



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

**Radioaktivně značené derivatizované siderofory pro  
diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Romana Christová</b>
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2018

## Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora</b>	Romana Christová
<b>Název práce</b>	Radioaktivně značené derivatizované siderofory pro diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění
<b>Typ práce</b>	Diplomová
<b>Pracoviště</b>	Laboratoř růstových regulátorů
<b>Vedoucí práce</b>	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce</b>	2018

### Abstrakt

Nádorová a infekční onemocnění jsou velmi častá, nebezpečná a život ohrožující onemocnění. Vysoká úmrtnost u onkologických pacientů a pacientů s infekčními komplikacemi je způsobena mimo jiné nedostatkem včasné, dostatečně specifické a senzitivní diagnostiky. Zobrazovací metody nukleární medicíny umožňují diagnostiku prostřednictvím radioaktivně značených látek pro cílenou lokalizaci zkoumané poškozené tkáně nebo orgánu a mohly by splňovat vysoké diagnostické nároky. Siderofory jsou nízkomolekulární látky produkované bakteriemi, houbami a některými rostliny s vysokou afinitou pro železité ionty. Bylo prokázáno, že různé siderofory mohou být značeny galliem-68, díky podobnosti mezi  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$ , které v posledních letech získalo velkou pozornost v oblasti nukleární medicíny pro molekulární zobrazování nádorových a infekčních onemocnění pomocí pozitronové emisní tomografie (PET). Některé siderofory jako je fusarinin C (FSC) mohou být derivatizovány například RGD peptidy, které jsou ligandem pro integrin  $\alpha_v\beta_3$ , nadměrně exprimovaný v některých nádorových buňkách a být využitelné pro diagnostiku lidského glioblastomu. Synteticky modifikovaný siderofor *tri*-propionylfusarinin C (TPFC), vykazuje podobné strukturní vlastnosti

jako triacetylfusarinin C (TAFC), u kterého byly prokázány vynikající vlastnosti pro detekci invazivní aspergilózy. Derivatizované siderofory značené galliem-68 vykazovaly vysokou *in vitro* stabilitu, velmi dobré farmakokinetické vlastnosti a *in vivo* akumulaci ve studovaných tkáních pomocí PET/CT zobrazování. Na základě těchto výsledků, lze tyto experimentální radioaktivně značené látky považovat za vhodné pro potenciální použití v klinické praxi.

<b>Klíčová slova</b>	Glioblastom, invazivní aspergilóza, PET/CT zobrazení, siderofory, <i>tri</i> -propionylfusarinin C a fusarinin C
<b>Počet stran</b>	79
<b>Jazyk</b>	Český

## Bibliographical identification

<b>Author's first name and surname</b>	Romana Christová
<b>Title of thesis</b>	Radiolabelled siderophore derivatives for detection of cancer and infection
<b>Type of thesis</b>	Diploma
<b>Department</b>	Laboratory of Growth Regulators
<b>Supervisor</b>	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
<b>The year of presentation</b>	2018

### Abstract

Cancer and infectious diseases are very common, dangerous and life-threatening diseases. High patient mortality is caused also by the lack of early, specific and sensitive diagnostic techniques. Nuclear medicine imaging methods allow the diagnostics with radiolabelled molecules for targeted localization of the damaged tissue or organ and could fulfill the high diagnostic demands. Siderophores are low-molecular-weight molecules produced by bacteria, fungi and some plants with high affinity for ferric ions. It has been shown that various siderophores can be labelled with gallium-68 based on the similarities between  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$  which in recent years has received great attention in the field of molecular imaging of tumour and infection diseases using positron emission tomography (PET). Some siderophores such as fusarinine C (FSC) may be derivatized by RGD peptides which are integrin  $\alpha_v\beta_3$  ligands overexpressed in tumor cells and may be useful for the diagnosis of glioblastoma. The synthetically modified siderophore *tri*-propionylfusarinine (TPFC) showed similar structural properties as triacetylfusarinine C (TAFC), which showed excellent properties for the detection of invasive aspergillosis. Derivatized siderophores labelled with  $^{68}\text{Ga}$  showed high *in vitro* stability, very good

pharmacokinetic properties, and *in vivo* accumulation in the studied tissues by PET/CT imaging. Based on these results, these experimental radiolabelled molecules can be considered suitable for potential use in clinical practice.

<b>Keywords</b>	Glioblastoma, invasive aspergillosis, PET/CT imaging, siderophores, <i>tri</i> -propionyl fusarinine C and fusarinine C
<b>Number of pages</b>	79
<b>Language</b>	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne: .....

Podpis: .....

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Miloši Petříkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a trpělivost při zpracování této práce.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>3</b>
<b>1 ÚVOD A CÍLE.....</b>	<b>5</b>
<b>2 STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Nádorová onemocnění.....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Glioblastom .....	8
2.1.1.1 Diagnostika glioblastomu .....	10
<b>2.2 Infekční onemocnění.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Invazivní aspergilóza .....	11
2.2.1.1 Diagnostika.....	14
2.2.1.1.1 Mikrobiologické metody.....	15
2.2.1.1.2 Serologické testy.....	15
2.2.1.1.3 Výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (HRCT) .....	16
2.2.1.1.4 PET zobrazení pomocí <sup>68</sup> Ga-TAFC .....	17
<b>2.3 Zobrazovací metody .....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Výpočetní tomografie (CT).....	19
2.3.2 Magnetická rezonance (MRI).....	20
2.3.3 Pozitronová emisní tomografie (PET).....	22
2.3.4 Hybridní systémy (PET/CT a PET/MR) .....	25
2.3.5 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT).....	25
<b>2.4 Základní pojmy nukleární medicíny.....</b>	<b>27</b>
2.4.1 Radiofarmaka .....	27
2.4.2 Radionuklidy .....	28
2.4.2.1 Přeměny radionuklidů.....	29
2.4.2.2 Výroba radionuklidů.....	31
<b>2.5 Příprava radiofarmak značených <sup>68</sup>galliem.....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Výroba radionuklidu <sup>68</sup> Ga.....	34
2.5.2 Příprava značení cílových molekul galliem-68 .....	35
2.5.3 Siderofory .....	36
2.5.4 RGD peptidy.....	39
2.5.4.1 <sup>68</sup> Ga-FSC-(succ-RGD) <sub>3</sub> .....	40
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>42</b>



<b>3.1</b>	<b>MATERIÁL .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Přístrojové vybavení .....	42
3.1.2	Použité chemikálie.....	42
3.1.3	Použité zvířecí modely .....	42
<b>3.2</b>	<b>METODY .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Radioaktivní značení .....	43
3.2.2	Kontrola kvality radioaktivního značení .....	43
3.2.3	In vitro stabilita.....	44
3.2.4	Rozdělovací koeficient (log P) .....	44
3.2.5	Vazba na proteiny.....	45
3.2.6	PET/CT zobrazování .....	45
3.2.7	Ex vivo biodistribuce.....	46
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub>.....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Radioaktivní značení a kontrola kvality .....	47
4.1.2	In vitro stabilita.....	48
4.1.3	Rozdělovací koeficient (log P) .....	49
4.1.4	Vazba na proteiny .....	49
4.1.5	PET/CT zobrazení nádorových myší.....	50
4.1.6	Ex vivo biodistribuce.....	52
<b>4.2</b>	<b>Derivatizovaný siderofor TPFC.....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Radioaktivní značení a kontrola kvality .....	54
4.2.2	In vitro stabilita.....	55
4.2.3	Rozdělovací koeficient (log P) .....	56
4.2.4	Vazba na proteiny .....	56
4.2.5	PET/CT zobrazení infikovaných a neinfikovaných potkanů.....	56
4.2.6	Ex vivo biodistribuce.....	58
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>67</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## SEZNAM ZKRATEK

BAL	Bronchoalveorální laváž
BFC	Bifunkční chelátor
BG	1,3- $\beta$ -D-glukan
CDKN2A	Cyklin-dependentní kinasový inhibitor 2A
CGD	Chronická granulomatózní choroba
CNS	Centrální nervový systém
CT	Počítačová tomografie
DFO	Desferoxamin B
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	Dietyltriainpentaoctová kyselina
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assai
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin
FDG	Fluorodeoxyglukosa
FSC	Fusarinin C
GBM	Glioblastom
GM	Galactomannan
HIV	Virus lidské imunodeficience
HPMA	N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid
HRCT	Výpočetní tomografie s vysokým prostorovým rozlišením
HSCT	Transplantace krvetvorné kmenové buňky
HU	Hounsfieldova jednotka
IA	Invazivní aspergilóza
IFN	Interferon
L-AmB	Liposomální amfotericin B
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MR	Magnetická rezonance
MRI	Magnetické rezonanční zobrazování
MRS	Magnetické rezonanční spektroskopie
NODAGA	1,4,7-triazacyklononan- <i>N</i> -glutamová kyselina- <i>N'</i> , <i>N''</i> -dioctová kyselina

NODASA	1,4,7-triazacyclononane- <i>N</i> -jantarová kyselina- <i>N',N''</i> -dioctová kyselina
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
PD	Denzita pozitronu
PET	Pozitronová emisní tomografie
PPV	Pozitivní prediktivní hodnota
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RF pulzy	Radiofrekvenční pulzy
RGD peptid	Peptid Arginin-glycin-aspartát
RNA	Ribonukleová kyselina
SIT	Sideroforový transportér železa
SPECT	Jednofotonová emisní tomografie
TAFC	Triacetylfusarinin C
TNF	Faktor nádorové nekrózy
TP53	Nádorový supresor proteinu p53
TPFC	<i>tri</i> -propionyl fusarinin
T1W	T1-vážený obraz
T2W	T2-vážený obraz
WHO	Světová zdravotnická organizace

# 1 ÚVOD A CÍLE

Nádorová a infekční onemocnění jsou nebezpečná, život ohrožující, stále častěji se vyskytující onemocnění. Glioblastom se řadí mezi nejzávažnější primární nádorové onemocnění mozku, vyskytující se zejména u dospělých jedinců. Prognóza je velmi špatná, pacienti se dožívají i při maximální možné terapii asi 12,1–14,6 měsíců od stanovení diagnózy, přičemž jen 3-5 % pacientů přežívá déle než tři roky (Krex et al., 2007). Jednou z nejzávažnějších mykotických infekcí na světě je invazivní aspergilóza (IA), způsobená vláknitou houbou *Aspergillus fumigatus*, která je vysoce nebezpečná zejména u těžce imunodeficientních pacientů (Tekaiia a Latgé, 2005). Celková úmrtnost IA je velmi vysoká, pohybuje se od 40-90 % (Lin et al., 2001). Včasná a přesná diagnostika je tedy klíčovým faktorem pro zahájení účinné léčby nádorových i infekčních onemocnění a následné snížení mortality pacientů.

V průběhu posledních let byly zavedeny a zdokonaleny účinnější metody pro diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění. Velký pokrok byl zaznamenán také v oblasti zobrazovacích metod. Jednou z moderních zobrazovacích modalit je například pozitronová emisní tomografie (PET). Vyšetření PET zahrnuje použití specifických radioaktivních farmak, které mohou umožnit včasnou diagnostiku a sledování terapeutické odpovědi daného léčiva. Radiofarmakum se skládá z radionuklidu, který signalizuje lokalizaci a množství radiofarmaka v těle a biologicky aktivní složky, která zajišťuje přítomnost radiofarmaka v místě, které chceme vyšetřit nebo farmakologicky ovlivnit (Kubinyi, 2015). Ve spojení s výpočetní tomografií (CT) můžeme u daného onemocnění určit souběžně strukturu a funkci zkoumané tkáně a následně stanovit přesnější staging pacienta než v samotném použití jednotlivých zobrazovacích technik (Evanko, 2008).

Nejpoužívanějším radiofarmakem pro diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění je  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglukóza. Hlavní nevýhodou této látky je, že může vykazovat falešně pozitivní a negativní výsledky v důsledku své akumulace v nádorových, zánětlivých i infekčních buňkách (Jacobson et al., 2012). Proto jsem se v mé diplomové práci zaměřila na testování nových potenciálních radiofarmak využitelných pro diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění pomocí pozitronové emisní tomografie.

Cílem mé diplomové práce byla příprava radioaktivně značených biologicky aktivních látek ze skupiny derivatizovaných sideroforů pro diagnostiku onkologických a infekčních onemocnění. Dále stanovit jejich *in vitro* charakterizaci a *in vivo* biologické chování ve vhodných zvířecích modelech a vypracovat literární rešerši na dané téma diplomové práce.

## 2 STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Nádorová onemocnění

S více než 3,7 milióny nových případů a 1,9 miliónů úmrtí ročně je rakovina považována za druhé nejčastější onemocnění v Evropě (WHO, Europe). V České republice na nádorové onemocnění připadá odhadem 576,3 tisíc nových případů (Ferlay *et al.*, 2013). K tomu bychom snížili incidenci nádorových onemocnění, potřebujeme porozumět procesům a změnám fenotypu nádorových buněk. Nádor je patologický soubor buněk, který roste nekontrolovaným způsobem a vzniká transformací normální buňky v nádorovou. Změna může být způsobena vnějšími nebo vnitřními podněty a může mít vliv na téměř jakoukoli část těla. Buňky s metastazujícím potenciálem jsou schopny proniknout přes bazální membránu epitelových buněk, kolonizovat se a šířit do okolní tkáně. Metastáze je jedním z hlavních znaků malignity nádorového onemocnění a nejčastější příčinou úmrtí pacienta. Rizikové faktory jako jsou kouření a konzumace alkoholu způsobuje 40 % nádorových onemocnění a přidáním dalších faktorů jako je nevhodná strava, obezita a nedostatečná fyzická aktivita, se procento rakoviny způsobené nezdravým způsobem života zvýší na 60 % (<http://www.euro.who.int>).

Hlavním problémem nádorových onemocnění je široká škála příčin a projevů těchto onemocnění. Cílem dnešní medicíny v oblasti nádorových onemocnění je co nejpřesnější poznání jednotlivých příčin při diagnostice nádorových onemocnění. Ačkoliv je pro léčbu rakoviny včasná diagnostika klíčová, bývá velmi obtížná. Nádorová onemocnění se diagnostikují pomocí široké škály různorodých technik, jako jsou biochemické, genetické, bioptické, cytologické a zobrazovací metody. Základními možnostmi léčby nádorových onemocnění je chirurgická resekce nádoru, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie a další adjuvantní terapie.

### 2.1.1 Glioblastom

Mozek má dva hlavní typy buněk – neurony a gliové buňky. Neurony jsou vysoce specializované buňky schopné přenášet a zpracovávat informace v celém nervovém systému díky elektrickým a chemickým signálům. Gliové buňky poskytují podporu pro neurony a pomáhají regulovat přenos signálu.

Většina nádorů centrálního nervového systému (CNS) jsou odvozeny od gliové buňky (gliomy). Současnou mezinárodní normou pro nomenklaturu a diagnostiku gliomů je klasifikace dle WHO (Světová zdravotnická organizace). Ta klasifikuje gliomy stupněm I až IV, na základě úrovně malignity, která je určena histopatologickými kritérii. Gliomy stupně I (astrocytom) se týkají lézí, které mají nízký proliferativní potenciál a mohou být léčeny chirurgickým zákrokem, zatímco gliomy stupně II (astroblastom), III (anaplastický astroblastom) a IV jsou vysoce maligní a invazivní. Nejčastějším a nejagresivnějším typem gliomu je glioblastom, který je značen dle WHO jako stupeň IV (Jovčevska et al., 2013).

Glioblastom (GBM) je primární maligní nádor mozku. Tvoří 25 % všech nádorů centrálního nervového systému (ENCR, 1999). Glioblastomy jsou typicky umístěny na povrchu hemisfér mozku a jen zřídka v mozečku nebo v hlubších oblastech mozku. Ačkoliv se jedná o zhoubný nádor, velice vzácně zakládá metastázy. Roste expanzivně, ve tvaru nepřesně ohraničené tkáně měkké konzistence. Často je ložiskovitě prokrvácený a nekrotický (Burger et al., 1985). Dělí se na primární a sekundární glioblastom. Tyto typy glioblastomu představují odlišné onemocnění, které se vyvíjí různými genetickými cestami, ovlivňují pacienty v různých věkových kategoriích a liší se různou prognózou a odpovědí na léčbu. Primární GBM vzniká *de novo*, bez klinických a histologických důkazů prekurzorové léze. Vykazuje nadměrnou expresi receptoru epidermálního růstového faktoru EGFR, mutaci fosfatázového tenzinového homologu PTEN (MMAC1), delecí cyklin-dependentní kinázy CDKN2A (p16) a amplifikaci myšího homologa MDM2 (Ohgaki a Kleihues, 2007). Vyskytuje se převážně u starších osob (průměrný věk 55 let) (Ostrom et al., 2013). Tvoří více než 80 % všech případů glioblastomu (Dropcho a Soong, 1996). Sekundární glioblastom vzniká transformací nízce maligního gliomu nebo anaplastického astrocytomu. Vyskytuje se u mladších osob (průměrný věk 40 let) a často obsahuje mutace

proteinu TP53 (Taylor et al., 2014). Představuje 5 % případů glioblastomu (Kleihues et al., 1999). Oba typy nelze od sebe histopatologicky rozlišit (Ohgaki a Kleihues, 2007).

V Evropě a USA jsou každý rok diagnostikovány asi 2-3 případy na 100 000 osob s maligním glioblastomem. Výskyt bývá ve vyspělých zemích vyšší. Nicméně nižší incidence je zaznamenána v Japonsku a Alžírsku, která může být způsobena nedostatečnou registrací (Brandes et al., 2008). Průměrný věk při diagnóze je 64 let a je 1,5krát častější u mužů než u žen a 2krát častější u bělochů než u černochů (Ostrom et al., 2013; Thakkar et al., 2014). Výskyt se za posledních 20 let mírně zvýšil především kvůli lepší radiologické diagnostice, zejména u starších osob (Fisher et al., 2007).

Glioblastom škodí především svým rychlým růstem. Příznaky glioblastomu se mohou lišit v závislosti na velikosti a poloze nádoru v mozku. Mezi nejčastější příznaky patří zvýšení intrakraniálního tlaku projevující se jako nevolnost, zvracení a bolesti hlavy. Dalšími příznaky glioblastomu jsou změny osobnosti a nálad, poruchy zraku, epileptické záchvaty, kognitivní poruchy nebo zpomalení kognitivní funkce (např. ztráta schopnosti mluvit), motorická dysfunkce jako je paralýza a smyslové ztráty (např. necitlivost, slabost) (Young et al., 2015; Brandes et al., 2008).

S výjimkou vzácných případů glioblastomu u pacientů s dědičným nádorovým syndromem, např. Turcotův syndrom nebo Li-Fraumeniův syndrom většina nádorů pochází bez jakékoliv známé genetické predispozice. Některé studie hodnotily vliv různých exogenních faktorů, jako je kouření, neionizující záření mobilních zařízení, elektromagnetické pole, socioekonomický status a úroveň vzdělání, imunologický stav a virové infekce. Neexistují však jednoznačné důkazy, které by spojovaly tyto rizikové faktory s glioblastomem, kromě ionizujícího záření (Krex et al., 2007). Ionizující záření je jedním z mála známých rizikových faktorů, které jednoznačně vykazují zvýšené riziko vývoje gliomů (Ellor et al., 2014). Glioblastom vyvolaný radiací se typicky projevuje roky po terapeutickém záření indikovaném pro jiný nádor nebo stav (Johnson et al., 2015).

Standardní léčbou glioblastomu je chirurgická resekce takového množství nádoru, jaká je bezpečná pro pacienta, následovaná radiační terapií a adjuvantní chemoterapií (systémová léčba temozolomidem) (Stupp et al., 2005). Střední doba přežití je i při



maximální možné terapii asi 12,1–14,6 měsíců od stanovení diagnózy, přičemž jen 3–5 % pacientů přežívá déle než tři roky (Krex et al., 2007).

### **2.1.1.1 Diagnostika glioblastomu**

Cílem diagnostického vyšetření je podrobný popis morfologické struktury orgánů nebo tkání a především testování jejich fyziologické funkce. Zobrazování pomocí magnetické rezonance (MRI) a počítačové tomografie (CT) jsou nejběžnějšími typy zobrazovacích testů využívaných k diagnostice glioblastomu (Nelson a Cha, 2003). Glioblastom je obvykle charakterizován rozsáhlým ložiskem, nehomogenní intenzity signálu, s cystickou či nekrotickou složkou, doprovázen edémem (Vymazal, 2006).

Výpočetní tomografie (CT) umožňuje určit velikost a strukturu nádoru a jeho vztah k okolním tkáním a strukturám. Při CT vyšetření se léze glioblastomu vyskytují většinou ve formě hypodenzní oblasti ve srovnání s přilehlými mozkovými tkáněmi a obvykle vykazují posun středové linie v důsledku středně těžkého až těžkého otoku (Omuro a DeAngelis, 2013).

Vyšetření magnetickou rezonancí ukazuje heterogenní, expanzivně se chovající útvar často utlačující komory a přetlačující středočárové struktury. Typicky se objevuje prstenčité zvýšení denzity na okraji centrálně uložených nekrotických oblastí přecházející do okolního edému (Nelson a Cha, 2003). Na MR skenech se zobrazuje snížený signál na T1-vážené sekvenci a nehomogenně zvýšený signál je vizualizován na T2-vážených sekvencích (Seidl a Vaněčková, 2007).

Při hodnocení změn hemodynamiky, tkáňové architektury a buněčného metabolismu gliomů mohou být využity metody jako je jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET) (Nelson a Cha, 2003). Avšak nevýhodou PET zobrazení je obtížnost anatomicky přesné lokalizace zobrazených ložisek. Proto se kombinuje s výpočetní tomografií v jednom přístroji (PET/CT). Pacienti jsou snímáni jak PET, tak CT ve stejné pozici pacienta, čímž dosahujeme lepší diagnostiky, přesné anatomické lokalizace funkčního nálezu a korekce na zeslabení (Trnka, 2015). Jednotlivé metody jsou popsány v následující kapitole (2.3 Zobrazovací metody).

## 2.2 Infekční onemocnění

Infekční choroby vznikají následkem vzájemného působení mikroorganismů, které se nacházejí na povrchu kůže a sliznic, v horních cestách dýchacích, na sliznicích trávicího i urogenitálního systému. Mezi mikroorganismy vyvolávající infekci patří bakterie, viry, mikroskopické houby a živočišní parazité. Charakteristickou vlastností většiny původců onemocnění je schopnost přenesení nákazy z člověka na člověka. Proces nákazy probíhá cestou vdechnutí, polknutí, prostřednictvím členovců nebo z kontaminovaných potravin. Pro vznik infekčního onemocnění je důležitá velikost infekční dávky a virulence (schopnost vyvolat onemocnění) (Navrátil et al., 2008). U vysoce patogenních organismů stačí k vyvolání infekčního onemocnění malá dávka mikrobů. Ti se začnou nekontrolovaně množit, což vede k těžkému infekčnímu onemocnění nebo smrti.

Příznaky infekčních onemocnění nejsou zcela specifické, řadí se mezi nimi horečka, bolesti hlavy, nechutenství, zvracení a malátnost. Diagnostika je právě díky nespecifickým klinickým příznakům velmi obtížná. Uplatnění v diagnostice infekčních onemocnění nacházejí v současnosti zejména metody biochemické, mikrobiologické, imunologické a zobrazovací (Slezáková et al., 2012).

Léčba je navržena dle původce infekčního onemocnění. Bakteriální infekce jsou léčené antibiotiky a virové infekce virostatiky. Virostatika však mají někdy jen omezený účinek (hemoragické horečky, vzteklna). Proto byly navrženy interferony a virové protilátky (imunoglobuliny), vyráběné uměle imunitním systémem, které napadají přímo virus. Proti kvasinkám, plísním a parazitům účinkují různé látky.

