

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Studium RGD peptidů značených galliem-68 jako
potenciálních diagnostických PET tracerů pro multiforní
glioblastom**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Autor: | Dominika Flašarová |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2016 |

Bibliografická identifikace

| | |
|---------------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora: | Dominika Flašarová |
| Název práce: | Studium RGD peptidů značených galliem-68 jako potenciálních diagnostických PET tracerů pro multifornní glioblastom |
| Typ práce: | Bakalářská |
| Pracoviště: | Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci |
| Vedoucí práce: | PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2016 |

Abstrakt:

Tématem této bakalářské práce je hledání vhodných podmínek značení ^{68}Ga , testování *in vitro* stabilitních parametrů a schopnosti akumulace tří vybraných RGD peptidů v nádorových buňkách U87MG pro potenciální použití v diagnostice multifornního glioblastomu prostřednictvím pozitronové emisní tomografie. Multifornní glioblastom je nejčastěji se vyskytující primární nádor mozku s velmi závažnými následky pro pacienta. Včasná diagnostika může výrazně přispět k prodloužení a zkvalitnění života pacienta. Významnou diagnostickou technikou, která je využívána k zobrazování nádorů, je pozitronová emisní tomografie s použitím příslušných radiofarmak. Některé RGD peptidy značené galliem-68 mohou být vhodnou volbou diagnostického radiofarmaka k zobrazování multifornního glioblastomu. Po nalezení nejvhodnějších podmínek pro značení tří vybraných peptidů - NODAGA-RGD dimer acetát, NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát, byly provedeny stabilitní testy, byla testována akumulační schopnost těchto peptidů a následně bylo provedeno jejich srovnání. Nejstabilnějším se jevil galliem-68 značený NODAGA-RGD trifluoroacetát, jehož radiochemická čistota ve všech stabilitních testech přesahovala 98% a vykazoval malou vazbu na plazmatické

proteiny, nejvyšší vazbu na buněčnou linii U87 MG však prokázal NODAGA-RGD dimer acetát.

Klíčová slova: glioblastom, integrin $\alpha_v\beta_3$, angiogeneze, RGD peptidy, gallium-68, NODAGA-RGD dimer acetát, NODAGA-RGD trifluoroacetát, DOTA-cyklo-RGDfK acetát

Počet stran: 62

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

| | |
|---|---|
| Author's first name and surname: | Dominika Flašarová |
| Title: | Gallium-68 labelled RGD peptides for PET imaging of glioblastoma multiforme |
| Type of thesis: | Bachelor |
| Department: | Institute of Molecular and Translational Medicine |
| Supervisor: | PharmDr. Zbyněk Nový, Ph.D. |
| The year of presentation: | 2016 |

Abstract:

The aim of this bachelor thesis is to find a suitable conditions for labeling Gallium-68, *in vitro* testing of stability parameters and to test the capability of accumulation of the three selected RGD peptides in tumor cells U87 MG for potential use as diagnostics of glioblastoma multiforme via positron emission tomography. Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor and is associated with very severe consequences for the patient. Well-timed diagnostics may help to prolong and to improve the quality of life of the patient considerably. Important technique used to diagnosis of the tumors is positron emission tomography with the use of radiopharmaceuticals. Some of the RGD peptides labeled by gallium-68 may be suitable choice of appropriate radiopharmaceuticals to image glioblastoma multiforme. In our study, after the finding of the most suitable conditions for labeling the three selected peptides i.e. NODAGA-RGD dimer acetate, NODAGA-RGD trifluoroacetate and DOTA-cyclo-RGDfK acetate the stability tests were carried out and the accumulation capability of these peptides were tested. Eventually, the results obtained with individual peptides was compared. The most stable appears to be NODAGA-RGD trifluoroacetate as its radiochemical purity was over 98 % in all

stability tests. NODAGA-RGD trifluoroacetate also showed low plasma protein binding, however the highest binding to the cell line U87 MG showed NODAGA-RGD dimer acetate.

Keywords: glioblastoma, integrins $\alpha_v\beta_3$, angiogenesis, RGD peptides, gallium-68, NODAGA-RGD dimer acetate, NODAGA-RGD trifluoroacetate, DOTA-cyclo-RGDfK acetate

Number of pages 62

Language Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci na téma Studium RGD peptidů značených galliem-68 jako potenciálních diagnostických PET tracerů pro multifonní glioblastom vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne: 1. 5. 2016

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především PharmDr. Zbyňku Novému, Ph.D. za trpělivost a cenné rady při vedení mé bakalářské práce.

Také bych ráda poděkovala rodičům za jejich podporu během studia a všem, kteří byli ochotni trávit čas nad všemožnými otázkami týkajícími se psaní mé bakalářské práce.

Obsah:

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 12 |
| 2 Teoretická část..... | 13 |
| 2. 1 Multiformní glioblastom..... | 13 |
| 2. 1. 1 Genetika gliomů | 14 |
| 2. 1. 2 Epidemiologie..... | 16 |
| 2. 1. 3 Diagnostika | 16 |
| 2. 1. 4 Léčba | 18 |
| 2. 2 Preklinické modely GBM..... | 19 |
| 2. 2. 1 Buněčná linie U87 MG | 20 |
| 2. 2. 2 Další buněčné linie GBM..... | 22 |
| 2. 3 RGD peptidy | 23 |
| 2. 3. 1 NODAGA-RGD dimer acetát..... | 24 |
| 2. 3. 2 NODAGA-RGD trifluoroacetát..... | 25 |
| 2. 3. 3 DOTA-cyklo-RGDfK acetát | 25 |
| 2. 3. 4 Angiogeneze | 27 |
| 2. 3. 2 Integriny | 29 |
| 2. 4 Radiofarmaka | 30 |
| 2. 4. 1 Radionuklidy a značení radiofarmak | 30 |
| 2. 4. 2 Gallium-68..... | 33 |
| 3 Experimentální část..... | 34 |
| 3. 1 Použitý materiál | 34 |
| 3. 2 Kontrola radiochemické čistoty peptidů | 35 |
| 3. 3 Značení peptidů | 35 |
| 3. 4 Stabilitní testy | 36 |
| 3. 4. 1 Stanovení plazmatické stability | 36 |

| | |
|---|----|
| 3. 4. 2 Stanovení stability v prostředí konkurenčního kationtu | 36 |
| 3. 4. 3 Stanovení stability v prostředí zvýšeného pH | 36 |
| 3. 4. 4 Stanovení stability v prostředí konkurenčního chelátoru | 36 |
| 3. 4. 5 Stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda | 37 |
| 3. 4. 6 Stanovení vazby na plazmatické proteiny | 37 |
| 3. 5 Akumulační schopnosti peptidů | 37 |
| 3. 5. 1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou | 38 |
| 4 Výsledky | 40 |
| 4. 1 Vhodné podmínky pro značení vybraných peptidů galliem-68..... | 40 |
| 4. 2 Stabilitní testy | 42 |
| 4. 3 Vazba na buněčnou linii U87 MG in vitro..... | 46 |
| 5 Diskuze | 47 |
| 6 Závěr | 53 |
| Použitá literatura | 55 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|--------------|---|
| ACN | acetonitril |
| Arg | arginin |
| Asp | aspartát |
| bFGF | bazický fibroblastový faktor; <i>angl.</i> basic fibroblast growth factor |
| BSA | hovězí sérový albumin; <i>angl.</i> bovine serum albumine |
| CDK4 | cyklin-dependentní kináza 4 |
| CDKN2 | inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2 |
| CNS | centrální nervový systém |
| CT | výpočetní tomografie; <i>angl.</i> computed tomography |
| DMEM | <i>angl.</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina |
| DPTA | diethylentriaminpentaoctová kyselina |
| EGF | epidermální růstový faktor; <i>angl.</i> epidermal growth factor |
| EGFR | receptor pro epidermální růstový faktor; <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor |
| EMEM | <i>angl.</i> Eagle's Minimum Essential Medium |
| FCSi | inaktivované fetální bovinní sérum |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv; <i>angl.</i> Food and Drug Administration |
| FDG | fluorodeoxyglukóza |
| GBM | multiformní glioblastom; <i>angl.</i> glioblastoma multiforme |
| Gly | glycin |
| HGF | hepatální růstový faktor; <i>angl.</i> hepatocyte growth factor |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie; <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography |
| LOH | ztráta heterozygoty; <i>angl.</i> loss of heterozygoty |
| MDM 2 | <i>angl.</i> mouse double minute 2 homolog |
| MRI | magnetická rezonance; <i>angl.</i> magnetic resonance paging |
| mTOR | proteinkináza serin/treonin; <i>angl.</i> mammalian target of rapamycin |
| NODAGA | 1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymethyl-1,4,7-triazacyklononan |
| NTF α | nádor nekrotizující α faktor; <i>angl.</i> tumor necrosis factor |

| | |
|--------|--|
| PDGFR | receptor destičkového růstového faktoru; <i>angl.</i> platelet-derived growth factor receptors |
| PET | pozitronová emisní tomografie |
| PIGF | placentární růstový faktor; <i>angl.</i> placenta growth factor |
| PTEN | fosfatázový a tensinový homolog; <i>angl.</i> phosphatase and tensin homolog |
| RB gen | retinoblastomový gen |
| RGD | sekvence aminokyselin: arginin-glycin-aspartát |
| SPECT | jednofotonová emisní výpočetní tomografie; <i>angl.</i> single-photon emission computed tomography |
| TFA | trifluoroctová kyselina; <i>angl.</i> trifluoroacetic acid |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor; <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru; <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor receptor |
| WHO | Světová zdravotnická organizace; <i>angl.</i> World Health Organization |

1 Úvod

Multiformní glioblastom je mozkový nádor končící téměř vždy smrtí pacienta. Velmi rychle prorůstá mozkovou tkání, což komplikuje jeho úplné chirurgické odstranění. V místě resekce nádoru navíc zůstávají jeho agresivní buňky, které nejdou zcela odstranit a způsobí opětovný růst nádoru.

Pro prodloužení doby života, která v průměru nepřesahuje 15 měsíců, je zásadní včasná diagnostika. Mezi běžně používané zobrazovací metody se řadí výpočetní tomografie a magnetická rezonance. S rychlým rozvojem techniky se vylepšují i diagnostické zobrazovací přístroje, které významně přispívají nejen k lepšímu anatomickému vyobrazení, ale mohou lékaři poskytnout i velmi důležité informace o biochemické stránce onemocnění.

