravé laboratorní myši při statickém PET/CT skenování *in vivo* v časech 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 5,1 MBq; data doplňují obr. č. 27; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.



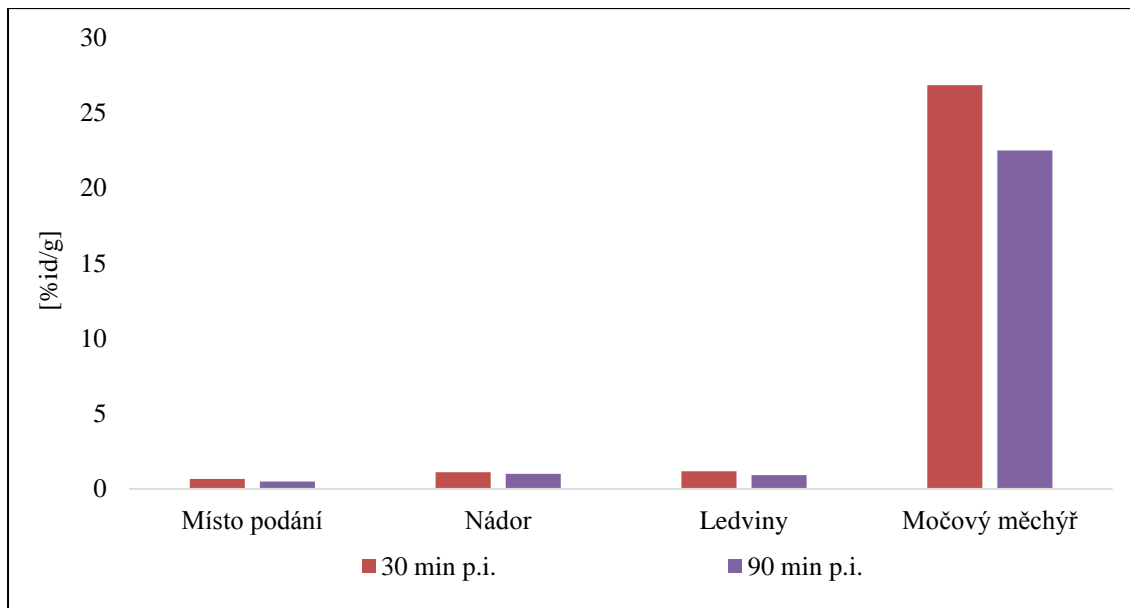
**Graf č. 15** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) ve zdravé laboratorní myši při statickém PET/CT skenování *in vivo* v časech 30 a 90 minut p.i. (n=1); radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 3,7 MBq; data doplňují obr. č. 28; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.



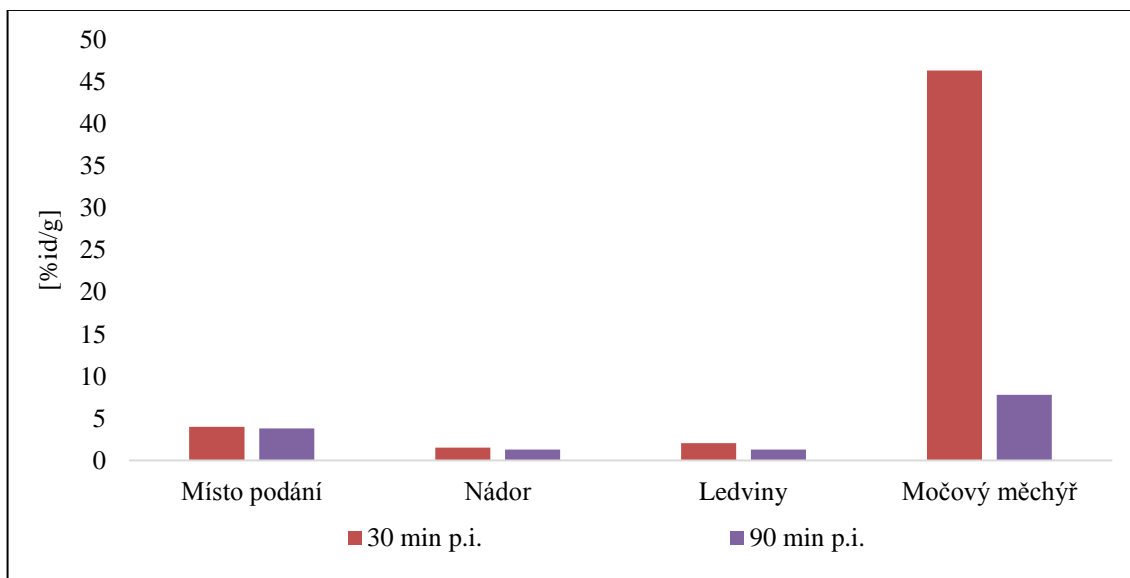
**Graf č. 16** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfk)<sub>2</sub> ve zdravé laboratorní myši při statickém PET/CT skenování *in vivo* v čase 30 a 90 minut p.i. (n=1); radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 3,5 MBq; data doplňují obr. č. 29; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.



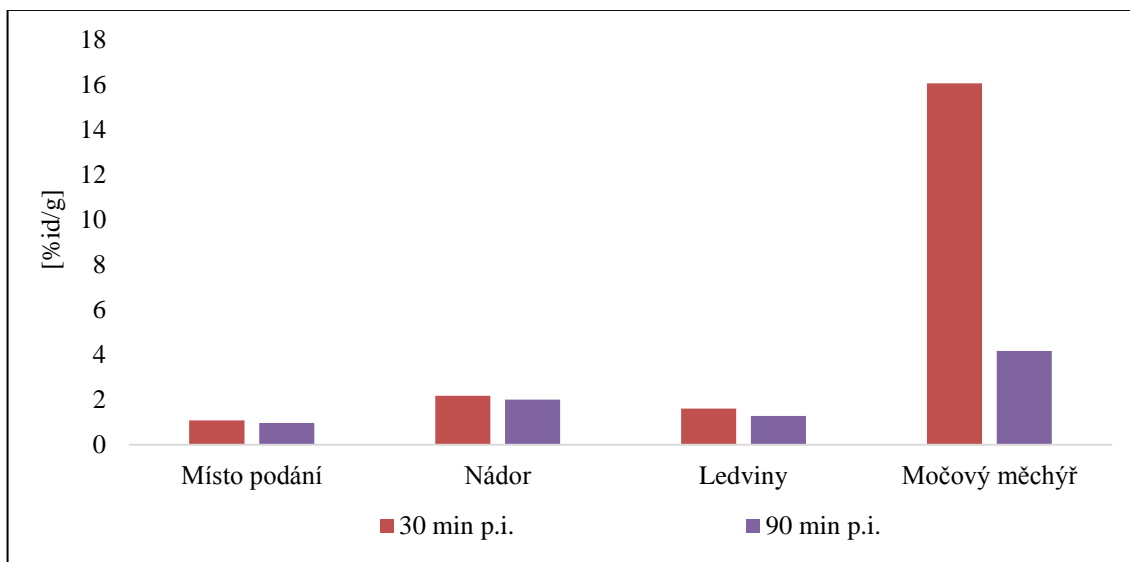
#### 4.6.2 Kvantifikace dat ze statického PET skenování nádorových zvířat



**Graf č. 17** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v laboratorní myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG) při statickém PET/CT skenování *in vivo* v časech 30 a 90 minut p.i.; radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 5,6 MBq; data doplňují obr. č. 30; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.

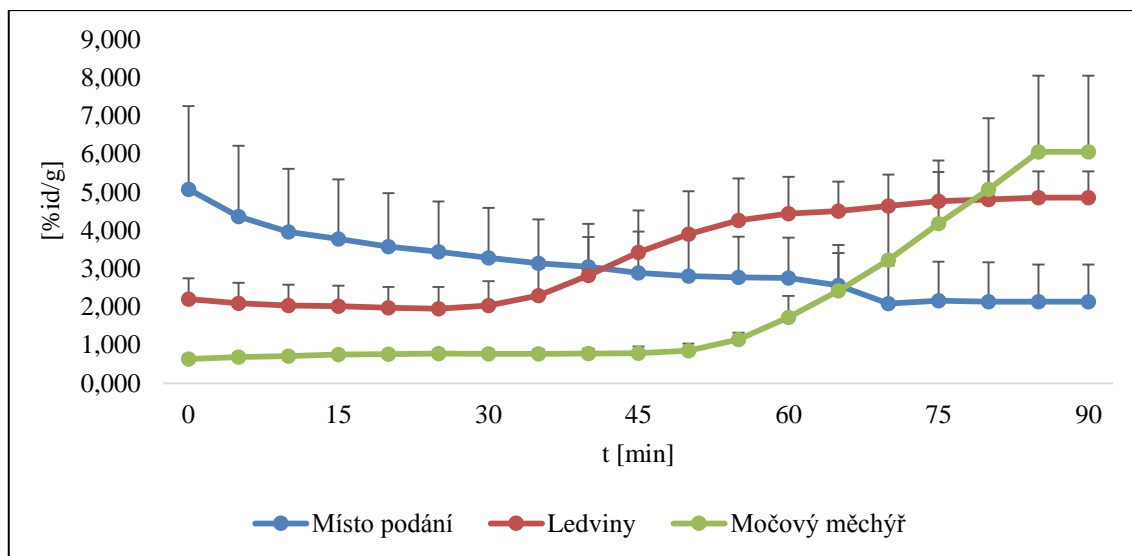


**Graf č. 18** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v laboratorní myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG) při statickém PET/CT skenování *in vivo* v časech 30 a 90 minut p.i. (n=1); radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 4,1 MBq; data doplňují obr č. 31; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.

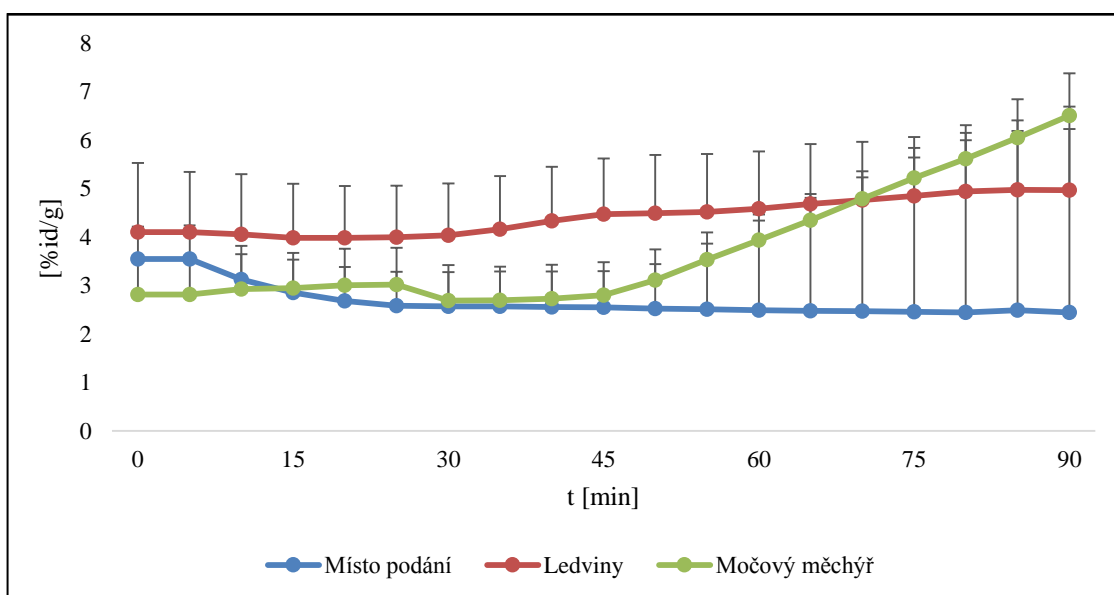


**Graf č. 19** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfk) $_2$  v laboratorní myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG) při statickém PET/CT skenování *in vivo* v časech 30 a 90 minut p.i. (n=1); radiofarmakum bylo podáno retroorbitálně; podaná aktivita činila 3,8 MBq; data doplňují obr č. 32; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=1.

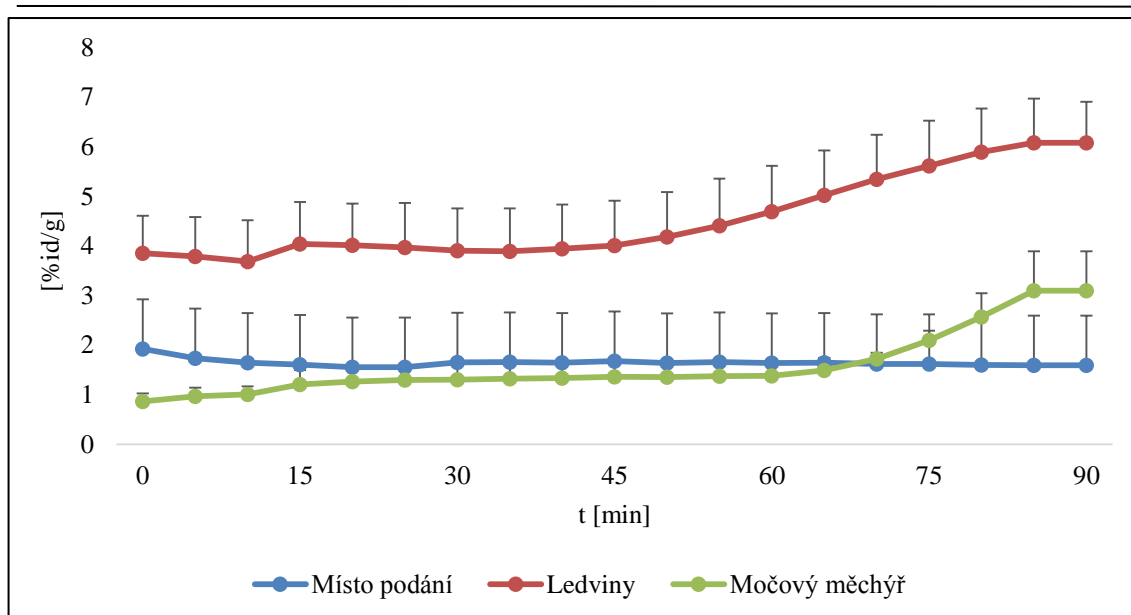
#### 4.6.3 Kvantifikace dat z dynamického PET skenování nenádorových zvířat



**Graf č. 20** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v jednotlivých orgánech laboratorní myši bez nádoru při dynamickém PET skenování. Vynesená data jsou aritmetické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 13,6 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

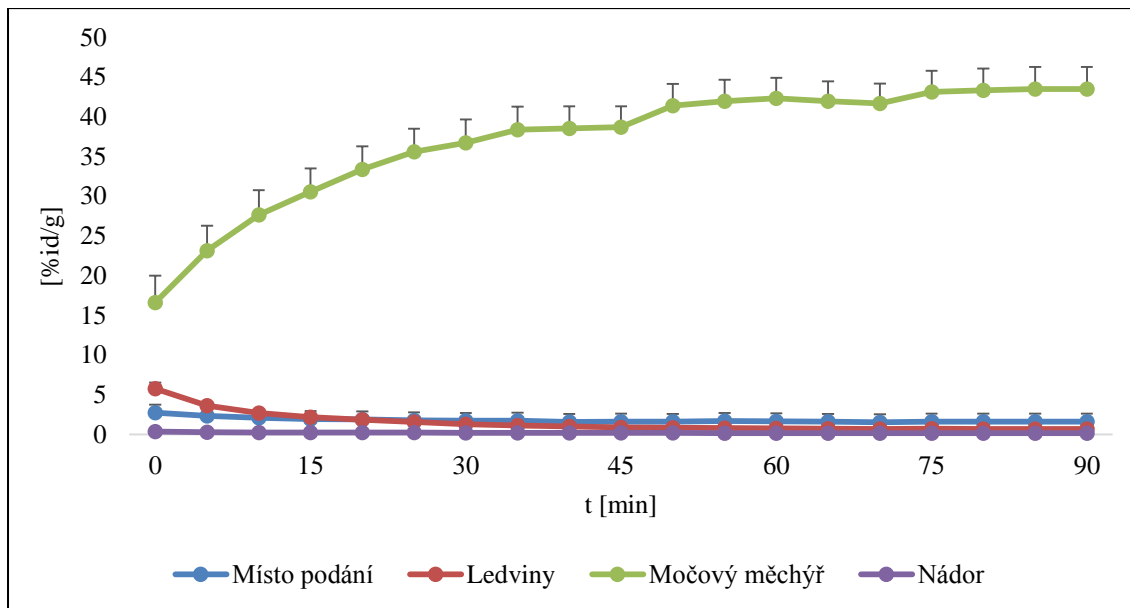


**Graf č. 21** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v jednotlivých orgánech laboratorní myši bez nádoru při dynamickém PET skenování. Vynesená data jsou aritmetické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 8,7 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