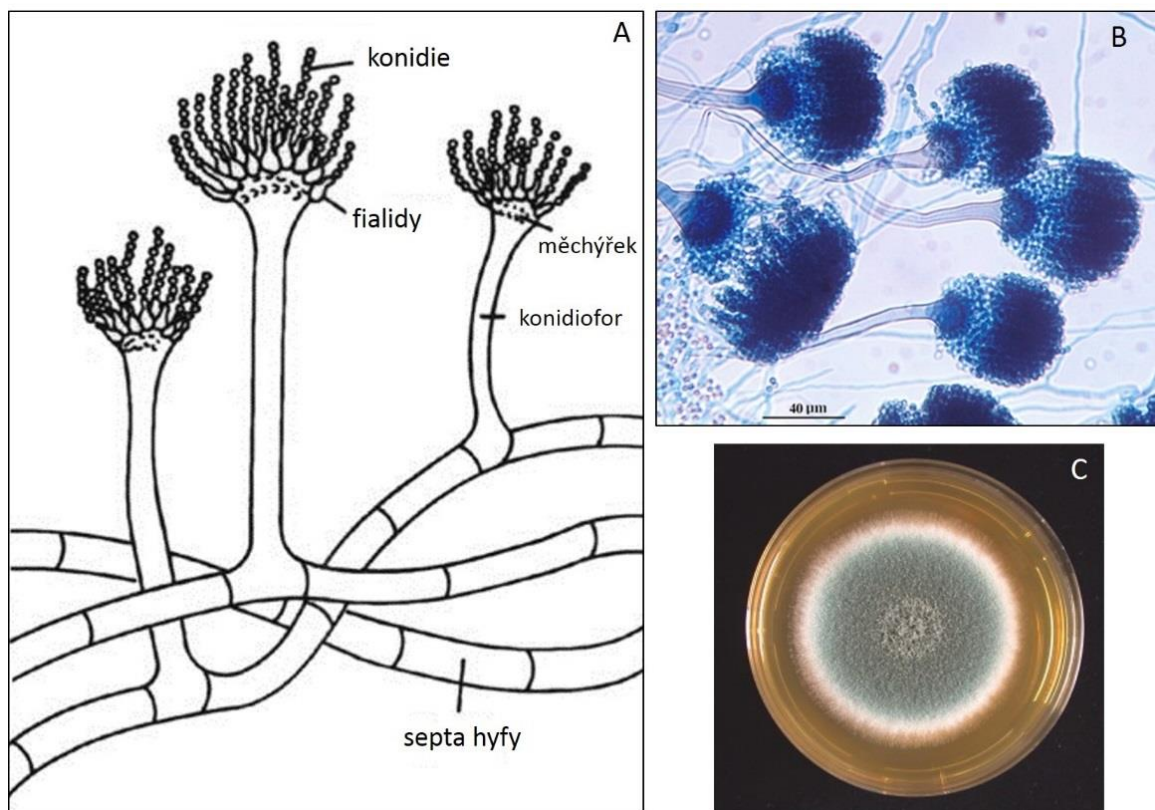
### 2.2.1 Invazivní aspergilóza

Aspergilóza je definována jako infekce způsobená jedním nebo více druhy hub rodu *Aspergillus*. Rod *Aspergillus* zahrnuje více než 200 druhů, z nichž jen malá skupina způsobuje infekční onemocnění. Více než 95 % všech infekcí je způsobeno *A. fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger*. K dalším klinicky významným druhům patří *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. ustus* a *A. versicolor* (Malcolm et al. 2009). Zástupci rodu *Aspergillus* jsou v okolním prostředí takzvaně „všudypřítomní“. Lze je nalézt, zvláště ve formě konidií nebo

části hyf, ve vodě, půdě, vzduchu nebo ulpívají na rostlinách či živočiších a mohou růst při teplotách až 40-50 °C (Walsch a Stevens, 2012). Setkání jedince s touto vláknitou houbou může způsobit širokou škálu onemocnění, od relativně méně závažných alergických forem přes aspergilom až po aspergilové infekce (aspergilózy), které mohou mít invazivní nebo chronický charakter a mohou být lokalizované nebo diseminované (Barnes a Marr, 2006)

Kolonie rodu *Aspergillus* mohou být v závislosti na druhu a podmínkách růstu různě barevné. Mycelium *Aspergillus spp.* je podobné jako u většiny dalších hub. Je dobře vyvinuté, rozvětvené a hyalinické. Myceliální fáze *Aspergillus spp.* je charakterizována silným růstem a bohatou produkcí konidií (asexuálních spor), pomocí nichž se *Aspergillus* rozmnožuje. Po určité době vegetativního růstu, buňky hyf zastaví svůj růst a zahájí konidiaci tvorbou konidioforů, které nesou řetězce konidií. Konidiální hlava je složena z konidií, fialidů, metuly, pokud jsou přítomny, měchýřku a konidioforu (Malcolm et al. 2009).

*Aspergillus fumigatus* je nejrozšířenějším houbovým patogenem, který způsobuje obvykle fatální invazivní plicní aspergilózy (Latgé, 2001). Primární cestou infekce člověka je vdechnutí vzdušných konidií, následovaná ukládáním konidií do průdušinek nebo alveolárních prostorů. U zdravých jedinců se konidie, která není odstraněna mukociliární clearancí, setkává s epiteliálními buňkami nebo alveolárními makrofágy, primárně rezidentními fagocytárními buňkami plic. Alveolární makrofágy jsou zodpovědné za fagocytózu konidie, stejně jako za iniciaci prozánětlivé odezvy, vyvolané neutrofilů, které jsou schopny zničit hyfy. Riziko vzniku invazivní aspergilózy vyplývá především z dysfunkce těchto hostitelských obranných mechanismů v kombinaci s houbovými atributy, které umožňují *A. fumigatus* přežít a růst (Dagenais a Keller, 2009).



Obr. 8: A. Schematické znázornění morfologie vláknité houby *A. fumigatus*. B. Mikroskopická morfologie *A. fumigatus*. C. Makroskopická morfologie *A. fumigatus* při použití média MEA (malt extract agar). Převzato z <http://www.abcdcatsvets.org/aspergillosis/>; <https://www.atcu.edu/faculty/chamberlain/website/lects/fungi.htm> a [http](http://www.abcdcatsvets.org/aspergillosis/)

Akutní invazivní aspergilóza se vyskytuje u imunokompromisních pacientů, zvláště u pacientů s hematologickými malignitami, transplantací hematopoetických kmenových buněk (HSCT), těžkou aplastickou anémií, primárními imunodeficity (HIV, CGD) a transplantací pevných orgánů, zejména transplantací srdce, plic a jater (Walsch a Stevens, 2012).

Hlavními faktory pro vývoj nebo progresi invazivní aspergilózy jsou: nedostatek aglutinačních povrchových aktivních proteinů a komplementových faktorů C3, C5; inhibice makrofágové aktivity; trombocytopenie a přetrvávající neutropenie; nízký počet CD4<sup>+</sup> T lymfocytů nebo selhání produkce interleukinu IL-12, INF (interferon) nebo TNF (tumor nekrotující faktor); onemocnění vyvolané cytomegalovirem, primární imunodeficity a dlouhodobá léčba antibiotiky nebo kortikosteroidy, které se běžně používají k prevenci nebo léčbě onemocnění štěpu (Aleksenko a Gyasi, 2006). Navzdory účinkům steroidů se

neutrofilů rekrutují do plic, zabraňují invazi hyf a vytvářejí zánětlivé prostředí, které vede k poškození tkání. Tato zhoršená zánětlivá odpověď je obecně považována za příčinu smrti (Lionakis a Kontoyiannis, 2003)

Míra úmrtnosti se pohybuje od 40-90 % u vysoce rizikových populací a závisí na faktorech, jako je imunitní stav hostitele, místo infekce a použitý léčebný režim (Lin et al., 2001). Klinické symptomy a příznaky spojené s invazivní plicní aspergilózou jsou nejasné, ale mohou být spojeny s horečkou, kašlem, pleuritickou bolestí a hemoptýzou. Hemoptýza a pleuritická bolest by měla být považována za alarmující příznaky, které mohou předvídat erozi hlavní cévy a fatálního krvácení. Okamžité rozpoznání této houbové infekce je nezbytné pro úspěšný výsledek intenzivní antifungální léčby (Denning, 1998).

Základem léčby IA je léčba antifungálními látkami. Amfotericin B deoxycholát, byl donedávna primární antifungální léčbou invazivní aspergilózy. Amfotericin B je rychle fungicidní, ale jeho hlavním omezením jsou toxické nežádoucí účinky. Použití amfotericinu B pro léčbu invazivní aspergilózy bylo z velké části nahrazeno bezpečnějšími a účinnějšími sloučeninami (Malcolm et al., 2009). Například vorikonazolem, který je v současnosti antifungální látkou volby pro léčbu většiny pacientů. Pacienti, kteří mají podstatně zvýšené jaterní transaminázy, jaterní dysfunkci a anamnézu přecitlivělosti nebo intoleranci na vorikonazol, dostávají liposomální amfotericin B (L-AmB). Sekundární léčbou jsou lipidové formy amfotericinu B, posakonazolu, itraconazolu nebo echinokandinu (Walsh a Stevens, 2012).

### **2.2.1.1 Diagnostika**

Včasná diagnostika invazivní aspergilózy (IA) je náročná kvůli nedostatku specifických klinických projevů infekce. Pokroky v počítačové tomografii odhalily charakteristické znaky invazivní aspergilózy, jimiž jsou plicní uzliny s „halo“ znakem, klínovité infiltráty a příznaky tvorby „vzdušných pŕlměsícu“ u imunokompromisních pacientů (Walsh a Stevens, 2012). Infekce způsobené *Fusarium spp*, *Scedosporium spp*, *Mucorales* a *Pseudomonas aeruginosa* však nejsou radiologicky rozlišitelné od IA a nálezy jsou nejednoznačné, je proto potřeba kombinovat tyto výsledky s cytologickým,

mikrobiologickým a sérologickým vyšetřením tekutiny z bronchoalveolární laváže (BAL) nebo ještě lépe materiálu z biopsie nebo resekce postiženého orgánu a s vyšetřením přítomnosti aspergilového antigenu v séru (Ráčil a Mayer, 2007).

#### **2.2.1.1.1 Mikrobiologické metody**

Konvenční metody, založené na histologii a kultivaci daných vzorků, jsou základními metodami pro stanovení definitivní diagnózy IA. Využívají se vzorky z bronchoalveolární laváže (BAL), aspirace perkutánní jehly, thorakoskopické biopsie a případně otevřené plicní biopsie. Mohou prokázat rozvětvené septátové hyfy přímou mikroskopií. Každý z těchto postupů je spojen s falešně negativními výsledky, stejně jako s komplikacemi. Naopak, detekce *Aspergillus* přímým vyšetřením nebo kultivací tkáně imunokompromisního hostitele s plicními uzly nebo dobře ohraničenými infiltracemi nese vysokou pravděpodobnost diagnózy invazivní aspergilózy (Walsh a Stevens, 2012).

Vzorky získané BAL sice vykazují vysokou pozitivní prediktivní hodnotu (PPV > 60%) pro diagnostiku IA u pacientů s oslabenou imunitou. Nicméně, jejich citlivost (<30%) je nepříjemně nízká a obvykle se stávají pozitivní pro IA v pozdním stádiu infekce nebo pozitivní kultura neindikuje infekci, ale může představovat pouze kolonizaci (Horvath a Dummer, 1996).

#### **2.2.1.1.2 Serologické testy**

Jak již bylo uvedeno, tradiční mikrobiologické metody (kultivace klinických vzorků a přímá mikroskopie) mají nízkou citlivost a nelze rozeznat stádium infekce od kolonizace. Dále v některých případech u pacienta je problém se získáním relevantního materiálu. Z těchto důvodů byly v posledních letech vyvinuty způsoby detekce různých markerů. Vhodnými markery mohou být galaktomannan (GM) nebo 1,3-β-D-glukan (BG).

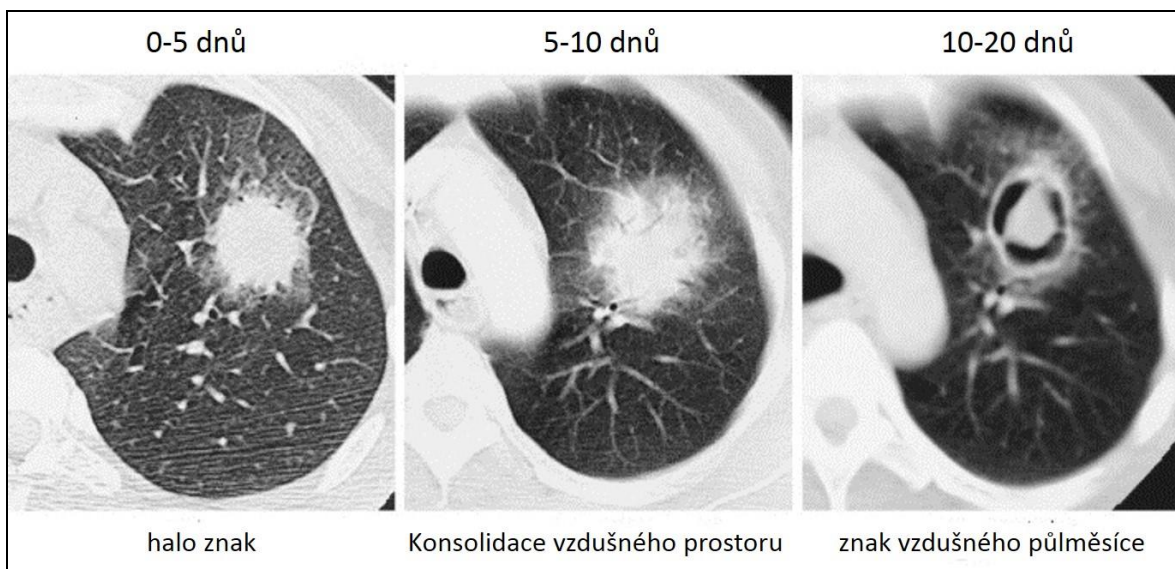
Galaktomannan (GM) je heteropolysacharid obsažený v buněčné stěně *Aspergillus spp.* Uvolňuje se do krevního oběhu během růstu ve tkáních a je tedy detekovatelný v tělesných tekutinách, zejména v séru pacienta s IA (Maertens et al., 2002). Molekula galaktomannanu je detekována komerčním sendvičovým testem ELISA (Platelia

Aspergillus, Biorad). Test se provádí převážně u pacientů s neutropenií, kteří podstoupili chemoterapii v léčbě leukémie nebo u příjemců HSCT. Může tak pomoci předčasně diagnostikovat IA (průměrná doba je 6 dní před tím, než se projeví známky a symptomy onemocnění) předtím, než se infekce stane příliš rozšířenou nebo sledovat terapii IA. Hladiny koncentrace v séru se snižují, pokud pacient reaguje na antifungální léčbu a zvyšuje se selháním léčby (Mennink-Kersten et al., 2004; Patterson T.F. et al., 1995).

Marker 1,3-β-D-glukan (BG) je rovněž dalším polysacharidem obsažený v buněčné stěně všech patogenních kvasinek a vláknitých hub kromě zygomycetů nebo kryptokoků, detekovatelný spektrofotometricky nebo turbidimetrií (Miyakazi et al., 1995). Vyšetření je velmi citlivé (dokáže detekovat koncentrace v řádu pg/ml), což pravděpodobně způsobuje falešně pozitivní výsledky. Falešně pozitivní výsledky byly taky objeveny u pacientů s jaterní cirhózou, podstupující hemodialýzu, po operaci břicha, po léčbě antibiotiky nebo chemoterapie. Monitorování BG v séru je užitečným nástrojem pro předpověď terapeutického výsledku pacientů s IA (Pazos et al., 2005). Nicméně, BG je méně specifitější a citlivější než GM (Malcolm et al. 2009).

### **2.2.1.1.3 Výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (HRCT)**

Výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (HRCT) může odhalit malé klínovité subpleurální léze nebo uzliny se znakem „halo“ v časných fázích. Aby bylo HRCT užitečné pro diagnózu IA, musí být provedeno do 5 dnů od nástupu infekce, jelikož počáteční znak halo vymizí během týdne. Při regeneraci neutrofilů, tyto léze splynou a vytvoří se znak "vzdušného pŕlměsíce", což je klasický znak pozdní fáze infiltrační infekce. Objevuje se až ve třetím týdnu invaze infekce, což je příliš pozdě na to, aby tento znak byl použitý pro včasnou diagnostiku (Greene, et al., 2003).



Obr. 9: Zobrazení vývoje invazivní aspergilózy, pomocí výpočetní tomografie. Převzato z Walsh a Stevens, 2012.

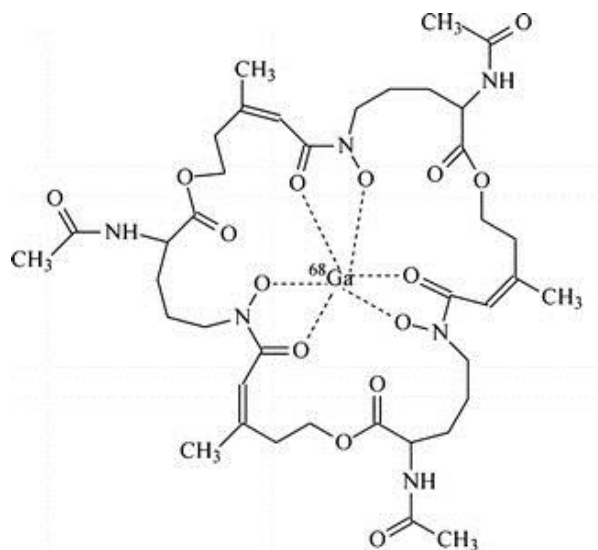
#### 2.2.1.1.4 PET zobrazení pomocí $^{68}\text{Ga}$ -TAFC

Triacetylfusarinin C (TAFC) je acetylovaná forma fusarininu C., patřící do skupiny hydroxymátových sideroforů. Je biosyntetizován rody *Aspergillus* (zejména *Aspergillus fumigatus*) a *Penicillium*. Má velmi dobré komplexotvorné vlastnosti pro  $^{68}\text{Ga}$ , což vede k vysoké specifické aktivitě a vynikající metabolické stabilitě (Winkelmann a Drechsel, 1997).

Sideroforový systém je nezbytný pro virulenci *Aspergillus fumigatus*, který je hlavním patogenem odpovědným za infekční onemocnění invazivní aspergilózy (IA). Například při *in vitro* a *in vivo* pokusech u myši infikovaných *A. fumigatus* bylo zjištěno, že biosyntéza sideroforů se transkripčně zvyšuje během doby bez příjmu železa a genetická inaktivace biosyntézy sideroforu zmírňuje virulenci *A. fumigatus* (McDonagh et al., 2008; Schrettl et al., 2007). Kromě toho bylo prokázáno, že siderofor triacetylfusarinin C (TAFC) produkováný *A. fumigatus* je schopen extrahovat železo z hostitelského transferinu (Hissen a Moore, 2005).



Radioaktivně značené siderofory tak mohou být použity pro PET zobrazení invazivní aspergilózy a pro včasnou diagnostiku IA. Jsou připravovány zavedením vhodného radionuklidu do přírodního železito-sideroforového komplexu výměnou za železo. Jelikož gallim-68 ( $\text{Ga}^{3+}$ , iontový poloměr = 62 pm) a železo ( $\text{Fe}^{3+}$ , iontový poloměr = 64 pm) jsou strukturně podobné a mají podobné koordinační vlastnosti, gallim-68 se tak stává vhodným radionuklidem pro značení TAFC. Bylo zjištěno, že  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC umožňuje detekovat infekci invazivní aspergilózy pomocí PET zobrazení (Petrik et al., 2010).



Obr. 10: Chemická struktura  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC. Převzato z Petrik et al., 2010.

## 2.3 Zobrazovací metody

### 2.3.1 Výpočetní tomografie (CT)

CT snímky jsou schopné vytvářet obrazy mozku a míchy, dále mohou odhalit struktury měkkých tkání, kostí, ale i abdominálních struktur. Jedná se o zobrazování vhodné pro většinu břišních a hrudních onemocnění, dále i pro mozkovou příhodu při poranění hlavy nebo akutní mrtvici (Waldman a Campbell, 2011a).

Počítačová tomografie (CT) využívá ionizující rentgenové záření z rentgenky, dopadající na detektor, který se nachází naproti rentgence. Rentgenka obsahuje žhavenou katodu a rotující anodu. Při dopadu elektronů z katody na anodu dochází ke vzniku rentgenového záření, které je vyzařováno do prostoru. Celá soustava je chlazena v olejové lázni (Ferda, 2009).

Po průchodu rentgenového záření pacientem dopadá paprsek na prstence rentgenových detektorů, které zaznamenávají hodnotu stupně útlumu rentgenového paprsku, která je registrovaná jako denzita v tzv. Hounsfieldových jednotkách (HU), pojmenované na počest vynálezce CT scanneru Sira Godfrey Hounsfielda. Tyto hodnoty odrážejí hustotu tkáně v malých objemech prostoru uvnitř pacienta, známých jako voxely (Waldman a Campbell, 2011a). Počítač poté analyzuje řadu proměnných pro každý voxel a přiřadí mu číslo založené na průměrné tkáňové radiodenzitě voxelu vzhledem ke konstantám vzduchu a vody. Podle konvence byla vodě přidělena hodnota denzity 0 HU, pro vzduch je přiřazena hodnota denzity -1000 HU a pro kost hodnota +1000 HU (Waldman, 2009).

Během expozice jedné vrstvy se systém rentgenka-detektory, které jsou spolu spojeny, otočí kolem pacienta o 360°. Během této rotace se změří několik stovek dat. Na základě těchto dat je počítačem vygenerován obraz vyšetřované vrstvy. Denzity jednotlivých tkání jsou reprezentované stupni šedi (Heřman, 2001). Tkáně s nižší denzitou (hypodenzní) jako je vzduch a tuk jsou vizualizovány na CT obrazech tmavší, tkáně s vyšší denzitou (hyperdenzní) jako je kost jsou na CT obrazech světlejší a tkáně jako je sval, které mají relativní denzitu mezi vzduchem a kostí, se zobrazí ve stínu šedé (Waldman, 2009).

Kontrast struktur měkkých tkání může být zvýšený použitím kontrastních látek. Kontrastní látky na bázi jodu jsou aplikovány intravenózně do kardiovaskulárního systému, umožňují lepší odlišení cév od ostatních struktur. Kontrastní látky na bázi kyseliny diatrizoové (Gastrografin) a barya mohou být podávány perorálně do gastrointestinálního systému, pro rozlišení střevních klíčků od jiných útvarů (Heřman, 2001; Waldman a Campbell, 2011a).

### **2.3.2 Magnetická rezonance (MRI)**

Magnetická rezonance je neinvazivní zobrazovací technologie, která vytváří trojrozměrné podrobné anatomické obrazy bez použití ionizujícího záření (Nelson, 2008). Využívá se pro zobrazování měkkých tkání (mozek, mícha, sval, šlachy a klouby), ale také pro diagnostiku malé pánve a abdominálních struktur (Waldman a Campbell, 2011b)

Zobrazování magnetickou rezonancí je založeno na principu zjišťování změn magnetických momentů souborů atomových jader prvků, s lichým protonovým číslem, uložených v silném magnetickém poli, po aplikaci radiofrekvenčních pulzů (Heřman, 2001). Ideálním prvkem je vodík (součástí vody), který má pouze jeden proton v jádře a je nejhojnějším prvkem v biologické tkáni (1000krát silnější signál MRI než ostatní prvky) (Viták, 2007). Protony se chovají jako malé válečkové magnety se severními a jižními póly. V důsledku rotace atomových jader kolem své osy (spin) vzniká kolem jader magnetické pole (magnetický moment). Bez vnějšího magnetického pole mají atomová jádra náhodnou orientaci magnetických momentů (Chou et al., 2007). Vnější magnetické pole způsobuje, že se protony otáčejí kolem své osy (spin) a po plášti pomyslného kužele, tento jev se nazývá precese (Heřman, 2001).

Po aplikaci radiofrekvenčního pulsu dochází k posunu magnetického momentu o určitý úhel a synchronizaci precese všech protonů. (Pooya et al., 2004). Po skončení RF pulzu dochází k návratu do původního stavu. Čas potřebný k návratu do klidové orientace spinu je označován jako T1 relaxační čas. T2 relaxační čas odráží čas potřebný k tomu, aby tato fáze koherence byla narušena interakcí s molekulárním prostředím (Detre, 2007).

Signál získaný po sérii různých radiofrekvenčních pulsů je generován pomocí gradientní cívky (Yoshioka et al., 2009).