Aby bylo vůbec možné sledovat biochemické pochody v těle pacienta, je nutné je nějakým způsobem „zviditelnit“ a radiofarmaka to umožňují. Radiofarmaka jsou látky značené radioaktivním nuklidem, který zodpovídá za jejich detekovatelnost. Díky charakteristickým znakům nádorů (např. vysoká glykolytická aktivita, angiogeneze) se poté určuje složení radiofarmaka vhodné pro jeho zobrazení. Radiofarmaka však nemají pouze diagnostické využití, používají se i jako léčebné látky.

Při zkoumání diagnostických a terapeutických účinků radiofarmak, je zapotřebí modelových buněčných linií multiformního glioblastomu. V mé práci jsem využívala linii U87 MG, která byla izolována z nádoru odebraného doktorem Ponténem v roce 1966 pacientovi s multiformním glioblastomem. Vhodná je především pro zkoumání angiogeneze a antiangiogenní léčby, čehož jsem využila pro testování vazebných schopností tří vybraných RGD peptidů značených galliem-68. Práce je založena na schopnosti těchto peptidů vázat se na angiogenní markery, konkrétně integriny $\alpha_v\beta_3$.

Cílem mé práce je najít vhodné podmínky pro značení tří vybraných peptidů (NODAGA-RGD dimer acetát, NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát) galliem-68, následně zjistit jejich stabilitu *in vitro* testy a nakonec testovat jejich schopnost akumulace v nádorových buňkách.

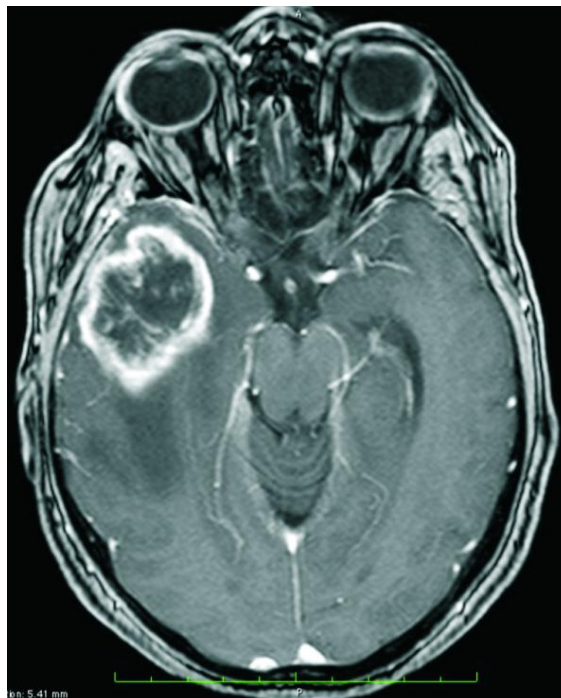
2 Teoretická část

2. 1 Multiformní glioblastom

Multiformní glioblastom (glioblastoma multiforme, GBM) je nejčastější a nejfatálnější primární nádor mozku. Patří k IV. třídě mozkových nádorů dle Světové zdravotnické organizace (WHO). Jedná se o velmi rychle rostoucí nádor, který vychází z gliových buněk hvězdicovitého tvaru, tedy z astrocytů a oligodendrocytů. Může vznikat dvěma cestami a to buď *de novo* (primární glioblastomy) nebo jako důsledek transformace nádoru nižší třídy (sekundární glioblastomy) (Urbanska et al., 2014; Tso et al., 2006)

I přes agresivní léčbu, kterou musí pacient podstoupit, zahrnující chirurgickou resekci, chemoterapii a radioterapii, téměř vždy končí smrtí pacienta. Průměrná doba přežití pacientů činí necelých 15 měsíců a méně než 5% pacientů přežije 5 let (Wilson et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že nádor velmi rychle roste, tlak na mozek obvykle způsobuje první příznaky. V závislosti na umístění a velikosti, může nádor způsobovat bolesti hlavy, závratě, problémy s pamětí, dvojité nebo rozmazané vidění až ztrátu zraku, změny nálad, obtíže s mluvením, letargii či hemiparézu (Young et al., 2015).

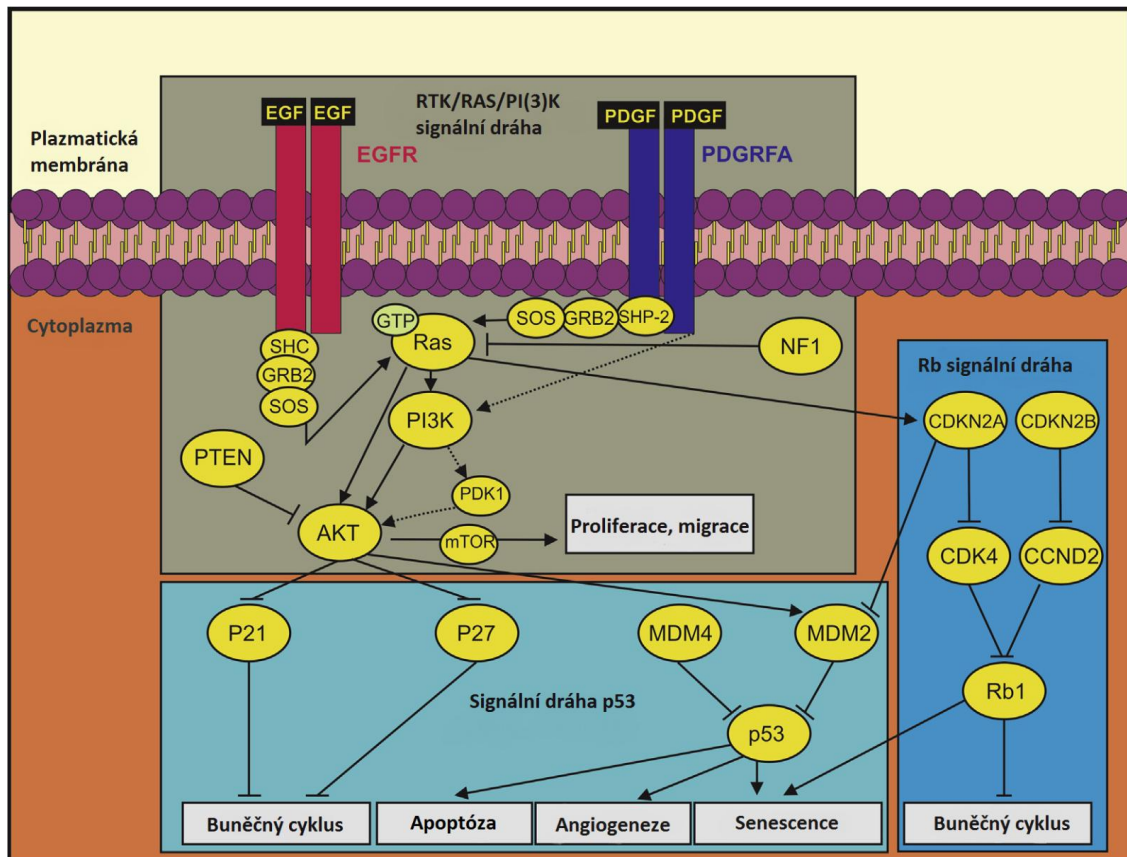


Obrázek 1. Magnetická rezonance zobrazující multiformní glioblastom v pravém spánkovém laloku člověka (Schreiber et al., 2010).

2. 1. 1 Genetika gliomů

Transformace zdravé buňky v neoplastickou, je důsledkem kombinací řady genetických změn, které vedou k narušení buněčného cyklu a následné nekontrolovatelné proliferaci. Na obrázku 2 jsou vyobrazeny tři základní signální dráhy ovlivňující gliogenezi.

K rozvoji astrocytomu vedou mutace a alterace p53 tumor supresorového genu, tedy genu, který u zdravých buněk zabraňuje vzniku nádorů, dále pak ztráta heterozygosity (LOH) chromozomu p17, 10, 9p nebo chromozomu 19q. Dochází k amplifikaci receptorů pro růstové faktory PDGFR a EGFR (receptor destičkového růstového faktoru a receptor pro epidermální růstový faktor), zvýšené expresi MDM2 genu, mutaci nebo delecí PTEN genu (fosfatázový a tensinový homolog), delecí tumor supresorového genu CDKN2 (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2), delecí RB genu (retinoblastomový gen) či amplifikaci CDK4 (cyklin-dependentní kináza 4) (Lang et al., 1994; de Vries et al., 2009).



Obrázek 2. Tři základní dráhy ovlivňující tvorbu gliomů.

Na obrázku jsou zobrazeny genetické změny vedoucí ke vzniku gliomů. Šipkami jsou označeny změny způsobené aktivací a tupý konec mají změny zapříčiněné inaktivací (Převzato a upraveno od Stylli et al., 2015).

EGF(epidermální růstový faktor), PDGFRA (receptor pro destičkový růstový faktor α), PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza), mTOR (*angl.* mammalian target of rapamycin), MDM 2 (*angl.* mouse double minute 2 homolog).

2. 1. 2 Epidemiologie

Multiformní glioblastom¹ je nejčastější nádor mozku a CNS s průměrnou dobou přežití 15 měsíců. Po celém světě je každoročně zaznamenáno více než 250 000 nově diagnostikovaných primárních zhoubných nádorů mozku a z toho 77% jsou gliomy² (Walsh et al., 2016). Bývá diagnostikován převážně v pozdějším věku a s přibývajícím věkem roste i jeho četnost. U dětí není běžný, čítá pouze 3% všech nádorů mozku a CNS, které se vyskytují mezi 0-19 rokem. Častější výskyt je zaznamenán u mužů než u žen v poměru 1,26:1 a dvakrát více u bílé rasy než u negroidní. Co se týče umístění v mozku, nejčastěji se vyskytuje v supratentoriální oblasti (frontální, temporální, parietální a okcipitální lalok). Jen velmi vzácně se vyskytuje v mozečku. Podle studie prováděné v letech 1973-2009, se GBM vyskytuje v mozečku častěji u mladších pacientů a dosahuje menší velikosti (Thakkar et al., 2014).