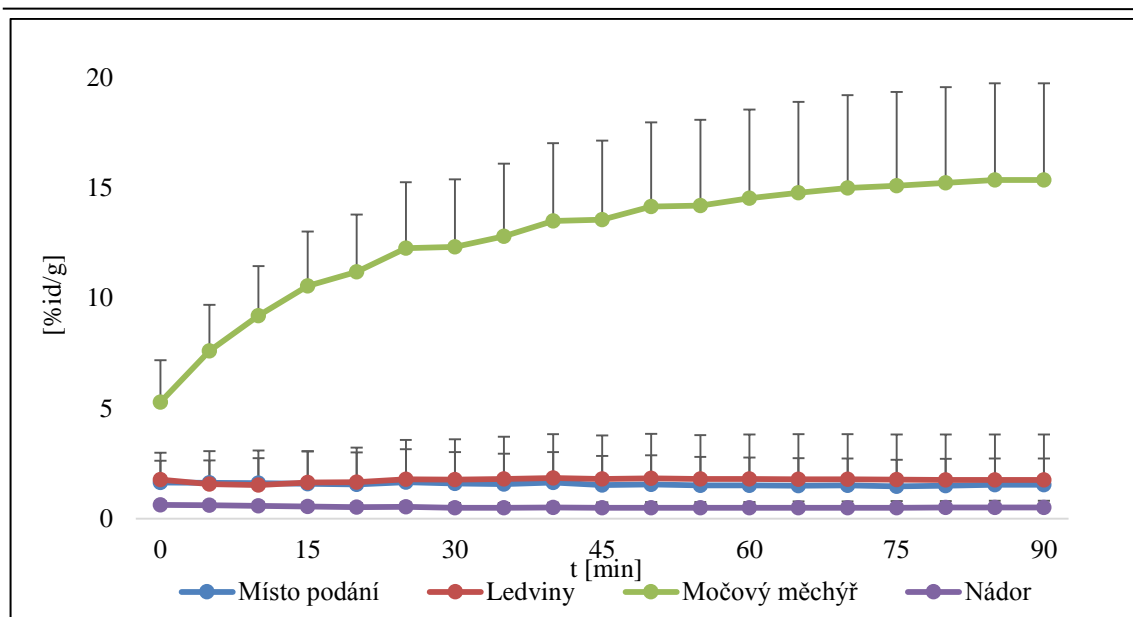


**Graf č. 22** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> v jednotlivých orgánech laboratorní myši bez nádoru při dynamickém PET skenování. Vynesená data jsou aritmetické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 7,2 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

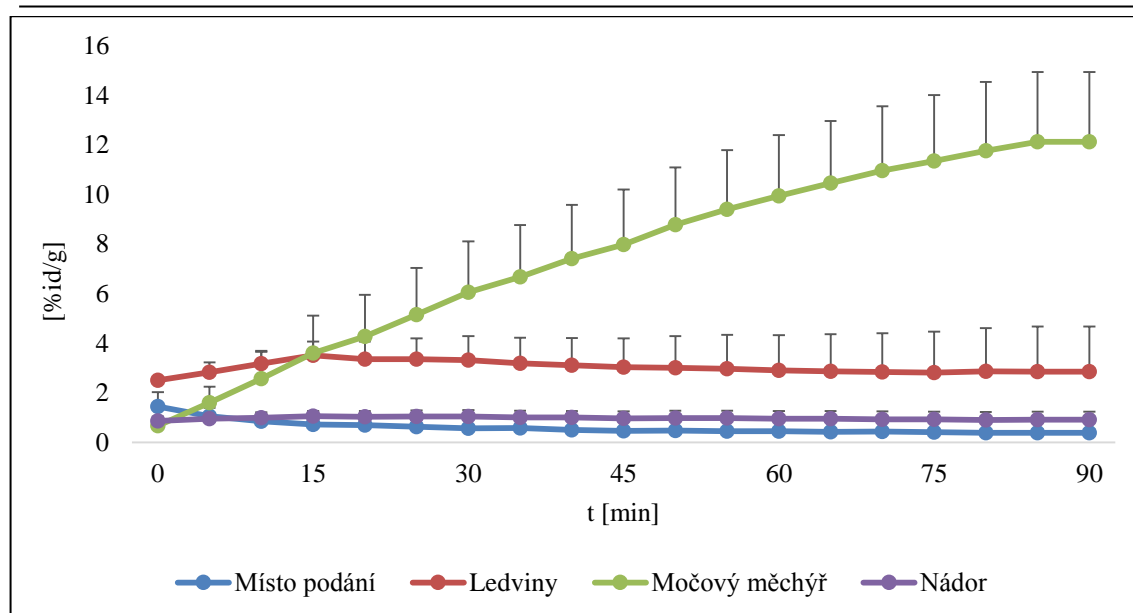
#### 4.6.4 Kvantifikace dat ze dynamického PET skenování nádorových zvířat



**Graf č. 23** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v jednotlivých orgánech laboratorní myši s nádorem při dynamickém PET skenování (nádorová linie U-87 MG). Vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 10,9 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.



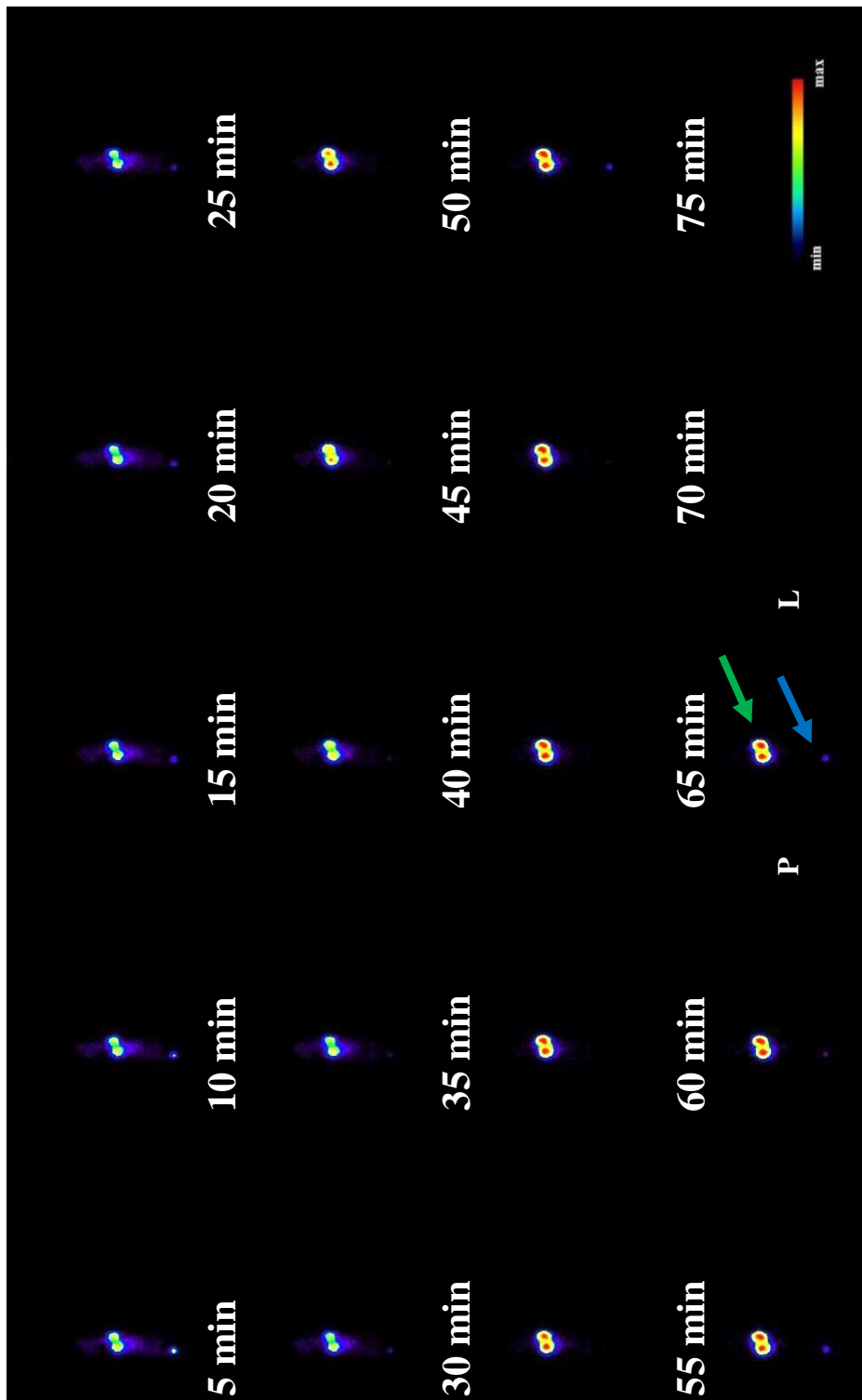
**Graf č. 24** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}$  v jednotlivých orgánech laboratorní myši s nádorem při dynamickém PET skenování (nádorová linie U-87 MG). Vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 9,3 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.



**Graf č. 25** Biodistribuční data  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$  v jednotlivých orgánech laboratorní myši s nádorem při dynamickém PET skenování (nádorová linie U-87 MG). Vynesená data jsou aritmetrické průměry s kladnou směrodatnou odchylkou. Čas se vztahuje k okamžiku aplikace radiofarmaka, jehož aktivita činila 9,3 MBq; aktivita radiofarmaka je uvedena v hodnotě procenta podané dávky radiopeptidu na g, [%id/g]; n=3.

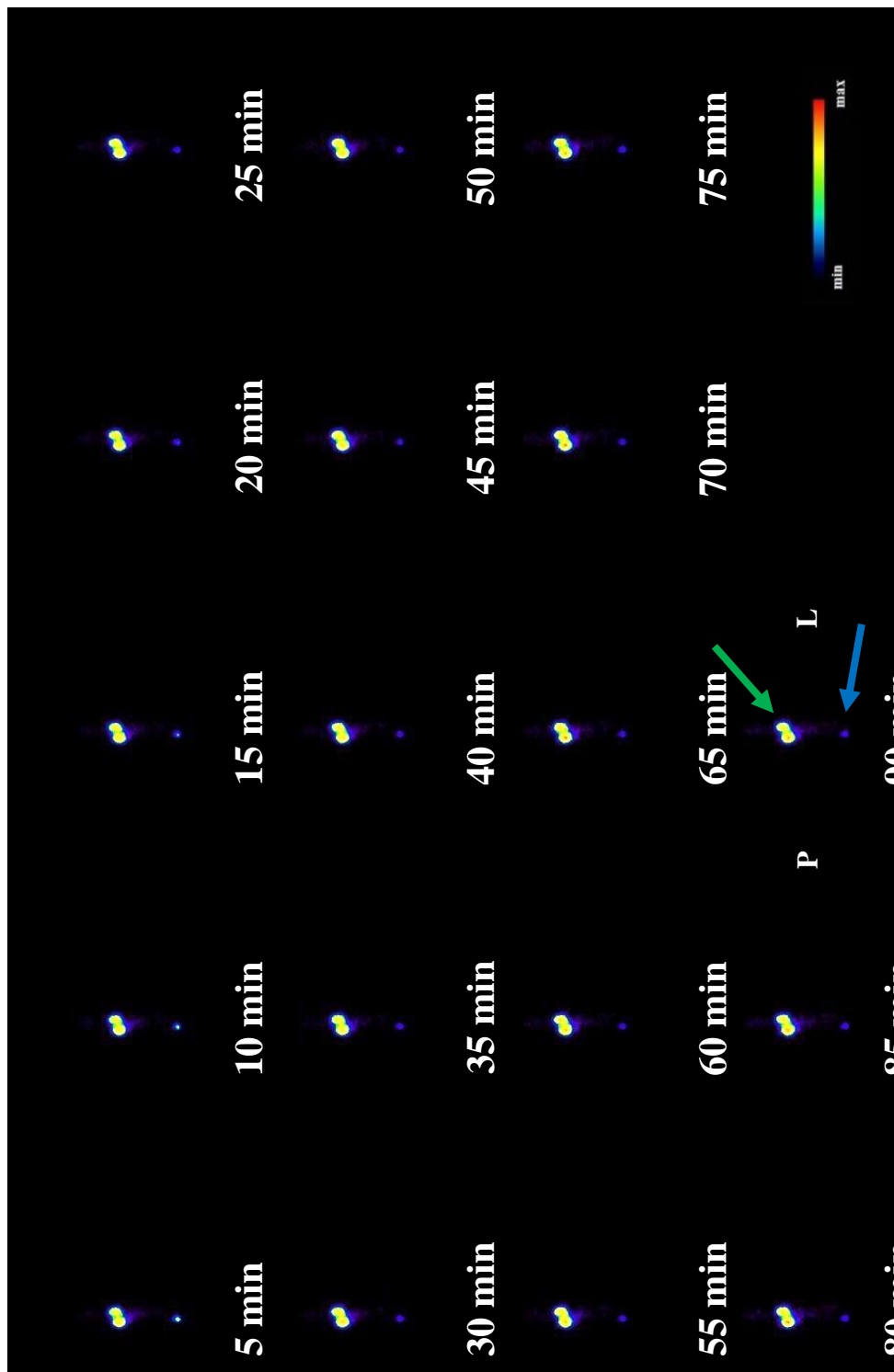
## 4.7 Zobrazování pomocí PET/CT

### 4.7.1 Dynamické skenování- normální zvířata

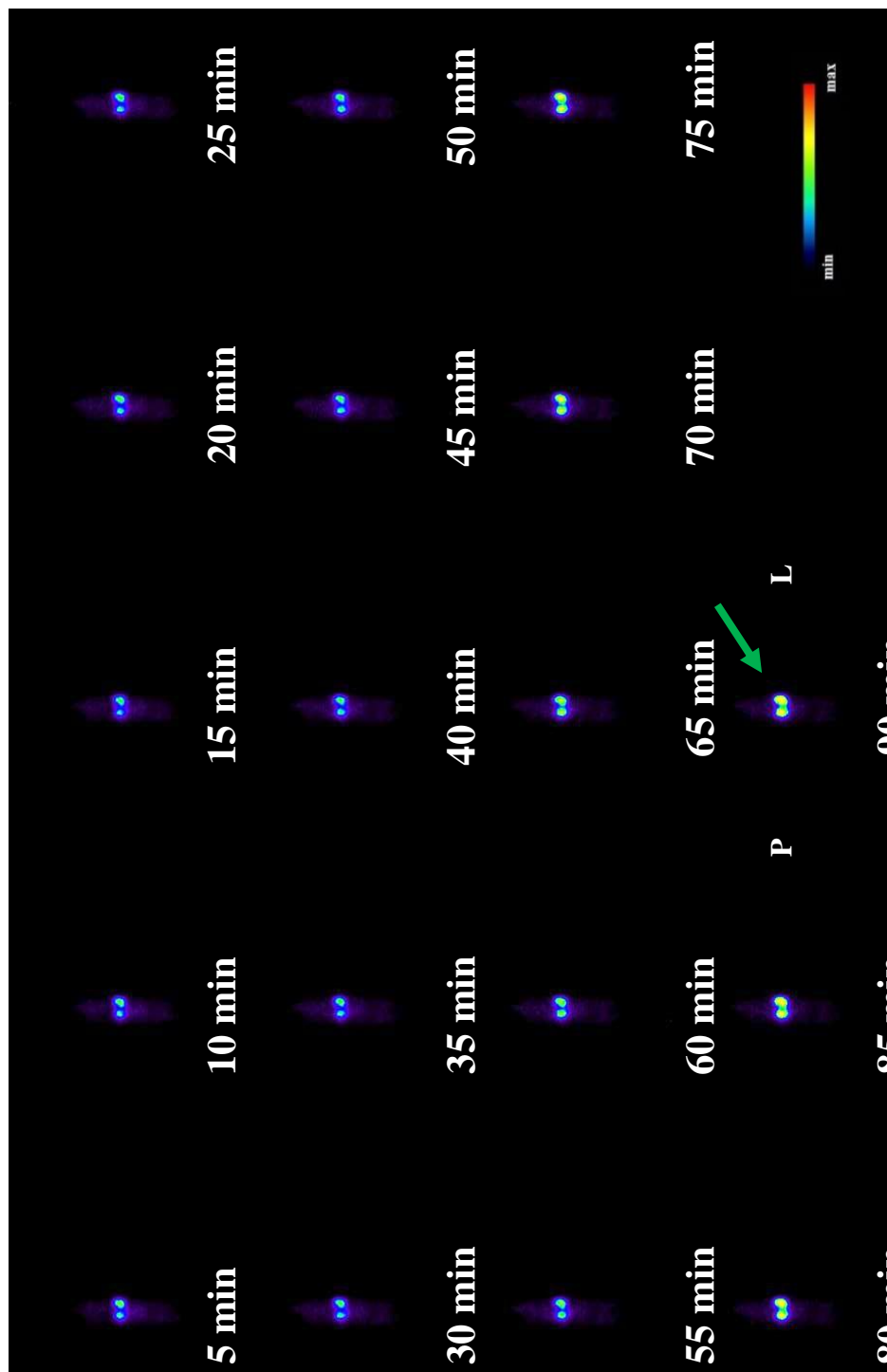


**Obr. č. 21** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-cyclo-(RGDfk)-acetátu ve zdravé myši v programu PMOD; PET/CT dynamický sken; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 13,6 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuci radiofarmaka v ledvinách (zelená šipka) a v místě podání (modrá šipka); P-pravá strana, L-levá strana; uvedený čas vychází od aplikace radiofarmaka.