Kontrast obrazu závisí na intenzitě signálu různých tkání. Některé tkáně, které jsou bohaté na protony a obsahují primárně vodu nebo tuk, reagují značně na RF pulsy. Jiné tkáně s menším obsahem protonů, vyplněné vzduchem nebo kostní tkáň, jsou méně citlivé a generují mnohem méně signálu. Různé tkáňové kontrasty mohou být určeny v závislosti na intenzitě a načasování RF pulsu. Tento parametr je znám jako sekvence MR. Mezi nejzákladnější formy MR sekvencí patří T1-vážená sekvence (T1W), na kterém tekutina vypadá tmavě a tuk vypadá světle a T2-vážená sekvence (T2W), na kterém se tekutina a tuk objevují světle a sekvence vážená dle pozitronové denzity (PD), která umožňuje získat informace o množství protonů (Waldman a Campbell, 2011b). Patologické procesy mají ve většině případů vyšší obsah vody než normální tkáň, proto je hyperintenzivní signál pozorován na T2W a hypointenzivní na T1W (Heřman, 2001).

Magnetické rezonanční zobrazování (MRI) je v současné době nejuniverzálnější a nejúčinnější zobrazovací metodou pro centrální nervovou soustavu. Jedná se o jednu z nejcitlivějších metod pro posouzení morfologie a patologie mozku (Detre, 2007). Indikace zahrnují především nádorová onemocnění, zánětlivá onemocnění (roztroušená skleróza), záchvatovitá onemocnění, cévní onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, psychické změny a onemocnění mozkových nervů (Schlösser, 2001; Traboulsee a Li, 2006; Agosta et al., 2017; Degnan et al., 2014; Fishman et al., 1986; Pooya et al., 2004).

Zobrazení pomocí MRI umožňuje lepší vizualizaci složitosti a heterogenity léze nádoru než CT vyšetření díky použití kontrastního barviva gadolinia, které se aplikuje intravenózně před nebo během skenování. Kontrastní barvivo vizualizuje např. u glioblastomu, centrální oblast nekrózy obklopené edémem bílé hmoty (Omuro a DeAngelis, 2013).

V současnosti jsou k dispozici různé specializované formy MRI, které ale nejsou nezbytné pro určení diagnózy. Patří mezi ně MR angiografie, MR spektroskopie, funkční MR a difúzní MR. Magnetická rezonanční spektroskopie (MRS) je slibná technika, která poskytuje multiparametrické údaje zaznamenáním různých spektrálních vzorků mozkové tkáně v důsledku odlišné distribuce N-acetyl-aspartátu, kreatinu (vysoká v normální tkáni a

nízké v nádorových buňkách), cholinu a laktátu (který se hromadí uvnitř nádorových buněk). Při MRS lze zobrazit neoplastickou tkáň a současně kvantifikovat její rychlost metabolismu. Tato technika může být potenciálně užitečná zejména při rozlišení radiační nekrózy, normální tkáně mozku, otoku a nádoru, sledování terapeutické odpovědi a včasné detekci relapsu (Lee a Gonzales, 2000). Funkční MR měří tok krve v mozku a používá se pro zmapování funkcí jednotlivých oblastí mozku. Mapování se provádí buď na základě změny prokrvení dané oblasti (perfúze) nebo na základě změny oxygenace krve. Difúzní MR slouží ke zobrazení náhodného pohybu molekul vody v biologických tkáních. Využívá se k detekci ischemických lézí, nádorů a zánětů. MR angiografie zobrazuje průtok krve cévami nebo tok mozkomíšního moku (Viták, 2007).

### **2.3.3 Pozitronová emisní tomografie (PET)**

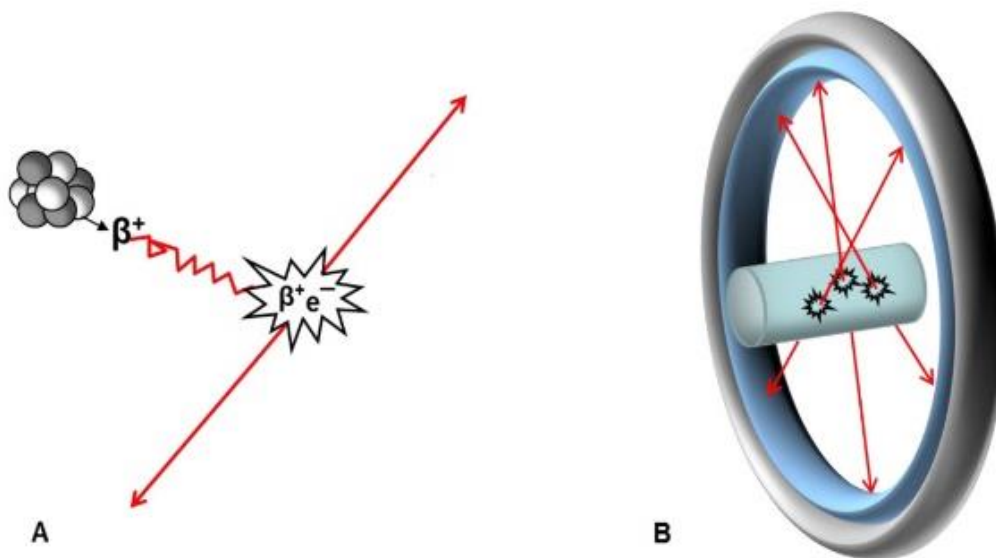
Pozitronová emisní tomografie (PET) je zobrazovací metoda podávající informaci o funkci dané tkáně či orgánu, na rozdíl od magnetické rezonance (MRI) a výpočetní tomografie (CT), které podávají informaci o anatomické struktuře (Bybel et al., 2006; Tai a Piccini, 2004). PET zobrazování se nejčastěji používá k diagnostice, stagingu, plánování léčby a sledování terapeutické odpovědi. Využívá se v kardiologii, neurologii a největší uplatnění a přínos má v diagnostice onkologických onemocnění (Shahhosseini, 2011).

Tato technika je založena na detekci radioaktivity vyzařované po aplikaci radiofarmaka, které se skládá z radionuklidu a jeho nosiče (Berger, 2003). Pro diagnostické zobrazování, by používané radionuklidy měly mít krátký poločas a uvolňovat pozitron o nízké energii. Mezi nejpoužívanější pozitronové zářiče (radionuklidy emitující pozitrony) používané v PET diagnostice patří  $^{11}\text{C}$  ( $T_{1/2} = 20,4$  min.),  $^{13}\text{N}$  ( $T_{1/2} = 10$  min),  $^{15}\text{O}$  ( $T_{1/2} = 2$  min),  $^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2} = 110$  min),  $^{82}\text{Rb}$  ( $T_{1/2} = 1,3$  min) a  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 67,6$  min) (Qaim, 2012).

Po aplikaci radiofarmaka dochází v nestabilním jádře pozitronového zářiče k přeměně protonu na neutron, což je provázeno vyzářením kladného náboje ve formě pozitronu ( $\beta^+$ ) (Bělohávek, 2009). Uvolněný pozitron se sráží s elektronem ( $e^-$ ) ve tkáni, kde dochází k jejich zániku a ztrátě energie (anihilace) v podobě dvou fotonů (záření gama o energii 511

keV), které se z místa anihilace vzdalují po přímce opačnými směry a jsou detekovány kamerou (Šámal a Štich, 2000).

PET kamera se skládá z jednoho až tří prstenců, z nichž každý má několik stovek scintilačních krystalů v osmi vrstvách (obvykle germaniová sůl bismutu, která je nejvhodnější pro detekci energie 511 keV). Krystaly detekují pouze fotony, které dopadly současně na dva detektory na protilehlých stranách prstence ze stejné vrstvy a vrstev sousedních, což znamená, že na spojnici těchto dvou detektorů došlo k anihilaci pozitronu a vytvoření tak přímky odezvy (Trojanová, 2008; Šámal a Štich, 2000). Rekonstrukce obrazu se provádí na základě zpětné projekce přímky odezvy. Přímky odezvy jsou primárním signálem akvizice PET a jako takové vstupují do matematické rekonstrukce, jejímž výstupem je sada transaxiálních řezů. Tento způsob zpracování odezvy nahrazuje funkci kolimátoru (Trnka, 2015). V důsledku toho PET obvykle poskytuje mnohem vyšší citlivost, lepší rozlišení (s výjimkou zobrazování malých zvířat, zejména v předklinickém testování) a lepší potenciál pro kvantitativní zobrazování než SPECT (Accorsi, 2008).



*Obr. 1:* Schématické znázornění principu PET: **A.** Po střetu pozitronu s elektronem dochází ke ztrátě a zániku energie v podobě dvou fotonů gama záření (511 keV), pohybující se v opačném směru. **B.** Anihilační fotony jsou registrovány radiodetektory, sestávající ze scintilačních krystalů a fotonásobičů. Převzato z Velikyan, 2014.

V současné době existují několik PET radiofarmak oficiálně uznané organizací FDA: fluorid sodný ( $\text{Na}^{18}\text{F}$ ) pro zobrazování kostí, rubidiumchlorid ( $^{82}\text{RbCl}$ ) pro hodnocení regionální perfúze myokardu při diagnostice a lokalizaci infarktu myokardu, fluorodeoxyglukóza ( $^{18}\text{F}$ FDG) pro identifikaci oblastí s abnormálním metabolismem glukózy a lokalizace primárního nádoru u pacientů s metastatickým postižením, amoniak ( $^{13}\text{NH}_3$ ) pro hodnocení průtoku krve myokardu, dále  $^{18}\text{F}$ -fluciclovin (Axumin) pro zobrazování recidivy karcinomu prostaty na základě zvýšených hladin PSA v krvi po předchozí léčbě;  $^{18}\text{F}$ -flutemetamol (Vizamyl),  $^{18}\text{F}$ -florbetaben (Neuraceq) a  $^{18}\text{F}$ -florbetapir (Amyvid) pro zobrazování mozku, zejména poruch kognitivních funkcí (Alzheimerova choroba), na základě odhadu hustoty  $\beta$ -amyloidního neuritického plaku,  $^{11}\text{C}$ -cholin pro identifikaci potenciálních míst recidivy rakoviny prostaty a  $^{68}\text{Ga}$ -dotatate (Netspot) pro lokalizaci neuroendokrinních nádorů pozitivních na receptor somatostatinu (NET) (<http://www.radiopharmaceuticals.info/pet-radiopharmaceuticals.html>).



*Obr. 2:* Recidiva glioblastomu při vyšetření  $^{18}\text{F}$ FDG-PET: Na snímku z PET skenování je zobrazen rozsáhlý hypermetabolismus (bílá šipka) a hypometabolismus (černá šipka). Toto zobrazení koreluje s lokalizací gliové jizvy po předcházející operaci. Převzato z Doležalová et al., 2014.

Fluorodeoxyglukóza ( $^{18}\text{F}$ -2-deoxyglukóza) je v současné době nejpoužívanějším PET radiofarmakem. Umožňuje měření rychlosti spotřeby glukózy. Používá se především v případech, kdy pomocí jiného zobrazovacího vyšetření nelze rozeznat povahu ložiska, například nádor oproti jinému onemocnění; aktivní nádorové ložisko oproti jizvě (obr.1),

kteřá zbyla po léčbě nádoru nebo rozlišení mezi benigními a maligními nádory (maligní tumory metabolizují glukózu rychleji než benigní nádory) (Doležalová et al., 2014).

#### **2.3.4 Hybridní systémy (PET/CT a PET/MR)**

Zobrazovací techniky, jako je výpočetní tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI), vytvářejí trojrozměrné (3D) obrazy, které obvykle poskytují podrobné informace o anatomických strukturách, použitelné pro diagnostické a terapeutické účely (Seute et al., 2008). Strukturální zobrazování však není vhodné pro detekci patologických jevů, kde je buněčná aktivita významnější než anatomické rysy (MacManus et al., 2009).

Pozitronová emisní tomografie (PET) poskytuje neinvazivní informace o tkáních na molekulární úrovni. Při kombinaci s CT nebo MRI využívá funkční (PET) i strukturální informace. Přestože citlivost PET skenů je obvykle mnohem vyšší než konvenční strukturální obrazy, anatomické informace z jiné modality (CT nebo MRI) jsou stále potřebné pro správnou interpretaci a lokalizaci funkční abnormality použitého radiofarmaka. (Balyasnikova et al., 2012; Basu et al., 2011). Pomocí hybridních systémů PET/CT a PET/MRI můžeme u daného onemocnění určit diagnózu a přesnější staging pacienta než v samotném rozložení zobrazovacích technik (MR, CT, PET) (Evanko, 2008).

#### **2.3.5 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)**

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie je neinvazivní technika, která poskytuje 3D funkční informace s vysokou citlivostí a specifičností. Stejně jako u všech postupů pro zobrazování v nukleární medicíně, je založena na injekci velmi malého množství (nano až pikomoly) molekul značených radionuklidem (Accorsi, 2008). Od PET se liší tím, že využívá radionuklidy emitující pouze jeden foton na přeměnu jako v případě nejčastěji používaného <sup>99m</sup>Tc (Trnka, 2015).

Pro detekci gama fotonů se využívá scintilační kamera. Skládá se z olověného kolimátoru, který propouští pouze fotony gama. Dále ze scintilačního krystalu (obvykle jodid sodný aktivovaný thaliem NaI (Tl), který konvertuje energii fotonů gama na fotony o



nižší energii. Ke scintilačnímu krystalu jsou v celé jeho ploše připojeny fotonásobiče konvertující scintilační světlo na elektrický signál. Signály z řady fotonásobičů jsou zpracovány elektronickými obvody, které poskytují informace o poloze, ve které foton interaguje s krystalem (Trnka, 2015; National Research Council et al., 1996).

SPECT rozšiřuje možnosti planární scintigrafie podobným způsobem jako výpočetní tomografie (CT), i když se obě tyto techniky v mnoha ohledech liší. SPECT zobrazuje distribuci radiofarmaka ve tkáni pacienta namísto distribuce koeficientu útlumu rentgenového paprsku (u CT). Expoziční čas u CT je v řádu 1 sekundy a u SPECT desítky minut. SPECT zobrazuje funkci a CT strukturu. Obě techniky však mají společný způsob rekonstrukce obrazů (Šámal a Štich, 2000; National Research Council et al., 1996). Výsledkem skenování je sada planárních projekcí (snímků) z různých úhlů, které jsou matematicky rekonstruovány. Výstupem je sada transverzálních řezů (Trnka, 2015). Rekonstrukce obrazu z projekcí se provádí metodami: filtrovaná zpětná projekce a iterativní algebraická technika (Šámal a Štich, 2000).

Doba skenování pomocí SPECT závisí na zobrazovacím systému, druhu radiofarmaka a požadované kvalitě obrazu. Obrazy s vysokým rozlišením celého mozku je možné získat za 20 až 30 minut. Objemová zobrazovací kapacita většiny systémů SPECT umožňuje rekonstrukci v jakémkoli úhlu včetně axiálních, koronálních a sagitálních rovin (Masdeu, 2007).

## 2.4 Základní pojmy nukleární medicíny

### 2.4.1 Radiofarmaka

Radiofarmaka jsou léčivé přípravky, které se v nukleární medicíně využívají při diagnostice a terapii různých typů onemocnění. Skládají se z radioaktivní (radionuklid) složky, která signalizuje lokalizaci a množství radiofarmaka v těle a biologicky aktivní složky (nosič), která zajišťuje přítomnost radiofarmaka v místě, které chceme vyšetřit nebo farmakologicky ovlivnit (Kubinyi, 2015). Podávají se většinou intravenózně, některá jiná perorálně nebo inhalací (Lázníček a Komárek, 1998).

Radiofarmakem mohou být jednoduché anorganické látky, jednoduché nebo složitější organické látky (cukry, aminokyseliny, peptidy, bílkoviny atd.) anebo buňky (erytrocyty, leukocyty, kmenové buňky) značené vhodným radionuklidem (Kubinyi, 2015). Důležitou vlastností radionuklidu určující následné použití radiofarmaka, je jeho poločas přeměny, druh a energie ionizujícího záření (Lázníček a Komárek, 1998). V závislosti na jejich lékařských aplikacích lze radiofarmaka rozdělit na dvě základní třídy, diagnostické a terapeutické. Mohou být rovněž klasifikovány podle jejich biodistribučních charakteristik, na ty, jejichž biodistribuce je určena výlučně jejich chemickými a fyzikálními vlastnostmi a ty, jejichž konečná distribuce je určena jejich schopností vázat receptory nebo jejich dalšími biologickými interakcemi (Liu, 2008).

Diagnostickým radiofarmakem je molekula značená radionuklidem emitující gama záření pro jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT) nebo radionuklidem emitující pozitron pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Používají se ve velmi nízkých koncentracích ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M) a nemají žádné farmakologické účinky. Cílem aplikace diagnostického radiofarmaka je podrobný popis morfologické struktury orgánů a tkání a především testování jejich fyziologické funkce (Liu a Edwards, 2002). Diagnostickými radiofarmaky jsou převážně komplexy kovového radionuklidu s organickým chelátorem pro biologicky aktivní látky se specifickým zacílením. V některých případech mohou být organickými molekulami připojenými k nekovovému radionuklidu, jako jsou  $^{18}\text{F}$  a  $^{125}\text{I}$  (Reichert, 1999).

Terapeutická radiofarmaka jsou molekuly značené radionuklidy emitující alfa nebo beta mínus záření, jejichž úlohou je doručení terapeutické dávky ionizujícího záření do místa poškozených tkání. Ideální terapeutické radiofarmakum má schopnost být vychytáváno v místě nádoru, v dostatečné koncentraci, aby poskytlo dávku cytotoxického záření nádorovým buňkám a současně se rychle eliminovat z orgánů, kde se nádor nevyskytuje, aby se minimalizovalo radiační poškození normálních tkání (Volkert a Hoffman, 1999).

Aby se radiofarmakum mohlo stát bezpečnou látkou pro pacienty, musí vykazovat vysoké a kvalitní chemické a radiochemické vlastnosti. Musí být chemicky čisté, sterilní, apyrogenní, izotonické, minimálně toxické a minimálně antigenní (Kubinyi, 2015).

Vlastnosti ideálního diagnostického radiofarmaka:

- Snadno dostupné za nízkou cenu.
- Radionuklidový rozklad vede k emisi gama záření vhodné energie [(100-200 keV je ideální pro gama kamery a 511 keV pro pozitronovou emisní tomografii (PET)].
- Neemituje záření  $\alpha$  ani  $\beta^-$  (vhodné pro terapeutická radiofarmaka). Tyto částice zvyšují dávku radiace pacientovi a neposkytuje žádné diagnostické informace.
- Má krátký biologický poločas, aby byl vyloučen z těla co nejrychleji.
- Fyzikální poločas přeměny je přiměřený době potřebné pro klinické vyšetření.
- Produktem použitého radionuklidu je stabilní nuklid.
- Sleduje nebo zachycuje metabolický proces, který nás zajímá.
- Záření emitované z radionuklidu je snadno detekována nukleárními přístroji a dávka záření pro pacienta je minimální.

(Lázníček a Komárek, 1998; Ziessman et al., 2014; Saha, 2010; Ruth, 2008)

## 2.4.2 Radionuklidy

Samotný atom je tvořen atomovým jádrem a elektronovým obalem. Atomové jádro (nuklid) je charakterizováno atomovým číslem ( $Z$ ), které udává počet protonů (nese kladný náboj)

v jádře a hmotnostním číslem ( $A$ ), které udává počet protonů a neutronů ( $N$ ) (nukleony) Elektronový obal je složen ze záporně nabitých elektronů (Ziessman et al., 2014).



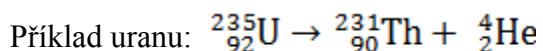
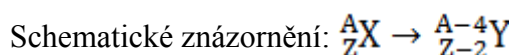
Obr. 3: Atomové jádro prvku  $X$  tvořeno hmotnostním číslem  $A$  a atomovým číslem  $Z$ .

Jádro je stabilní, pokud je vhodný poměr počtu protonů a neutronů ( $N/Z$ ), jádra s jiným poměrem se samovolně přeměňují. Tyto nestabilní nuklidy se nazývají radionuklidy, jsou schopné samovolné radioaktivní přeměny jader (Lázníček a Komárek, 1998). Je známo více než 3000 nuklidů, z nichž přibližně 250 je stabilních a zbytek jsou radioaktivní (Jacobson et al., 2012). Radionuklidy se přeměňují tak dlouho až dosáhnou ideálního poměru  $N/Z$  (stabilní nuklid). Jádro, které se přeměňuje se nazývá mateřské ( $X$ ) a jádro, které vzniká dceřiné ( $Y$ ). Radioaktivní přeměny dělíme na přeměnu alfa a přeměny beta. Ve všech procesech přeměny musí být zachována energie, hmota a náboj radionuklidů (Saha, 2010).

#### 2.4.2.1 Přeměny radionuklidů

##### Přeměna alfa

Při přeměně alfa vylétá z mateřského jádra částice  $\alpha$ , která se skládá ze dvou neutronů a dvou protonů (heliové jádro  ${}^4_2\text{He}$ ) (Ziessman et al., 2014). Dochází ke snížení atomového čísla ( $Z$ ) mateřského jádra o 2 a hmotnostního čísla ( $A$ ) o 4. Přeměna probíhá u těžkých jader neptunia, uranu a radonu (Saha, 2010).

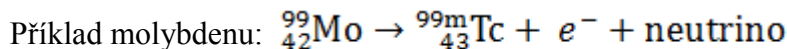
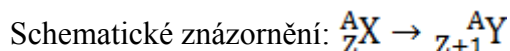


##### Přeměna beta

Je trojího druhu: přeměna  $\beta^-$ , přeměna  $\beta^+$  a elektronový záchyt.

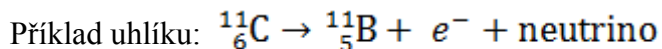
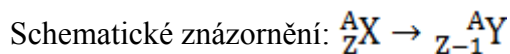
## Přeměna $\beta^-$

Při přeměně  $\beta^-$  je z mateřského jádra emitován záporně nabitý elektron a velmi malá neutrální částice neutrino. Emisí elektronu dochází k přeměně jednoho neutronu na proton. Dochází tak ke zvýšení atomového čísla (Urbánek, 2000).



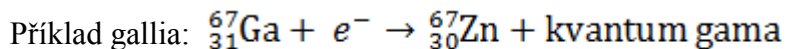
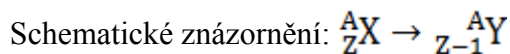
## Přeměna $\beta^+$

Při této přeměně se z mateřského jádra emitují kladně nabitě pozitrony a neutrální neutrino. K přeměně dochází u radionuklidů, u nichž převládá počet protonů nad počtem neutronů. Jeden proton se v jádře mění v neutron, a tak dochází ke snížení atomového čísla (Skibová 2015). Pozitron velmi rychle zaniká při reakci s elektronem. Dochází ke vzniku dvou gama fotonů o energii 511 keV (Urbánek, 2000).



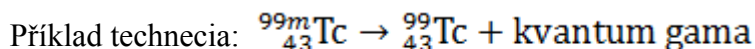
## Elektronový záchyt

Při elektronovém záchytu dochází k zachycení elektronu z valenčních sfér atomu jedním z protonů v jádře, za vzniku neutronu a neutrina. Neutron zůstává v dceřiném jádře. Po záchytu elektronu jádrem, elektron z vyšších orbit přeskočí okamžitě na místo původního elektronu a přitom se uvolňuje rentgenové záření.



### **Izomerní přechod**

Někdy je dceřiné jádro schopné přetrvávat v excitovaném energetickém stavu dlouhou dobu, jedná se o metastabilní stav jádra. Při přechodu do základního stavu je emitováno záření  $\gamma$ . Příkladem je velmi často používaný radionuklid technecium-99m.



### **Vnitřní konverze**

Je radioaktivní přeměna, při které foton gama vzniklý deexcitací jádra vyrazí elektron z obalu atomu a na takto uvolněné místo přeskočí elektron z vyšší sféry, za současného vyzáření gama a rentgenového záření. (Skibová, 2015; Urbánek, 2000).