2. 1. 3 Diagnostika

Včasná diagnóza může významně prodloužit dobu přežití. Pro určení diagnózy jsou nezbytné zobrazovací metody. Mezi ty nejběžněji používané patří magnetická rezonance (MRI) a výpočetní tomografie (CT). MRI je všeobecně lepší pro zobrazování nádorů mozku než CT, nicméně i přesto CT poskytuje velmi důležité doplňující informace a je snadněji dostupná. Je vhodná například pro zobrazení akutního krvácení či kalcifikací. Naproti tomu, charakterizace měkkých tkání je horší a výraznou nevýhodou je i použití ionizujícího záření.

Na základě výsledků z MRI a CT se dále provádí biopsie tkáně či léze pro potvrzení diagnózy (Young et al., 2015).

Novější a pokrokovější metodou určenou k zobrazování je pozitronová emisní tomografie (PET). PET je třídímní zobrazovací technika, která využívá biomolekul značených radioizotopy, jež emitují pozitrony. Poté co je pozitron emitován, dojde k jeho anihilaci s elektronem pocházejícím z tkáně, čímž vzniknou dva fotony s energií 511 keV. Zdrojem pozitronů jsou tedy značené biomolekuly.

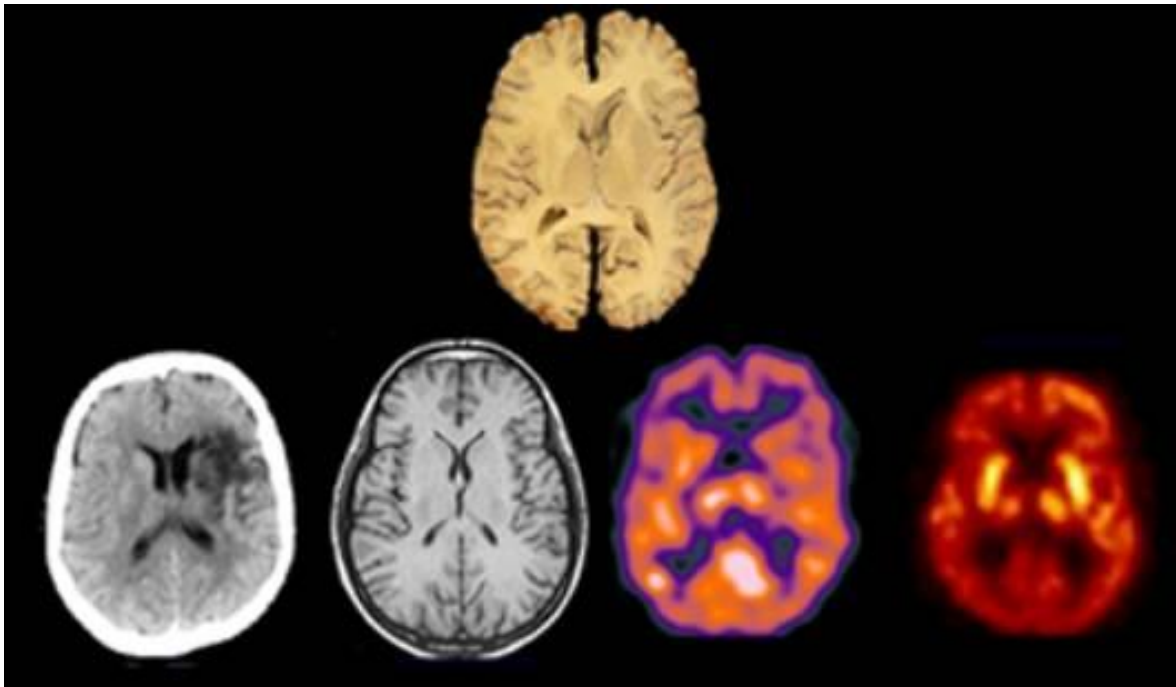
¹ Glioblastom je nejčastěji vyskytující se typ gliomu.

² Gliom je nejběžnější primární nádor mozku, vznikající z gliálních buněk.

Při onkologických vyšetřeních zobrazovací technikou PET se velmi často využívá radiofarmakum ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glukóza – tj. glukóza značená radioizotopem ^{18}F (FDG). Důvodem je fakt, že nádory mají zvýšenou spotřebu glukózy. Poté co nádorová buňka přijme FDG, dochází v buňce k fosforylaci FDG a k jejímu hromadění, které koreluje se spotřebou energie v nádoru. Díky PET tedy můžeme rozlišit nádorovou tkáň od zdravé tkáně, navíc můžeme rozlišit energeticky náročnější a tudíž i pravděpodobně agresivnější nádory (Bockisch et al., 2009).

V diagnostice nádorů se nově využívají různé hybridní techniky, které jsou kombinací běžně používaných zobrazovacích přístrojů. Jedním z nich je i PET/CT. Zatímco PET se zaměřuje spíše na biochemickou stránku onemocnění, CT s využitím rentgenového záření umožňuje zobrazit jednotlivé části těla (Bockisch et al., 2009; Lonsdale et al., 2010). PET/CT tedy poskytuje velký rozsah anatomických a metabolických informací o nádoru, což umožňuje lékařům přesnější diagnózu a následně i léčbu (Beyer et al., 2011).

Další možnou kombinací dvou zobrazovacích technik je například PET/MRI.



Obázek 3. V horní části obrázku je transaxiální řez lidského mozku, v dolní části je pak vyobrazen tento řez pomocí zobrazovacích technik. Zleva: CT, MRI, SPECT a PET (Zaidi, 2000).

2. 1. 4 Léčba

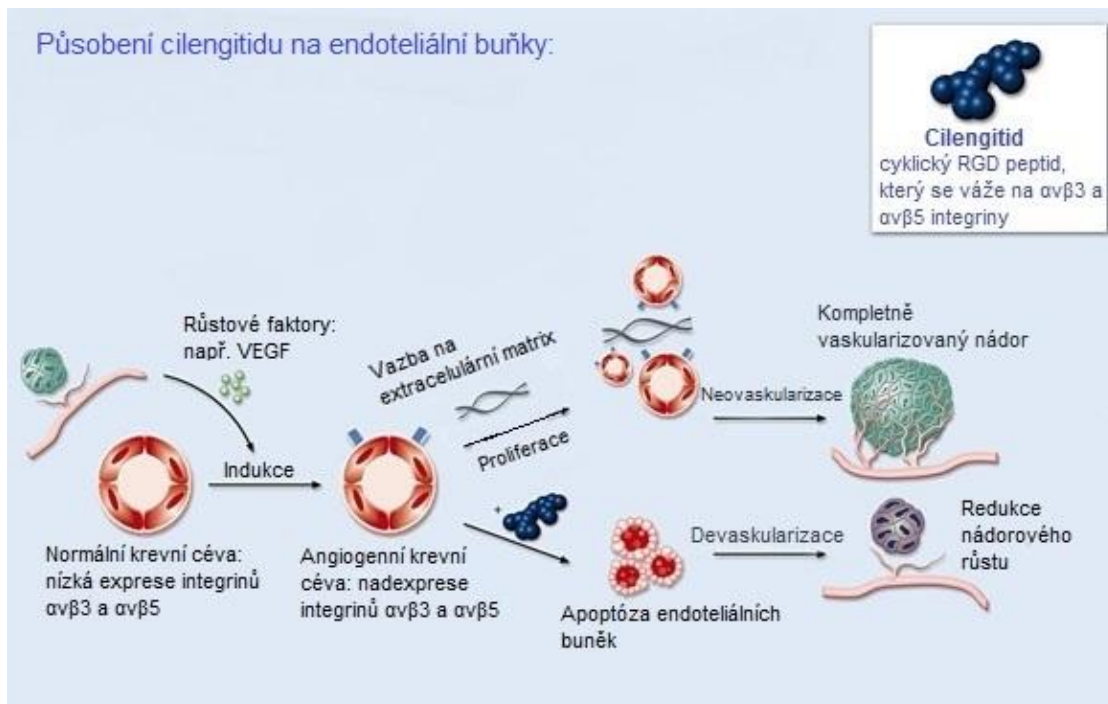
Standardní postup při léčbě multifornního glioblastomu je chirurgické odstranění následované radioterapií a chemoterapií s použitím nejčastěji temozolomidu³, lipofilního léku schopného projít hematoencefalickou bariérou.

Chirurgické odstranění nádoru s použitím intraoperační magnetické rezonance napomáhá k přesnějšímu stanovení hranic tumoru, nicméně i přes to je recidiva prakticky nevyhnutelná. Úplné odstranění nádoru je nemožné z důvodu zachování vysoce invazivních buněk, které napomůžou k obnově nádoru v místě resekce nebo v jejím blízkém okolí (Mangiola et al. 2008; Wilson et al., 2014).

Navzdory snaze o nalezení léčebných postupů, které by byly schopné GBM vyléčit nebo alespoň prodloužit dobu přežití, glioblastom zůstává velmi obávaným „protivníkem“ s téměř 100% mortalitou. Imunoterapie, genová terapie či léčba antiangiogenními látkami by mohly být nadějí pro léčbu maligních mozkových nádorů. Jedním ze zkoumaných antiangiogenních léčiv je monoklonální protilátka s inhibičním účinkem pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), bevacizumab. V roce 2009 byl bevacizumab v USA schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro použití k léčbě glioblastomu, v Evropské unii však v této indikaci schválen není (Kreisl et al. 2009, Friedman et al. 2009).

Dalšími potenciálními léky s antiangiogenním účinkem jsou například cediranib - inhibitor VEGF receptoru, aflibercept – inhibitor VEGF a PlGF (placentární růstový faktor) nebo cilengitid – inhibitor $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$ integrinových receptorů (Batchelor et al. 2007,2010).

³ Temozolomid je alkylační činidlo, má tedy schopnost přenést methylovou skupinu do purinových bází DNA, čímž změní jejich vlastnosti. Dochází tedy ke vzniku O⁶-methylguaninu a následné apoptóze buněk (Kanzawa et al., 2003).



Obrázek 4. Na obrázku vyobrazeno fungování potencionálního antiangienního léčiva cilengitid (převzato a upraveno z webového magazínu M – The Explorer Magazine).

Za normálních okolností by došlo vlivem růstových faktorů ke zvýšené expresi integrinů $\alpha v\beta 3$ a $\alpha v\beta 5$ na povrchu endoteliálních buněk, integriny by poté zprostředkovaly připojení buněk na extracelulární matrix a následnou novotvorbu cév, která by vedla k vaskularizaci tumoru. Nádoru by tedy nic nebránilo k nekontrolovatelnému růstu. Cilengitid však vazbou na integriny vyvolá apoptózu endoteliálních buněk a tedy inhibici angiogeneze.