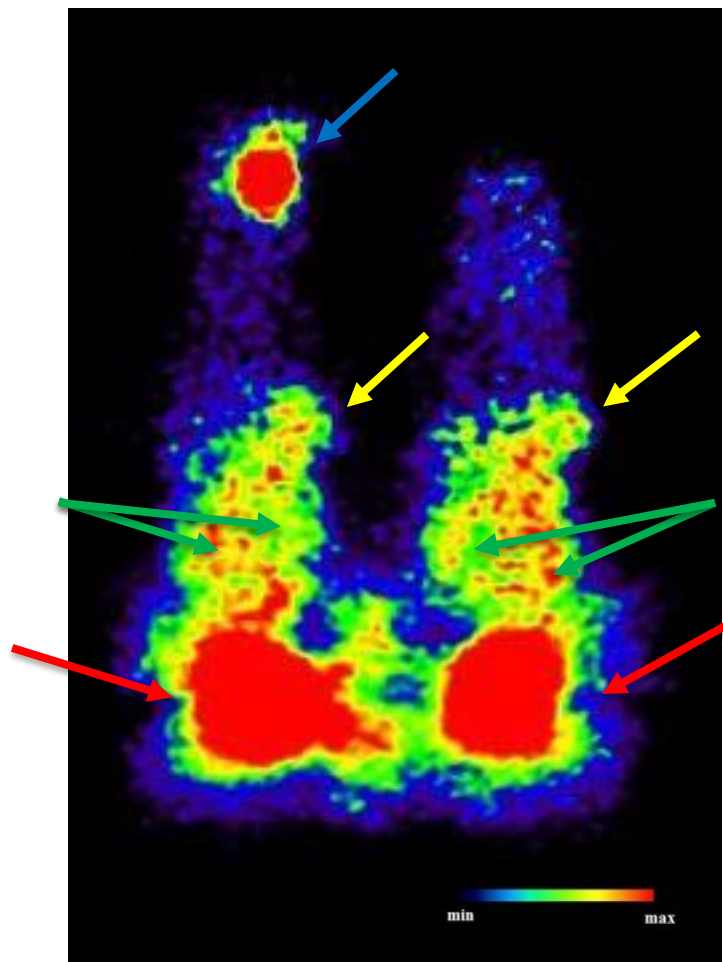
**Obr. č. 22** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyk) ve zdravé myši v programu PMOD; PET/CT dynamický sken; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 8,7 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuci radiofarmaka v ledvinách (zelená šipka) a v místě podání (modrá šipka); P-pravá strana, L-levá strana; uvedený čas vychází od aplikace radiofarmaka.



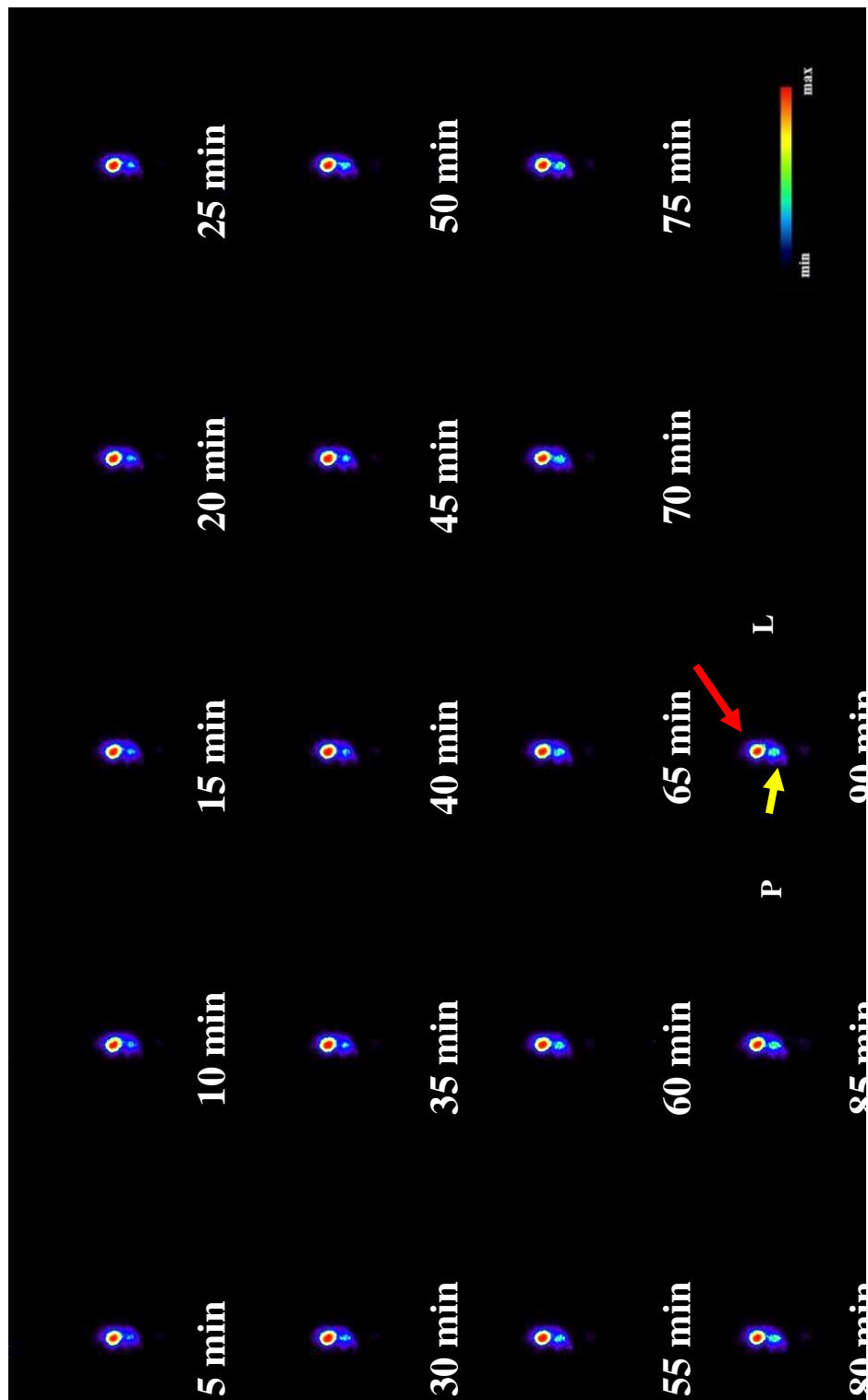
**Obr. č. 23** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) $_2$  ve zdravé myši v programu PMOD; PET/CT dynamický sken; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 7,2 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuci radiofarmaka v ledvinách (zelená šipka); P-pravá

strana L-levá strana uvedený čas vzhledí od aplikace radiofarmaka

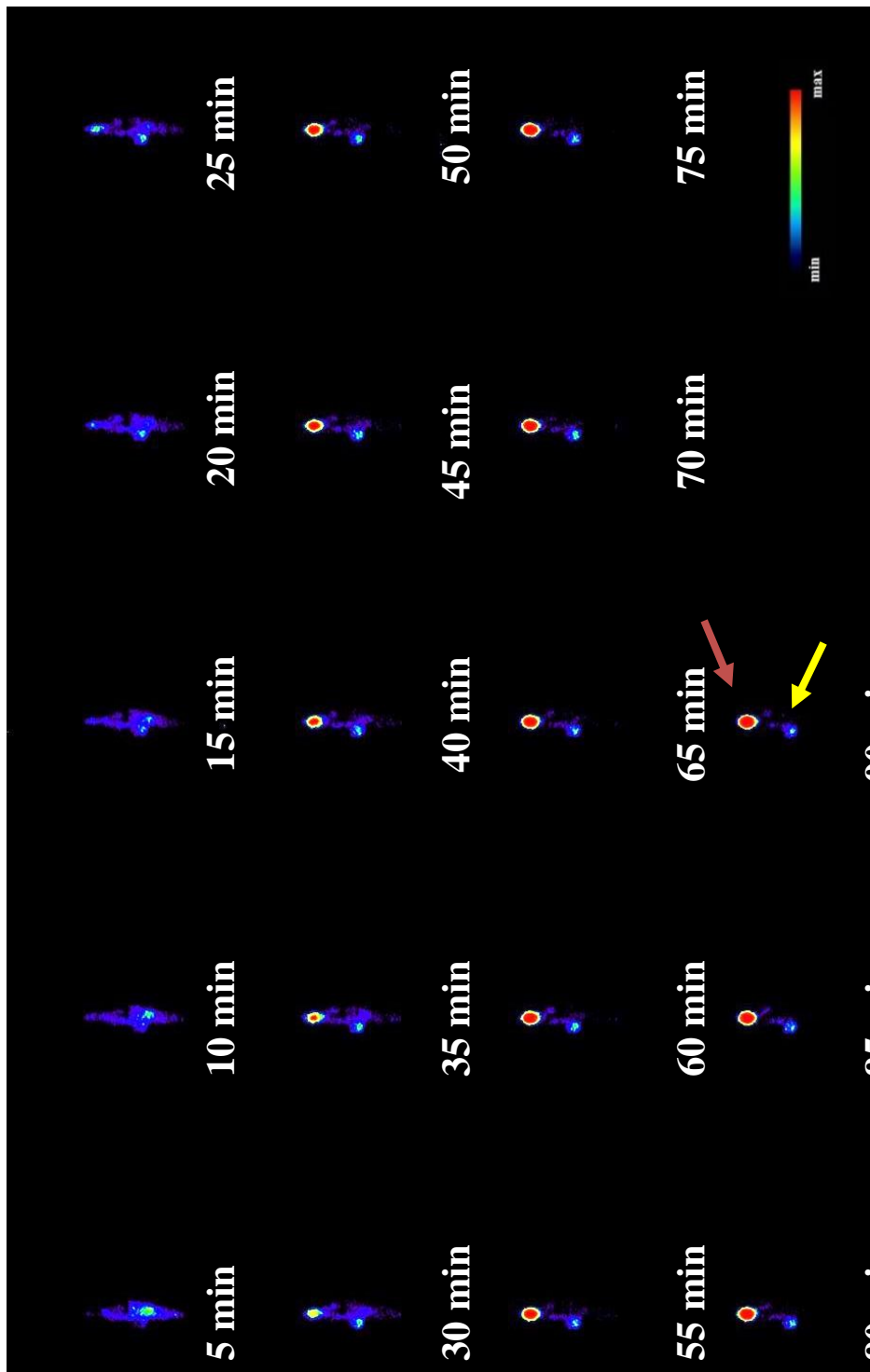
#### 4.7.2 Dynamické skenování - nádorová zvířata



**Obr. č. 24** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-cyclo-(RGDfk)-acetátu v myši snádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG) v programu PMOD; PET/CT snímek vychází z dynamického skenování v čase 70 min p.i.; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 10,9 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuci radiofarmaka v místě podání (modrá šipka), v nádoru (žlutá šipka), ledvinách (zelená šipka) a v močovém měchýři (červená šipka) ; P-pravá strana, L-levá strana.

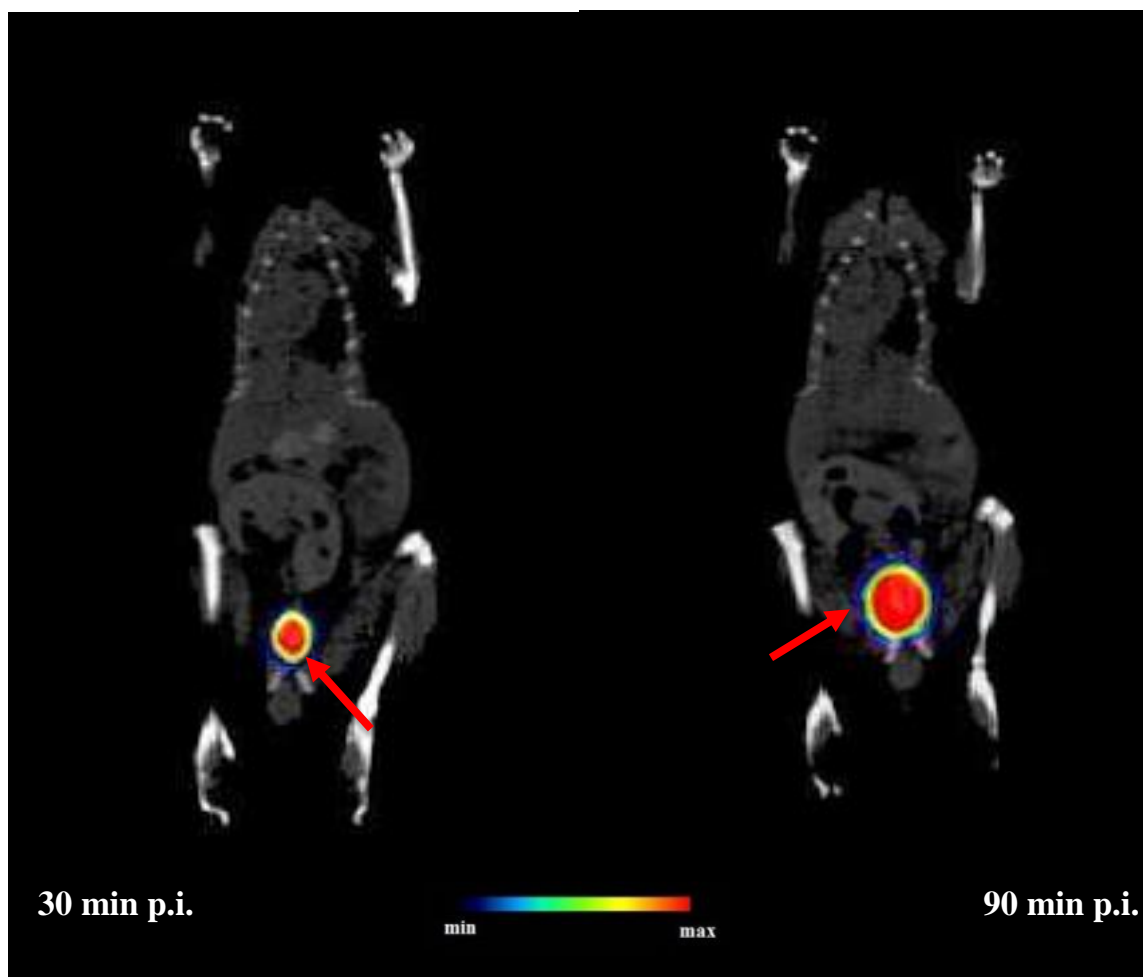


**Obr. č. 25** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v myši s nádorem (nátorová linie U-87 MG) v programu PMOD; PET/CT dynamický sken; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 9,3 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuce radiofarmaka v nádoru