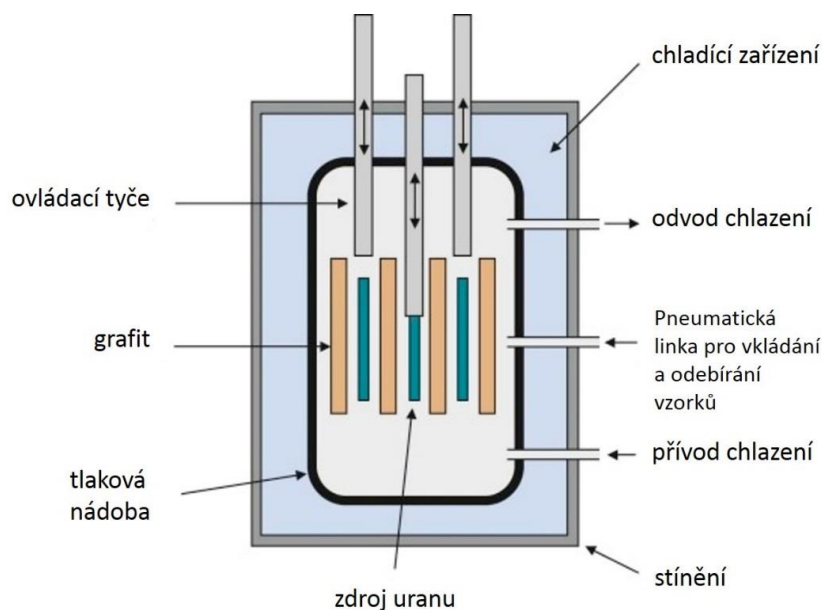
#### **2.4.2.2 Výroba radionuklidů**

Přírozně se vyskytující radionuklidy (např. uran, aktinium, thorium, radium a radon) jsou těžké toxické prvky s velmi dlouhými poločasy rozpadu ( $> 1000$  let). Důsledkem toho nemají klinickou roli v diagnostické nukleární medicíně, ale mohou být využity pro výrobu běžně používaných radionuklidů ( ${}^{235}\text{U}$  a  ${}^{238}\text{U}$ ) (Ziessman et al., 2014). Potřebné radionuklidy jsou uměle vytvářeny ve speciálních zařízeních, jako je cyklotron, jaderný reaktor nebo generátor. Vyrábí se na základě ostřelování terčíkového materiálu neutrony nebo nabitými částicemi, které způsobí přeměnu stabilního jádra na nestabilní (radioaktivní) jádro. (Cherry et al., 2012).

#### **Příprava v jaderném reaktoru**

Jednou z možností přípravy radionuklidu je ozařování vhodného terčíkového materiálu neutrony v ozařovací komůrce reaktoru, kde vznikají jádra s přebytkem neutronů, které obvykle vykazují radioaktivitu  $\beta^-$ . Nejobvyklejší reakcí je prostý neutronový záchyt ( $n, \gamma$ ). (<http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika4.htm>).

Další metodou výroby radionuklidů v jaderném reaktoru je ozařování jader uranu  $^{235}\text{U}$  (popřípadě  $^{238}\text{U}$ ) neutrony a následné izolaci žádaných radionuklidů ze štěpných produktů. Jaderný reaktor je vybaven palivovými tyčemi vyrobenými ze štěpných materiálů jako je přírodní uran ( $^{235}\text{U}$  a  $^{238}\text{U}$ ).  $^{235}\text{U}$  Uran prochází spontánním jaderným štěpením ( $T_{1/2} \sim 7 \times 10^8$  let) na dva lehčí jaderné fragmenty a emituje dva nebo tři štěpné neutrony. Spontánní štěpení  $^{235}\text{U}$  není dostatečným zdrojem neutronů. Štěpné neutrony však stimulují další štěpné reakce bombardováním jader  $^{235}\text{U}$  a  $^{238}\text{U}$ . Důležitou reakcí je:  $^{235}\text{U} + n \rightarrow ^{236}\text{U}^*$ .



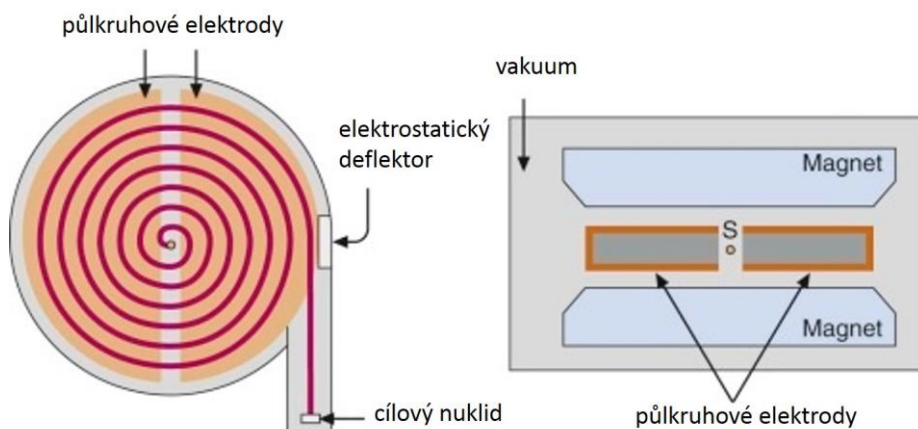
Obr. 4: Schématické znázornění jaderného reaktoru. Převzato Cherry et al., 2012.

Jádro  $^{236}\text{U}^*$  je vysoce nestabilní, tím se rychle štěpí a uvolňuje další štěpné neutrony. Cílem je vyzařování štěpných neutronů v každé spontánní nebo stimulované štěpné reakci. Tím vzniká řízená, samostatná jaderná řetězová reakce (Cherry et al., 2012). Tato řetězová reakce musí být kontrolována, což je dosaženo správnou velikostí, tvarem a hmotností palivového materiálu a dalších technických parametrů. Nadbytečné neutrony jsou odstraněny umístěním kadmiových tyčí do palivového jádra (kadmium má vysokou pravděpodobnost absorpce tepelného neutronu) (Saha, 2010).

## Příprava v cyklotronu

Cyklotron se skládá z dvojice dutých, půlkruhových kovových elektrod, umístěných mezi póly velkého elektromagnetu. V blízkosti středu půlkruhové elektrody je iontový zdroj pro generování nabitých částic (protony, deuterony,  $\alpha$ -částice). Všechny tyto složky jsou obsaženy ve vakuové nádrži (Cherry et al., 2012).

Nabitě částice jsou urychleny elektromagnetickými silami. Magnetické pole, které je orientováno kolmo k elektrickému poli, umožňuje pohyb nabitých částic po kruhové dráze, v půlkruhových elektrodách s rostoucím poloměrem. Na konci dráhy se nachází terčik s nuklidem ozařovaným zrychlenými částicemi. Po ozáření dochází k přeměně neaktivního prvku na radionuklid (Kubinyí, 2015). Při ozařování jader protony, jsou jádra s přebytkem protonů většinou  $\beta^+$ -radioaktivní nebo se rozpadají elektronovým záchytem (<http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika4.htm>).



Obr. 5: Schematické znázornění cyklotronu. S-iontový zdroj nabitých částic. Převzato z Cherry et al., 2012.

## Radionuklidové generátory

Význam radionuklidových generátorů spočívá ve skutečnosti, že jsou snadno přenositelné a slouží jako zdroje krátkodobých radionuklidů v institucích daleko od místa jakéhokoli cyklotronu nebo reaktorového zařízení. Generátor je konstruován na principu rozpadu dlouhodobého mateřského radionuklidu na krátkodobý dceřiný radionuklid.



Skládá se ze skleněné nebo plastové kolony, která je umístěna na dno s fritovaným diskem. Kolona je naplněna adsorpčním materiálem, na kterém je adsorbován mateřský radionuklid. V důsledku rozdílných chemických vlastností se dceřiný radionuklid eluuje vhodným elučním činidlem, přičemž mateřský radionuklid je nadále adsorbován na koloně (Saha, 2010).

## 2.5 Příprava radiofarmak značených $^{68}\text{Ga}$ galliem

### 2.5.1 Výroba radionuklidu $^{68}\text{Ga}$

Gallium-68 je vyráběno uměle z  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru. Generátor se skládá z mateřského radionuklidu germania-68 a dceřiného radionuklidu gallia-68. Germanium se rozpadá elektronovým záchytem, s poločasem rozpadu 271 dnů, díky jeho dlouhému poločasu rozpadu lze tento generátor využívat i po dobu několika let. Gallium-68 se rozpadá pozitronovou emisí s poločasem rozpadu 68 minut, jeho relativně krátký poločas rozpadu je tak vhodný pro PET zobrazování (Velikyan, 2014; Saha, 2010).

První  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor byl popsán Gleasonem v roce 1960 (Gleason, 1960). Brzy po roce 1960 byl generátor vylepšen v důsledku zvýšeného zájmu o aplikace  $^{68}\text{Ga}$  značených látek v nukleární medicíně a také v důsledku pokroků v technologii PET (Greene, 1961; Yano, 1964). Nicméně, nový typ  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru se stal komerčně dostupný až v prvních letech 21. století (Razbash, 2005).

Při prvním použití  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru byla eluce  $^{68}\text{Ga}$  provedena metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (Gleason, 1960). Později se využívala iontově výměnná chromatografie s extrakcí na pevné fázi a stala se tak hlavní používanou chemickou metodou (Yano, 1964). Generátor obsahuje plastovou nebo skleněnou kolonu naplněnou oxidem hlinitým ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).  $^{68}\text{Ge}$  koncentrovaný kyselinou chlorovodíkovou je neutralizován v roztoku EDTA a adsorbován na koloně. Poté je  $^{68}\text{Ga}$  eluován roztokem 0,005 M EDTA s 95% výtěžkem a obsahem méně než  $1,4 \times 10^{-5}$  % nadřazené položky  $^{68}\text{Ge}$  (Saha, 2010;

Rosch, 2013). Za každých 3,5 hodin může generátor eluovat téměř úplnou (90%)  $^{68}\text{Ga}$  radioaktivitu (Roesch, 2012).

Dnešní distribuované komerční generátory jsou založeny na extrakci na pevné fázi s použitím kyseliny chlorovodíkové (HCl), k eluci generovaného  $^{68}\text{Ga}$ , bez ohledu na to, jaký typ pevné fáze se používá (anorganický nebo organický). Vzhledem ke kationtové formě  $^{68}\text{Ga}$  v eluátu, jsou všechny generátory velmi dobře navrženy, tak aby generované galium bylo použito pro následné značení. Systémy se liší zejména v oblasti dané koncentrace HCl, pak ve smyslu  $^{68}\text{Ga}$  elučních výtěžků, klesající se zvyšující frekvencí používání a také z hlediska obsahu  $^{68}\text{Ge}$  v eluátu (Roesch, 2012).

### **2.5.2 Příprava značení cílových molekul galliem-68**

Gallium je klasifikován jako kov, který vytváří stabilní komplexy s mnoha ligandy obsahující kyslík a dusík, jako donorové atomy. Umožňuje tak vytvářet komplexy s chelatačními činidly, konjugovanými s peptidy nebo jinými makromolekulami cílenými na určitý ligand (Velikyan, 2005).

Značení galliem-68, může probíhat přímo nebo může být zprostředkované chelátorem. Přímé značení  $^{68}\text{Ga}$  makromolekul se vztahuje na proteiny (například laktoferrin, transferin, feritin), které obsahují místo pro navázání železa, kdy je využita chemická podobnost mezi  $\text{Ga}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (Kumar et al., 2011). Bifunkční chelátor (BFC) je kovalentně vázán na cílovou molekulu buď přímo nebo prostřednictvím PKM (farmakokinetický modifikátor) spojky a je silně koordinován s galliem-68. Volba BFC je z velké části určena povahou a oxidačním stavem  $^{68}\text{Ga}$ . Ideální BFC je ten, který dokáže vytvořit stabilní komplex kovového radionuklidu s chelátorem, s vysokou termodynamickou a kinetickou stabilitou (Liu, 2008).

Významnými chelátory pro  $^{68}\text{Ga}$  značení malých biomolekul jsou DTPA, DOTA a NOTA deriváty. Bifunkční chelátory jako NODASA a NODAGA jsou obzvláště užitečné pro  $^{68}\text{Ga}$  značení, díky vysoké hydrofilite, stabilitě a vyšší účinnosti značení než u NOTA chelátoru. Rychlé a účinné radioaktivní značení galliem-68 je zvláště důležité zejména, kvůli jeho krátkému poločasu přeměny ( $t_{1/2} = 68$  min) (Velikyan, 2014; Liu, 2008).

Alternativou k těmto cyklickým aminokarboxylátům a aminofosfinátům jsou siderofory. Jedná se o chelátory s nízkou molekulovou hmotností a s velmi vysokou afinitou k železitým iontům (Winkelmann, 1991). Vzhledem ke srovnatelnému iontovému poloměru, náboji a elektronické konfiguraci,  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  vykazuje téměř identickou koordinační chemii s  $\text{Fe}^{3+}$ . Může tak být použito k radioaktivnímu značení příslušného sideroforu. Jeden z prvních sideroforů používaných pro značení  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  byl desferoxamin B (DFO). Jedná se o hexadentátový siderofor izolovaný ze *Streptomyces pilosus*, významný pro léčbu  $\beta$ -thalasemie (Aouad et al., 2002, Yokoyama et al., 1982).

Dalším sideroforem pro  $^{68}\text{Ga}$  značení je triacetylfusarinin C (TAFC), zástupce ze třídy hydroxymátů. V nedávných studiích bylo zjištěno, že  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC detekuje infekce způsobené *Aspergillus fumigatus* u zvířecího modelu potkana pomocí PET zobrazování (Petrik et al., 2010). Jeho deacetylovaná forma fusarinin C (FSC) umožňuje rychlé a vysoce selektivní značení s  $^{68}\text{Ga}$  v širokém rozmezí pH a vede k vysokým specifickým aktivitám.  $^{68}\text{Ga}$ -FSC navíc vykazuje velmi vysokou stabilitu v nízkých koncentracích. Ukazuje se tedy, že FSC je vhodnější pro značení  $^{68}\text{Ga}$  než DFO, u kterého byla prokázána vysoká nestabilita při nízkých koncentracích (<50 nM) (Caraco et al., 1998).

### 2.5.3 Siderofory

Železo je nezbytným kofaktorem pro různé buněčné procesy eukaryot a většiny prokaryot, včetně procesů jako je respirace, metabolismus aminokyselin a biosyntéza DNA a sterolů. I když je jedním z nejběžnějších prvků v zemské kůře, v aerobním prostředí se železo nachází ve formě vysoce nerozpustného komplexu hydroxidu železitého (Wandersman a Delepelaire, 2004). V přírodní lokalitě se železo vyskytuje převážně ve formě Fe (III), jako hydroxidové a oxyhydroxidové koloidní částice ve velmi malém množství. Proto si patogenní i nepatogenní organismy musely vyvinout sofistikované strategie, k zajištění příjmu železa. Jednou z těchto strategií je sideroforem-zprostředkovaná absorpce železa (Hider a Kong 2010).

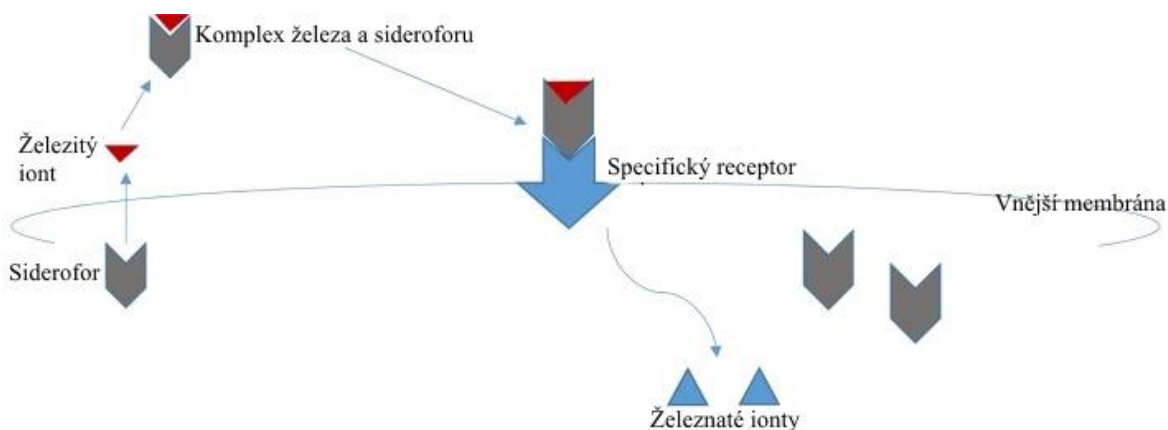
Siderofory jsou organické sloučeniny s relativně nízkou molekulovou hmotností, produkovány bakteriemi, houbami a některými rostlinami. Slouží jako chelatační činidla

pro železité ionty. Hlavní úlohou těchto sloučenin je vychytávání železa z prostředí a tím jeho zpřístupnění pro mikrobiální a rostlinné buňky (Winkelmann, 1991). Dělí se do tří hlavních skupin, v závislosti na charakteristické funkční skupině, tj. na hydroxamáty, katecholy a ( $\alpha$ -hydroxy) karboxyláty. Je známo více než 500 různých typů sideroforů, z nichž 270 bylo strukturálně charakterizováno (Boukhalfa et al., 2003). Většina sideroforů patří do skupiny hydroxamátů a jsou obvykle tvořeny houbami. Dělí se do 4 podskupin: fusarininy, koprogeny, ferrichromy a kyselina rhodotorová. Hydroxamátová skupina je syntetizována acylací aminokyseliny N<sup>5</sup>-hydroxy-L-ornithinu (Winkelmann, 2002). S výjimkou fusarininu C, produkovaného *Aspergillus nidulans* (např. TAFC), který obsahuje esterové vazby, všechny ostatní hydroxamáty obsahují peptidovou vazbu (Oberegger et al., 2001). Každý hydroxamát je schopen vytvořit hexadentátový oktahedrický komplex s železitým iontem (Saha et al., 2016).

Syntéza sideroforů zahrnuje enzymy, které se vyskytují výhradně v bakteriích a houbách a příjem sideroforů je umožněn specifickými transportéry. Na obrázku č. 6 je zobrazeno schematické znázornění vychytávání železa, zprostředkované siderofory. Obecný princip vychytávání železa spočívá v navázání železitých iontů na vyloučené siderofory, za tvorby komplexu, který je navázán na specifický receptorový protein, přítomný na vnější membráně mikrobiálních buněk. Komplex je přenesen aktivním transportem a uvolněn do vnitřního prostoru buňky (Winkelmann, 2002).

U gramnegativních bakterií musí siderofory procházet jak vnější, tak plazmatickou membránou. Sideroforem zprostředkované vychytávání železa vyžaduje specifické receptory vnější membrány, jako jsou např. FepA, FecA a FhuA, které se vážou na jejich příbuzný železito-sideroforový komplex (Köster, 2001). Komplex sideroforu a železa se v periplazmatickém prostoru váže na periplazmatický vazebný protein TonB a je transportován prostřednictvím transportéru ABC (ATP-binding cassette) do cytosolu buňky. Transportér ABC se skládá ze dvou proteinů, z nichž jeden působí jako permeáza a druhý hydrolyzuje ATP, aby poskytl energii pro transport. Poté se železnatý iont uvolňuje z železito-sideroforového komplexu, redukcí železitého iontu. (Krewulak a Vogel, 2011). TonB-ExbB-ExbD jsou vnitřním membránovým proteinovým komplexem, který pomáhá

při přepravě železito-sideroforového komplexu přes vnější membránu. (Sah a Singh, 2015).



Obr. 6: Schematické znázornění vychytávání železa siderofory. Převzato a upraveno dle Khan et al., 2017.

U hub byly identifikovány čtyři různé mechanismy pro získání železa: a) příjem železa zprostředkovaný siderofory, b) redukční asimilace železa (RIA), c) nízkoafinitní absorpce železného iontu a d) vychytávání a degradace hemu (Haas et al., 2008).

Vychytávání komplexů sideroforu a železa v houbách, je zprostředkováno "transportéry sideroforu-železa" (SIT) (Philpott a Protchenko, 2008). Většina druhů hub, včetně těch, kteří produkují siderofory, má více SIT transportérů, např. *A. fumigatus* a *A. nidulans* kódují sedm a deset možných SIT. Některé studované druhy hub jako je oportunní patogenní *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* a rod *Candida spp.* postrádají biosyntézu sideroforu. Využívají tak příjem železa mechanismem b), c) a d) (Haas et al., 2008). Nicméně, jsou schopni využívat siderofory produkované jinými druhy organismů (xenosiderofory) (Philpott, 2006).

Siderofory mají široké uplatnění v různých oblastech, jako je zemědělství, za účelem zlepšení úrodnosti půdy a v biologické kontrole houbových patogenů. Dále v medicíně v boji proti bakteriím rezistentním na léky (konjugace s antibiotiky), léčbě  $\beta$ -thalasemie a malárie, a detekci a terapii infekčních a nádorových onemocnění. Siderofory se dále využívají pro snížení kontaminace půdy a vody kovy, ale také pro zlepšení kontrastu magnetické rezonance (Ali a Vidhale, 2013).

## 2.5.4 RGD peptidy

Peptidy jsou důležitými regulátory růstu, buněčné funkce, mezibuněčné komunikace a imunitní odpovědi. Významnými peptidovými ligandy jsou neurotransmitery, hormony, chemokiny, cytokiny a růstové faktory. Jedná se o oligomery aminokyselin, vytvářející peptidovou vazbu. Existuje 21 DNA-kódovaných přírodních  $\alpha$ -aminokyselin a nespočet syntetických aminokyselin, což umožňuje tvorbu velkého množství peptidových modifikací.

Biologické účinky peptidů jsou zprostředkovány vazbou na receptory s vysokou afinitou. Vysoká nadměrná exprese těchto receptorů v různých nádorových buňkách ve srovnání s jejich nízkou hustotou v normálních tkáních poskytla molekulární základ pro klinické použití radioaktivně značených peptidů (Mankoff et al., 2008). V minulých letech bylo pro detekci různých typů nádorů vyvinuto mnoho analogů radioaktivně značených peptidů, jako je somatostatin, bombesin, vazoaktivní intestinální peptid, cholecystokinin/gastrin, neurotensin, exendin a RGD peptidy (Fani et al., 2012).

RGD peptid obsahující sekvenční motiv arginin-glycin-aspartát se specificky váže na integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Integriny jsou dimerní transmembránové glykoproteiny, které zprostředkovávají interakci mezi buňkami a matrixem. Hrají významnou roli při regulaci růstu nádoru, angiogenezi, invazivitě a metastatického potenciálu nádoru (Hood a Cheresch, 2002). Integrin  $\alpha_v\beta_3$  je nadměrně exprimován v aktivovaných endotelových buňkách během angiogeneze a v některých nádorových buňkách (gliomu, prostaty a prsu) (Eliceiri a Cheresch, 1999).

Vzhledem k tomu, že hladina  $\alpha_v\beta_3$  je rozhodující při určování invazivity a metastatického potenciálu maligních nádorů, jsou RGD peptidy značené vhodnými radionuklidy zajímavé pro neinvazivní zobrazování. Umožňují vizualizaci a kvantifikaci hladiny  $\alpha_v\beta_3$ , což lze využít pro včasnou detekci nádorových onemocnění a sledování terapeutické odpovědi (Brooks et al., 1994). Pro diagnostické zobrazování se využívají radionuklidy jako je  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$  a  $^{64}\text{Cu}$  a pro terapii -  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{90}\text{Y}$  (Fani et al., 2012).