2. 2 Preklinické modely GBM

Ideální preklinický model GBM by měl co nejvíce napodobovat charakteristické znaky lidského glioblastomu. Mimo jiné by měl vykazovat co největší podobnost v histologických a genetických aspektech, být invazivní, co nejlépe napodobovat terapeutickou odpověď a angienní růst a také musí být neimunogenní v hostiteli. To vše je velmi důležité pro prozkoumání faktorů způsobujících tvorbu metastáz, invazivitu nebo reakci nádoru na nové léčebné postupy.

Mezi nejpoužívanější patří xenogenní modely. Buňky nádorové linie jsou vloženy do imunodeficientního hostitele, nejčastěji myši. Podle místa transplantace buněk, rozlišujeme modely ortotopické a subkutánní.

V případě ortotopického modelu se provádí transplantace přímo do místa vzniku nádoru, u subkutánního se buňky transplantují pod kůži (Morton & Houghton, 2007; Stylli et al., 2015).

Nevýhodou xenogenního typu modelu je zavádění velkého množství buněk prostřednictvím jedné injekce, v případě ortotopického modelu, přímo do mozku myši. Dochází tedy k narušení hematoencefalické bariéry a onkogenezi z velkého počtu buněk, což neodpovídá vzniku nádoru u člověka.

Ke studiu nádorů se používají také geneticky upravované myšičí modely. Dochází tedy k manipulaci s myšičím genomem, která vede ke vzniku nádoru.

Existují také chemicky indukované modely. V roce 1939 se poprvé povedlo chemicky indukovat mozkový nádor polycyklickým aromatickým uhlovodíkem metylcholantrenem (Seligman et al., 1939).

Mezi nejpoužívanější buněčné linie izolované z tkáně pacienta nebo chemicky indukované patří 9L, T9, RG2, F98, RT-2, C6, 9L, GL261, U251 MG a U87 MG (Stylli et al., 2015).

2. 2. 1 Buněčná linie U87 MG

Jedná se o buněčnou linii izolovanou z nádoru v roce 1966 Ponténem a jeho kolegy pacientovi s GBM (Pontén & Macintyre, 1968). U87 MG vykazuje určité rozdílnosti oproti lidskému GBM, ke kterým se při použití této linie musí přihlížet a zohlednit při vyvozování závěrů. I přesto se jedná o velmi významný model, zejména pro zkoumání angiogenze a antiangiogenní léčby (Jacobs et al., 2011).

Buněčná linie U87 MG se běžně kultivuje při 37°C v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) nebo v EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) médiu.

Značnou nevýhodou U87 MG, ale také dalších buněčných linií je tvorba velkých shluků buněk s jasně definovanými okraji, kterými pronikají cévy, jež jsou snadno přístupné pro léčiva. Tento fakt však odporuje charakteristice lidského GBM. Tyto ohraničené shluky buněk neinfiltrují mozkový parenchym nádorovými buňkami, tak jako je tomu u lidského GBM, což je jedna z dalších velmi podstatných odlišností.

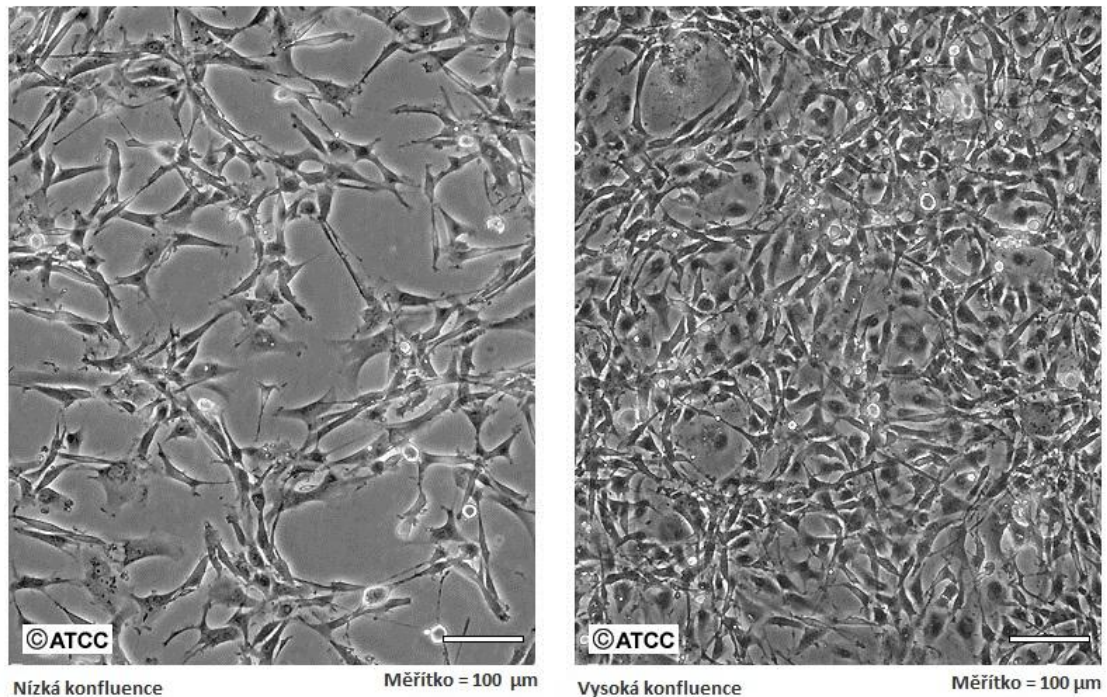
Dalšími typickými znaky pro tuto nádorovou linii je nepravidelné jádro, vzácně se vyskytující nekrotická místa, vysoká neovaskularizace a s tím spojená exprese integrinu $\alpha_v\beta_3$, čehož se využívá při zobrazování pozitronovou emisní tomografií pomocí RGD peptidů.

Téměř všechny neoplastické buňky vykazují výraznou expresi proteinu vimentinu⁴, zatímco exprese GFAP (gliální fibrilární acidický protein) nebo S100 proteinu nebyla zaznamenána. Okolo 44% U87 MG buněk exprimuje Ki-67 nukleární protein (Radaelli et al., 2009).

Linie U87 MG obsahuje mutace více než 140- ti genů, včetně PTEN genu, delecí tumor supresorového genu CDKN2A a jím kódovaných proteinů p14^{ARF} a p16^{INK4} a vysokou expresi Akt genu (Radaelli et al. 2009; Ishii et al. 1999)

⁴ Vimentin je protein patřící do III. skupiny intermediálních filament. Je považován za marker epiteliálně-mezenchymatické tranzice probíhající při embryogenezi nebo metastazování nádoru (Mendez et al., 2010).

Buněčná linie U87 MG



Obrázek 5. Buněčná linie multifornního glioblastomu U87 MG izolovaná v roce 1966 J. Ponténem (převzato a upraveno z: webové stránky firmy ATCC).

2. 2. 2 Další buněčné linie GBM

Dalším významným modelem GBM je buněčná linie U251 opět získána Janem Ponténem (Pontén, 1975; Houchens et al., 1983). Vykazuje velkou podobnost s lidským GBM především v klíčových znacích jako je mikrovaskuární proliferace, tvorba nekrotických míst nebo vysoká invazivita. Neoplastické buňky U251 exprimují gliální fibrilární acidický protein (GFAP), vimentin a více než 50% vykazuje expresi proteinu Ki-67 jako znak vysoké proliferace buněk. Stejně jako buněčná linie U87, U251 vykazuje vysokou expresi Akt⁵, který reguluje významné buněčné funkce, jako je progresse buněčného cyklu, buněčnou migraci, invazivitu a angiogenezi (Candolfi et al., 2007; Radaelli et al., 2009).

⁵ Akt – serin/threonin-proteinová kináza, také známá jako proteinová kináza B (PKB).

Za zmínku stojí také buněčná linie GL261, jež je syngenní myší model GBM využívaný k studiu imunoterapie multifornního glioblastomu (Koul et al., 2006; Young et al., 2015).

Buněčná linie C6 stejně jako GL261 vznikla chemickou indukci a to konkrétně opakovaným podáváním mutagenu N-nitroso-N-methylurey (MNU) krysám. Linie C6 však vykazuje určité rozdílnost oproti lidskému GBM. Liší se především expresí p53 a poklesem exprese PTEN (Stylli et al., 2015).

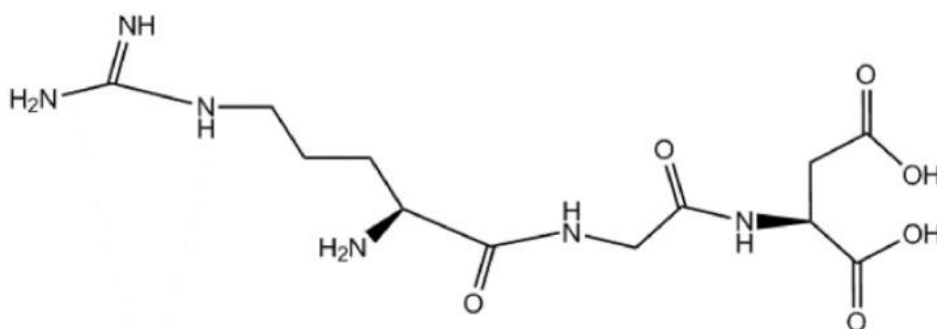
2. 3 RGD peptidy

Sekvence tří aminokyselin, arginin-glycin-aspartát, byla objevena v roce 1984 v adhezivním glykoproteinu fibronektinu doktorem E. Ruoslahtim. (Pierschbacher & Ruoslahti, 1983) Později se ukázalo, že fibronektin není jediný adhezivní protein s RGD⁶ sekvencí vázající se na $\alpha_v\beta_3$ receptor. (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984) RGD sekvence je obsažena i ve vitronectinu, fibrinogenu, kolegeny typu I, von Willebrandově faktoru a například v osteopontinu. Tripeptid RGD je specificky rozpoznávám skupinou povrchových receptorů, integrinů, které hrají důležitou roli při rozpoznávání buněk a podporují buněčnou adhezi (Hautanen, 1989).

Pro medicínské účely mají RGD peptidy několik výhod. Jsou menší než monoklonální protilátky, tudíž přístup k nádorové tkáni je snadnější. Riziko imunitní reakce je minimalizováno a jejich syntéza je levná a poměrně jednoduchá.