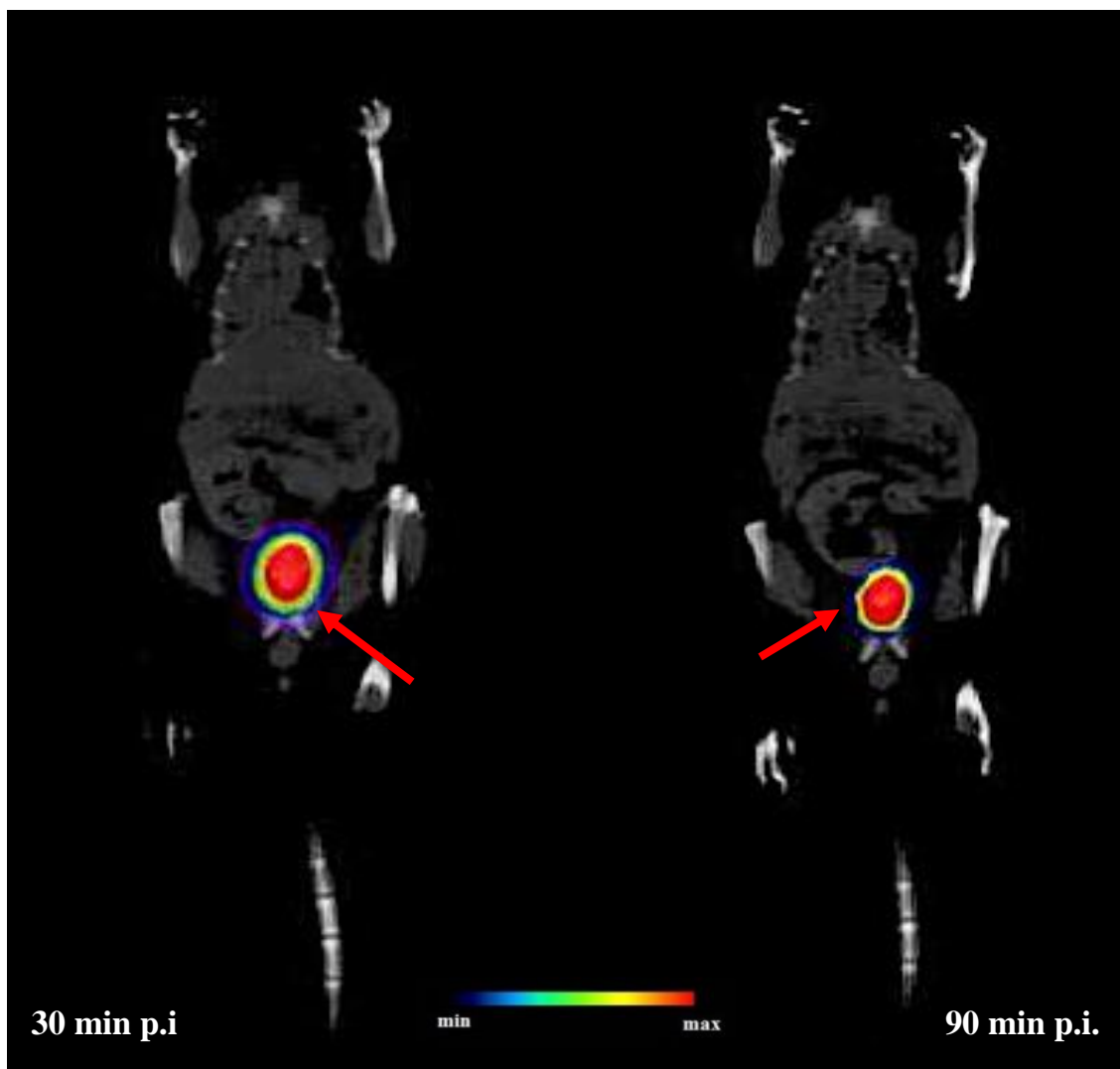


**Obr. č. 26** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) $_2$  v myši s nádorem (nádorová linie U-87-MG) v programu PMOD; PET/CT dynamický sken; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 9,3 MBq bylo podáno retroorbitálně; řez znázorňuje biodistribuci radiofarmaka v nádoru (žlutá šipka), ledvinách (zelená šipka) a močovém měchýři (červená šipka); P-pravá strana, L-levá strana;

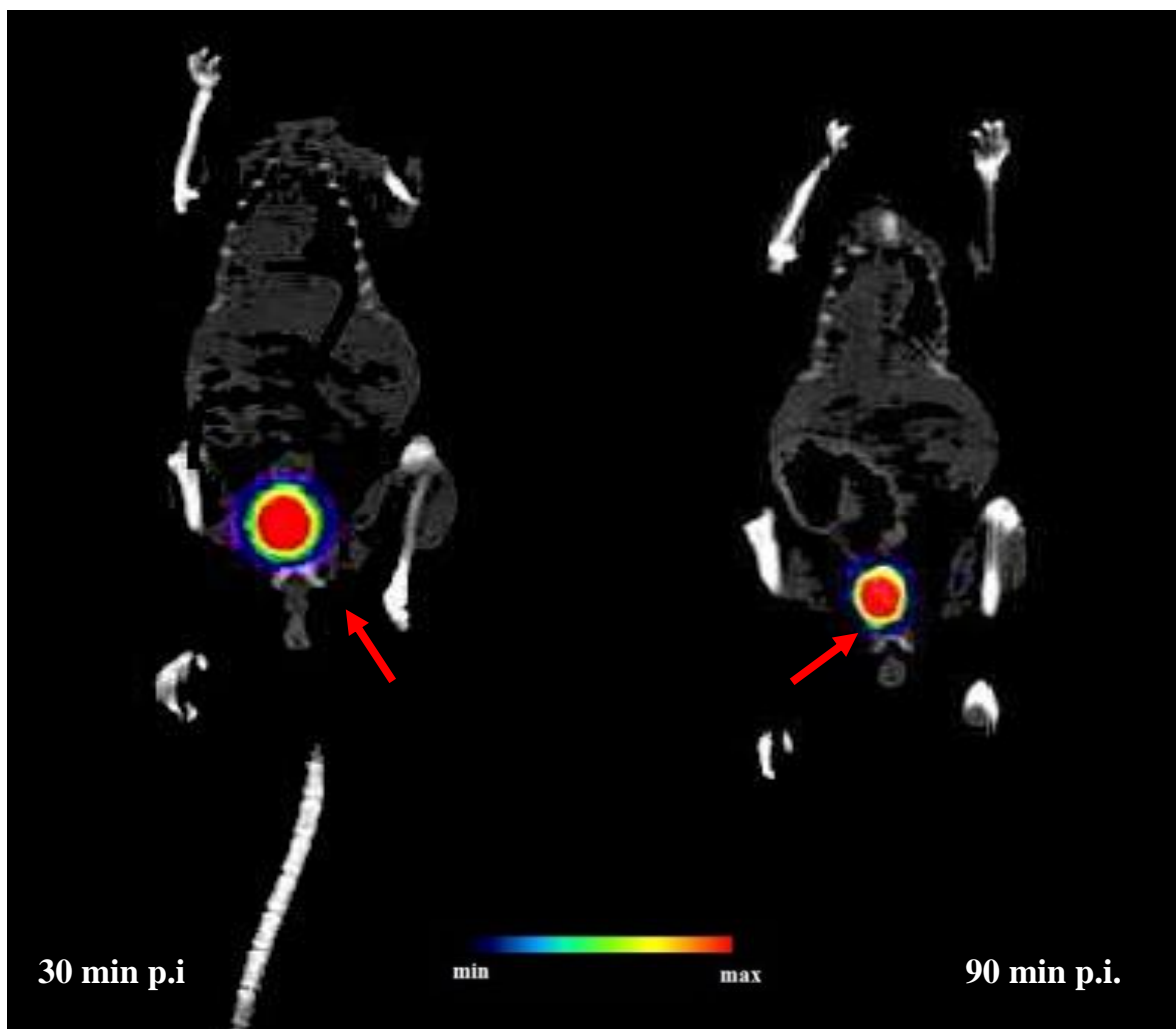
#### 4.7.3 Statické zobrazení 2D – normální zvířata



**Obr. č. 27** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) ve zdravé laboratorní myši v programu PMOD; PET/CT sken *in vivo*; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 5,1 MBq bylo podáno retroorbitálně. V pánevní oblasti je zvýrazněná aktivita kumulující se v močovém měchýři (vyznačeno červenými šipkami). Poměrově je aktivita při 90 min p.i. 3 x nižší, než při 30 min p.i. (viz graf č. 23). Většina aktivity byla vyloučena renální cestou; n=1.



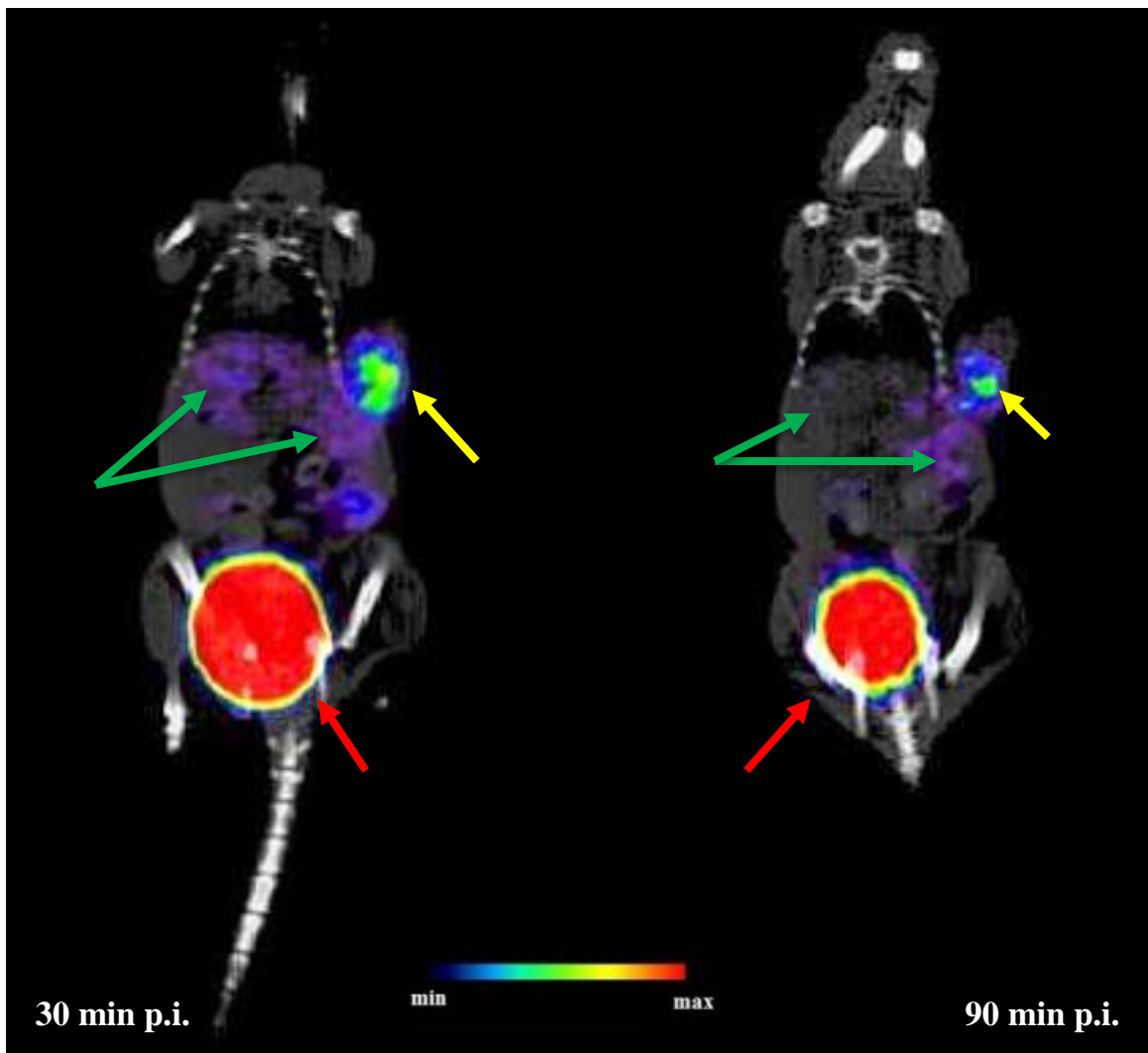
**Obr. č. 28** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) ve zdravé laboratorní myši v programu PMOD; PET/CT sken A- 30 min p.i.; B- 90 min p.i.; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 3,7 MBq bylo podáno retroorbitálně. V pánevní oblasti je zvýrazněná aktivita kumulující se v močovém měchýři (vyznačeno červenými šipkami). Poměrově je aktivita při 90 min p.i. 3 x nižší, než při 30 min p.i. (viz graf č. 17). Většina aktivity byla vyloučena renální cestou; n=1.



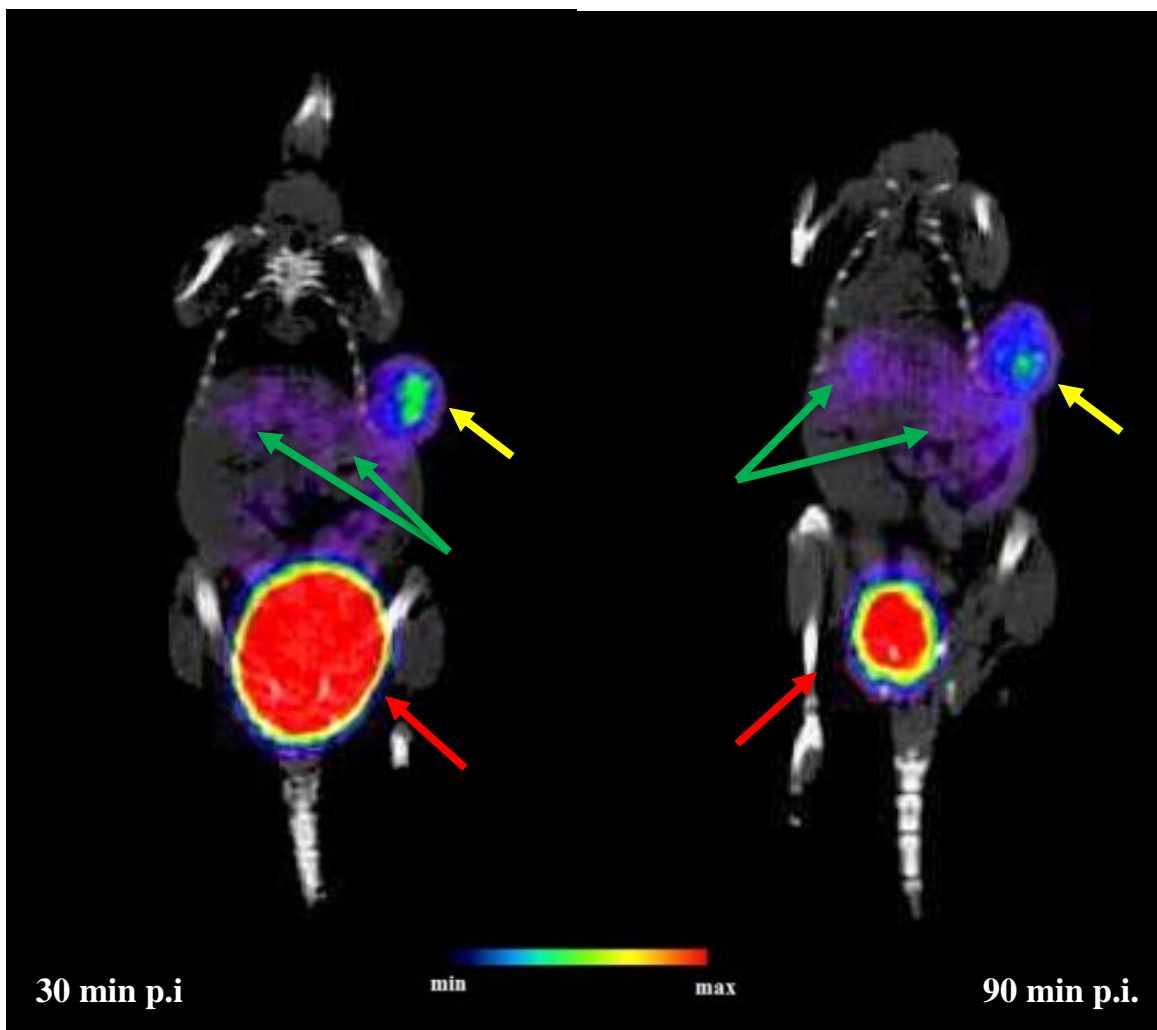
**Obr. č. 29** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) $_2$  ve zdravé laboratorní myši v programu PMOD; PE/CT sken *in vivo*; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 3,5 MBq bylo podáno retroorbitálně. V pánevní oblasti je zvýrazněná aktivita kumulující se v močovém měchýři (vyznačeno červenými šipkami). Poměrově je aktivita při 90 min p.i. 5 x nižší, než při 30 min p.i. (viz graf č. 11). Většina aktivity byla vyloučena renální cestou; n=1.