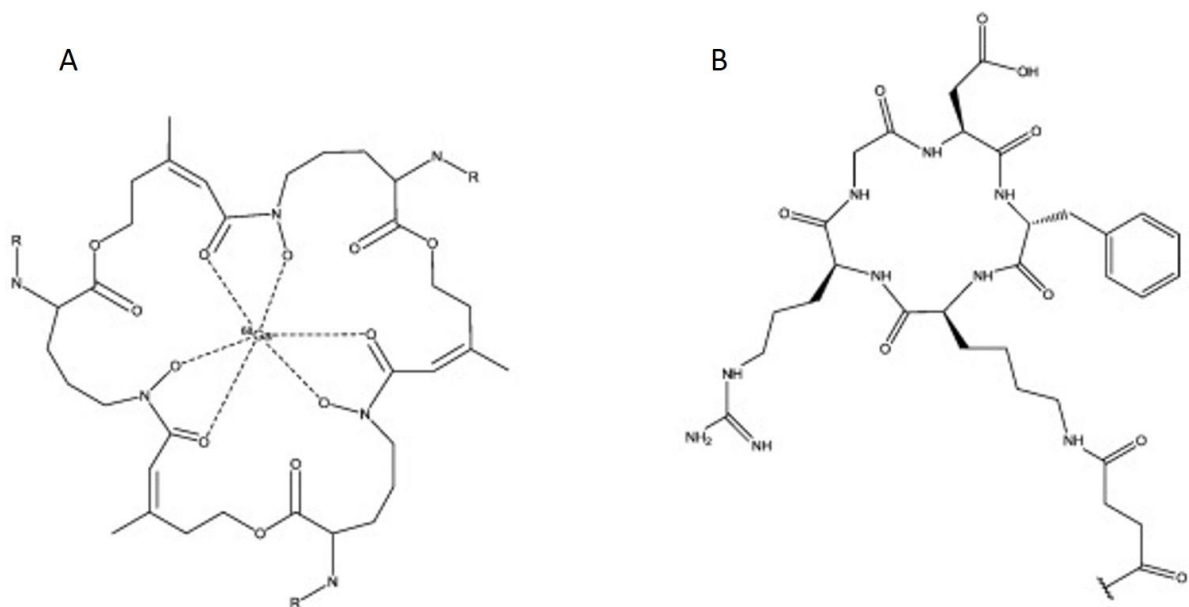
Bylo navrženo mnoho peptidů odvozených z RGD sekvence tak, aby vykazovali vysokou afinitu k integrinu  $\alpha_v\beta_3$ , například cyklický pentapeptid cyklo (-Arg-Gly-Asp-dPhe-Val-) (Plow et al., 2000). Nezbytné je ale také, aby byl radionuklid stabilně připojen k RGD peptidu, což umožňuje použití bifunkčního chelatačního činidla (BFC), jímž je například NODAGA, NOTA, DOTA, HPMA atd. (Fani et al., 2012).

Bylo zavedeno velké množství různých RGD peptidů značených radioaktivními kovy nebo halogeny. Jednou z nejintenzivněji klinicky testovaných látek je glykosylovaný cyklický pentapeptid  $^{18}\text{F}$ -Galacto-RGD, který prokázal vysokou expresi integrinu  $\alpha_v\beta_3$  u pacientů s maligními nádory (Haubner et al., 2005). Avšak syntéza tohoto radiofarmaka je velmi složitá a časově náročná. Jeho alternativou by mohl být  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD, díky jeho snadné přípravě (Dumont et al., 2011).

#### 2.5.4.1 $^{68}\text{Ga}$ -FSC-(succ-RGD)<sub>3</sub>

Fusarinin C patří do skupiny hydroxymátových sideroforů. V prvním kroku biosyntézy sideroforu fusarininu C, dochází k hydroxylaci ornitinu, který je acylován na hydromevalonyl-hydroxyornithin. Neribozomální peptid syntetáza (NRPS) poté převede tento produkt na cyklický fusarinin C (FSC) (Khan et al., 2017).

Přidáním cyklického RGD peptidu vazbou na integrin  $\alpha_v\beta_3$ , exprimovaný během angiogeneze, pomocí linkeru kyseliny jantarové (FSC-(succ-RGD)<sub>3</sub>) byly vytvořeny komplexy s  $^{68}\text{Ga}$ . Vykazují vyšší stabilitu než monomerní  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD, s vynikajícími vazebnými vlastnostmi receptorů a možností *in vivo* zobrazování vybraných nádorů (Zhai et al., 2016).



*Obr. 7: A. Chemická struktura  $^{68}\text{Ga}$ -FSC, substituent R-(succ-RGD) $_3$ . B. Chemická struktura cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Succ)-). Převzato z Knetch et al., 2015.*



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části byly použity následující přístroje:  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor (Eckert a Ziegler; Berlín, Německo), vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Dionex UltiMate 3000, Thermo scientific, Waltham, MA, USA) s detektorem radioaktivity (Raytest; Straubenhardt, Německo), HPLC kolona Watrex Nucleosil 120 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250x4 mm (Watrex; Praha, Česká republika), hybridní zobrazovací systém PET/SPECT/CT pro malá laboratorní zvířata (Albira, Bruker Biospis Corporation, Woodbridge; USA), automatický gama počítač (Wizard<sup>2</sup>; Perkin elmer, Waltham, MA, USA), třepačka, vortex, ionizační komora, centrifuga, analytické váhy, termoblok, inkubátor.

#### 3.1.2 Použité chemikálie

K experimentům byly použity následující komerčně dostupné chemikálie: Isofluran, 0,1 M  $\text{FeCl}_3$ , 6 mM DTPA, 0,1 M HCl, 1,1 M acetátový pufr, PBS pufr, acetonitril, fyziologický roztok, trifluoroctová kyselina, deionizovaná voda a oktanol.

Derivatizované siderofory TPFC (*tri*-propionyl fusarinin C) a FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> [fusarinin C-cyclo(arginin-glycin-aspartát-d-fenylalanin-lysin)] byly syntetizovány na oddělení nukleární medicíny v Innsbrucku; TAFC triacetylfusarinin C (Microcollections, Tuebingen, Německo) a NODAGA-c(RGDfK) [NODAGA-cyclo(arginin-glycin-aspartát-d-fenylalanin-lysin)] (ABX, Radeberg, Německo) byly získány z komerčních zdrojů.

#### 3.1.3 Použité zvířecí modely

Všechny pokusy na zvířatech byly prováděny v souladu se zákonem 246/1992 Sb., se souhlasem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-16402/2012-30 a MSMT-18724/2016-12) a se souhlasem Odborné komise na ochranu zvířat proti týraní Lékařské

fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Veškeré experimenty byly prováděny na myších kmene Balb/c a Balb/c nude a potkanech kmene Lewis (Anlab, Praha, ČR).

## **3.2 METODY**

### **3.2.1 Radioaktivní značení**

Z  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoru byl získán izotop  $^{68}\text{Ga}$ , pomocí elučního činidla 0,1 M HCl (ve formě  $^{68}\text{GaCl}_3$ ). Byla odebrána frakce cca 1 ml s radioaktivitou v rozmezí 120-180 MBq. Ke zjištění optimálních podmínek radioaktivního značení byla testována různá množství FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> nebo TPFC (0,1 µg, 1 µg, 5 µg a 10 µg). K reakční směsi 30 µl acetátového pufru a testovaného množství FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> nebo TPFC bylo přidáno 300 µl roztoku  $^{68}\text{GaCl}_3$  o aktivitě 18-30 MBq. Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 100 µl acetátového pufru, k úpravě pH na hodnotu 6-7. Vzorek radioaktivně značené látky byl naředěn deionizovanou vodou a stanovení radiochemické čistoty bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

### **3.2.2 Kontrola kvality radioaktivního značení**

Kontrola kvality radioaktivního značení  $^{68}\text{Ga}$ -FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> a  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC byla provedena pomocí HPLC s radiodetekcí. Ze získaných dat bylo vyhodnoceno optimální množství testovaných látek pro radioaktivní značení, s požadovanou radiochemickou čistotou minimálně 95 %.

#### **Chromatografické podmínky:**

Kolona: Watrex Nucleosil 120 C18 5µm 250x4mm

Mobilní fáze: A = 99,9 % H<sub>2</sub>O s 0,1 % TFA; B = 99,9 % ACN s 0,1 % TFA

Průtoková rychlost: 1 ml/min

Gradient: 0-3 min, 0 % B; 3-6 min, 0-50 % B; 6-10 min, 50 % B; 10-10,1 min, 50-80 % B; 10,1-13 min, 80 % B; 13-13,1 min, 80-0 % B; 13,1-15 min, 0 % B.

Detekce: radiodetektor

### 3.2.3 *In vitro* stabilita

Stabilita byla testována v lidském séru a v prostředí zvýšeného množství konkurenčního kovu ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a chelátoru kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA). Při testování stability v lidském séru bylo smícháno 100  $\mu\text{l}$  připravené radioaktivně značené látky s 300  $\mu\text{l}$  lidského séra. Směs se nechala inkubovat v inkubátoru při teplotě 37°C. Po 30, 60 a 120 minutách bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  vzorku směsi a k ní byla přidáno 150  $\mu\text{l}$  acetonitrilu. Následně byla reakční směs centrifugována 3 minuty při 15 000 rpm. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a pomocí HPLC analyzován.

K testování stability v prostředí zvýšeného množství konkurenčního kovu a chelátoru byly použity roztoky 0,1 M  $\text{FeCl}_3$  a 6 mM DTPA. Ke 150  $\mu\text{l}$  radioaktivně značené látky bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{FeCl}_3$  nebo 150  $\mu\text{l}$  roztoku DTPA. Směs se nechala inkubovat při 37 °C a po 30, 60 a 120 minutách byly odebrány vzorky pro analýzu na HPLC.

### 3.2.4 Rozdělovací koeficient ( $\log P$ )

Radioaktivně značená látka byla naředěna přidáním 600  $\mu\text{l}$  PBS. Následně bylo připraveno šest zkumavek vzorků obsahující 500  $\mu\text{l}$  oktanolu, 450  $\mu\text{l}$  PBS a 50  $\mu\text{l}$  naředěné radioaktivně značené látky. Všechny zkumavky byly zvortexovány a na třepače promíchávány 20 minut při 450 rpm. Poté byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 15 000 rpm. Z každé zkumavky bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  vzorku z oktanolové fáze a 50  $\mu\text{l}$  vzorku z vodné fáze (PBS). Jednotlivé zkumavky se vzorky byly analyzovány pomocí automatického gama počítače. Ze získaných dat byl vypočítán rozdělovací koeficient  $\log P$  dle vzorce:

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

### 3.2.5 Vazba na proteiny

Připravená radioaktivně značená látka byla smíchána v množství 10 µl se 190 µl PBS v jedné zkumavce (kontrolní vzorky) a v druhé ve stejném poměru s lidským sérem. Obě reakční směsi byly inkubovány při 37 °C. Po 30, 60 a 120 minutách od začátku inkubace bylo odebráno vždy 25 µl vzorku a nanášeno po kapkách na aktivovanou mikrokolonku. Mikrokolonky s nanesenými vzorky byly centrifugovány 2 minuty při 2000 g. Následně byla pomocí automatického gama počítače změřena radioaktivita na gelové kolonce a v eluátu a vyhodnocena vazba na proteiny testovaných radioaktivně značených látek.

### 3.2.6 PET/CT zobrazování

*In vivo* experimenty byly provedeny na myších Balb/c nude (samice, 10 týdnů) se subkutánně aplikovanou nádorovou linií U87MG (lidský glioblastom) a na Lewis potkanech (samice, cca 150 g) intratracheálně infikovaných vysokou dávkou vláknité houby rodu *Aspergillus* (100µl  $1 \times 10^9$  CFU/ml). Laboratorním zvířatům bylo v celkové anestezii retroorbitálně aplikováno přibližně 100 µl radioaktivně značené látky, o aktivitě 5-10 MBq.

Skenování bylo provedeno pomocí zobrazovacího systému PET/SPECT/CT pro malá laboratorní zvířata. Během celého vyšetření byla laboratorní zvířata udržována v celkové inhalační anestezii (2% isofluran). Pomocí tohoto systému bylo provedeno statické skenování, které zahrnovalo vyšetření PET i CT a provádělo se po 30 a 90 minutách od podání radioaktivně značené látky u nádorového zvířecího modelu a po 45 minutách od podání radioaktivně značené látky u infekčního zvířecího modelu. Ke zhodnocení využitelnosti testovaných látek pro zobrazování glioblastomu a aspergilové infekce byly také připraveny kontrolní radioaktivně značené látky, které se k těmto indikacím experimentálně používají.  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfK) byl připraven jako kontrolní látka pro PET/CT zobrazení nádorových myši a  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC pro PET/CT zobrazení infikovaných potkanů (Knetsch et al., 2011; Petrik et al., 2012).

Získaná data byla zrekonstruována pomocí softwaru Albira Reconstructor (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, USA) a jednotlivé snímky byly upravovány v

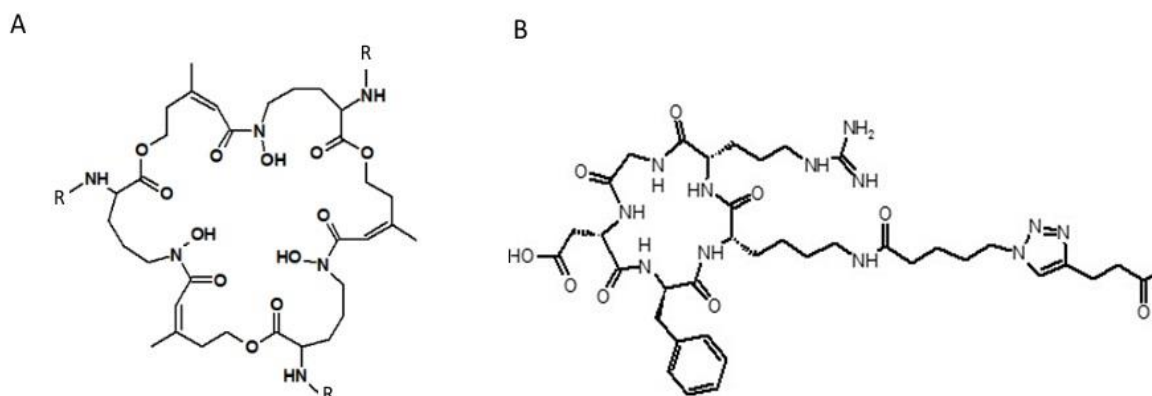
počítačových programech PMOD (PMOD Technologies Ltd., Curych, Švýcarsko) a VolView (Kitware Inc., New York, USA) pro 3D zobrazení.

### **3.2.7 *Ex vivo* biodistribuce**

Studované radioaktivně značené látky (po kontrole pH a kvality značení) byly naředěny 600  $\mu$ l fyziologického roztoku a následně r.o. aplikovány experimentálním zvířatům (cca 100  $\mu$ l o aktivitě v rozmezí 1-2 MBq). Po 30 a 90 minutách od aplikace testovaných látek byla experimentální zvířata usmrcena. Jednotlivé orgány (krev, slezina, slinivka, žaludek (vyprázdněný), střeva, ledviny, játra, srdce, plíce, sval, kost a u nádorových zvířat byl navíc odebrán i nádor) byly odebrány a následně zváženy. Množství radioaktivity v jednotlivých orgánech a tkáních bylo změřeno na automatickém gama počítači. Naměřená data byla vyhodnocena jako procento podané dávky na gram orgánu (%ID/g).

## 4 VÝSLEDKY

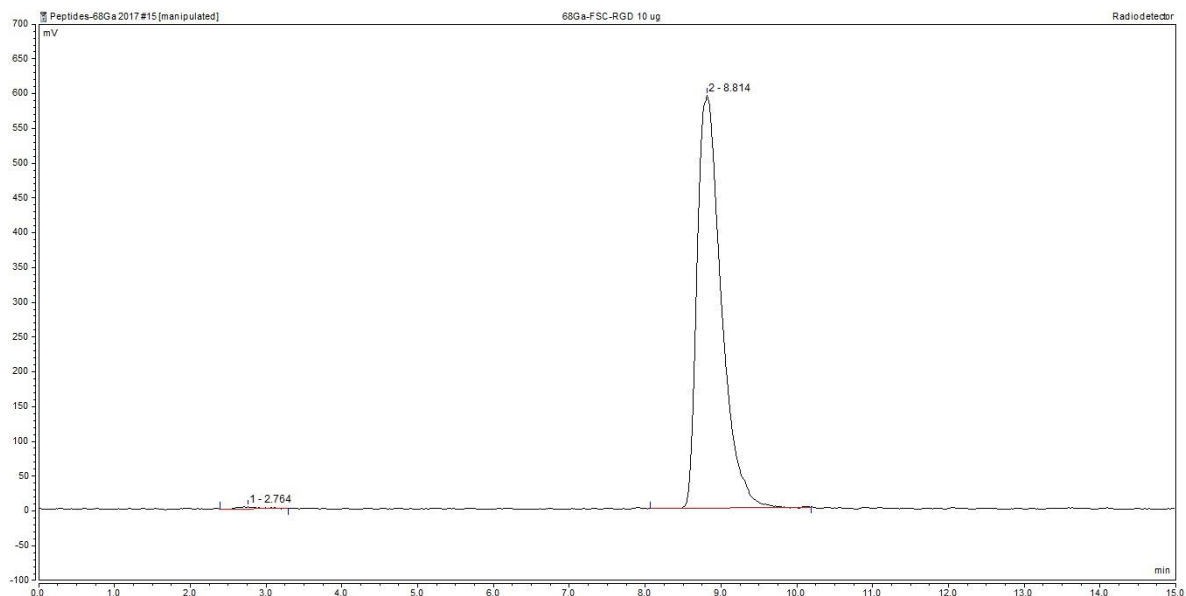
### 4.1 FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub>



Obr. 11: Chemická struktura derivatizovaného sideroforu FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub>. A. Struktura fusarininu C (FSC), R-c(RGDfK). B. Struktura substituentu R-c(RGDfK).

#### 4.1.1 Radioaktivní značení a kontrola kvality

Radiochemická čistota vyšší než 95 % byla naměřena u všech testovaných množství FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> s výjimkou 0,1 µg. V tomto případě dosahovala radiochemická čistota hodnoty pouze 19,7 %. Nejvyšší radiochemická čistota (99,8 %) byla pozorována při použití 10 µg FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> (Tab. 1). Z radiochromatogramu na obrázku č. 12 je patrné, že retenční čas <sup>68</sup>Ga-FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> je v daném chromatografickém systému 8,8 minut. Pro navazující experimenty jsem jako optimální množství FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> pro značení galliem-68 zvolila 10 µg.



Obr. 12: Radiochromatogram látky FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> z HPLC.

Tab. 1: Optimalizace množství FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> pro radioaktivní značení galliem-68.

Množství peptidu (μg)	Radiochemická čistota (%) <sup>68</sup> Ga-FSC-[c(RGDfK)] <sub>3</sub>
0,1	19,7
1	96,1
5	98,6
10	99,8

#### 4.1.2 *In vitro* stabilita

Komplex <sup>68</sup>Ga-FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> vykazoval vysokou stabilitu v lidském séru a v prostředí konkurenčního chelátoru (DTPA) i po 120minutové inkubaci při 37°C. Naproti tomu v prostředí nadbytku konkurenčního kovu (Fe<sup>3+</sup>) byla pozorována výrazná nestabilita komplexu <sup>68</sup>Ga-FSC--[c(RGDfK)]<sub>3</sub>. Výsledné hodnoty radiochemické čistoty <sup>68</sup>Ga-FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> v různých prostředích jsou shrnuty v tabulce 2.

### 4.1.3 Rozdělovací koeficient ( $\log P$ )

Z dat získaných z automatického gama počítače byl vypočítán dekadický logaritmus podílu procentuálního zastoupení radioaktivity v oktanolové a vodné fázi. Výsledná hodnota rozdělovacího koeficientu pro  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  byla  $-3,17 \pm 0,33$  (jedná se o průměr ze 6 měření; viz tabulka 2).

### 4.1.4 Vazba na proteiny

Z dat naměřených automatickým gama počítačem byla stanovena průměrná procentuální hodnota radioaktivity v eluátu a na gelové kolonce. Zásadní byla hodnota radioaktivity v eluátu, která odpovídá vazbě  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  na plazmatické proteiny. Nejvyšší naměřená hodnota vazby komplexu  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  na plazmatické proteiny byla zaznamenána po 120minutové inkubaci při  $37^\circ\text{C}$  a činila 5,16 %. Výsledky vazby  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  na plazmatické proteiny stanovené po 30, 60 a 120 minutách jsou shrnuty v tabulce 2.

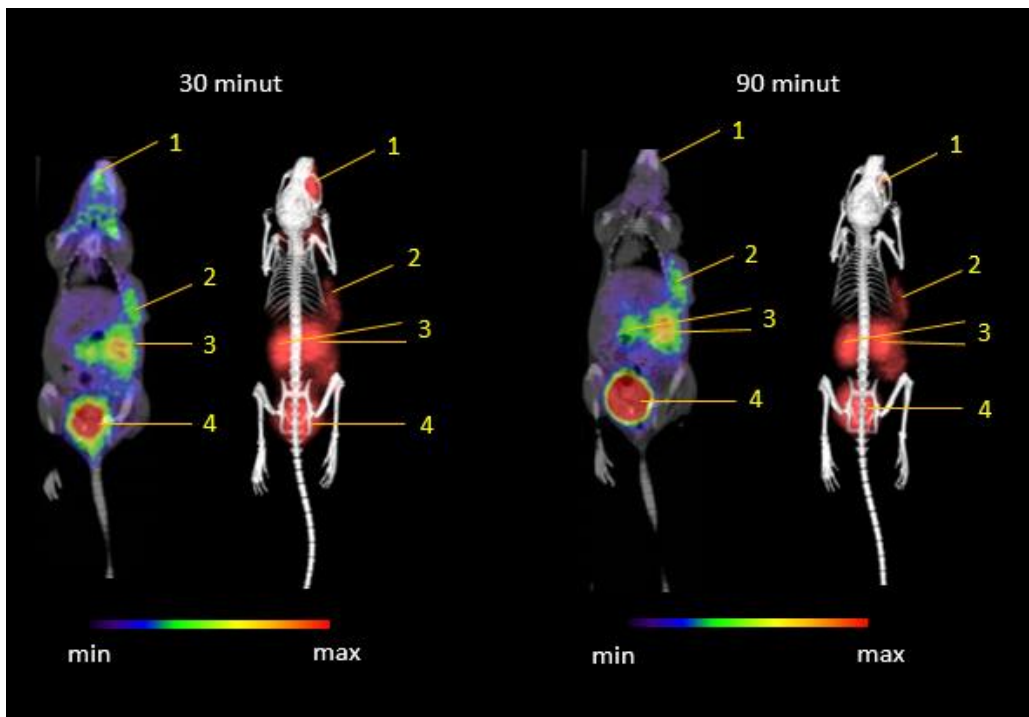
Tab. 2: *In vitro* charakterizace a stabilita  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  v různých prostředích.

Radioaktivně značená látka	$\log P \pm \text{SD}$	Inkubace (min)	Stabilita v lidském séru (%)	Stabilita v 0,1 M $\text{FeCl}_3$ (%)	Stabilita v 6 mM DTPA (%)	Vazba na proteiny (%)
$^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$	$-3,17 \pm 0,33$	30	99,78	0,86	87,57	4,65
		60	99,93	0,77	83,39	4,82
		120	97,49	1,93	91,98	5,16

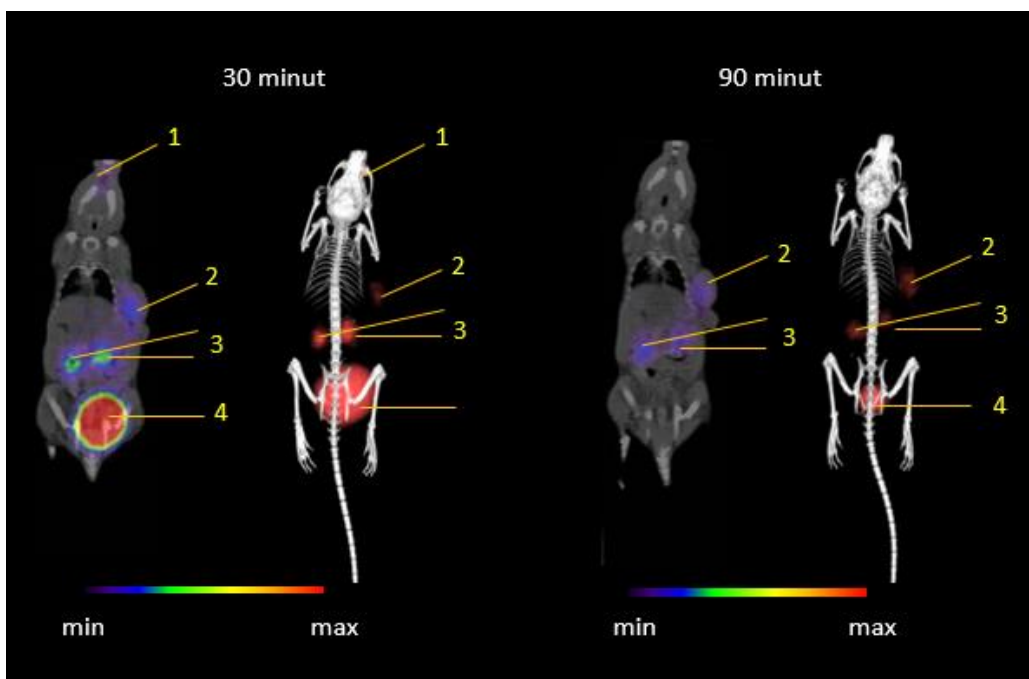


#### 4.1.5 PET/CT zobrazení nádorových myší

Po aplikaci radioaktivně značené látky  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  byly laboratorní myši skenovány pomocí PET/CT zobrazovacího systému pro malá laboratorní zvířata. Na obrázku 13 jsou zobrazeny výsledky statického PET/CT skenování laboratorní nádorové (U87MG buněčná linie) myši 30 minut a 90 minut po aplikaci  $^{68}\text{Ga}$  značeného FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub>. Radioaktivní signál  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  30 min po aplikaci byl zaznamenán v místě podání, ledvinách, močovém měchýři a také v nádorové tkáni. Po 90 minutách od aplikace  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  nebyl radioaktivní signál v místě podání již příliš výrazný, ale celkové rozložení radioaktivního signálu bylo podobné, jako v případě skenování v čase 30 min po aplikaci. Ukázalo se tedy, že sideroforem derivatizovaný RGD peptid, konkrétně  $^{68}\text{Ga}$  značený FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> lze použít ke zobrazení glioblastomu. Na obrázku 14 jsou pak pro porovnání zobrazeny výsledky statického PET/CT skenování laboratorní nádorové (U87MG buněčná linie) myši 30 minut a 90 minut po aplikaci kontrolního radioaktivně značeného RGD peptidu derivatizovaného standardně používaným chelátorem NODAGA. Obě látky jsou vychytávány U87MG buněčnou linií *in vivo* a lze je použít ke zobrazení glioblastomu pomocí PET/CT.  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  i  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  ukázaly podobné farmakokinetické vlastnosti s rozdílnou retencí v ledvinách a nádorové tkáni.