Afinita RGD peptidu může být ovlivněna jeho konformací. RGD peptidy mohou mít lineární nebo cyklickou formu. Cyklické RGD peptidy však vykazují vyšší stabilitu a afinitu k integrinům, jelikož je cyklická forma pevnější (Wang et al., 2013; Enwerem et al., 2012). Z toho důvodu se výzkum zaměřuje na cyklické pentapeptidy a hlavní zkoumanou strukturou je c(RGDfV) obsahující aminokyseliny arginin, glycin, aspartát, D-fenylalanin a valin. Například v případě nahrazení valinu lysinem vzniká c(RGDfK). Takovými záměnami vznikají další modely cyklických pentapeptidů s RGD sekvencí. Deset takových modelů studoval I. Enwerem (Enwerem et al., 2012).

⁶ R: arginin, G: glycin, D: aspartát

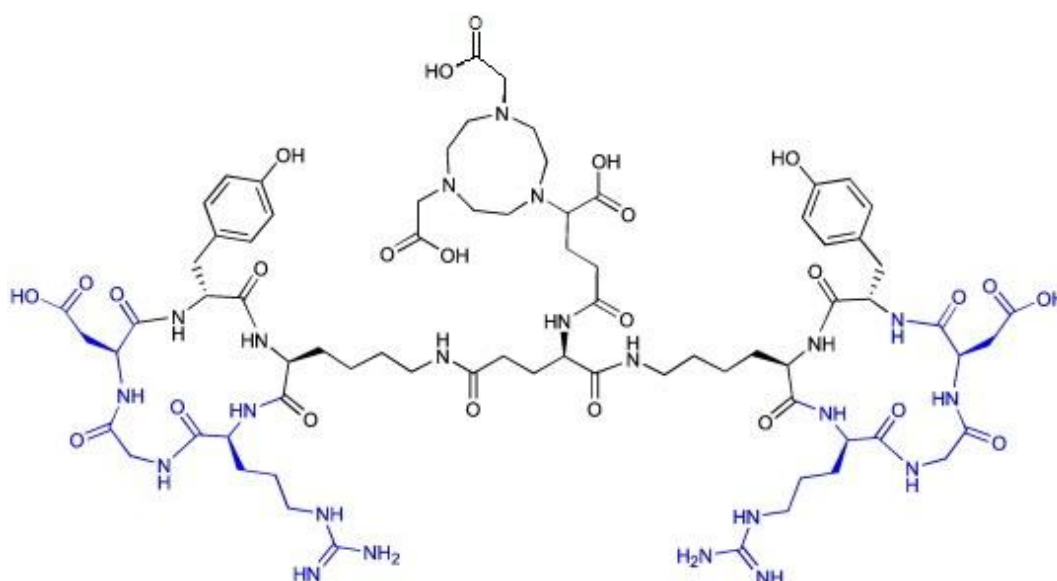


Obrázek 6. RGD peptid (arginin-glycin-aspartát) (Wang et al., 2013).

2. 3. 1 NODAGA-RGD dimer acetát

NODAGA-RGD dimer acetát je cyklický (RGDyK) peptid obsahující aminokyselinovou sekvenci Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys a 1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymethyl-1,4,7-triazacyklononan (NODAGA) chelátor, jež tvoří komplexy s radioaktivními kovy a je derivátem NOTA chelátoru.

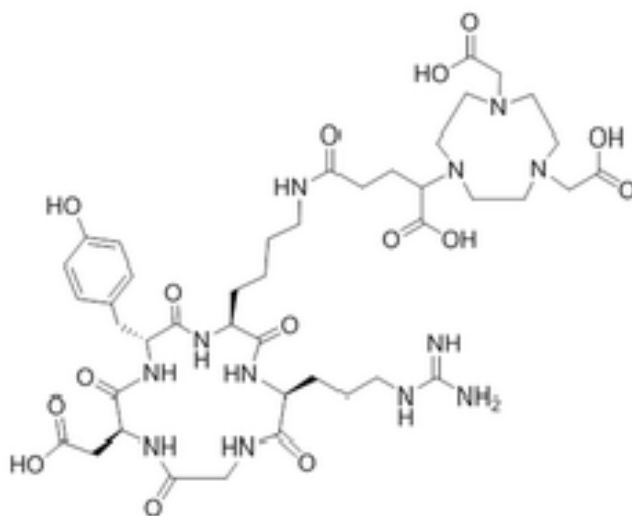
Bylo provedeno několik studií zabývajících se ovlivněním afinity k receptorům multimerizací RGD peptidů a bylo zjištěno, že stoupající multiplicita peptidů přispívá k vyšší afinitě k integrinům, problémem je však současný výrazný nárůst akumulace označených peptidů v orgánech nenapadených nádorem (Liu, 2009). Zajímavostí je, že v případě tetramerů je vazba k integrinům bivalentní i přesto, že obsahuje čtyři RGD sekvence (Shi, et al., 2011).



Obrázek 7. Struktura NODAGA-RGD dimeru (Oxboel et al., 2014).

2. 3. 2 NODAGA-RGD trifluoroacetát

NODAGA-RGD trifluoroacetát, má ve své struktuře stejně jako předešlý peptid NODAGA chelátor zprostředkovávající vazbu k radionuklidům jako je například ^{68}Ga , ^{64}Cu nebo ^{44}Sc . Opět se jedná o c(RGDyK) peptid, oproti předchozímu peptidu se však nejedná o dimer, ale monomer. Měl by tedy vykazovat menší afinitu k $\alpha_v\beta_3$ integrinům.



Obrázek 8. Struktura NODAGA-RGD (Domnanich et al., 2016).

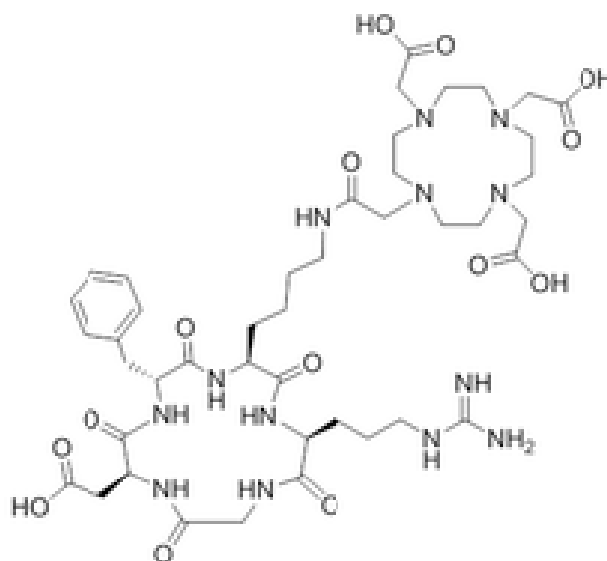
2. 3. 3 DOTA-cyklo-RGDfK acetát

DOTA-cyklo-RGDfK acetát sestává ze sekvence aminokyselin Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys a 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny (DOTA). DOTA slouží jako bifunkční chelátor, tedy váže radioaktivní kovy.

Strukturně se RGDfK liší oproti RGDyK přítomností fenyloalaninu namísto tyrosinu, tímto způsobem může být ovlivněna farmakokinetika těchto peptidů. Následkem je pak v případě ^{68}Ga -DOTA-RGD větší hromadění v játrech (Domnanich et al., 2016). Cyklododekanový kruh DOTA chelátoru není ideální pro vazbu gallia (Haubner et al., 2014).

Decristoforo spolu s kolegy ve své studii porovnávali *in vitro* afinitu k integrinu $\alpha_v\beta_3$ DOTA-cyclo-RGDfK peptidů značených ^{68}Ga a ^{111}In . Výsledky ukazovaly velmi

vysokou afinitu ^{68}Ga značeného DOTA-RGD peptidu k proteinům (Decristoforo et al., 2008).



Obrázek 9. Struktura DOTA-cyklo-RGDfK (Domnanich et al., 2016).

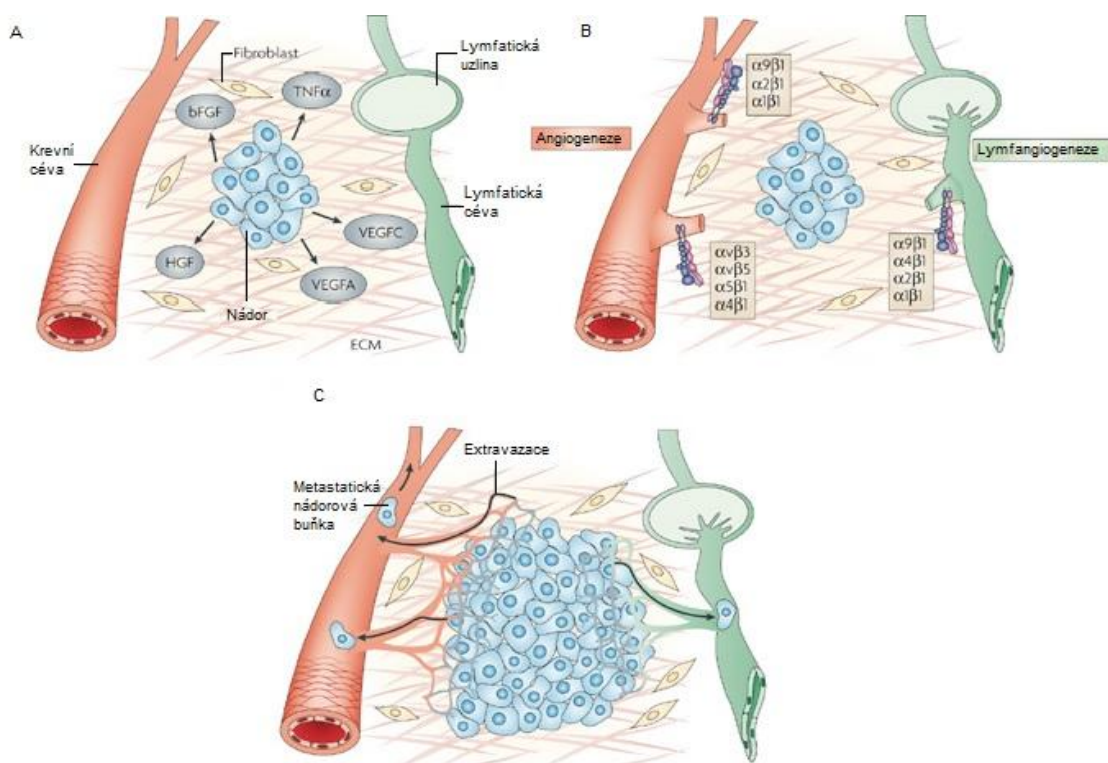
2. 3. 4 Angiogeneze

Angiogeneze je proces novotvorby cévního systému, který je charakteristický pro řadu onemocnění (lupénka, revmatoidní artritida, diabetická retinopatie, atd.) včetně nádorových. Za normálních fyziologických podmínek se angiogeneze uplatňuje při hojení ran nebo při embryogenezi (Klener, 2002a, 2002b; Lukešová et al., 2006).