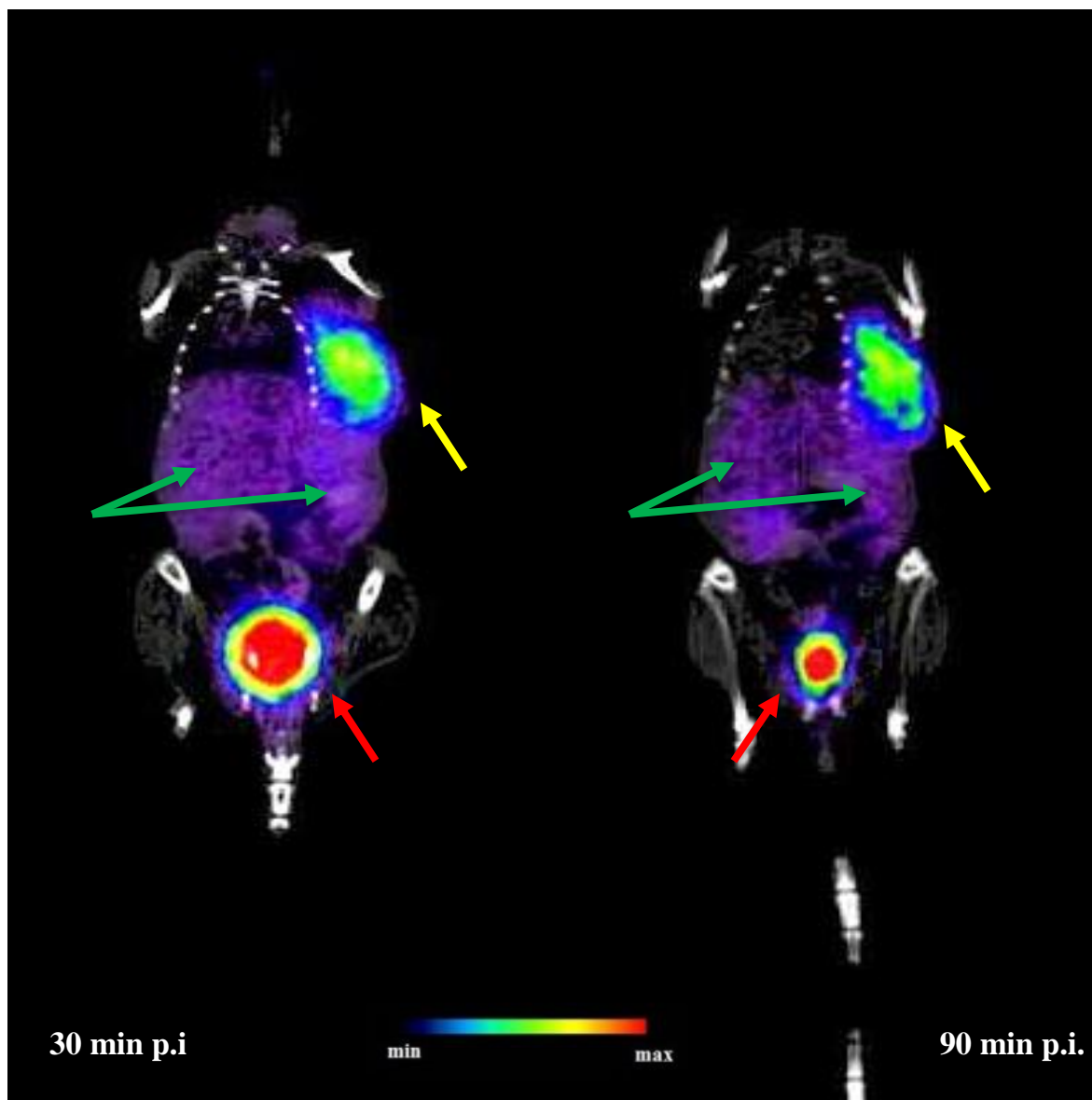
#### 4.7.4 Statické zobrazení 2D – nádorová zvířata



**Obr. č. 30** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) v laboratorní myši s nádorem buněčné linie U-87 MG v programu PMOD; PET/CT sken *in vivo*; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 5,6 MBq bylo podáno retroorbitálně. V hrudní oblasti napravo je zvýrazněna aktivita kumulující se v nádoru (žlutá šipka); v břišní oblasti jsou zvýrazněny ledviny (obrys je rozostřen kvůli nízké aktivitě v renální oblasti; zelená šipka); V pánevní oblasti je vyobrazen močový měchýř (zde se aktivita akumuluje nejvíce; červená šipka). Akumulace radiofarmaka v nádoru je v obou skenech vysoká a detekovatelná. Poměrově je aktivita v močovém měchýři při 30 a 90 min p.i. stejná (viz graf č. 24); n=1.

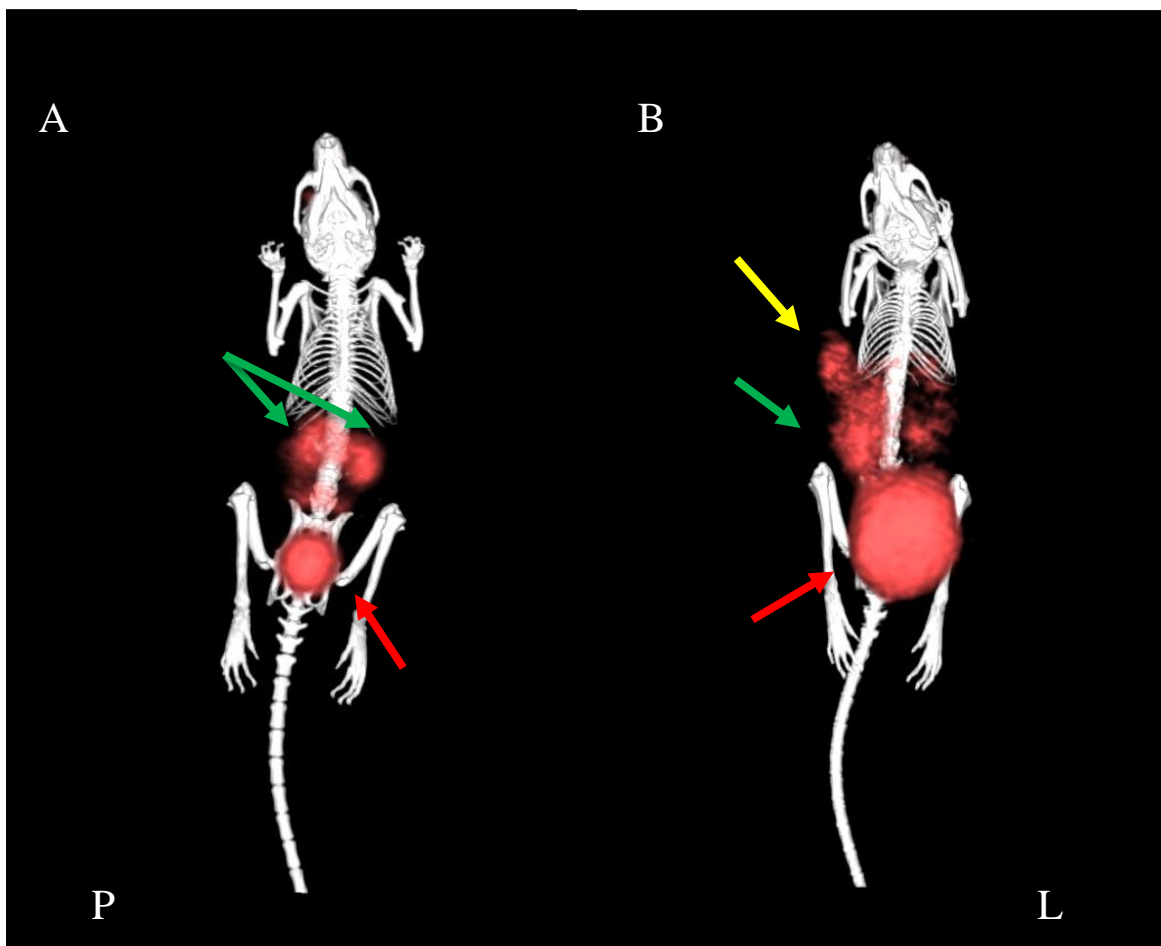


**Obr. č. 31** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v laboratorní myši s nádorem buněčné linie U-87 MG v programu PMOD; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 4,1 MBq bylo podáno retroorbitálně. V hrudní oblasti napravo je zvýrazněna aktivita kumulující se v nádoru (žlutá šipka); v břišní oblasti jsou zvýrazněny ledviny (obrys je rozostřen kvůli nízké aktivitě v renální oblasti; zelená šipka); V pánevní oblasti je vyobrazen močový měchýř (zde se aktivita akumuluje nejvíce; červená šipka). Akumulace radiofarmaka v nádoru je v obou skenech vysoká a detekovatelná. Poměrově je aktivita v močovém měchýři při 90 min p.i. 3 x nižší, než při 30 min p.i. (viz graf č. 18). Většina aktivity byla vyloučena renální cestou po 30 min p.i.; n=1.

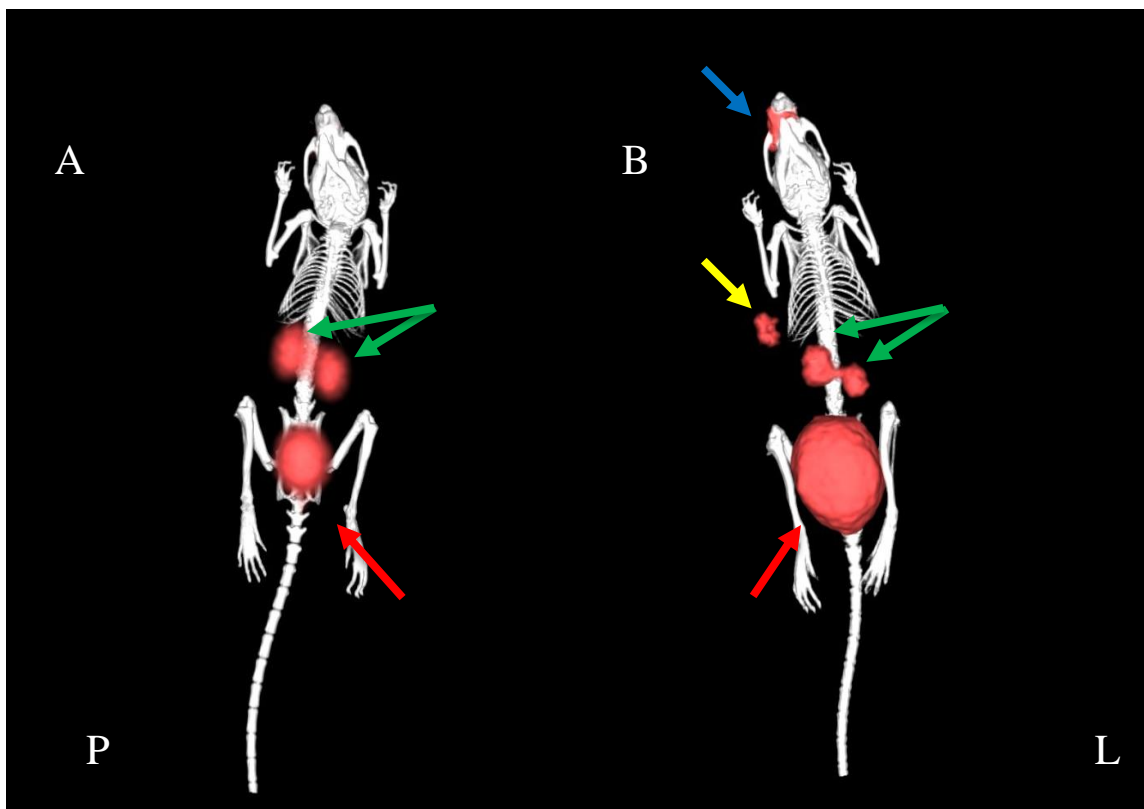


**Obr. č. 32** Biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) $_2$  v laboratorní myši s nádorem buněčné linie U-87 MG v programu PMOD; frontální rovina. Radiofarmakum o aktivitě 3,8 MBq bylo podáno retroorbitálně. V hrudní oblasti napravo je zvýrazněna aktivita kumulující se v nádoru (žlutá šipka); v břišní oblasti jsou zvýrazněny ledviny (obrys je rozostřen kvůli nízké aktivitě v renální oblasti; zelená šipka); V pánevní oblasti je vyobrazen močový měchýř (zde se aktivita akumuluje nejvíce, dochází k aktivnímu vylučování radiofarmaka; červená šipka). Akumulace radiofarmaka v nádoru je v obou skenech vysoká a detekovatelná. Poměrově je aktivita v močovém měchýři při 90 min p.i. 4 x nižší, než při 30 min p.i. (viz graf č. 12). Většina aktivity byla vyloučena renální cestou po 30 min p.i.; n=1.

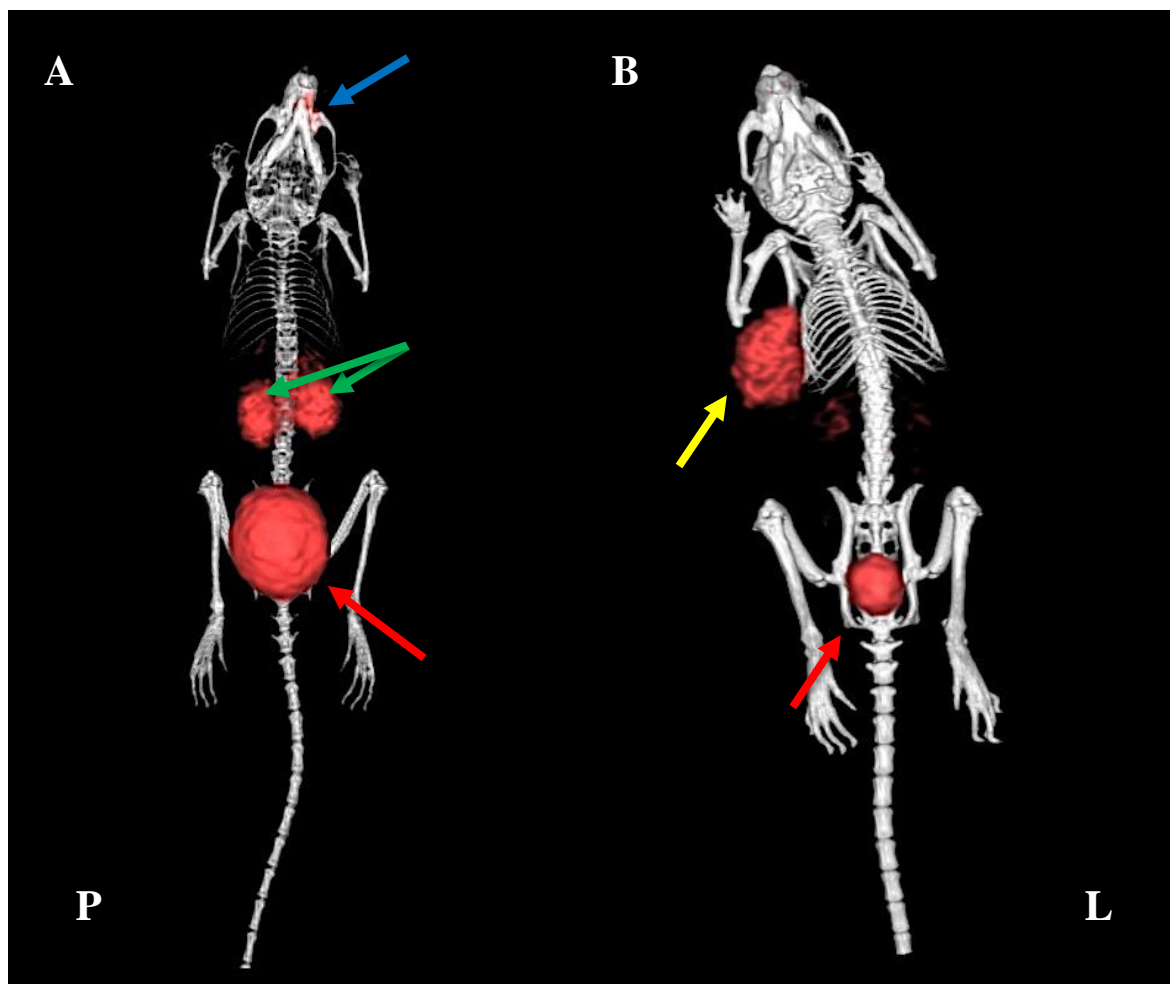
#### 4.8 Zobrazení 3D modelu statického skenování



**Obr. č. 33** PET/CT fúzované 3D zobrazení biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfk) ve zdravé myši - A a myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG) - B; 30 min p.i.; místo podání (modrá šipka), nádor (žlutá šipka), ledviny (zelená šipka), močový měchýř (červená šipka); myš je natočena zády vpřed; P-pravá strana, L-levá strana.