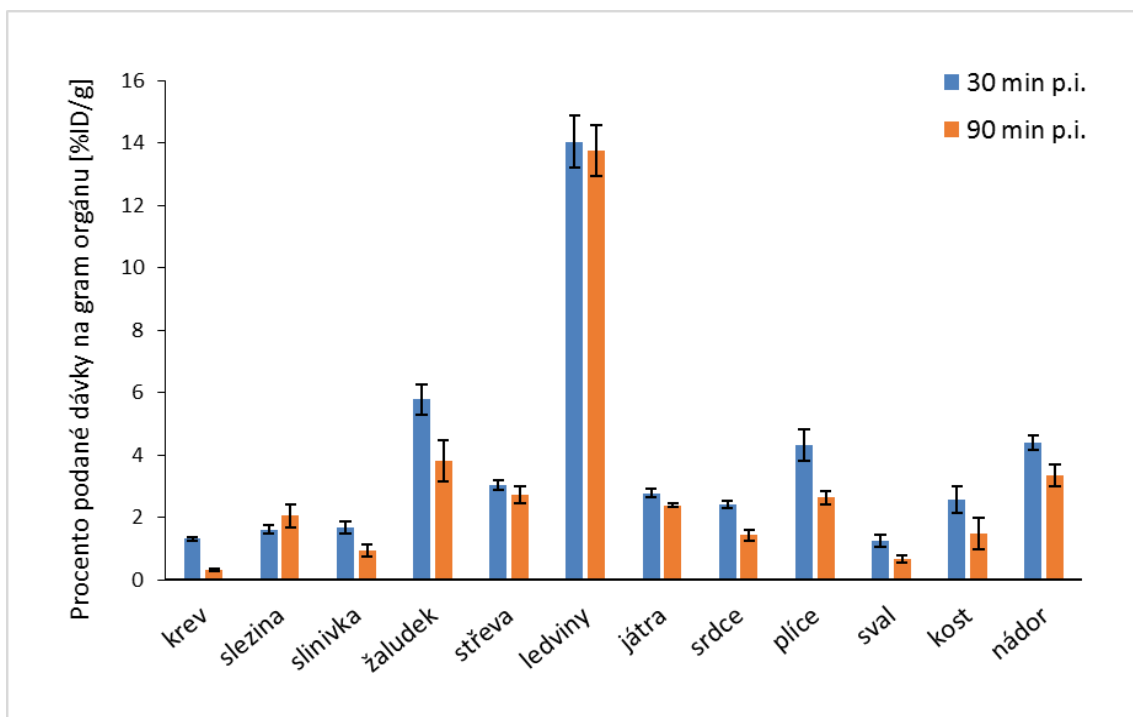
Obr. 13: Statické PET/CT skenování nádorové myši 30 minut a 90 minut po aplikaci látky  $^{68}\text{Ga-FSC-c(RGDfK)}_3$ . Koronální řezy (1 – místo podání, 2 – nádor, 3 – ledviny, 4 – močový měchýř) a 3D obrázky.



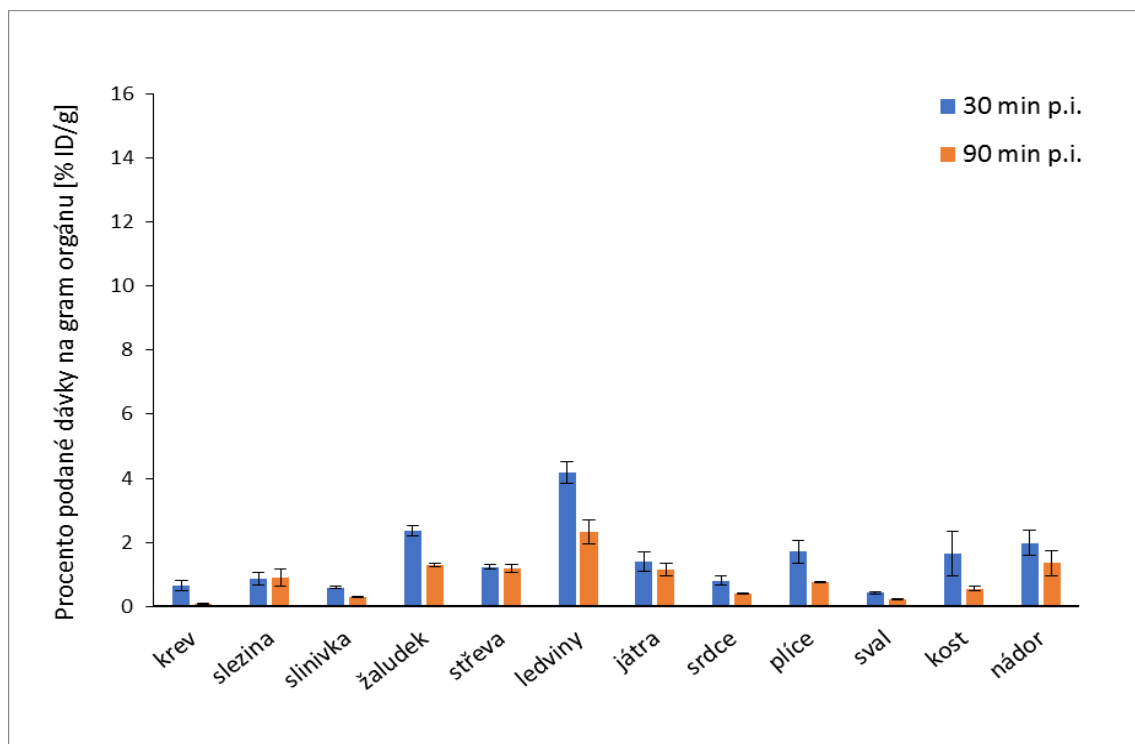
Obr. 14: Statické PET/CT skenování nádorové myši 30 minut a 90 minut po aplikaci látky  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}_3$ . Koronální řezy (1 – místo podání, 2 – nádor, 3 – ledviny, 4 – močový měchýř) a 3D obrázky.

#### 4.1.6 *Ex vivo* biodistribuce

Jednotlivé orgány odebrané nádorovým (U87MG buněčná linie) myším 30 a 90 min po aplikaci testovaných látek byly analyzovány na automatickém gama počítači. Naměřená data byla převedena na hodnoty procentuálního zastoupení podané dávky na gram určitého orgánu (%ID/g) u obou studovaných látek:  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  (graf 1 a 2). Nejvyšší radioaktivní signál po aplikaci  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  i  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  byl zaznamenán v ledvinách. 30 min po aplikaci  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  byla v ledvinách stanovena hodnota  $14,05 \pm 0,14$  %ID/g. Podobná hodnota ( $13,76 \pm 0,81$  %ID/g) byla zaznamenána i 90 min po podání  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$ . V nádorové tkáni byly zaznamenány hodnoty  $4,4 \pm 0,25$  %ID/g (30 min p.i.) a  $3,4 \pm 0,36$  %ID/g (90 min p.i.). Po aplikaci látky  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  nádorovým (U87MG buněčná linie) myším byly zaznamenány výrazně nižší hodnoty jak v ledvinách, tak v nádorové tkáni v porovnání s  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$ . Výsledky *ex vivo* biodistribuce studovaných látek jsou zaznamenány v grafech 1 a 2, a v tabulce 3.



Graf 1: *Ex vivo* biodistribuce u nádorových (U87MG) myši 30 a 90 min po aplikaci  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  (průměr ze 3 zvířat/časový interval).

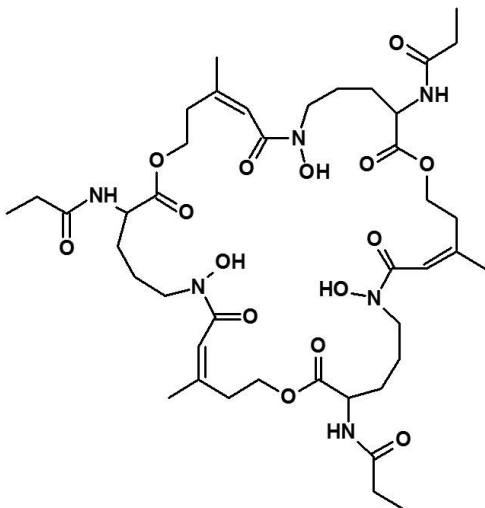


Graf 2: Ex vivo biodistribuce u nádorových (U87MG) myší 30 a 90 min po aplikaci <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDfK) (průměr ze 3 zvířat/časový interval).

Tab. 3: Hodnoty aplikování dávky studovaných látek na gram orgánu (ledviny a nádor).

Radioaktivní látka	Naměřená hodnota v ledvinách [% ID/g]	Naměřená hodnota v nádoru [% ID/g]
Po 30 min. aplikaci <sup>68</sup> Ga-FSC-[c(RGDfK)] <sub>3</sub>	14,05±0,85	4,4±0,25
Po 90 min. aplikaci <sup>68</sup> Ga-FSC-[c(RGDfK)] <sub>3</sub>	13,76±0,81	3,4±0,36
Po 30 min. aplikaci <sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(RGDfK)	4,17±0,35	1,99±0,4
Po 90 min. aplikaci <sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(RGDfK)	2,33±0,38	1,35±0,39

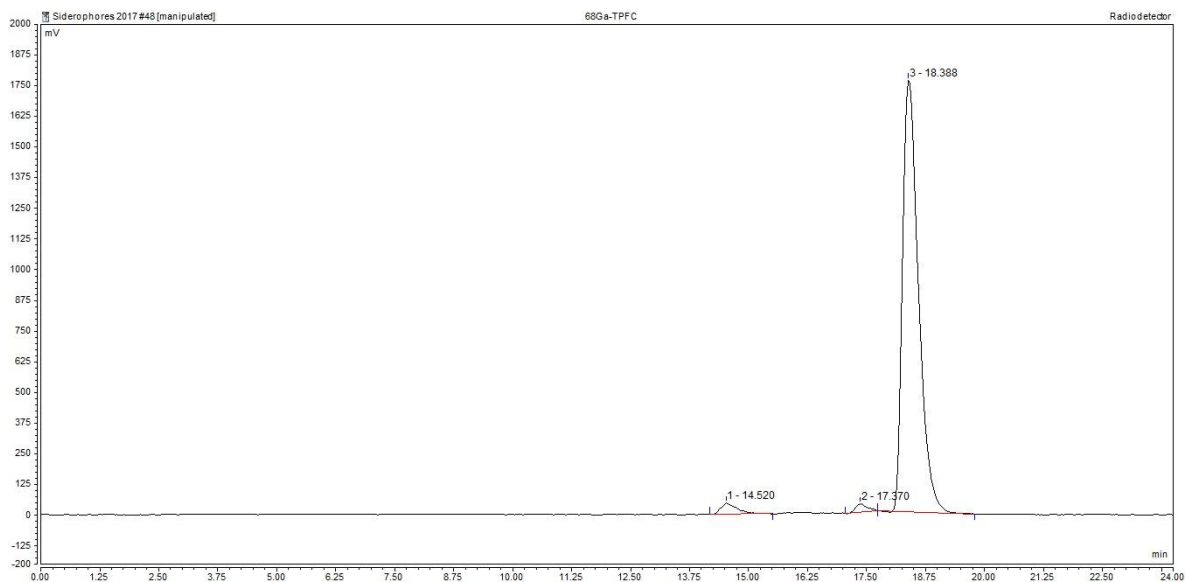
## 4.2 Derivatizovaný siderofor TPFC



Obr. 15: Chemická struktura derivatizovaného sideroforu TPFC.

### 4.2.1 Radioaktivní značení a kontrola kvality

U všech testovaných množství TPFC byla pomocí HPLC stanovena vysoká (>95 %) radiochemická čistota připraveného komplexu  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC. Pouze v případě použití 0,1  $\mu\text{g}$  TPFC činila radiochemická čistota pouze 48,4 %. Nejvyšší radiochemická čistota (96,8 %) byla pozorována při použití 10  $\mu\text{g}$  TPFC (Tab. 4). Z radiochromatogramu na obrázku č. 16 je patrné, že retenční čas  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC je v daném chromatografickém systému 18,4 minut. Pro navazující experimenty jsem jako optimální množství TPFC pro značení galliem-68 zvolila 10  $\mu\text{g}$ .



Obr. 16: Radiochromatogram látky  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC.

Tab. 4: Optimalizace množství TPFC pro radioaktivní značení galliem-68.

Množství TPFC ( $\mu\text{g}$ )	Radiochemická čistota (%) $^{68}\text{Ga}$ -TPFC
0,1	48,4
1	95,8
5	96,3
10	96,8

#### 4.2.2 *In vitro* stabilita

Komplex  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC byl vysoce stabilní v lidském séru a v prostředí konkurenčního chelátoru DTPA. V prostředí 0,1 M  $\text{FeCl}_3$  byla naměřena velmi nízká stabilita, v důsledku pravděpodobného rozložení komplexu  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC a navázání  $\text{Fe}^{3+}$  namísto  $\text{Ga}^{3+}$ . Výsledky *in vitro* stability  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC po 30, 60 a 120minutové inkubaci při 37 °C v různých prostředích jsou shrnuty v tabulce 5.

### 4.2.3 Rozdělovací koeficient (log *P*)

Výsledná hodnota rozdělovacího koeficientu pro komplex  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  činila  $-0,97 \pm 0,06$  (stanovená z průměru 6 měření; viz tabulka 5).

### 4.2.4 Vazba na proteiny

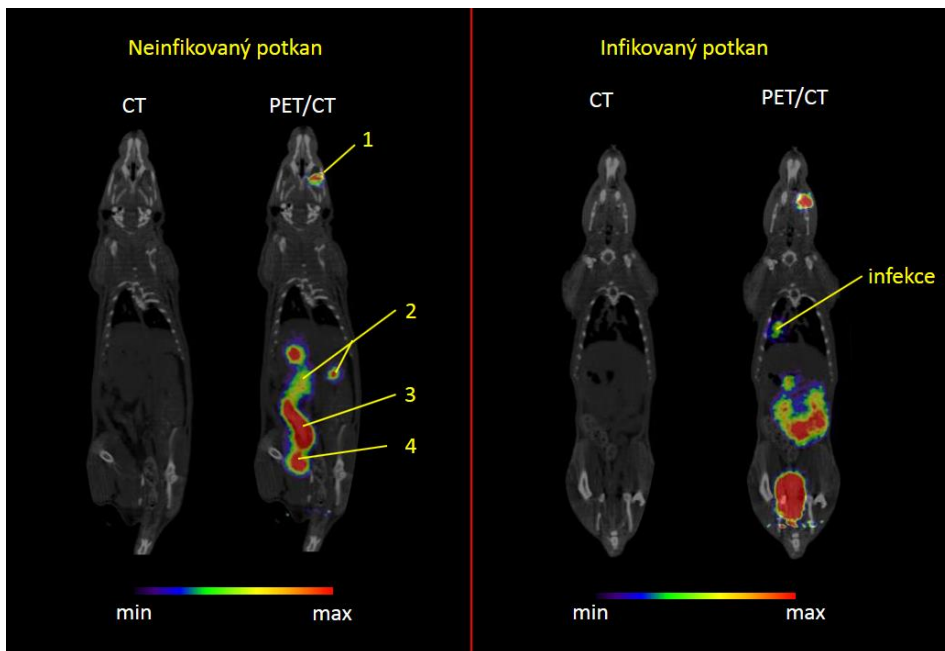
Rozhodující hodnotou pro stanovení vazby komplexu  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  na plazmatické proteiny byla hodnota radioaktivity v eluátu, naměřená pomocí automatického gama počítače. Nejvyšší naměřená hodnota vazby komplexu  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  na plazmatické proteiny byla zaznamenána po 120minutové inkubaci při 37 °C a činila 3,44 %. Výsledné hodnoty vazby  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  na plazmatické proteiny stanovené po 30, 60 a 120minutové inkubaci při 37 °C jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5: *In vitro* charakterizace a stabilita komplexu  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  v různých prostředích.

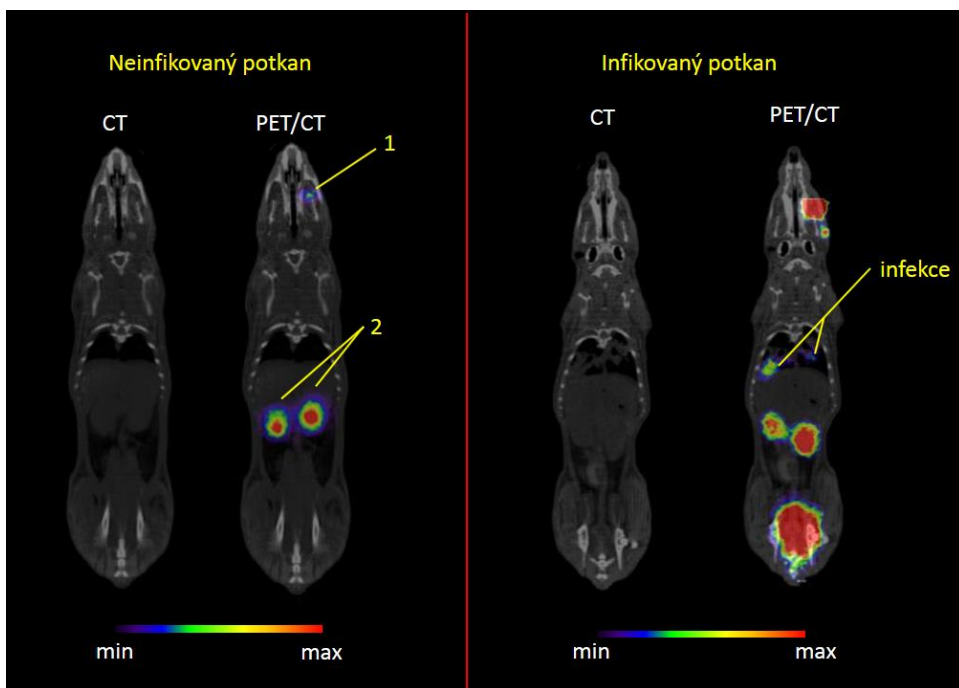
Radioaktivně značená látka	Log <i>P</i> ± SD	Inkubace (min)	Stabilita v lidském séru (%)	Stabilita v 0,1 M FeCl <sub>3</sub> (%)	Stabilita v 6 mM DTPA (%)	Vazba na proteiny (%)
$^{68}\text{Ga-TPFC}$	$-0,97 \pm 0,06$	30	96,75	4,08	96,96	2,94
		60	96,82	1,75	92,2	1,02
		120	96,95	5,81	91,69	3,44

### 4.2.5 PET/CT zobrazení infikovaných a neinfikovaných potkanů

Statické skenování pomocí PET/CT u potkanů infikovaných *A. fumigatus* 45 min po aplikaci ukázalo akumulaci  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  v plicích, střevech, ledvinách a močovém měchýři. Zatímco u neinfikovaných potkanů akumulace  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  v plicích nebyla zobrazena (obr. 17). U kontrolní látky ( $^{68}\text{Ga-TAFC}$ ) byla pozorována akumulace taktéž v plicích, ledvinách a močovém měchýři a u neinfikovaných potkanů nebyla zjištěna žádná *in vivo* absorpce v plicní oblasti (obr. 18). Obě testované látky ukázaly podobné farmakokinetické vlastnosti. Určitý rozdíl byl pozorován zejména v exkreci  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  a  $^{68}\text{Ga-TAFC}$ .  $^{68}\text{Ga-TPFC}$  byl částečně vylučován i gastrointestinální cestou, zatímco  $^{68}\text{Ga-TAFC}$  se eliminoval převážně ledvinami.



Obr. 17: Statické PET/CT skenování neinfikovaného a infikovaného (*A. fumigatus*) potkana po aplikaci látky radioaktivně značené látky  $^{68}\text{Ga-TPFC}$ . Koronální řezy (1 – místo podání infekce, 2 – ledviny, 3 – střeva, 4 – močový měchýř).

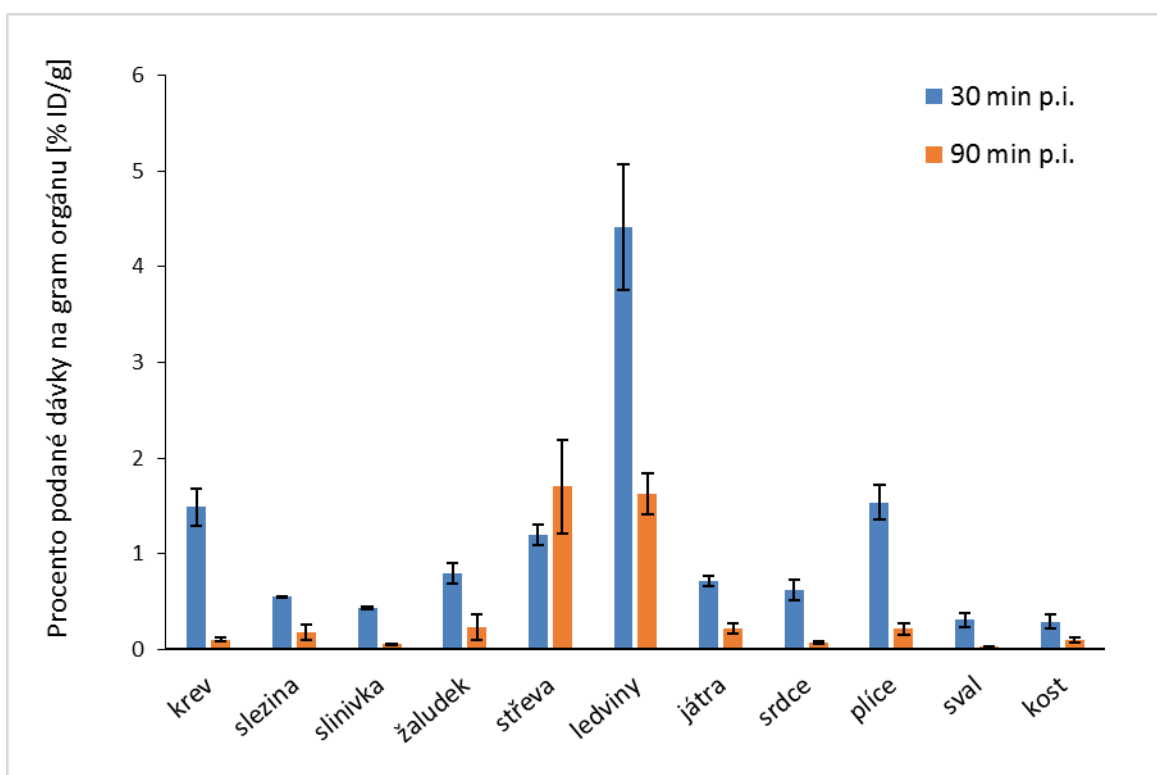


Obr. 18: Statické PET/CT skenování neinfikovaného a infikovaného (*A. fumigatus*) potkana po aplikaci radioaktivně značené látky  $^{68}\text{Ga-TAFC}$ . Koronální řezy (1 – místo podání infekce, 2 – ledviny).