Angiogeneze je podmiňující pro růst nádorů a tvorbu metastáz. Vytvořený cévní systém zprostředkovává nádoru přísun živin a kyslíku. Angiogeneze závisí na invazi a migraci endoteliálních buněk, které jsou regulovány řadou faktorů, především pak receptorem vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR) a integriny.

Integriny jsou glykoproteiny nacházející se na povrchu buňky. Zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami a extracelulárním prostředím. Jsou složeny ze dvou nekovalentně vázaných podjednotek α (18 podjednotek) a β (8 podjednotek). Dohromady tedy mohou tvořit 24 různých heterodimerů. Každý z těchto komplexů rozeznává specifické ligandy (vitronectin, fibronectin, atd.). (Hynes, 2002) V průběhu angiogeneze je výrazně zvýšena exprese integrinů a to zejména integrinu $\alpha_v\beta_3$ na povrchu nádorových buněk (Chen et al., 2016).

Používání radiofarmak k zobrazování nádorů je založeno na vazbě integrinu $\alpha_v\beta_3$ s RGD peptidy. Peptidy se označí radioaktivními nuklidy, například ^{18}F nebo ^{68}Ga , což je učiní viditelnými pro PET zobrazování nebo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v případě použití jednofotonové emisní výpočetní tomografie (SPECT) (Gaertner et al., 2012).



Obrázek 10. Na obrázku je schéma průběhu angiogeneze a lymfangiogeneze u nádorů (převzato a upraveno dle Avraamides et al., 2008).

A: Nádorové buňky začnou vylučovat růstové faktory jako hepatální (HGF), bazický fibroblastový (bFGF), nádor nekrotizující α (NTF α) a vaskulární endoteliální (VEGFA, VEGFC) růstový faktor a chemokiny v blízkosti již existujících krevních cév. Vliv faktorů na klidové endoteliální buňky způsobuje jejich vstup do buněčného cyklu a růst nových lymfatických cév.

B: Růstové faktory aktivují nebo způsobí zvýšenou expresi integrinů na povrchu endoteliálních buněk.

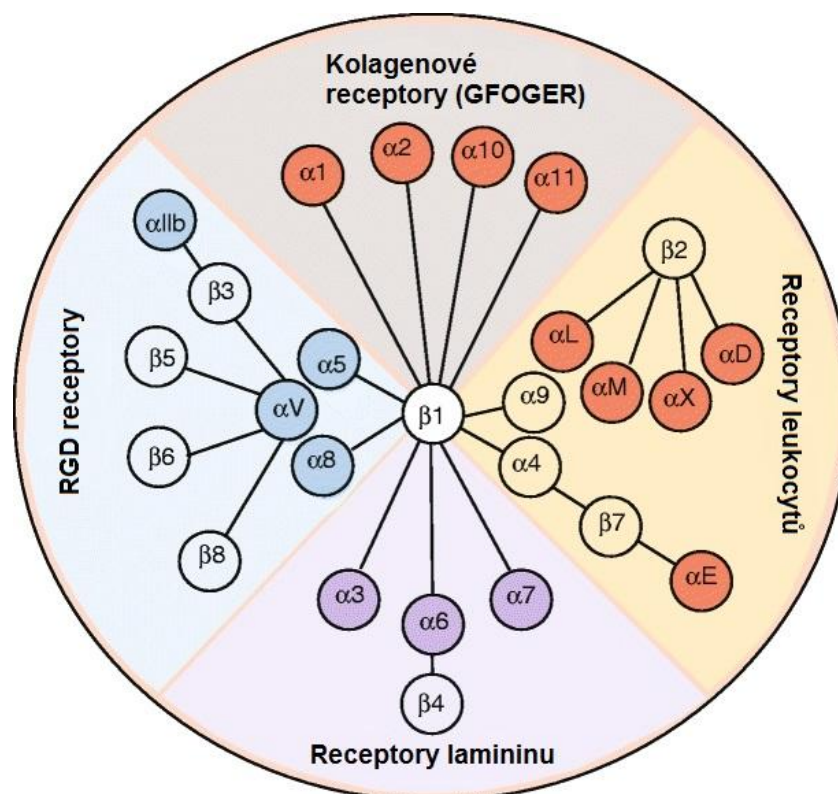
C: Integriny se posléze podílí na endoteliální migraci, což vede k tvorbě nových cév. Je tedy umožněna výživa nádoru a vytvořená cesta pro nádorové metastázy.

2. 3. 2 Integriny

Integriny jsou speciální skupina povrchových receptorů, jež zprostředkovává přichycení adhezních proteinů k povrchu buňky. Byly objeveny v polovině 80. let 20. století a kromě adheze, mají integriny význam při regeneraci tkání, podílí se na shlukování krevních destiček a nádorové invazivitě. (Ruoslahti, 1991)

Kombinací 18 α a 8 β podjednotek, může vzniknout až 24 různých transmembránových receptorů – integrinů. Kombinace podjednotek určuje vazebné a signalizační vlastnosti integrinů. Po návázání proteinu k integrinu, dochází ke spuštění signálních drah, například po navázání fibronektinu na integrin $\alpha_v\beta_3$ ⁷, jsou aktivovány různé signální dráhy, prostřednictvím kterých jsou endoteliální buňky chráněny před apoptózou.

U GBM dochází ke zvýšené expresi integrinu $\alpha_v\beta_3$ a ve větší míře je přítomen i fibronektin. Nádorové buňky se díky tomu stávají pohyblivější a odolné vůči apoptóze. (Danhier et al., 2012)



Obrázek 11. Znázornění možných kombinací α a β podjednotek, které vytváří 24 různých integrinů (Převzato a upraveno dle Barczyk et al., 2010).

⁷ Integrin $\alpha_v\beta_3$ je vitronektinový receptor, proto má v názvu písmeno „v“. (Hermann et al., 1999)

2. 4 Radiofarmaka

Nukleární medicína se v současné době čím dál víc zabývá studiem molekulárních mechanismů nemocí. Zobrazování na molekulární úrovni významně dopomáhá k úspěšnější léčbě, díky možnosti lépe detekovat, lokalizovat a charakterizovat onemocnění. S tím souvisí i čím dál tím častější používání radiofarmak jak k účelům diagnostickým, tak léčebným (Liu, 2004).

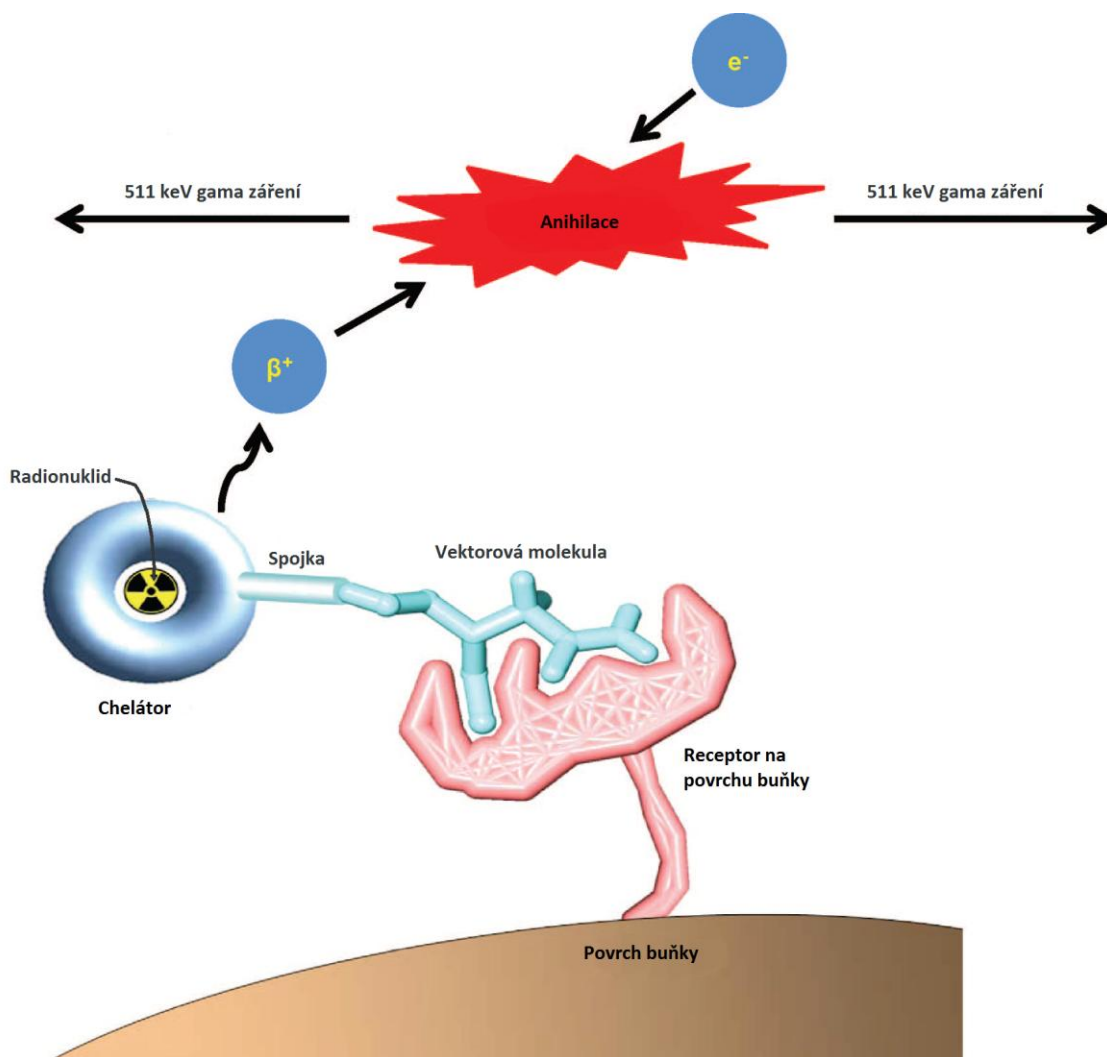
Začátek rozvoje radioterapie v roce 1950 započal použitím radioaktivního jódu, jako prostředek pro diagnostiku a léčbu rakoviny štítné žlázy a jejích poruch. V dnešní době jsou každoročně po celém světě využívány desítky milionů procedur nukleární medicíny s použitím radiofarmak (Gijs et al., 2015).