**Obr. č. 34** PET/CT fúzované 3D zobrazení biodistribuce  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) ve zdravé myši-A a myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG)-B; 30 min p.i.; místo podání (modrá šipka), nádor (žlutá šipka), ledviny (zelená šipka), močový měchýř (červená šipka); myš je natočena zády vpřed; P-pravá strana, L-levá strana.



**Obr. č. 35** PET/CT fúzované 3D zobrazení bodistribuce  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDyK)}_2$  ve zdravé myši-A a myši s nádorem (nádorová buněčná linie U-87 MG)-B; 30 min p.i.; místo podání (modrá šipka), nádor (žlutá šipka), ledviny (zelená šipka), močový měchýř (červená šipka); myš je natočena zády vpřed; P-pravá strana, L-levá strana.

**Tabulka č. 16** Hodnoty poměru nádor/krev testovaných radiopeptidů; hodnoty vypočteny z *ex vivo* studie; 30 a 90 min p.i.; vyznačené  $\pm$ SD; n=3.

	<b>30 min</b>			<b>90 min</b>		
	(RGDyK) <sub>2</sub>	RGDyK	RGDfK	(RGDyK) <sub>2</sub>	RGDyK	RGDfK
<b>poměr nádor/krev</b>	2,30 $\pm$ 1,09	1,90 $\pm$ 0,44	1,09 $\pm$ 0,84	16,00 $\pm$ 0,09	24,33 $\pm$ 0,22	14,77 $\pm$ 0,05

## DISKUZE

Multiformní glioblastom se řadí mezi nejagresivnější intrakraniální nádory. Jelikož se vyznačuje vysokou morbiditou a mortalitou, je jeho léčebná prognóza ve většině případů fatální. Pacienti se dožívají v průměru maximálně 15ti měsíců od začátku terapie. Jedná se o gliom IV. stupně a je považován za nejdestruktivnější a letální formu nádorů CNS, poněvadž je charakteristický rozsáhlou infiltrací do okolního parenchymu mozku. Vzhledem k tomu, že se multiformní glioblastom (GBM) liší od jiných druhů tumorů invazivní difuzí do okolní tkáně, není možné provést úplné odstranění nádoru běžnou chirurgickou metodou. Je nezbytné použití chemoterapie. Avšak terapeutický účinek cytostatických léčiv je velice neuspokojivý. Existuje mnoho omezení, jako jsou systémové cytotoxické účinky a omezená penetrace léčiva, která je přičítána hematoencefalické bariéře (*angl.* brain-blood barrier, BBB) a hematoencefalické-nádorové bariéře (*angl.* brain-blood tumor barrier, BBTB). BBB je velmi důležitá pro udržení homeostázy vnitřního prostředí mozku. Dále je většině léčiv zabráněno v transportu do jádra nádoru kvůli vysoké hustotě buněk či zvýšenému intersticiálnímu tlaku. Tyto faktory také významně ovlivňují terapeutickou účinnost podaných léků. Proto jsou v klinické léčbě gliomu žádoucí nová inovativní léčiva, která usnadní transport léku přes BBB, BBTB a infiltrují se do nádoru glioblastomu (Belhadj et al., 2017).

Pro efektivní PET/CT zobrazování gliomů byly vyvinuty syntetické RGD peptidy, které se selektivně vážou k povrchovým receptorům glioblastomu, integrinům  $\alpha v \beta 3$  (Haubner et al., 2014). Díky této vazbě je možné nádor detekovat i v raném stádiu v nesnadně přístupné mozkové tkáni. Ideálním radioizotopem pro značení RGD peptidů je izotop gallium-68 s poločasem přeměny 68 minut. Je to ideální izotop pro diagnostické účely. Jeho příprava je snadno proveditelná díky komerčně dostupnému  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru. Je také kompatibilní s farmakokinetikou RGD peptidů. Díky jeho relativně rychlé radiochemické přeměně není pro pacienta tak velkou radiační zátěží.

Dijkgraaf et al. potvrdil, že struktura RGD peptidů významně ovlivňuje vazbu na integrin a *in vivo* biodistribuci. Multimerizace a cyklizace lineární formy RGD peptidů zlepšily afinitní vlastnosti, farmakokinetiku a zvýšily akumulaci peptidu v nádorových buňkách. Avšak tato zlepšení mají i své stinné stránky, a to zvýšení akumulace zkoumaných látek i v



necílových orgánech, jako jsou ledviny a játra (Dijkgraaf et al., 2011; Yoshimoto et al., 2008).

Pro vygenerování nádoru glioblastomu v myších, byla zvířatům aplikována na pravý bok dávka nádorové buněčné linie U-87 MG. Tato buněčná linie je velmi kvalitně popsána. Jedná o velmi významný model, zejména pro zkoumání angiogenze a antiangiogenní léčby (Jacobs et al., 2011). Je tedy používána pro studium multifonního glioblastomu. Výsledky akumulace cyklického pentapeptidu c(RGDyK) v modelových buněčných liniích glioblastomu prokázaly, že se tato radiofarmaka přednostně váží na buňky U-87 MG. Výzkum doktora Belhadj et al. prokázal, že c(RGDyK) peptid má vysokou vazebnou afinitu k cílovému ligandu, integrinu  $\alpha\beta3$  (Belhadj et al., 2017).

Radioaktivně značené cyklické RGD peptidy mají velký potenciál pro detekci nádorů. Zprostředkují jak neinvazivní vizualizaci nádorových metastáz, tak i terapeutickou odpověď.

Proto byly pro tuto práci vybrány cyklické RGD peptidy a to konkrétně **DOTA-c(RGDfK)**, **NODAGA-RGDc(RGDyK)** a **NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>**. Peptidy c(RGDyK)<sub>2</sub> a c(RGDyK) byly modifikovány chelátorem NODAGA, jehož vnitřní struktura je lépe uzpůsobena pro vazbu radioizotopu <sup>68</sup>Ga, než je tomu u DOTA. Chelátor DOTA vykazuje více jak 98 % radiochemickou čistotu po označení izotopem <sup>68</sup>Ga s radiopeptidem, jak bylo prokázáno ve výsledcích této práce. Na druhou stranu stabilita chelatačního činidla NODAGA byla 99 % po celou dobu *in/ex vivo* experimentů. NODAGA je charakteristická svou vysokou hydrofilitou a ve vazbě s <sup>68</sup>Ga i vyšší termodynamickou stabilitu. Tato vlastnost zapříčiňuje rychlejší renální exkreci, čímž se zabrání zvýšené akumulaci radioaktivity v gastrointestinálním traktu a v ledvinách (Dummont et al., 2011; Oxboel et al., 2012). Dále se cyklické RGDyK liší tím, že obsahují ve své aminosekvenci D-tyrozin, a ne D-fenylalanin, jak je tomu u RGDfK. Tato odlišnost zapříčiňuje vysokou afinitu c(RGDfK) k plazmatickým proteinům a tím retenci v krevním řečišti (Haubner et al., 2014). Dle Domnanich et al. je vyšší absorpce RGDfK detekovatelná i v játrech. Rozdílnost těchto peptidů může také mít vliv na farmakokinetiku těchto peptidů. (Domnanich et al., 2016).

Cílem této práce bylo studium tří výše zmíněných RGD radiofarmak *in vitro*, stanovení jejich *ex vivo/ in vivo* biodistribuce a posouzení jejich možnosti zobrazování mozkového nádoru multiformního glioblastomu tvořeného buněčnou linií U-87-MG lokalizovaného subkutánně.

Pro následné experimentální práce bylo třeba na počátku stanovit, jak koncentrace množství značeného peptidu a jak dlouhý čas inkubace s galliem-68 je nejvhodnější pro docílení dostatečné radiochemické čistoty za použití co nejmenšího množství peptidu a zároveň nejkratší inkubační doby. Proto byly zvoleny tři různá testovaná množství RGD peptidů - 1, 5 a 10  $\mu\text{g}$  a tři doby inkubace - 5, 10 a 15 minut. NODAGA modifikované peptidy byly značeny za pokojové teploty, pro úspěšný průběh značení DOTA-c(RGDfK) galliem-68 bylo potřeba vyšší teploty a to 90 °C.

Bylo zjištěno, že radiochemickou čistotu 99 % vykazují radiopeptidy již po 10 minutách inkubace s radioizotopem. Inkubace 15 minut by se také dala považovat za vhodnou, ovšem cílem tohoto testování bylo zjistit nejkratší možný čas inkubace. Tudíž pro další experimenty byla tato délka zavržena. Při kratší tj. 5ti minutové inkubaci nebylo dosaženo potřebné radiochemické čistoty. Co se týče množství značených RGD peptidů zavzatých do reakce, radiochemická čistota při značení 1  $\mu\text{g}$  peptidu nevykazovala dostatečné výsledky, jako další testovaná množství (5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ ). Dle publikací by měla být minimální vyhovující radiochemická čistota >95 %, tudíž by mohlo být toto minimální množství peptidu (1  $\mu\text{g}$ ) přijatelné. Avšak 5  $\mu\text{g}$  vykazovalo vyšší hodnoty RCHČ (viz grafy č. 1, 2, 3) (Decristoforo et al., 2008).

Proto bylo stanoveno jako nejvhodnější množství peptidů pro značení 5  $\mu\text{g}$ . RGD peptidy byly při značení radioizotopem gallium-68 inkubovány po dobu 10 minut. Tento čas byl vybrán jako nejvhodnější - vyplývá z pokusu stanovení radiochemické čistoty u všech vybraných peptidů. Toto nastavení značící reakce bylo vybráno za účelem následných experimentů na živých organismech, jelikož v praxi je nejvhodnější použít co nejmenší množství peptidu inkubované co nejkratší čas.

Testování *in vitro* bylo provedeno za účelem potvrzení stability vazby peptidů s radiokovem  $^{68}\text{Ga}$  zprostředkovanou chelátorem DOTA/NODAGA.

Pro sledování vazby radioizotopu  $^{68}\text{Ga}$  na chelatační činidlo byly provedeny testy stability radiofarmaka v prostředí s konkurenčním kationtem kovu, dále byla testována stabilita v prostředí s konkurenčním chelatačním činidlem DPTA a v prostředí s fyziologickým pH.

Testování stability peptidů v prostředí s kationtem kovu má ověřit, zda nedochází k transchelataci  $\text{Fe}^{3+}$  do chelatačního hnízda na místo již obsazené  $\text{Ga}^{3+}$ . Radiochemická čistota dimeru i monomeru NODAGA-cRGDyK byla  $>98\%$  120 min p. i. (tab. č. 11, 12). U DOTA-cRGDfK byly hodnoty  $>95\%$  (tab. č. 10). Tyto výsledky potvrzují, že u peptidů nedochází k významné transchelataci.

Inkubace v roztoku s konkurenčním chelátorem DTPA (diethylentriaminpentaoctovou kyselinou) testovala schopnost značených peptidů udržet navázané gallium-68, jakožto radioaktivní kov. Analýza radiochemické čistoty na HPLC ukázala, že všechny tři zkoumané peptidy jsou velmi stabilní i v přítomnosti konkurenčního chelátoru, jelikož hodnoty čistoty překračovaly  $99\%$ .

Získání  $^{68}\text{Ga}$  z  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru dochází pomocí  $0,1\text{ M HCl}$ . Samotné značení RGD peptidů probíhá při upraveném pH po přidání acetátového pufru, jenž zvyšuje pH na 3-4. Jelikož se fyziologické pH krve pohybuje v rozmezí 7,36-7,44, je třeba otestovat stabilitu RGD peptidů značených  $^{68}\text{Ga}$  v alkaličtějším pH než má reakční směs během značení galliem-68. Dle naměřených výsledků je patrné, že stabilita RGD peptidů zůstane nezměněna i po aplikaci peptidu do prostředí s pH zvýšeným na fyziologickou hodnotu. Všechny testované peptidy vykazují  $99\%$  radiochemickou čistotu i po 120 minutách inkubace (viz tab. č. 10, 11, 12).

Hydrofilita NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK), DOTA-c(RGDfK) značených  $^{68}\text{Ga}$  byla zjištěna stanovením rozdělovacích koeficientů oktanol/voda ( $\log P$ ). Hodnoty  $\log P$  testovaných peptidů jsou  $-3,341 \pm 0,13$ ;  $-3,047 \pm 0,62$ ;  $-3,429 \pm 0,10$ . Dle Dijkgraaf et al. jsou hodnoty  $<1$  stanoveny jako hydrofilní. Hodnoty  $\log P$  všech RGD peptidů se v publikacích pohybují v rozmezí  $-4,70$  až  $-3,50$  bez ohledu na chelatační činidlo. V případě, že jsou stanovené hodnoty  $\log P >1$ , je látka určena jako lipofilní. Hydrofilita je pro diagnostická radiofarmaka žádoucí, a to pro jejich následnou specifickou biodistribuci.

Dále bylo nutno otestovat stabilitu zkoumaných  $^{68}\text{Ga}$ -RGD peptidů v lidské plazmě. Zkoumané peptidy byly tedy inkubovány po dobu 0, 30, 60 a 120 minut v lidské plazmě. NODAGA-cRGDyK peptidy i DOTA-cRGDfK peptid vykazovaly i po 120ti minutové inkubaci s plazmou  $99\%$  radiochemickou čistotou (viz tab. 13, 14, 15). I Decristofoto et al.

prokázali, že tyto peptidy vykazují vysokou stabilitu v plazmě a to 95 % po 120 minutách inkubace (Decristofo et al., 2008).

Výsledky testování vazby na plazmatické proteiny potvrdily, že se vybrané RGD peptidy na plazmatické proteiny příliš neváží. NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK), DOTA-c(RGDfK) měly po 120 minutové inkubaci procento vázané frakce velice nízké a pohybovalo se v rozmezí hodnot 3,20 - 3,40 %. Při porovnání výsledků procentuální vazby na plazmatické proteiny této práce s výsledky bakalářské práce Dominiky Flašarové, která se zabývala totožnými peptidy se shodnou koncentrací, má oproti mým výsledkům Flašarová uvedenou hodnotu 5,42 % po 120 min inkubace v lidské plazmě (Flašarová, 2016) Vzhledem k přesnosti použité metody se dají výsledky této práce a výsledky kolegyně Flašarové považovat za prakticky shodné.