#### 4.2.6 *Ex vivo* biodistribuce

Po r.o. aplikaci  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC laboratorním myším docházelo k rychlé eliminaci radioaktivity z krve i ostatních orgánů a tkání přes ledviny a částečně i gastrointestinální cestou. Nejvyšší radioaktivní signál byl zaznamenán v ledvinách a střevech. 30 min po aplikaci  $^{68}\text{Ga}$  značeného TPFC byla v ledvinách změřena aktivita  $4,41 \pm 0,66$  %ID/g, která se čase snižovala na hodnotu  $1,63 \pm 0,21$  %ID/g (90 min p.i.). Ukázalo se, že  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC má v myších velmi podobný biodistribuční profil jako  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC (Petrik *et al.*, 2010). *Ex vivo* biodistribuční data  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC v myších jsou shrnuta v grafu 3.



Graf 3: *Ex vivo* biodistribuce u myší 30 a 90 min po aplikaci  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC.

## 5 DISKUZE

Glioblastom je nejzávažnější primární nádorové onemocnění mozku, vyskytující se převážně u dospělých jedinců. Standartně používanou léčbou je chirurgická resekce (pokud je to možné), po níž následuje radioterapie se souběžnou adjuvantní chemoterapií s temozolomidem. Prognóza je velmi špatná, pacienti se dožívají obvykle 15 měsíců. Včasná diagnostika by tak mohla prodloužit tuto krátkou dobu přežití. Základními zobrazovacími metodami pro diagnostiku glioblastomu jsou CT, MR, PET a SPECT. Pozitronová emisní tomografie využívá k diagnostice radiofarmaka, která umožňují zobrazovat nádor na molekulární úrovni. V současné době se využívají hybridní systémy, které spojují PET techniku s MR nebo CT (PET/CT, PET/MR), které umožňují souběžně diagnostikovat anatomii a funkci dané tkáně či orgánu.

Radiofarmaka jsou léčivé přípravky, které se skládají z radionuklidu, signalizující lokalizaci a množství radiofarmaka v těle a biologicky aktivní molekuly (BAM), která zajišťuje přítomnost radiofarmaka v místě, které chceme vyšetřit nebo farmakologicky ovlivnit. Aby došlo ke kovalentnímu navázání radionuklidu ke zkoumané BAM, využívají se bifunkční chelatační činidla (Kubinyi, 2015).

Jedním z prvních a nejpoužívanějších radiofarmak pro diagnostiku nádorových onemocnění se stala  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglukóza ( $^{18}\text{F}$ -FDG). Zvýšená absorpce FDG je způsobena výrazným zvýšením glykolytické rychlosti, kdy dochází k aktivaci leukocytů. GLUT receptory a zvýšená aktivita hexokinázy v aktivovaných leukocytech je velmi podobná v nádorových buňkách. Díky akumulaci  $^{18}\text{F}$ -FDG v zánětlivých a infekčních buňkách dochází k falešně pozitivním a falešně negativním výsledkům při detekci nádorových onemocnění (Jacobson et al., 2012). V důsledku toho se testují nové radionuklidy a biologicky aktivní molekuly, které by umožnily specifickou akumulaci v cílových nádorových tkáních a bylo by možné je zobrazit pomocí PET/CT.

V nedávných studiích byla zkoumána další radiofarmaka pro klinické využití v radiodiagnostice nádorových onemocnění mozku, jako je například  $^{11}\text{C}$ -methionin (MET), O-(2- $^{18}\text{F}$ -fluorethyl)-L-tyrosin ( $^{18}\text{F}$ -FET), 6- $^{18}\text{F}$ -fluoro-L-dopa ( $^{18}\text{F}$ -FDOPA), 39-deoxy39- $^{18}\text{F}$ -fluorothymidin ( $^{18}\text{F}$ -FLT) a  $^{18}\text{F}$ -fluoromizonidazol (Chen, 2007).

Se zvyšující se dostupností  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátorů se radiofarmaka značená  $^{68}\text{Ga}$ , zejména na bázi peptidů, dostávají do oblasti zájmu vývoje nových radiofarmak pro diagnostiku nádorových a infekčních onemocnění (Fani et al., 2008). Výhody generátorového  $^{68}\text{Ga}$  spočívají ve snadné dostupnosti radionuklidu bez potřeby cyklotronu a možnosti přímých strategií značení, které jsou optimální pro automatizaci syntézy. Nejčastěji používaným chelatačním činidlem pro různé radioaktivní kovy, včetně  $^{68}\text{Ga}$ , je kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová (DOTA). I když se  $^{68}\text{Ga}$  značená radiofarmaka rychle rozšiřují, počet alternativ radiofarmak na bázi DOTA chelátoru pro konjugaci s biomolekulami, je stále omezen a nová bifunkční chelatační činidla jako jsou siderofory by mohly napomoci dalšímu rozvoji tohoto typu radiofarmak (Velikyan, 2014).

Siderofory jsou nízkomolekulární chelatační činidla s velmi vysokou afinitou k železitým iontům, které využívají bakterie, houby a rostliny pro příjem a skladování železa (Winkelmann, 1991). Nedávno bylo prokázáno, že siderofory značené  $^{68}\text{Ga}$ , zejména triacetylfusarinin-C (TAFC), umožňuje diagnostikovat invazivní aspergilózu (IA) (Petrik et al., 2010). Jeho deacetylovaná forma fusarinin C (FSC) obsahuje tři primární aminové skupiny, které mohou být použity pro konjugaci s biomolekulami, jako jsou RGD peptidy (Winkelmann, 2002). RGD peptidy obsahují sekvenční motiv arginin-glycin-aspartát a jsou ligandem pro integrin  $\alpha_v\beta_3$ , který je nadměrně exprimován v aktivovaných endotelových buňkách během angiogeneze a v některých nádorových buňkách (např. melanomu, glioblastomu, pankreatu a děložního čípku) (Eliceiri a Cheresch, 1999).

Studie prezentovaná Knetschem et al. se zaměřila na konjugaci tří RGD peptidů na fusarinin C značený  $^{68}\text{Ga}$ . Připravené radiofarmakum  $^{68}\text{Ga}$ -FSC-(RGD)<sub>3</sub> vykazovalo vysokou radiochemickou čistotu, stabilitu a výrazně lepší *ex vivo* biodistribuci v nádorové tkáni ve srovnání s  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD. Fusarinin C tak může být použit jako základ pro vývoj nových cílených biokonjugátů pro PET zobrazení nádorových onemocnění (Knetsch et al., 2015).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala přípravou a analýzou derivatizovaného sideroforu FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> značeného  $^{68}\text{Ga}$ . Následně jsem stanovila *in vitro* charakterizaci a stabilitu studovaného radiofarmaka v různých prostředích a dále jsem

sledovala biologické chování v laboratorních myších se subkutánně aplikovanou nádorovou linií U87MG (lidský glioblastom). Získané výsledky byly porovnány se standardně používaným radiofarmakem  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$ .

Pro derivatizovaný siderofor  $\text{FSC-[c(RGDfK)]}_3$  bylo studováno optimální množství pro radioaktivního značení galliem-68, které by vykazovalo vysokou radiochemickou čistotu (>95%). Při použití množství 0,1  $\mu\text{g}$  byla pozorována velmi nízká radiochemická čistota (19,7%), avšak při dalších použitých množstvích, byla splněna podmínka vysoké radiochemické čistoty. Pro další experimenty bylo zvoleno použití množství 10  $\mu\text{g}$ , s nejvyšší naměřenou radiochemickou čistotou (99,8 %).

*In vitro* testy zahrnovaly testy stability v různých prostředích, stanovení vazby na plazmatické proteiny a rozdělovací koeficient. Aby bylo možné radiofarmakum použít pro potenciální aplikaci pacientům, musí vykazovat vysokou stabilitu v lidském séru. Po 30, 60 a 90minutové inkubaci při 37 °C byla naměřena vysoká radiochemická čistota ve všech zkoumaných časových intervalech (více jak 97 %).

Siderofory mají vysokou afinitu k železitým iontům. Testovala jsem, zda-li derivatizovaný siderofor bude stabilní právě v prostředí konkurenčního železitého iontu ( $\text{FeCl}_3$ ). Komplex  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  vykazoval v tomto prostředí velmi nízkou stabilitu, došlo tak pravděpodobně k rozpadu komplexu a navázání  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{FSC-[c(RGDfK)]}_3$ , zatímco u kontrolního  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  byla naopak pozorována vysoká stabilita v prostředí  $\text{FeCl}_3$  (97,2 %). Jedním z významných, často používaných bifunkčních chelátorů je DTPA. Komplex  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  vykazoval vysokou stabilitu v prostředí konkurenčního chelátoru DTPA ve všech stanovovaných časových intervalech.

Rozdělovací koeficient  $\log P$  popisuje rozdělení dané látky ve dvou vzájemně nemísitelných fázích (n-oktanol-voda). Vyjadřuje se ve formě dekadického logaritmu podílu procentuálního zastoupení radioaktivity v oktanolové a vodné fázi. Hodnota lipofility je velmi důležitá pro vývoj nových léčiv. Pro injekční podání jsou vhodné velmi nízké hodnoty ( $\log P < 1$ ), což určuje hydrofilní charakter, pro perorální podání se pohybují v rozmezí 0-3 a transdermální podání naopak vyžaduje vysoké hodnoty, určující lipofilní charakter ( $\log P > 1$ ). Diagnostická radiofarmaka se aplikují intravenózně a tak by měla

vykazovat hydrofilní vlastnosti, aby byla použita pro potenciální klinickou aplikaci pacientům. Testovaná látka vykazovala  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  hydrofilní charakter, podobně jako kontrolní látka  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$ . V publikaci Zhai et al., byly studovány siderofory derivatizované trimerními RGD peptidy-  $^{68}\text{Ga-FSC-(succ-RGD)}_3$ ,  $^{68}\text{Ga-FSC-(RGDfE)}_3$  a  $^{68}\text{Ga-FSC-(Mal-RGD)}_3$ , zkoumané pro PET/CT zobrazení nádorové linie MEL-1, u nichž byly naměřeny podobné hodnoty  $\log P$  (Zhai et al., 2016).

V dalším *in vitro* testu byla stanovena hodnota vazby  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  na plazmatické proteiny, pomocí gelové chromatografie. Gel obsahující póry definovaných rozměrů slouží jako molekulové síto pro látky lišící se svou molekulovou velikostí a tvarem. Malé molekuly vnikají do vnitřních prostor gelových částic, čímž jsou na koloně zadržovány déle než velké molekuly ( $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  vázané na plazmatické proteiny), které jsou unášeny proudem mobilní fáze a vytékají z kolony dříve. Proto zásadní hodnotou pro určení vazby na proteiny byla hodnota stanovená v eluátu. Pro  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  byly pozorovány lehce vyšší hodnoty vazby na plazmatické proteiny (5,16 %) než u látky  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$ .

Další experimenty zahrnovaly PET/CT skenování nádorové (U87MG buněčná linie) myši 30 minut a 90 minut po aplikaci  $^{68}\text{Ga}$  značeného  $\text{FSC-[c(RGDfK)]}_3$  a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$ . Radioaktivní signál  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  30 min po aplikaci byl zaznamenán v místě podání, ledvinách, močovém měchýři a také v nádorové tkáni. Podobné výsledky PET/CT zobrazení vykazovala látka  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$ , avšak s nižší intenzitou radioaktivního signálu.

*Ex vivo* biodistribuční studie ukázala rozdílnou retenci v ledvinách a nádorové tkáni, kdy 90 minut po aplikaci látky  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  byly naměřeny až 6krát vyšší hodnoty v ledvinách než u  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(RGDfK)}$  a 3krát vyšší hodnoty v nádorové tkáni. *Ex vivo* biodistribuce potvrdila, že obě látky byly specificky vychytávány U87MG buněčnou linií *in vivo* a  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  lze tak použít ke zobrazení lidského glioblastomu pomocí PET/CT.

Liu et al. testovali monomerní, dimerní a tetramerní RGD peptidy konjugované s chelátorem NOTA značeným  $^{68}\text{Ga}$ , které vykazovaly zvýšenou vazebnou afinitu k receptoru pro integrin  $\alpha_v\beta_3$  a prodlouženou retenci v nádoru, ale také akumulaci

v ledvinách podobně jako studovaná látka  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  (Liu et al., 2008). Dimerní RGD peptidy vykazovaly nejlepší farmakokinetické výsledky a jsou tak považovány za vhodnější molekuly pro potenciální klinické testování. Dále bylo pozorováno lehce vyšší vychytávání nádorovou linií U87MG při použití aktivní molekuly c(RGDyK) oproti c(RGDfK). Oxboel et al. studovali látku NODAGA-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> značenou  $^{68}\text{Ga}$  pro PET zobrazování glioblastomu (Oxboel et al., 2014). Ve srovnání s NODAGA-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> moje studovaná látka  $^{68}\text{Ga-FSC-[c(RGDfK)]}_3$  vykazovala vyšší retenci v nádorové linii U87MG. Ukázalo se, že siderofor FSC derivatizovaný RGD peptidem má podobné farmakokinetické vlastnosti jako různé varianty NODAGA-RGD peptidů a mohl by být použitelný k diagnostice lidského glioblastomu.

Invazivní aspergilóza je infekční onemocnění způsobené vláknitou houbou *Aspergillus fumigatus*. S rostoucí populací imunosupresivních pacientů se výskyt těžké a často fatální invazivní plicní aspergilózy v posledních desetiletích značně zvyšuje. (Tekaia a Latgé, 2005). Celková úmrtnost IA je velmi vysoká, pohybuje se od 40-90 % u vysoce rizikových pacientů (Lin et al., 2001). Včasná a přesná diagnostika je tak klíčovým faktorem pro zahájení včasné a účinné léčby a následné snížení mortality pacientů. V současné době se v klinické praxi používá řada testů a technik, které bohužel nemají dostatečnou citlivost nebo specifitu a diagnostika IA je tak nadále velmi náročná (Walsh a Stevens, 2012).

Zobrazovací techniky nukleární medicíny by při použití vhodného radiofarmaka mohly být potenciálně použitelné pro diagnostiku invazivní aspergilózy. Tomografické zobrazovací metody jako je PET nebo SPECT jsou neinvazivními technikami s vysokým rozlišením a citlivostí, případná specifita vyšetření je pak dána vhodně navrženými radiofarmaky. Bylo studováno mnoho radiofarmak použitých v klinické praxi nukleární medicíny pro zobrazování zánětů nebo infekcí např.  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglukóza (FDG) a  $^{67}\text{Ga}$ -citrát, nicméně tyto látky nebyly dostatečně specifické pro detekci IA (Del Val Gómez, et al., 2000; Hot et al., 2011). Dalšími navrhovanými radiofarmaky pro klinickou aplikaci detekce infekce byly  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -polyethylenglykolový lipozom,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -interleukin-8 a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -flukonazol. Avšak žádná z těchto látek také neprokázala specifické mechanismy detekce infekce způsobené druhy *Aspergillus* a žádná z nich nebyla zařazena do klinických studií

(Boerman et al., 2000; Rennen et al., 2004; Lupetti, et al., 2002). Další studií byla zjištěna *in vivo* detekce invazivní aspergilózy, založená na peptidu vázajícího se na houbové hyfy (c (CGGRLGPFC)-NH<sub>2</sub>) značeného <sup>111</sup>In. Nicméně, kumulace radioaktivity v místě infekce byla ve srovnání s dalšími studovanými látkami (<sup>68</sup>Ga-siderofory), mnohem nižší (Yang et al., 2009).

V nedávné studii bylo zjištěno, že siderofory jako jsou triacetylufusarinin C (TAFC) a ferioxamin E (FOXE) značené galliem-68 umožňují detekovat infekci invazivní aspergilózy pomocí PET/CT zobrazení (Petrik et al., 2010). *A. fumigatus* produkuje několik typů sideroforů, z nichž nejvýznamnější je právě jmenovaný triacetylufusarinin C (TAFC). Význam využití TAFC pro detekci infekce byl popsán Schrettl a kol., kteří pozorovali upregulaci biosyntézy a příjmu TAFC v průběhu infekce, stejně jako zeslabení virulence v případě inaktivace biosyntézy TAFC (Schrettl et al., 2007).

Železo je základní živinou ale také klíčovým faktorem virulence patogenních mikroorganismů (Sriharan, 2006). *Aspergillus* získává železo z komplexu, který vytvoří se sideroforem. Gallium-68 vykazuje podobné vlastnosti jako Fe<sup>3+</sup>, proto TAFC může být radioaktivně značen <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> a to zavedením gallia do železito-sideroforového komplexu výměnou za železo (Petrik et al., 2010). Tento komplex (<sup>68</sup>Ga-TAFC) je následně přenesen přes vysoce specifické transportéry, které jsou upregulovány během infekce *A. fumigatus*, což vede k rychlé akumulaci radiofarmaka v místě infekce a možnosti detekce infekce pomocí PET (Schrettl et al., 2007; Petrik et al., 2010).

V další studii bylo zkoumáno *in vitro* a *in vivo* chování vybraných hydroxamátových sideroforů (TAFC, FOXE) značených Zr-89. Triacetylufusarinin C (TAFC) a ferioxamin E (FOXE) jsou makrocyclické hydroxamátové siderofory s kruhovým rozsahem 35 atomů (TAFC) a 33 atomů (FOXE), které se považují za vhodné pro Zr<sup>4+</sup> chelataci a pro zachování optimální prostorové orientace (Guérard et al., 2013). Tyto siderofory byly zvoleny díky jejich předchozí úspěšné aplikaci pro zobrazování aspergilové infekce u potkanů (Petrik et al., 2010). Siderofory značené <sup>68</sup>Ga a <sup>89</sup>Zr vykazovali analogické, ale ne zcela totožné *in vitro* a *in vivo* chování. <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> se jevílo být vhodnějším radionuklidem pro značení hexadentátových hydroxamátových sideroforů (Petrik et al., 2016) a proto v mé práci bylo zvoleno značení galliem-68.

V mé diplomové práci jsem se zabývala preklinickým testováním derivatizovaného sideroforu *tri*-propionyl fusarinin C (TPFC), značeným radioaktivním  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ . Stanovovala jsem *in vitro* charakterizaci a testy stability v různých prostředích a sledovala jsem jeho biologické chování ve vhodných zvířecích modelech. Získaná data jsem porovnávala s přírodním sideroforem TAFC izolovaný z houby *Aspergillus fumigatus*, u kterého bylo prokázáno využití pro detekci invazivní aspergilózy (Petrik et al., 2010). Synteticky modifikovaný siderofor TPFC, vykazuje podobné strukturní vlastnosti jako TAFC a mohl by tak mít potenciální využití pro diagnostiku invazivní aspergilózy.

Na počátku experimentální práce bylo třeba stanovit optimální množství derivatizovaného sideroforu pro radioaktivní značení  $^{68}\text{Ga}$ , aby vykazovalo vysokou radiochemickou čistotou (>95%). Byla zvolena různá množství 0,1, 1, 5 a 10  $\mu\text{g}$  pro testování optimálních podmínek radioaktivního značení, z nichž 10  $\mu\text{g}$  vykazovalo nejvyšší radiochemickou čistotu (96,8 %) a bylo použito pro následující experimenty.

Dále byla provedena *in vitro* charakterizace a testy stability v různých prostředích. Aby bylo možné značený TPFC použít pro potenciální aplikaci pacientům, musí vykazovat vysokou stabilitu v lidském séru. Ukázalo se, že komplex  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC je vysoce stabilní, a to i po 120minutové inkubaci (96,9 %) podobně jako u studovaných sideroforů  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC a  $^{68}\text{Ga}$ -FOXEX (Petrik et al., 2012).

Komplex  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC vykazoval podobné hydrofilní vlastnosti a hodnoty nízké vazby na plazmatické proteiny jako  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC a  $^{68}\text{Ga}$ -FOXEX. V publikaci Petrik et al. bylo hodnoceno *in vitro* a *in vivo* chování i dalších sideroforů COP, FC, FCH, FUS a FOXB. Vykazovaly vyšší či menší nestabilitu zejména v lidském séru a v prostředí DTPA, avšak v prostředí železitého iontu byly stabilnější než studovaný siderofor TPFC, u kterého byla pozorována velmi nízká stabilita. Došlo pravděpodobně k rozpadu komplexu  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC a k navázání  $\text{Fe}^{3+}$  na TPFC. Naopak v prostředí konkurenčního chelátoru DTPA byla sledována vysoká stabilita 91,7 % i po 120minutové inkubaci, ve srovnání s  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC, který vykazoval mírně nižší stabilitu (81,8 %) (Petrik et al., 2016).

Následně bylo sledováno *in vivo* chování  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC v laboratorních potkanech prostřednictvím PET/CT zobrazování 45 minut po aplikaci. Radioaktivní signál  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC byl u intratracheálně infikovaných potkanů zobrazen v plicích, střevech, ledvinách a močovém měchýři. Zatímco u neinfikovaných potkanů akumulace  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC v plicích



nebyla zobrazena. U kontrolní látky ( $^{68}\text{Ga}$ -TAFC) byla u infikovaných potkanů pozorována akumulace taktéž v plicích, ledvinách a močovém měchýři a u neinfikovaných potkanů nebyla akumulace v plicích pozorována. Obě testované látky ukázaly podobné farmakokinetické vlastnosti. Určitý rozdíl byl pozorován zejména v exkreci  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC a  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC.  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC byl částečně vylučován i gastrointestinální cestou, zatímco  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC se eliminoval převážně ledvinami.

*Ex vivo* biodistribuční studie v neinfikovaných myších prokázaly, že  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC vykazuje téměř identickou *ex vivo* biodistribuci jako  $^{68}\text{Ga}$ -TAFC (Petrik et al., 2012). Oba dva komplexy se rychle vylučovaly primárně přes ledviny a částečně i gastrointestinální cestou (především  $^{68}\text{Ga}$ -TPFC) a vykazovaly minimální retenci v krvi a v dalších orgánech.

## 6 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo radioaktivně označit derivatizované siderofory FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> a TPFC galliem-68 a následně stanovit a porovnat *in vitro* charakteristiku a *in vivo* chování s RGD peptidem derivatizovaným standardně používaným chelátorem NODAGA, pro diagnostiku lidského glioblastomu a s přírodním sideroforem TAFC značeným <sup>68</sup>Ga pro experimentální diagnostiku invazivní aspergilózy. Nedílnou součástí této práce bylo také porovnání biodistribučních dat získaných automatickým gama počítačem, s daty získanými pomocí zobrazovacích metod (PET/CT).

Oba derivatizované siderofory bylo možné radioaktivně označit galliem-68 s vysokou radiochemickou čistotou. Byla zaznamenána vysoká stabilita v lidském séru a v prostředí konkurečního chelátoru DTPA, velmi nízká vazba na plazmatické proteiny a hydrofilní vlastnosti testovaných látek, nicméně v prostředí konkurečního železitého iontu byly obě testované látky vysoce nestabilní.

Po aplikaci látky <sup>68</sup>Ga-FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> pokusným zvířatům byla zaznamenána vyšší intenzita radioaktivního signálu v nádorové tkáni než u <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDfK), prostřednictvím PET/CT zobrazování. Výsledky *ex vivo* biodistribuce ukázaly odlišnou retenci v nádorové tkáni a ledvinách. *In vivo* experimenty prokázaly, že <sup>68</sup>Ga-FSC-[c(RGDfK)]<sub>3</sub> byl vychytáván buněčnou linií lidského glioblastomu a lze ho tak použít ke zobrazení glioblastomu pomocí PET/CT.