Diagnostická radiofarmaka jsou látky značené radionuklidy pro PET nebo SPECT zobrazování. Většina radiofarmak se podává intravenózně. Mohou být složena z makromolekul (monoklonální protilátky, fragmenty protilátek), ale převažují radiofarmaka na bázi malých organických nebo anorganických molekul, jež poskytují informace o konkrétních biologických procesech. Radiofarmaka pro diagnostické účely slouží primárně pro detailní zobrazení tkání, orgánových struktur a jejich fyziologických funkcí. Naproti tomu terapeutická radiofarmaka přivádí dávku ionizujícího záření na místo výskytu nemoci (Liu, 2004).

2. 4. 1 Radionuklidy a značení radiofarmak

Většina používaných radionuklidů, až na několik výjimek (^{18}F , ^{131}I) jsou kovy. Radiofarmaka značená radioaktivním kovem obsahují bifunkční chelátor s navázaným kovem, spojku (spacer/linker) a vektorovou molekulu, která se váže na receptor umístěný na povrch cílové buňky. (Fani et al., 2012) V případě GBM je vektorová molekula RGD peptid a váže se na integrin $\alpha_v\beta_3$ epiteliální buňky nádorových cév.

Na obrázku 7 je ukázáno, jak probíhá detekce značeného radiofarmaka prostřednictvím pozitronové emisní tomografie. V tabulce 2 je pak přehled klinicky významných radionuklidů, využívaných při zobrazování pomocí PET nebo SPECT a používaných k léčbě, spolu s jejich fyzikálními vlastnostmi a způsobem produkce.



Obrázek 12. Schéma vyobrazující základní princip PET detekce.

Na obrázku je chelátor s navázaným radioaktivním kovem a spojkou připojený na vektorovou molekulu, která je navázána na receptor na povrchu buňky. Při přeměně radionuklidu dochází k emisi částic β^+ (kladně nabitě pozitrony), které při střetu s elektrony anihilují, tím tedy dochází k jejich zániku a vznikají dva fotony gama záření s energií 511 keV (Převzato a upraveno dle Wadas et al., 2010).

Tabulka 1. Klinicky významné radionuklidy a jejich vlastnosti (Fani et al., 2012).

| Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--|
| Radionuklid | Poločas přeměny (hod.) | Emitovaná energie (keV) | Výroba |
| ^{99m}Tc | 6,02 | 141 | generátor $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ |
| ^{111}In | 67,9 | 171 | cyklotron |
| | | 245 | |
| ^{123}I | 13,2 | 159 | cyklotron |
| | | 27 | |
| | | 31 | |
| ^{67}Ga | 78,26 | 93 | cyklotron |
| | | 185 | |
| | | 300 | |
| Pozitronová emisní tomografie (PET) | | | |
| ^{18}F | 1,83 | 634 | cyklotron |
| ^{64}Cu | 12,7 | 656 | cyklotron |
| ^{68}Ga | 1,13 | 1,899 | generátor $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ |
| Radionuklidy používané k léčbě | | | |
| ^{90}Y | 64,1 | 2,28 | generátor $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ |
| ^{177}Lu | 161 | 498 | reaktor |
| | | 385 | |
| | | 177 | |
| | | 392 | |
| | | 484 | |
| ^{67}Cu | 61,9 | 577 | urychlovač |

2. 4. 2. Gallium-68

Na počátku šedesátých let dvacátého století byl použit v klinické medicíně radionuklid emitující pozitrony, gallium-68 (Anger and Gottschalk, 1963).

Gallium-68 je radionuklid emitující pozitrony o energii 1,92 MeV. Využívá se v nukleární medicíně jako součást radiofarmaka, zodpovědná za jeho detekovatelnost. Jeho předností je snadná dostupnost prostřednictvím generátoru gallia a krátký poločas přeměny ($T_{1/2} = 67,71$ minut). K získání gallia-68 není zapotřebí cyklotronu jako je tomu u většiny radionuklidů, ale používá se generátor $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Rozpadem ^{68}Ge tedy získáme ^{68}Ga , které se dále rozpadá na stabilní ^{68}Zn . Dlouhý poločas rozpadu „rodičovského“ radionuklidu germania-68 ($T_{1/2} = 270,8$ dní) ve spojení s krátkým rozpadovým poločasem gallia-68, umožňuje používání generátoru až po dobu jednoho roku. Nejvýznamnější radiofarmaka značená galliem-68 jsou ^{68}Ga -DOTATOC, ^{68}Ga -DOTATATE a ^{68}Ga -DOTANOC (Banerjee & Popmer, 2013).

3 Experimentální část

3. 1 Použitý materiál

Byly použity tři radioaktivně označitelné peptidy a to NODAGA-RGD dimer acetát, NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát (ABX GmbH, Německo – Radeberg).

Gallium-68 bylo eluováno z generátoru $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (Eckert & Ziegler, Berlín, Německo). Eluce byla prováděna 0,1 N HCl.

K analýze čistoty bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) UltiMate 3000 UHPLC (Dionex, Germering, Německo) s detektorem radioaktivity (Raytest GmbH, Straubenhardt, Německo) a kolona Watrex Nucleosil 120 C18 5 μm 250x4 mm (Watres, Praha, Česká republika). Získaná data byla zpracovávána pomocí programu Chromeleon 7.1 systém (Dionex, Kalifornie, USA).

Při stanovování vazby na plazmatické proteiny byla použita kolona ilustra MicroSpin G-50 s náplní Sephadex G-50 s frakcionačním rozsahem 1,5-30 kDa (GE Healthcare, Velká Británie). K centrifugaci byla použita mikrocentrifuga Smart 15 (Hanil BioMed Inc., Gwangju, Korea)

Ke kultivaci buněk bylo použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) s přidavkem 10% tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FCSi), 1% neesenciálních aminokyselin, 1% pyruvátu sodného a s 1% antibiotik (penicilin a streptomycin). Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve byl na místo trypsinu použit tripLE. Vše Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Inkubační pufr s pH 7,4 použitý pro stanovení akumulace značených peptidů v buňkách obsahoval 25 mM Tris/HCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , 5 mM glukózu, 140 mM NaCl a H_2O .

Na měření radioaktivity vzorků byl použit automatický gamma počítač 2480 Wizard² (PerkinElmer, Vídeň, Rakousko).

Absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru Infininte M200 PRO (Tecan Trading AG, Männedorf, Švýcarsko).

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

3. 2 Kontrola radiochemické čistoty peptidů

Stanovování radiochemické čistoty⁸ jednotlivých radioaktivně značených peptidů se provádělo pomocí HPLC a detektoru radioaktivity. Ze směsi peptidu (5 nebo 10 µg), acetátového pufru (30 µl) a eluátu gallia-68 (300 µl) bylo odebráno 10 µl a smícháno s 40 µl deionizované vody pro naředění radioaktivity. Poté byl podle velikosti radioaktivity (100 - 800 kBq) volen objem nástřiku, který se pohyboval mezi 5 a 20 µl. Během 15ti minut trvání analýzy, došlo k separaci jednotlivých složek vzorku v závislosti na interakci se stacionární fází. Rychlost průtoku byla 1 ml/min. Složení mobilní fáze se měnilo v čase dle tabulky 2. Radiochemická čistota značených peptidů byla měřena před každým použitím značeného peptidu.

| Čas (min) | složení mobilní fáze |
|-----------|----------------------|
| 0-3 | 100% A |
| 3-10 | 50% A + 50% B |
| 10-13 | 20% A + 80% B |
| 13-15 | 100% A |

Tabulka 2. Složení mobilní fáze v závislosti na čase. A (99,9% H₂O + 0,1% TFA), B (99,9% ACN + 0,1% TFA).

3. 3 Značení peptidů

Jednotlivé peptidy byly značeny galliem-68. Nejprve byla provedena eluce gallia-68 prostřednictvím generátoru ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga. Gallium-68 bylo eluováno pomocí HCl (0,1 mol/l) frakcionační metodou. Ze získané ⁶⁸Ga-frakce (1 ml) byl eluát v množství 300 µl přidáván ke směsi acetátového pufru (30 µl) a jednoho ze tří zkoumaných peptidů (5 nebo 10 µg). Směs eluátu, pufru a peptidů se posléze ponechala inkubovat, v případě NODAGA-RGD trifluoroacetátu a DOTA-cyklo-RGDfK acetátu 10 minut, v případě NODAGA-RGD dimer acetátu 15 minut. Oba NODAGA-RGD peptidy byly inkubovány při pokojové teplotě, DOTA-RGD peptid při 95°C.

⁸ Radiochemická čistota je poměr radioaktivity radionuklidu v radiofarmaku a celkové radioaktivity radionuklidu. Čistota je uváděna v procentech (Český lékopis, 2009).

3. 4 Stabilitní testy

Bylo provedeno šest stabilitních testů tří zkoumaných peptidů.

3. 4. 1 Stanovení plazmatické stability

K 100 μl značeného preparátu bylo přidáno 400 μl lidské plazmy a vše bylo pečlivě zamícháno. Posléze byla směs inkubována při 37°C. Následně bylo odebráno 100 μl vzorku pro analýzu v časech 0, 30, 60 a 120 minut. Vzorek pro analýzu byl dále smíchán s 200 μl acetonitrilu a ponechán po dobu 1 minuty na třepačce. Posléze se vzorek centrifugoval 3 minuty při 15 000 rpm. Po dokončení centrifugace byla odebrána část supernatantu k analýze radiochemické čistoty pomocí HPLC.

3. 4. 2 Stanovení stability v prostředí konkurenčního kationtu

50 μl značeného preparátu bylo smícháno se 150 μl roztoku FeCl_3 (0,1 mol/l) a směs byla opět inkubována při 37°C a to 30, 60 a 120 minut. Posléze byla analyzována radiochemická čistota vzorku na HPLC.