Výsledky analýz vzorků moči odebraných laboratorním myším 30 min p. i. a 90 min p. i. měly odhalit, zda se testované peptidy v organismu metabolizují. U látky <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> nebyly sledovány výrazné změny retenčních časů (radiochromatogram aplikované látky vs. chromatogram moči odebrané v čase 30 min p. i. a 90 min p. i., viz graf č. 13). Retenční čas radiopeptidu po označení galliem-68 a pík aktivity v moči odebrané 30 min p.i. se shodovaly (8,3 min). U píku aktivity v moči odebrané 90 min p.i. byl pozorován posun retenčního času na 8,1 min. Tento rozdíl je ale zanedbatelný. Z naměřených dat vyplývá, že se látka v těle nedegraduje a vylučuje se močí v nezměněná podobě, což je vhodné pro její správnou cílenou biodistribuci. Tento výsledek je shodný s <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDyK) monomerem (graf č. 12). Můžeme o něm prohlásit, že v těle nedochází k degradaci a tvorbě metabolitů. Avšak testování radiochemické čistoty <sup>68</sup>Ga-DOTA-RGDfK prokázalo, že dochází k mírnému snížení radiochemické čistoty testovaného vzorku moči. V moči odebrané v čase 30 min p.i. je detekován pík volného radioizotopu <sup>68</sup>Ga o velikosti 3 % zaznamenaný čase 2,5 minuty. Tento pík se nadále v 90 min p.i. zvyšuje na 5 %. Dle v této práci nepublikovaných radiochromatogramů je možno sledovat retenční čas volného nenavázaného <sup>68</sup>Ga při nezdařilém značení okolo 2,4 min (graf č. 4). Tento retenční čas se prakticky shoduje s časem detekovaným 30 a 90 min p.i. na grafu č. 11. Tento údaj prokazuje, že dochází k uvolňování <sup>68</sup>Ga z vazby s komplexem DOTA-c(RGDfK). Nižší stabilita komplexu <sup>68</sup>Ga-DOTA může vést k transchelaci gallia-68 na transferin. Na druhou stranu ve studiích *in*

*vitro* nebyly pozorovány žádné důkazy o nestabilitě komplexu  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA či jeho významné vazbě na plazmatické proteiny (Blois et al., 2011).

Data získaná z *ex vivo* biodistribučních experimentů plně korespondovala s výsledky získanými pomocí PET/CT zobrazování. Z *ex vivo* biodistribučních dat pro nenádorové myši dominovaly hodnoty akumulované radioaktivity v ledvinách i v žaludku, a to u všech testovaných peptidů. Avšak u monomeru  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) byla kumulace radioaktivity v ledvinách podstatně vyšší 90 min p.i. (graf č. 6) než u dimeru, který vykazoval vyšší hodnoty při 30 min p.i. (graf č. 7).  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) vykazoval také zvýšené hodnoty akumulace v ledvinách nicméně byla naměřena vysoká kumulace radioaktivity i v kosti (viz graf č. 20).

U *ex vivo* experimentů na nádorových myších bylo zjištěno, že hodnota akumulované radioaktivity pro nádor 30 min p.i. u  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> je přibližně třikrát vyšší než u monomeru a RGDfK. Zvyšující se hodnota poměru radioaktivit v nádoru a v krvi v čase vypovídá o specifické kumulaci látky v cílové tkáni. 30 min po aplikaci vykazuje dimer RGDyK hodnoty  $2,30 \pm 0,19$ , avšak 90 min p.i. byl poměr akumulace nádor/krev již  $16,00 \pm 0,09$ . Jedná se o hodnotu, která se dá přirovnat k výsledkům Oxboel et al.. Jejich hodnoty vykazují  $12,7 \pm 2,31$  pro poměr nádor/krev 60 min p.i. (Oxboel et al., 2012). Monomer vykazoval hodnoty 30 min p.i.  $1,90 \pm 0,44$ , ale 90 min p.i. se poměr zvýšil na  $24,33 \pm 0,22$ . Hodnoty 90 min p.i. u monomeru vykazovaly optimální výsledky z pohledu kumulace v nádoru. Radiofarmaka  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) monomer i dimer jsou tedy vhodná pro zobrazování nádoru glioblastomu.

Poměr akumulace nádor/krev  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c RGDfK byl 30 min p.i.  $1,09 \pm 0,44$ , následně v čase 90 min p.i. byla naměřena hodnota  $14,77 \pm 0,05$  (viz tab. č. 15). Testování  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) provedl také Murkherjee et al. na laboratorních myších kmene *balb*. Aplikace ovšem nebyla provedena retroorbitálně, ale radiofarmakum bylo aplikováno do ocasní žíly. Následně bylo zjištěno, že tento peptid vykazuje poměr nádor/krev 3,26 (60 min p.i.), což jsou poměrně nižší hodnoty, než které byly naměřeny v této práci (Dle Murkherjee et al., 2013).

Tato data potvrzují informace z PET/CT. Dimer i monomer RGDyK se v nádoru kumulují ve velkém množství (obr. č. 34, 35). Díky těmto výsledkům je umožněna snadná

identifikace nádoru na PET snímcích. Nýbrž u  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA(cRGDfK) nelze nádor na PET snímcích lehce vizualizovat kvůli jeho nízké retenci v nádoru (obr. č. 33).

Důležitou částí této práce bylo testování *in vivo* biodistribuce vybraných peptidů značených  $^{68}\text{Ga}$  ve zdravých laboratorních myších kmene SCID i v laboratorních myších totožného kmene nesoucích nádor buněčné linie U-87-MG pomocí pozitronové emisní tomografie spojené s počítačovou tomografií (PET/CT). U látky  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> aplikované zdravým myším byla *in vivo* pozorována výrazná retence radiofarmaka v ledvinách (obr. č. 22). Dále se radiofarmakum poměrně rychle vylučovalo do močového měchýře. Většina orgánů (slinivka, žaludek, střeva, srdce) vykazovala stabilní retenci aktivity až na slezinu a plíce. Při statickém PET/CT skenu lze pozorovat vysokou akumulaci radioaktivity v močovém měchýři již 30 min p.i., sken aplikace 90 min p.i. zobrazuje již méně kumulace radioaktivity (viz obrázek č. 29). Tímto způsobem lze prokázat, že se dimer z těla vylučuje poměrně rychle.

Výsledky biodistribuce testovaných látek v nádorových myších ukázaly, že  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub> se výrazně kumuloval v nádoru. Již 30 min p.i. lze detekovat relativně vysokou aktivitu radiofarmaka v nádoru. Na obrázku dynamického skenu č. 26 je viditelné, že se akumulace v nádorové tkáni exponenciálně zvyšuje. Avšak v 75. minutě p.i. výstupní signál mírně slábne. Ideální doba pro vyšetření prostřednictvím tohoto radiofarmaka tedy bude 30-65 min p.i.

Akumulace radioaktivity v těle po podání monomeru cRGDyK byla detekována v největším množství v ledvinách. Ale navíc byla v časech 30 i 90 min p.i. po podání látky odhalena kumulace radioaktivity v gastrointestinálním traktu. Avšak průběh biodistribuce pozorovaný během dynamického skenování je shodný s průběhem během skenování  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>. Dochází k retenci radiofarmaka v ledvinách, přes něž se látka poměrně rychle vylučovala do močového měchýře (graf č. 21). Akumulace radioaktivity byla ovšem detekována i v místě podání 30 min p.i. (obr. č. 34). Část radiofarmaka se nahromadila v místě aplikace. Avšak podle obrázku č. 22 můžeme sledovat dynamický pokles radioaktivity v místě podání.

$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) vykazoval poměrně shodné hodnoty jaké byly naměřeny u peptidů RGDyK. Statickým skenováním tohoto radiofarmaka pomocí PET/CT byla v čase 30 min p.i. detekována vysoká akumulace radioaktivity v ledvinách. Při statickém skenování došlo v čase 90 min p.i. k výraznému poklesu radioaktivity v ledvinách (viz obr. č. 30). Oxboel et al. testoval *in vivo* biodistribuci RGDfK na laboratorních myších s nádorem buněčné linie U-87 MG a prokázal, že dochází k vylučování tohoto radiofarmaka převážně renální cestou. Také bylo prokázáno, že se RGDfK projevují rychlou clearance (Oxboel et al., 2011). Z této informace vychází, že statický sken podal nepřesné výsledky.

Také akumulace v močovém měchýři se logicky s časem zvyšuje. Biodistribuce RGD peptidů v orgánech modelové myši byla víceméně rovnoměrná. Odlišné hodnoty vykazovala pouze játra, ve kterých byla akumulace DOTA-RGD peptidu zvýšena (viz graf č. 20, 21). Fenylalanin obsažený ve struktuře RGDfK negativně ovlivňuje farmakokinetiku radioaktivně značeného peptidu tím, že prodlužuje biologický poločas tohoto peptidu a následně zapříčiňuje jeho hromadění v játrech. Tuto informaci potvrdil ve své publikaci i Domnanich et al. (Domnanich et al., 2016).

Výsledky zobrazování biodistribuce testovaných látek v nádorových myších ukázaly, že se  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) dimer i monomer výrazně kumulují v nádoru, což je zřetelně viditelné na obrázcích 34, 35.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) se také jasně kumuluje v nádoru, avšak jeho signál je slabší, než tomu je u RGDyK (viz obr. č. 33). Slabá aktivita radiofarmaka  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK) v nádoru je detekována i na obr. č. 24. Tento nezdařilý snímek zobrazuje biodistribuci c(RGDfK) v čase 75 min p.i.. Kvůli slabé aktivitě v nádoru bylo nutno signál sotwarově zesílit, aby bylo možno demonstrovat kumulaci radiofarmaka v nádoru.

Oxboel et al. ve své studii popsal, že dochází k výraznějšímu poklesu radioaktivity  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) v ledvinách, střevě a játrech v časech od 1 do 18 hodiny p.i. (2,2/0,5; 1,6/0,4 a 1,1/0,4 % ID/g) než u  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfK) ve stejných časových intervalech (2,2/1,6; 2,1/1,3; 1,7/1,0 % ID/g). Při pohledu na renální retenci jednotlivých radiofarmak se zdá být komplex c(RGDyK) vhodnější než c(RGDfK) (Oxboel et al., 2012).

Pokud jde o stabilitu všech těchto zkoumaných RGD peptidů, bylo dle sledování stability peptidu v moči potvrzeno, že jsou stabilní *in vivo* po intravenózní aplikaci. Tyto radiopeptidy se následně pomalu metabolizují na hydrofilní metabolity. Průměrné

procentuální zastoupení těchto metabolitů se v krvi po 120 min pohybuje v rozmezí od 4-25 %. Tuto tezi potvrdil Laitinen et al., 2013.

NODAGA-c(RGDyK) a DOTA-c(RGDfK) jsou monomery, tedy obsahují pouze jednu sekvenci RGD. Očekávalo se tedy, že jejich akumulace v nádoru bude o něco nižší oproti dimeru, což se potvrdilo. Dle provedených studií nebyl zjištěn výrazný rozdíl v akumulaci mezi NODAGA-c(RGDyK) a DOTA-c(RGDfK), jelikož nahrazení chelátoru DOTA za NODAGA nemá významný vliv na afinitu nebo specifitu vlastního peptidu (Dijkgraaf et al., 2013; Oxboel et al., 2014). Výsledky *ex vivo* biodistribuce jsou slibné u všech testovaných peptidů.

Při porovnání výsledků *in vivo* a *ex vivo* biodistribučních dat v ledvinách a nádoru bylo zjištěno, že hodnoty vykazují vyšší akumulaci radiopeptidu zjištěnou *ex vivo* biodistribucí než při testování *in vivo*.

Závěrem této diskuze bych chtěla upozornit na to, že data k degradaci peptidů a tvorby jejich metabolitů v těle laboratorní myši získaná z moči jsou unikátní, neboť nejsou doposud v literatuře dostupná. Také komplexní srovnání těchto tří peptidů značených  $^{68}\text{Ga}$  prozatím nebylo uvedeno v žádné dostupné publikaci.



## ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsem se zabývala preklinickým testováním stability  $^{68}\text{Ga}$  značených peptidů NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>, NODAGA-c(RGDyK) a DOTA-c(RGDfK), jakožto potencionálních radiofarmak pro efektivnější diagnostiku multifornního glioblastomu za pomoci pozitronové emisní tomografie. Peptidy byly podrobeny testováním stability nejen *in vitro*, ale také *in vivo*. A v hlavní řadě byla tato práce zaměřená na studii *ex/in vivo* biodistribuce těchto peptidů pomocí zobrazovací metody PET/CT.

Všechna tři testovaná radiofarmaka vykazovala *in vitro* stabilitu. Nicméně c(RGDyK) deriváty se jevily jako mnohem stabilnější než c(RGDfK), což bylo prokázáno z rozdílných hodnoty získaných *in vivo*. Peptidy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK)<sub>2</sub>,  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) se kumulovaly v nádoru v mnohem větší míře, než tomu bylo u  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-c(RGDfK). Avšak retence v ledvinách byla u všech výše zmíněných peptidů totožná. c(RGDfK) derivát se však vyznačoval detekovatelnou akumulací v dalším necílovém orgánu, a to v játrech.

Značně vysokou kumulací v nádoru se projevoval monomer c(RGDyK), jelikož poměr akumulace nádor/krev pro tento peptid vykazoval hodnoty  $24,33 \pm 0,22$ . Ze všech testovaných radiofarmak se jedná o nejvyšší dosaženou hodnotu poměru akumulace nádor/krev. Díky zvýšené akumulaci radioaktivity v nádorové tkáni umožňovaly  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) deriváty jasné zobrazení nádoru pomocí pozitronové emisní tomografie.

Podle získaných dat lze pokládat deriváty  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDyK) za další z řady možných kandidátů perspektivních radiofarmak pro diagnostiku multifornního glioblastomu v klinické praxi.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHRONIAN, L.; LEWIS, B.: Using the RCAS-TVA System to Model Human Cancer in Mice. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2014, vol. 2, s. 1128-1135.

AL-NAHHAS, A.; WIN, Z.; SZYSZKO, T.; SINGH, A.; NANNI, C.; FANTI, S.; RUBELLO, D.: Gallium-68 PET: A New Frontier in Receptor Cancer Imaging. Anticancer research. 2007, vol. 27, s. 4087-4094.

ALAVI, J. B.; ALAVI, A.; CHAWLUK, J.; KUSHNER, M.; POWE, J.; HICKEY, W.; REIVICH, M.: Positron emission tomography in patients with glioma a predictor of prognosis. 1988, vol. 62, s. 1074–1078.

ALEXANDRU-ABRAMS, D.; JADUS, M.; HSU, F.; STATHOPOULOS A.; BOTA, D.: Therapeutic Targeting of Malignant Glioma. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2014, vol. 14, s. 1075-1084.

ALLEN, M.; BJERKE, M.; EDLUND, H.; NELANDER, S.; WESTERMARK, B.: Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. Science Translational Medicine. 2016, vol. 8, s.

APPEL, E.; ROWLAND, M.; LOH, X.; HEYWOOD, R.; WATTS, C.; SCHERMAN, O.: Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit[*n*]uril. Chemical Communication. 2012, vol. 48, s. 9843-9845.

ATCC. U-87 MG. [Online] 2014. [Citace: 7. 9. 2016]. Dostupné na URL: [atcc.org/~media/5037A09C51B742988E2534FBEA5E9C60.ashx](http://atcc.org/~media/5037A09C51B742988E2534FBEA5E9C60.ashx)

BACH, H. T.; CLAYTOR, T. N.; HUNTER, J. F.; OLIVAS, E. R.; KELSEY, C. T.; ENGLE, J. W.; CONNORS, M. A.; NORTIER, F. M.; RUNDE, W. H.; MODDRELL, C.; LENZ, J. W.; JOHN, K. D.: Improving the survivability of Nb-encapsulated Ga targets for the production of <sup>68</sup>Ge. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. 2013, vol. 299, s. 32-41.

BANERJEE, S.; POMPER, M. G.: Clinical applications of gallium-68. Applied Radiation and Isotopes. 2013, vol. 76, s. 2-13.

BELHADJ, Z.; YINGA, M.; CAO, X.; HUA, X.; ZHANG, C.; WEI, X.; GAO, J.; WANG, X.; YANG, Z.; LU, W.: Design of Y-shaped targeting material for liposome-

based multifunctional glioblastoma-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017, vol. 255, s.132-141.

BLOM, E.; VELIKYAN, I.; ESTRADA, S.; HALL, H.; MUHAMMAD, T.; DING, C.; NAIR, M.; LANGSTRÖM, B.: <sup>68</sup>Ga-Labeling of RGD peptides and biodistribution. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2012, vol. 5, s. 165-172.

BOSMA, MJ.; CARROLL, AM.: The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Review Immunology*. 1991, vol. 9, s. 323-350.

BREEMAN, W.; DE BLOIS, E.; CHAN, H.; KONIJNENBERG, M.; KWEKKEBOOM, D.; KRENNING, E.: <sup>68</sup>Ga-labeled DOTA Peptides and <sup>68</sup>Ga-labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2011, vol. 41, s. 314-321.