Po aplikaci látky <sup>68</sup>Ga-TPFC laboratorním zvířatům byl zaznamenán radioaktivní signál v místě infekce podobně jako u kontrolní látky <sup>68</sup>Ga-TAFC. *Ex vivo* biodistribuční studie potvrdila výsledky získané PET/CT zobrazování testovaných zvířat. Oba dva komplexy se rychle vylučovaly přes ledviny a zejména <sup>68</sup>Ga-TPFC částečně i gastrointestinální cestou.

Testované derivatizované siderofory značené galliem-68 vykazovaly vysokou *in vitro* stabilitu, velmi dobré farmakokinetické vlastnosti a *in vivo* akumulaci ve studovaných tkáních (v nádoru a místech infekce). Na základě těchto výsledků, lze tyto experimentální radioaktivně značené látky považovat za vhodné pro potenciální použití v klinické praxi.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Accorsi R. (2008) Brain single-photon emission CT physics principles. *Am. J. Neuroradiol.* **29** (7): 1247-1256.
- Agosta F., Galantucci S., Filippi M. (2017) Advanced magnetic resonance imaging of neurodegenerative diseases. *Neurol. Scienc.* **38** (1): 41–51.
- Aleksenko A., Gyasi R.K. (2006) Disseminated invasive aspergillosis. *Ghana. Med. J.* **40** (2):69-72.
- Ali S.S., Vidhale N.N. (2013) Bacterial siderophore and their application: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Scienc.* **2** (12): 303-312.
- Aouad F., Florence A., Zhang Y, Collins F., Henry C., Ward R.J., Crichton R.R. (2002) Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorg. Chim. Acta.* **339**: 470-480.
- Balyasnikova S., Löfgren J., Nijs R., Zamogilnaya Y., Højgaard L., Fischer B.M. (2012) PET/MR in oncology: an introduction with focus on MR and future perspectives for hybrid imaging. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2** (4): 458-474.
- Barnes P.D., Marr K.A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **20**: 545-561.
- Basu S., Kwee T., Surti S., Akin E., Yoo D., Alavi A. (2011) Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Ann. NY Acad. Sci.* **1228** (1): 1-18.
- Berger A. (2003) How does it work? Positron emission tomography. *BMJ* **326** (7404): 1449.
- Bělohávek O. (2009) Pozitronová emisní tomografie, *Klinické PET a PET/CT*, pp. 13-20, Galén, Praha.
- Boerman O.C., Laverman P., Oyen W.J., Corstens F.H., Storm G. (2000) Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog. Lipid. Res.* **39** (5): 461-475.
- Boukhalfa H., Lack J., Reilly S.D., Hersman L., Neu M.P. (2003) Siderophore production and facilitated uptake of iron and plutonium in *P. putida*. *AIP Conf. Proc.* **673**: 343-344.
- Brandes A.A., Tosoni A., Franceschi E., Reni M., Gatta G., Vecht C. (2008) Glioblastoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **67** (2): 139-52.
- Brooks P.C., Clark R.A.F., Cheresh D.A. (1994) Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science.* **264** (5158): 569-571.

- Burger P.C., Vogel F.S., Green S.B. a Strike T.A. (1985) Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* **56** (5): 1106-1111.
- Bybel B., Brunken R.C., Shah S.S., Guiyun W., Turbiner E., Neumann D.R. (2006) PET and PET/CT imaging: What clinicians need to know? *Cleveland Clin. J. Med.* **73**: 1075-1087.
- Dagenais T.R.T., Keller N.P. (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** (3): 447-465.
- Del Val Gómez M., Gallardo F.G., Babe J., Cobo J. (2000) Ga-67 scan in invasive aspergillosis: a case report. *Clin. Nuc.l Med.* **25** (12): 1035-1036.
- Denning D.W. (1998) Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26** (4): 781-803.
- Degnan A.J., Samtani R., Paudel K., Levy L.M. (2014) Neuroimaging of epilepsy: a review of MRI findings in uncommon etiologies and atypical presentations of seizures. *Future Neurol.* **9** (4): 431-448.
- Detre J.A. (2007) Magnetic resonance imaging, *Neurobiology of disease*, pp. 793-800, Academic press, Burlington, USA.
- Doležalová I., Bolčák K., Kuba R. (2014) Využití pozitronové emisní tomografie (PET) v neurologii. *Neurol. praxi* **15** (1): 16-21.
- Dropcho E.J., Soong S.J. (1996) The prognostic impact of prior low grade gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* **313**: 144-147.
- Dumont R.A., Deininger F., Haubner R., Maecke H.R., Weber W.A., Fani M. (2011) Novel <sup>64</sup>Cu- and <sup>68</sup>Ga-labeled RGD conjugates show improved PET imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression and facile radiosynthesis. *J. Nucl. Med.* **52**: 1276-84.
- Caraco C., Aloj L., Eckelman W. (1998) The gallium–deferoxamine complex: stability with different deferoxamine concentrations and incubation conditions. *Appl. Radiat. Isot.* **49**: 1477–1479.
- Eliceiri B.P., Cheres D.A. (1999) The role of  $\alpha_v\beta_3$  integrins during angiogenesis: Insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.* **103** (9): 1227-1230.
- Ellor S.V., Pagano-Young T.A., Avgeropoulos N.G. (2014) Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J. Law. Med. Ethics.* **42**: 171-182.

- ENCR, European Network of Cancer Registries. Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon. 2001.
- Evanko D. (2008) Two pictures are better than one. *Nat. Methods* **5** (5): 377.
- Fani M., André J.P., Maecke H.R. (2008)  $^{68}\text{Ga}$ -PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast. Media. Mol. Imag.* **3**: 67-77.
- Fani M., Maecke H. R., Okarvi S. M. (2012) Radiolabeled peptides: Valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* **2** (5): 481-501.
- Ferda J., Mírka H., Baxa J. (2009) Multidetektorová výpočetní tomografie. Galén, Praha.
- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J. W. W., Comber H., Forman D., Bray F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Euro. J. Cancer.* **49**: 1374-1403.
- Fisher J.L., Schwartzbaum J.A., Wresch M., Wiemels J.L. (2007) Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin.* **25**: 867-890.
- Fishman M.C., Naidich J.B., Stein H.L. (1986) Vascular magnetic resonance imaging. *Radiol. Clin. North. Am.* **24** (3): 485-501.
- Gleason G.I. (1960) A positron cow. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **8**: 90-94.
- Greene M.W., Tucker W.D. (1961) An improved gallium-68 cow. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **12**: 62-63.
- Greene R.E., Schlamm R.E., Stark P. et al. (2003) Impact of halo and air-crescent signs on initial identification of invasive pulmonary aspergillosis: prevalence, variability of diagnosis and utility, *13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Glasgow UK, Oral Presentation O397.
- Guérard F., Lee Y.S., Tripier R., Szajek L.P., Deschamps J.R., Brechbiel M.W. (2013) Investigation of Zr(IV) and  $^{89}\text{Zr}$ (IV) complexation with hydroxamates: progress towards designing a better chelator than desferrioxamine B for immuno-PET imaging. *Chem. Commun. (Camb).* **49** (10): 1002-1004.
- Haas H., Eisendle M., Turgeon B.G. (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 149-187.

- Haubner R., Weber W.A., Beer A.J., Vabuliene E., Reim D., Sarbia M. et al. (2005) Noninvasive visualization of the activated  $\alpha_v\beta_3$  integrin in cancer patients by positron emission tomography and [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD. *PLoS Med.* **2**: e70.
- Heřman M. (2001) Zobrazovací metody, *Radiologie*, pp. 12-26, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Hider R.C., Kong X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 637-657.
- Hissen A.H., Moore M.M. (2005) Site-specific rate constants for iron acquisition from transferrin by the *Aspergillus fumigatus* siderophores N',N'',N'''-triacetylfusarinine C and ferricrocin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**: 211-220.
- Hood J.D., Cheresch D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* **2** (2): 91-100.
- Horvath JA., Dummer S. (1996) The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Med.* **100**: 171-178.
- Hot A., Maunoury C., Poiree S., Lanternier F., Viard J.P., Loulergue P., Coignard H., Bougnoux M.E., Suarez F., Rubio M.T., Mahlaoui N., Dupont B., Lecuit M., Faraggi M., Lortholary O. (2011) Diagnostic contribution of positron emission tomography with [ $^{18}\text{F}$ ]fluorodeoxyglucose for invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **17** (3): 409-417.
- Chou E.T., Carrino J.A. (2007) Magnetic resonance imaging, Pain Management Vol 1., pp. 106-117, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Jacobson M.S, Raymond A.S., Peller P.J. (2012) PET radiochemistry and radiopharmacy. *PET-CT and PET-MRI in Oncology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Johnson D.R., Fogh S.E., Giannini C., Kaufmann T.J., Raghunathan A., Theodosopoulos P.V., Clarke J.L. (2015) Case-based review: Newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol. Practice.* **2**: 106-121.
- Jovčevska I., Kočevar N., Komel R. (2013) Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? *Mol. Clin. Oncol.* **1**: 935-935.
- Khan A., Singh P., Srivastava A. (2017) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review. *Microbiol. Res.* in Press, Corrected proof.

- Kleihues P., Ohgaki H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Onco.* **1**: 44-51.
- Knetsch P.A., Zhai Ch., Rangger Ch., Bltazer M., Hass H., Kaeopookum P., Decristoforo C. (2015) [<sup>68</sup>Ga]FSC-(RGD)<sub>3</sub> a trimeric RGD peptide for imaging  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold—synthesis and evaluation. *Nucl. Med. Biol.* **42** (2): 115-122.
- Knetsch P.A., Petrik M., Griessinger C.M., Rangger C., Fani M., Kesenheimer C. et al. (2011) [<sup>68</sup>Ga]NODAGA-RGD for imaging  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **38**: 1303–1312.
- Köster W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12? *Res. Microbiol.* **152** (3-4): 291-301.
- Krewulak K.D., Vogel H.J. (2011) TonB or not TonB: is that the question? *Biochem. Cell. Biol.* **89** (2): 87-97.
- Krex D., Klink B., Hartmann C., von Deimling A., Pietsch T., Simon M. et al. (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130** (10): 2596-2606.
- Kubinyi J. (2015) Radiofarmaka, *Nukleární medicína*, pp. 37-38, Nakladatelství P3k, s.r.o., Praha.
- Kumar V., Boddeti D.K., Evans S.G., Roesch F., Howman-Giles R. (2011) Potential use of Ga-68-apo-transferrin as a PET imaging agent for detecting *Staphylococcus aureus* infection. *Nucl. Medic. Biol.* **38**: 393-398.
- Latgé J.P. (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **9** (8): 382-389.
- Lázniček M., Komárek P. (1998) *Základy radiofarmacie*. 1.vyd., Karolinum, Praha.
- Lee P.L., Gonzalez R.G. (2000) Magnetic resonance spectroscopy of brain tumors. *Curr. Opin. Oncol.* **12**: 199-204.
- Lin S.J., Schranz J., Teutsch S.M. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 358-366.
- Lionakis M.S., Kontoyiannis D.P. (2003) Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* **362** (9398): 1828-38.
- Liu S. (2008) Biofunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanc. Drug Del. Rev.* **60** (12): 1347-1370.

- Liu S., Edwards D.S. (2002) Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. *Top. Curr. Chem.* **222**: 259-278.
- Li Z.B., Chen K., and Chen X. (2008) (68)Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin alpha(v)beta (3) expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **35**: 1100-1108.
- Lupetti A., Welling M.M., Mazzi U., Nibbering P.H., Pauwels E.K. (2002) Technetium-99m labelled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **29** (5): 674-679.
- MacManus M., Nestle U., Rosenzweig K., Carrio I., Messa C., Belohlavek O., Danna M., Inoue T., Deniaud-Alexandre E., Schipani S., et al. (2009) Use of PET and PET/CT for radiation therapy planning: Iaea expert report 2006–2007. *Radiother. Oncol.* **91** (1): 85-94.
- Maertens J., Van Eldere J., Verhaegen J. et al. (2002) Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **186**: 1297-1306.
- Malcolm D., Richardson K.B., Hope W. (2009) *Aspergillus*, *Clinical Mycology (2nd ed.)*, pp. 271-296, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Mankoff D.A., Link J.M., Linden H.M., Sundararajan L, Krohn K.A. (2008) Tumor receptor imaging. *J. Nucl. Med.* **49**: 149-163.
- Masdeu J.C. (2007) Single-photon emission computed tomography, *Neurobiology of disease*, pp. 829-837, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA; San Diego, California, USA; London, UK.
- McDonagh A., Fedorova N.D., Crabtree J., Yu Y., Kim S., Chen D., et al. (2008) Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. *PLoS. Pathog.* **4**: 1000154.
- Mennink-Kersten M.A., Donnelly J.P., Verweij P.E. (2004) Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet. Infect. Dis.* **4**: 349-357.
- Miyakazi T.S.K., Mitsutake K., Maesaki S., Tanaka K., Ishikawa N., Hara K. (1995) Plasma (1–3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3115-3118.



- National Research Council, Division on Engineering and Physical Sciences, Mathematics and Applications Commission on Physical Sciences, Committee on the Mathematics and Physics of Emerging Dynamic Biomedical Imaging (1996) Single Photon Emission Computed Tomography, *Mathematics and Physics of Emerging Dynamic Biomedical Imaging*, National Academies Press, USA.
- Navrátil L., Filip S., Višek V. (2008) Infekční nemoci, *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*, pp. 345-356, Grada Publishing, a.s., Praha.
- Nelson S.J., Cha S. (2003) Imaging glioblastoma multiforme. *J. Cancer*. **9**:134-134.
- Nelson Ch.A. (2008) Incidental Findings in Magnetic Resonance Imaging (MRI) Brain Research. *J. Law. Med. Ethics*. **36** (2): 315-213.
- Oberegger H., Schoeser M., Zadra I., Abt B., Haas H. (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis: utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **41** (5): 1077-1089.
- Ohgaki H., Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170** (5): 1445-1453.
- Omuro A., DeAngelis L.M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: *J. Am. Med. Association* **310**: 1842-1850.
- Ostrom Q.T., Gittleman H., Farah H., Ondracek A., Chen Y., Wolinsky Y., et al. (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol.* **15** (2): 1-56.
- Oxboel J., Brandt-Larsen M., Schjoeth-Eskesen Ch., Myschetzky R., El-Ali H. H., Madsen J., Kjaer A. (2014) Comparison of two new angiogenesis PET tracers  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> and  $^{64}\text{Cu}$ -NODAGA-E[c-(RGDyK)]<sub>2</sub>; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl. Med. Biol.* **41** (3): 259-267.
- Patterson T.F., Minitier P., Patterson J.E., Rapoport J.M., Andriole V.T. (1995) *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **171**: 1553-1558.
- Pazos C., Ponton J., Palacio del A. (2005) Contribution of (1→3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 299-305.

- Petrik M., Haas H., Dobrozemsky G., Lass-Flörl C., Helbok A., Blatzer M., et al. (2010)  $^{68}\text{Ga}$ -siderophores for PET imaging of invasive pulmonary aspergillosis: proof of principle. *J. Nucl. Med.* **51**: 639-645.
- Petrik M., Haas H., Schrettl M., Helbok A., Blatzer M., Decristoforo C. (2012) *In vitro* and *in vivo* evaluation of selected  $^{68}\text{Ga}$ -siderophores for infection imaging. *Nucl. Med. Biol.* **39**: 361-369.
- Petrik M., Zhai Ch., Novy Z., Urbanek L., Haas H., Decristoforo C. (2016) *In vitro* and *in vivo* comparison of selected Ga-68 and Zr-89 labelled siderophores. *Mol. Imaging Biol.* **18**: 344-352.
- Philpott C.C. (2006) Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763** (7): 636-45.
- Philpott C.C., Protchenko O. (2008) Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell.* **7** (1): 20-7.
- Pooya H.A., Seguin B., Tucker R.L., Gavin P.R., Tobias K.M. (2004) Magnetic resonance imaging in small animal medicine: clinical applications. *Comp. Cont. Educ. Practic. Veterin.* **26**: 292-302.
- Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W. (2000). Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **275** (29): 21785-21788.
- Qaim S.M. (2012) The present and future of medical radionuclide production. *Radiochim. Acta.* **100**: 635-651.
- Ráčil Z., Mayer J (2007) Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. *Vnitř. Lék* **53** (Suppl.): 1-25.
- Raymond K., Dertz E., Kim S. (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Pro. Natl. Acad. Sci.* **100** (7): 3584-3588.
- Razbash A.A., Sevastianov Yu.G., Krasnov N.N., Leonov A.I., Pavlekin V. E. (2005) Germanium-68 row of products. *Proceedings of the 5th International Conference on Isotopes*, pp. 147-151, 5ICI, Brussels, Belgium, Medimond, Bologna.
- Reichert D.E., Lewis J.S., Anderson C.J. (1999) Metal complexes as diagnostic tools. *Coord. Chem. Rev.* **184**: 3-66.

- Rennen H.J., Bleeker-Rovers C.P., van Eerd J.E., Frielink C., Oyen W.J., Corstens F.H., Boerman O.C. (2004)  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled interleukin-8 for scintigraphic detection of pulmonary infections. *Chest*. **126** (6): 1954-1961.
- Roesch F. (2012) Maturation of key resource-the germanium-68/galium-68 generator: development and new insights. *Curr. Radiopharm.* **5**: 202-211.
- Rösch F. (2013) Past, present and future of  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generators. *Appl. Radiat. Isot.* **76**: 24-30.
- Ruth T.J. (2008) The uses of radiotracers in the life sciences. *Rep. Prog. Phys.* **72**: 23.
- Sah S., Singh R. (2015) Siderophore: structural and functional characterisation – a comprehensive review. *Agricult. (Pol'nohosp.)* **61** (3): 97-114.
- Saha G.B. (2010) *Fundamentals of Nuclear Pharmacy (6th ed.)*, pp. 83-113, Springer Science+Business Media, New York.
- Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (5): 3984-3999.
- Seidl Z., Vaněčková M. (2007) Mozkové nádory, *Magnetická rezonance hlavy, mozku a páteře*, pp.135-164, Grada Publishing a.s., Praha.
- Seute T., Leffers P., ten Velde G., Twijnstra A. (2008) Detection of brain metastases from small cell lung cancer. *Cancer* **112** (8): 1827-1834
- Shahhosseini S. (2011) PET Radiopharmaceuticals. *Iran. J. Pharm. Res.* **10** (1): 1-2.
- Schwartzbaum J.A., Fisher J.L., Aldape K.D., Wrensch M. (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2** (9): 494-503.
- Schlösser R. (2001) MRI (Magnetic Resonance Imaging) in Psychiatry, *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, pp. 10148–10155, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, et al. (2007) Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS. Pathog.* **3**: 1195-1207.
- Skibová D. (2015) Základní fyzikální pojmy, *Nukleární medicína*, pp. 17-19, Nakladatelství P3k, s.r.o., Praha.

- Slezáková L., Hejnarová E., Kaduchová P., Marcián P., Ošťádalová A., et al., (2012) Ošřovatelský proces na infekčním oddělení, Ošřovatekství pro střední zdravotnické školy, Grada Publishing, a.s., Praha.
- Sritharan M. (2006) Iron and bacterial virulence. *Indian. J. Med. Microbiol.* **24** (3): 163-4.
- Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi Ch., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia S., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E. a Mirimanoff R.O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352** (10): 987-996.
- Šámal M., Štich V. (2000) Emisní tomografie, *Nukleární medicína*, pp. 36-42, Gentiana Jilemnice, Praha.
- Tai Y.F., Piccini P. (2004) Applications of positron emission tomography (PET) in neurology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**: 669–676.
- Taylor A., Karajannis M.A., Harter D.H. (2014) Glioblastoma multiforme: State of art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **5**: 64.
- Tekaia F., Latgé J.P. (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol.* **8** (4): 385-92.
- Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C., Ostrom Q.T., Lightner D.D, Barnholtz-Sloan J.S., Villano J.L. (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23**: 1985–1996.
- Traboulsee A.L., Li D.K. (2006) The role of MRI in the diagnosis of multiple sclerosis. *Adv. Neurol.* **98**: 125-46.
- Trnka J. (2015) Přístrojová technika nukleární medicíny, *Nukleární medicína*, pp. 27-36, Nakladatelství P3k, s.r.o., Praha.
- Trojanová H. (2008) Přístrojová technika, *Nukleární kardiologie*, pp. 25-34, Galén, Praha.
- Urbánek J. (2000) Základní fyzikální pojmy, *Nukleární medicína*, pp. 19-21, Gentiana Jilemnice, Praha.
- Velikyan I. (2014) Prospective of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics* **4** (1): 47-80.

- Volkert W.A., Hoffman T.J. (1999) Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **99**: 2269–2292.
- Viták T. (2007) Technika magnetické rezonance, *Magnetická rezonance hlavy, mozku a páteře*, pp. 283-312, Grada Publishing a.s., Praha.
- Vymazal J. (2006) Magnetická rezonance nervové soustavy, Radiologické a klinické aspekty, M-DIAG Publishing, Praha.
- Waldman S.D. (2009) Computed tomography, *Pain review*, pp. 366, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Waldman S.D., Campbell R.S.D. (2011a) Computed tomography, *Imaging of pain*, pp. 15-17, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Waldman S.D., Campbell R.S.D. (2011b) Magnetic resonance imaging, *Imaging of pain*, pp. 19-21, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Walsh T.J., Stevens D.A. (2012) Aspergillosis, Goldmans Cecil Medicine (24th ed.), pp. 1990-1994, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Wandersman C., Delepelaire P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 611-647.
- Wehrl H.F., Sauter A.W., Judenhofer M.S., Pichler B. (2010) Combined PET/MR imaging--technology and applications. *Tech. Canc. Res. Treat.* **9**: 5-20.
- Winkelmann G. (1991) Handbook of Microbial Iron Chelates, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Winkelmann, G., Drechsel H. (1997) Microbial siderophores, *Products of secondary metabolism*, pp. 200-246, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Winkelmann G. (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 691-696.
- Wrensch M., Minn Y., Chew T., Bondy M., Berger M.S. (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro oncol.* **4**: 278-299.
- Yano Y. Anger H.O. (1964) A gallium-68 positron cow for medical use. *J. Nucl. Med.* **5**: 484-487.
- Yokoyama A., Ohmomo Y., Horiuchi K., Saji H., Tanaka H., Yamamoto K., et al. (1982) Deferoxamine, a promising bifunctional chelating agent for labeling proteins with gallium: Ga-67 DF-HSA: concise communication. *J. Nucl. Med.* **23**: 909-914.

- Yoshioka H., Schlechtweg P.M., Kose K. (2009) Magnetic Resonance Imaging, *Imaging of Arthritis and Metabolic Bone Disease*, pp. 34-48, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Young R.M., Jamshidi A., Davis G., Sherman J.H. (2015) Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann. Transl. Med.* **3**: 121.
- Ziessman H.A., O'Malley J.P., Thrall J.H. (2014) Radiopharmaceuticals, *Nuclear Medicine (4th ed.)*, pp. 1-15, Elsevier, Philadelphia, PA.
- Zhai C., Franssen G.M., Petrik M., Laverman P., Summer D., Rangger C., Haubner R., Haas H., Decristoforo C. (2016) Comparison of Ga-68-Labeled Fusarinine C-Based Multivalent RGD Conjugates and [<sup>68</sup>Ga]NODAGA-RGD-*In Vivo* Imaging Studies in Human Xenograft Tumors. *Mol Imaging Biol.* **18** (5): 758-767.

## Internetové zdroje

<http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika4.htm>; Staženo dne 4.4.2018.

<http://www.abcdcatsvets.org/aspergillosis/> Growth of *Aspergillus fumigatus* on malt extract agar (MEA). Colonies are typically olive green and velvety due to rapid sporulation. Courtesy of Vanessa Barrs, University Veterinary Teaching Hospital, Sydney, Australia; Staženo dne 10.4. 2018.

<https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/website/lects/fungi.htm>, Asexual fruiting structure of *Aspergillus* species, illustrating septate hyphae, conidiophore, vesicle, phialides and conidiospores; Staženo dne 10.4. 2018.

<http://medicinembbs.blogspot.cz/2013/02/microscopic-morphology-of-aspergillus.html>; Microscopic morphology of *Aspergillus fumigatus*. Staženo dne 10.4. 2018.

<http://www.radiopharmaceuticals.info/pet-radiopharmaceuticals.html>, Staženo dne 30.4. 2018.

<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics>, WHO Europe, Staženo dne 30.4. 2018.