BRUCE, J.; KENNEDY, B.; TALAVERA, F.; HARRIS, J.; SHEPARD, R.: Glioblastoma Multiforme. [Online] 2015. [Citace: 26. 4. 2016]. Dostupné na URL: [emedicine.medscape.com/article/283252-overview](http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview).

CAO, J.; WAN, S.; TIAN, J.; LI, S.; DENG, D.; QIAN, Z.; GU, Y.: Fast clearing RGD-based near-infrared fluorescent probes for in vivo tumor diagnosis. *Contrast Media Molecular Imaging*. 2012, vol. 7, s. 390–402.

CAI, H.; CONTI, P.: RGD-based PET tracers for imaging receptor integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression. *Labelled of Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2013, vol. 56, s. 264–279.

CANDOLFI, M.; CURTIN, J. F.; NICHOLS, W. S.: Intracranial glioblastoma models in preclinicalneuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of Neuro- Oncology*. 2007, vol. 85, s. 133-148.

CARRASCO, J.; GIZZI, M.; PAIRET, G.; LANNOY, V.; EYNDE, M.: Pathological responses after angiogenesis or EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer depend on the chemotherapy backbone. *British Journal of Cancer*. 2015, vol. 113, s. 1298-1304.

CLARK, J. M.; HOMER, N.; O`CONNOR, B.; CHEN, Z.; ESKIN, A.; LEE, H.; MERRIMAN, B.; NELSON, S.: U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLOS Genetics*. 2010, vol. 6, s. 16.

CNS Pathology Index: Neoplas ms. In: The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. [Online] 2012. [Citace: 25. 5. 2016]. Dostupné na URL: [library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS136.html](http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS136.html).

CONSTANT, S.; HUANG, S.; WISZNIEWSKI, L.; MAS, CH.: Drug Discovery. Rijeka: InTech, 2013. kap. 15.

DASH, A.; KNAPP, R.; MRA, P.: Industrial radionuclide generators: A potential step towards accelerating radiotracer investigations in industry. RSC Advances. 2013, vol. 3, s. 14890-14909.

DECRISTOFORO, C.; GONZALEZ, H.; CARLSEN, J.; RUPPRICH, M.; HUISMAN, M.; VIRGOLINI, I.; WESTER H. J.; HAUBNER, R.:  $^{68}\text{Ga}$ - and  $^{111}\text{In}$ -labelled DOTA-RGD peptides for imaging of  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin expression. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. 2008, vol. 35, s. 1507-1515.

DIJKGRAAF, A.; TERRYB, S.; McBRIDE, W.; GOLDENGERG, D.; LAVERMAN, P.; FRANSSEN, P.; OYEN W.; BOERMAN, O.: Imaging integrin alpha-v-beta-3 expression in tumors with an  $^{18}\text{F}$ -labeled dimeric RGD peptide. Contrast Media Molecular Imaging. 2013, vol. 8, s. 238–245.

DOMNANICH, K. A.; MÜLLER, C.; FARKAS, R.; SCHMID, R. M.; PONSARD, B.; SCHIBLI, R.; TÜRLER, A.; VAN DER MEULEN, N.:  $^{44}\text{Sc}$  for labeling of DOTA- and NODAGA-functionalized peptides: preclinical in vitro and in vivo investigations. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry. 2016, vol. 1, s. 1-19.

DUMONT, R. A.; DEININGER, F.; HAUBNER, R.; MAECKE, H. R.; WEBER, W. A.; FANI, M.: Novel  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled RGD Conjugates Show Improved PET Imaging of  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Integrin Expression and Facile Radiosynthesis. Journal of Nuclear Medicine. 2011, vol. 52, s. 1276–1284.

ENWEREM, I.; WANG, J.; LESZCZYNSKI, J.: In search of active RGD peptides: Theoretical study of hydrogen bonding in five-member ring Cyclic-RGD isomers. Computational and Theoretical Chemistry, 2012, vol. 998, s. 141-147.

EO, J. S.; JEONG, J. M.: Angiogenesis Imaging Using  $^{68}\text{Ga}$ -RGD PET/CT: Therapeutic Implications. Seminar Nuclear Medicine. 2016, vol. 46, s. 419-427.

FLAŠÁROVÁ, D. Studium RGD peptidů značených galliem-68 jako potenciálních diagnostických PET tracerů pro multifonní glioblastom. Olomouc, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.

GAERTNER, F. C.; KESSLER, H.; WESTER, H. J.; SCHWAIGER, M.; BEER, A. J.: Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012, vol. 39, s. 126–138.

GHOSH, S. C.; PINKSTON, K. L.; ROBINSON, H.; HARVEY, B. R.; WILGANOWSKI, N.; GORE, K.; SEVICK-MURACA, E. M.; AZHDARINIA, A.: Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for (64)Cu-labeled immunoconjugates. *Nucl Med Biol*. 2015, vol. 42, s. 177-83.

HAUBNER, R.; MASCHAUER, S.; PRANTE, O.: PET Radiopharmaceuticals for Imaging Integrin Expression: Tracers in Clinical Studies and Recent Developments. *BioMed Research International*. 2014, vol. 2014, s. 17.

HAUBNER, R.; FINKENSTEDT, A.; STEGMAYR, AC; RANGGER, C.; DESCRISTOFORO, H.; ZOLLER, I.; VIRGOLINI, J.: [<sup>68</sup>Ga]NODAGA-RGD – Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2016, vol. 43, s. 2005–2013.

HUSZTHY, P. C.; DAPHU, I.; NICLOU, S. P.: In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro-Oncology*. 2012, vol. 14, s. 979-993.

CHEN, H.; GANG, N.; WU, H.; CHEN, X.: Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin  $\alpha\beta 3$ . *Theranostics*. 2016, vol. 6, s. 78–92.

CHERES, D. *Methods in Enzymology; Integrins*. San Diego, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2007. vol 426.

CHOI, H.; PHI, J. H.; PAENG, J. C.; KIM, S. K.; LEE, Y. S.; JEONG, J. M.: Imaging of integrin  $\alpha\beta 3$  expression using <sup>68</sup>Ga-RGD positron emission tomography in pediatric cerebral infarct. *Molecular Imaging*. 2013, vol. 12, s. 213–217.

ITO, M.; HIRAMATSU, H.; KOBAYASHI, K.; SUZUE, K.; KAWAHATA, M.; HIOKI, K.; UEYAMA, Y.; KOYANAGI, Y.; SUGAMURA, K.; TSUJI, K.; HEIKE, T.;

NAKAHATA, T.: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002, vol. 100, s. 3175-3182.

JACOBS, V.; VALDES, P.; HICKEY, W.; DE LEO, J.: Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour mode. *Asn Neuro Journal*. 2011, vol. 3, s. 171-181.

KNETSCH, P.; PETRIK, M.; GRIESSINGER, CH.; RANGGER, CH.; FANI, M.; KESSENHEIMER, CH.; VON GUGGENBERG, E.; PILCHER, B.; VIRGOLINI, I.; DECRISTOFO, C.; HAUBNER, R.: [<sup>68</sup>Ga]-NODAGA-RGD for imaging  $\alpha\beta 3$  integrin expression. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011, vol. 38, s. 1303–1312.

KUMAR, C: Integrin  $\alpha\beta 3$  as a Therapeutic Target for Blocking Tumor-Induced Angiogenesis. *Current Drug Targets*. 2003, vol. 4, s. 123-131.

KUPKA, K.; KUBINYI, J.; ŠAMÁL, M.: *Nukleární medicína*. Praha: P3K, 2007. s. 185.

LAZNÍČEK, M., KOMÁREK, P.: *Základy radiofarmacie*. Praha: Karolinum, 1998. s. 27-64.

LIU, Z.; WANG, F.; CHEN, X.: Integrin  $\alpha\beta 3$ -Targeted Cancer Therapy. *Drug Development Research*, 2008, vol. 69, s. 329–339.

LOCH, C.; MAZIERÉ, B.; COMAR, D.: A new generator for ionic gallium-68. *Journal of Nuclear Medicine*, 1980, vol. 21, s. 171-173.

LOUREIRO, L.; PONTES, L.; CALLEGARO-FILHO, D.; KOCH, L.; WELTMAN, E.; VICTOR, E; SANTOS, A.; BORGES, L.; SEGRETO, R.; MALHEIROS, S.: Waiting time to radiotherapy as a prognostic factor for glioblastoma patients in a scenario of medical disparities. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015, vol. 73, s. 104-110.

MARTINIOVA, L.; DE PALATIS, L.; ETCHEBEHERE, E.; RAVIZZIN, G.: Gallium-68 in Medical Imaging. *Current Radiopharmaceuticals*. 2016, vol. 9, s. 187-207.

McNEILL, R.; VITUCCI, M.; WU, J.; MILLER, C.: Contemporary murine models in preclinical astrocytoma drug development. *Neuro-Oncology*. 2015, vol. 17, s. 12–28.

MUKHERJEE, A.; KORDE, A.; CHAKRABORTY, S.; SARMA, H. D.; SAMUEL, S.; PILLAI, R. A.: Preparation and Bioevaluation of DOTA-Cyclic RGD Peptide Dimer Labeled with <sup>68</sup>Ga.

International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering. 2013, vol. 7, s. 248-250.

MURPHY, A.; RABKIN, S.: Current status of gene therapy for brain tumors. *Translational Research*. 2013, vol. 161, s. 339–354.

NATIONAL CANCER INSTITUT: Adult Central Nervous System Tumors Treatment (PDQ®)–Patient Version. [Online] 2016. [Citace: 4. 6. 2016]. Dostupné na URL: [cancer.gov/types/brain/patient/adult-brain-treatment-pdq](http://cancer.gov/types/brain/patient/adult-brain-treatment-pdq).

NG, K.; KIM, R.; KESARI, S.; CARTER, B., CHEN, C.: Genomic profiling of glioblastoma: convergence of fundamental biologic tenets and novel insights. *Jurnal Neurooncol*. 2012, vol. 107, s. 1–12.

OLLINGER, J. M. a FESSLER, J.A.: Positron-Emission Tomography. *IEEE Signal Processing Magazine* 1997, vol. 97, s. 43-55.

OXBOEL, J.; SCHJOETH-ESKESEN, C.; EL-ALI, H.; MADSEN, J.; KJAER, A: <sup>64</sup>Cu-NODAGA-c(RGDyK) Is a Promising New Angiogenesis PET Tracer: Correlation between Tumor Uptake and Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 Expression in Human Neuroendocrine Tumor Xenografts. *International Journal of Molecular Imaging*. 2012, vol 2012, s. 11.

OXBOEL, J.; Comparison of two new angiogenesis PET tracers <sup>68</sup>Ga-NODAGA-E [c(RGDyK)]<sub>2</sub> and <sup>64</sup>Cu-NODAGA-E [c(RGDyK)]<sub>2</sub>; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nuclear medicine and biology*. 2014, vol. 41, s. 259-267.

PerkinElmer, Inc. WIZARD<sup>2</sup> Automatic Gamma Counters. [Online] 2008. [Citace: 20. 2. 2016]. Dostupné na URL: [cic.ugr.es/descargas/lar/PDF7.pdf](http://cic.ugr.es/descargas/lar/PDF7.pdf).

PONTEN, J.; MACINTYRE, E. H.: Long-term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1968, vol. 74, s. 465-486.

PRICE, E. W.; ORVIG, CH.: Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *The Royal Society of Chemistry*. 2014, vol. 43, s. 260-290.

PURCHIARONI, F.; BEGINI, P.; MINNITII, G.; GALLINA, S.; DELLE FAVE, G.; MARIGNANI, M.: Glioblastoma multiforme and hepatitis B:do the right thing(s). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014, vol. 18, s. 3629-3631.

RAMIREZ, Y.; WEATHERBEE, J.; WHEELHOUSE, R.: Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals*. 2013, vol. 6, s. 1475-1506.

ROOSENBERG, S.; LAVERMAN, P.; JOOSTEN, L.; COOPER, S.; KOLENC-PEITL, P. K.; FOSTER, J. M.; HUDSON, C.; LEYTON, J.; BURNET, J.; OYEN, W. J. G.; BLOWER, P. J.; MATHER, S. J.; BOERMAN, O. C.; SOSABOWSKI, J. K.: PET and SPECT Imaging of a Radiolabeled Minigastrin Analogue Conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and Labeled  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{111}\text{In}$ . *Molecular Pharmaceutics*. 2014, vol. 11, s. 3930–3937.

Scottdalesupplyonline. High Detection Rate of Tumours using PET CT Scans in India. [Online] 2017. [Citace: 21. 4. 2017]. Dostupné na URL: [scottdalesupplyonline.com/high-detection-rate-tumours-using-pet-ct-scans-india.htm](http://scottdalesupplyonline.com/high-detection-rate-tumours-using-pet-ct-scans-india.htm).

SHI, J.; ZHOU, Y.; CHAKRABORTY, S.; KIM, Y. S.; JIA, B.; WANG, F.; LIU, S.: Evaluation of  $^{111}\text{In}$ -labeled cyclic RGD peptides: effects of peptide and linker multiplicity on their tumor uptake, excretion kinetics and metabolic stability. *Theranostics*. 2011, vol. 1, s. 322-340.

ŠLAMPA, P.; BURKOŇ, P.; KOMÍNEK, L.: Glioblastom přehled léčby [Online] 2010. [Citace 4. 3. 2017]. Dostupné na URL: [zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/glioblastom-prehled-lecby-454084](http://zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/glioblastom-prehled-lecby-454084).

TEIXEIRA, V.; BLATTNER, S. M.; LI, M.; ANDERS, H-J.; COHEN, C. D.; EDENHOFER, I.; CALVARESI, N.; MERKLE, M.; PIA RASTALDI, M.: Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney International*. 2005, vol 67, s. 514–523.

The Carcinoid Cancer Foundation. First Northeastern Facility Offers Gallium-68 DOTATOC PET/CT Imaging for Carcinoid and Neuroendocrine Cancer Patients. [Online] 2015. [Citace: 20. 3. 2017]. Dostupné na URL: [www.carcinoid.org/2015/02/09/first-northeastern-facility-offers-gallium-68-dotatoc-petct-imaging-for-carcinoid-and-neuroendocrine-cancer-patients](http://www.carcinoid.org/2015/02/09/first-northeastern-facility-offers-gallium-68-dotatoc-petct-imaging-for-carcinoid-and-neuroendocrine-cancer-patients).

VILLA, S.; BALANA, C.; COMAS, S.: Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Chinese Journal of Cancer*. 2014; vol. 33, s. 25-31.

VOGELSTEIN, B., SUR, S.; PRIVES, C.: p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. *Nature Education*. 2010, vol. 3, s. 6.



- WANG, Fen, et al. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *International journal of molecular sciences*. 2013, vol. 14, s. 13447-13462.
- WANG, I.; PUC, J.; LI, J.; BRUCE, J.; CAIRNS, P.; SIDRANSKY, D.; PARSONS, R.: Somatic Mutations of PTEN in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research*. 1997, vol. 57, s. 4183-4186.
- WU, 2005
- XIONG, J-P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S.; ARNAOUT, M.: Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha v\beta 3$  in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science*. 2002, vol. 296, s. 151-155.
- YOSHIMOTO, M.; OGAWA, K.; WASHIYAMA, K.; SHIKANO, N.; MORI, H.; AMANO, R.; KAWAI, K.:  $\alpha v\beta 3$  Integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *Int. J. Cancer*. 2008, vol. 123, s. 709–715.
- YOUNG, M. R.; JAMSHIDI, A.; DAVIS, G.; SHERMAN, J.: Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of Translational Medicine*. 2015, vol. 3, s. 121-136.
- YU, S.; PING, Y.; YI, L.; ZHOU, Z.; CHEN, J.; YAO, X.; GAO, L.; WANG, J. M.; BIAN, X.: Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters*. 2008, vol. 265, s. 124–134.
- ZHANG, J.; XIAOLI, L.; WAN, N.; HUA, Z.; WANG, Z.; HUANG, H.; YANG, M.; WANG, F.:  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NGR as a novel molecular probe for APN-positive tumor imaging using MicroPET. *Nuclear Medicine and Biology*. 2014, vol. 41, s. 268–275.
- ZIMMERMAN, B. E.; CESSNA, J. T.; FITZGERALD, R.: Standardization of  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  using three liquid scintillation counting based methods. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2008, vol. 113, s. 265-280.