3. 4. 3 Stanovení stability v prostředí zvýšeného pH

K 50 μl značeného preparátu bylo přidáno 100 μl acetátového pufru (1,1 mol/l) a bylo zkontrolováno pH pomocí pH papírku. Hodnota pH se pohybovala okolo 7,0. Po kontrole pH následovala inkubace při 37°C a vzorek pro analýzu byl odebrán po 30, 60 a 120 minutách. Poté následovala analýza radiochemické čistoty na HPLC.

3. 4. 4 Stanovení stability v prostředí konkurenčního chelátoru

Bylo smícháno 50 μl značeného preparátu se 150 μl roztoku DTPA (6 mmol/l) a směs byla inkubována při 37°C po dobu 30, 60 a 120 minut. Následná analýza radiochemické čistoty se prováděla na HPLC.

3. 4. 5 Stanovení rozdělovacího koeficientu oktanol/voda

K označenému preparátu (335 μ l v případě NODAGA-RGD trifluoroacetátu a DOTA-cyklo-RGDfK acetátu a 340 μ l v případě NODAGA-RGD dimer acetátu) bylo přidáno 600 μ l PBS. Z takto připravené směsi bylo odebráno 50 μ l ke kterým bylo přidáno 500 μ l oktanolu a 450 μ l PBS. Tímto způsobem bylo připraveno celkem šest vzorků, které byly posléze vloženy na 20 minut na třepačku. Po dvaceti minutách byly vzorky 1 minutu centrifugovány (15 000 rpm). Z oktanolové fáze bylo odebráno 50 μ l a z vodné fáze se odebralo 10 - 50 μ l podle aktivity vzorku (aktivita by neměla přesahovat 20 kBq). Následně bylo provedeno měření aktivity vzorků na gama počítači a výpočet rozdělovacího koeficientu oktanol/voda ($\log P$). Pro výpočet byl použit vzorec $\log P = \log(\text{aktivita oktanolu/aktivita vody})$.

3. 4. 6 Stanovení vazby na plazmatické proteiny

Značený preparát (10 μ l) byl smíchán se 190 μ l lidské plazmy a v jednom případě pro ověření funkce separační kolony bylo smícháno 10 μ l značeného preparátu se 190 μ l PBS. Vzorky byly inkubovány při 37°C. Po 0 a 120 minutách bylo odebráno 25 μ l vzorku a nanášeno na gelovou kolonu. Poté proběhla 2 minutová centrifugace (2000 g) a kontrola zda je aktivita vzorků pod 20 kBq. Následně byla změřena aktivita eluátu i gelové kolony na gama počítači a byla vypočítána míra vazby na plazmatické proteiny. Pro výpočet byl použit vzorec $\%vazby = (\text{aktivita eluátu/aktivita eluátu+kolony}) \times 100$.

3. 5 Akumulační schopnosti peptidů

K akumulacním testům bylo použito osm jamek z dvanácti jamkové destičky, čtyři jamky pro neinhibované a čtyři pro inhibované buňky. Konfluence buněk se pohybovala okolo 80%.

Prvním krokem bylo odsátí kultivačního média a opláchnutí buněk 1 ml PBS pro odstranění zbytku média. Následně bylo přidáno do čtyř jamek 1 ml inkubačního pufru, do dalších čtyř jamek pro inhibici buněk bylo přidáno 900 μ l inkubačního pufru a 100 μ l směsi neoznačeného peptidu (použité koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.) s inkubačním pufrem. Po 15ti minutové inkubaci při 37°C bylo do každé jamky

přidána směs značeného peptidu s inkubačním pufrům dle tabulky 3. Opět proběhla inkubace, tentokrát po dobu 90ti minut při 37°C. Poté byly buňky opláchnuté 1 ml PBS a přidáno do každé jamky 400 µl 0,1 M NaOH pro lýzu buněk. Po 30ti minutové inkubaci s roztokem hydroxidu sodného při 37°C byly buňky homogenizovány pipetou, bylo odebráno 10 µl pro stanovení koncentrace celkového proteinu BCA metodou a zbylý obsah jamek byl přenesen do lahviček k analýze radioaktivity na gama počítací.

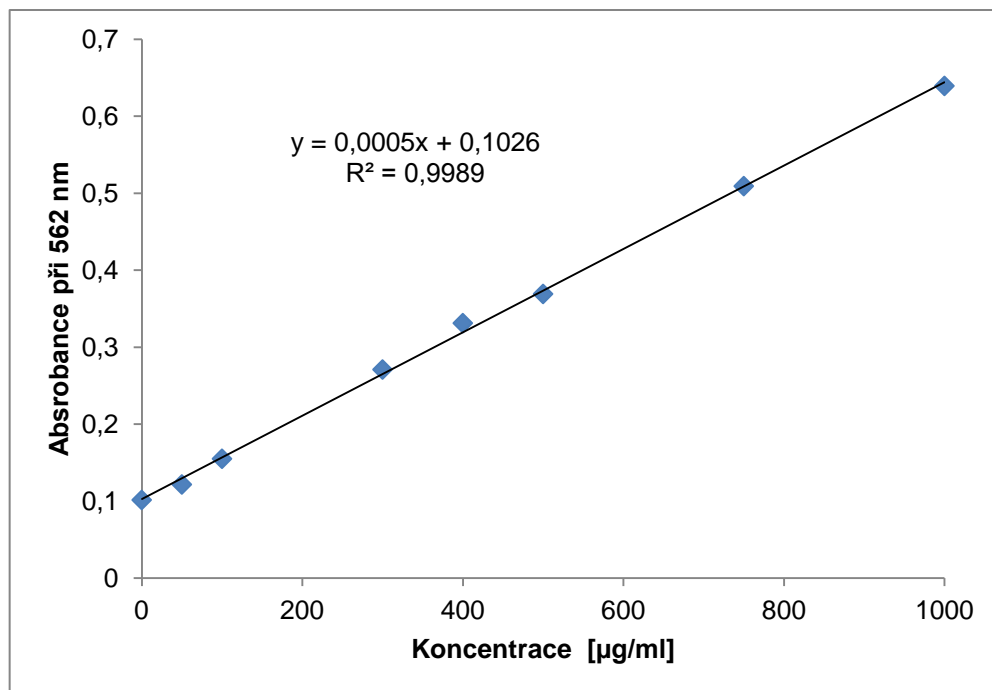
Tabulka 3. Přehled radioaktivity užitá pro značení jednotlivých peptidů, množství použité směsi ⁶⁸Ga-peptidů a koncentrace inkubovaná s buňkami pro jednotlivé RGD peptidy.

| | NODAGA-RGD trifluoroacetát | DOTA-cyklo- RGDFK acetát | NODAGA-RGD dimer acetát |
|---|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| radioaktivita značeného preparátu [MBq] | 18,26 | 8,3 | 17,41 |
| množství směsi (⁶⁸Ga-RGD peptid + inkubační pufr) na jamku⁹ [µl] | 183,5 | 201,8 | 175,8 |
| koncentrace ⁶⁸Ga-RGD peptidu [mol/l] | 2,37x10 ⁻⁷ | 1,80x10 ⁻⁷ | 2,57x10 ⁻⁷ |
| koncentrace neznačeného RGD peptidu [mol/l] | 2,37x10 ⁻⁵ | 1,80x10 ⁻⁵ | 2,57x10 ⁻⁵ |

3. 5. 1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou

200 µl směsi sodné soli kyseliny bicinchoninové a 4% CuSO₄ v poměru 50:1 bylo přidáno k 10 µl vzorku jednotlivých buněčných lyzátů a též k vzorkům proteinových standardů (0-1 mg/ml hovězího sérového albuminu - BSA). Následovala 30ti minutová inkubace při 37°C. Posléze byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru Infinite 200 PRO firmy TECAN (Männedorf, Švýcarsko). Ze získaných výsledků byla sestavena kalibrační křivka, prostřednictvím které byl následně vypočítán obsah proteinu v jamce.

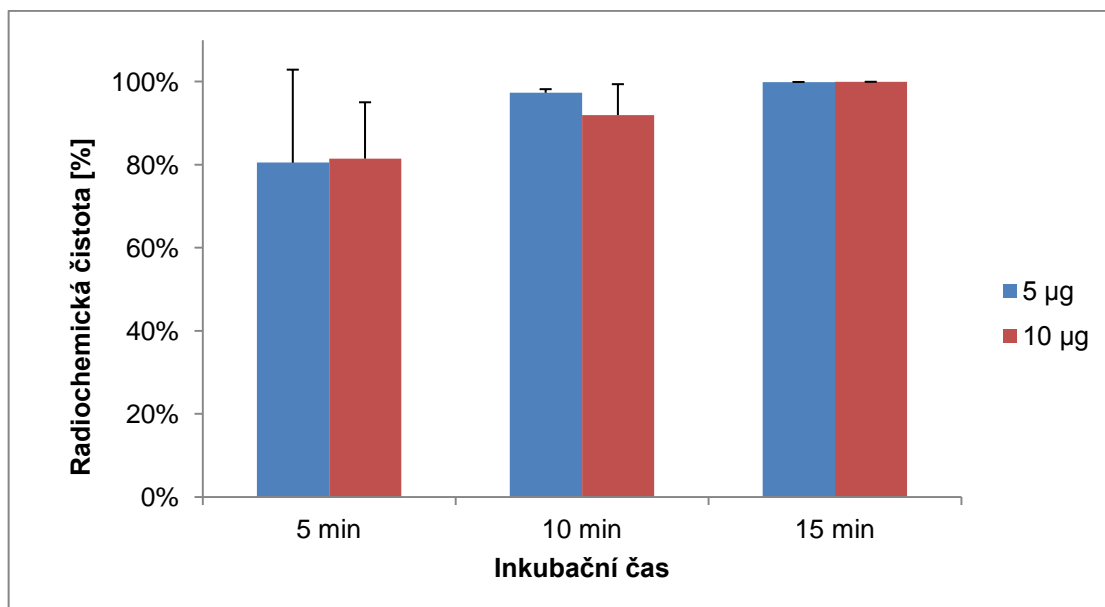
⁹ Použita byla 12ti jamková destička, kde byl celkový objem inkubačního roztoku před přidáním ⁶⁸Ga-RGD peptidu 1 ml.



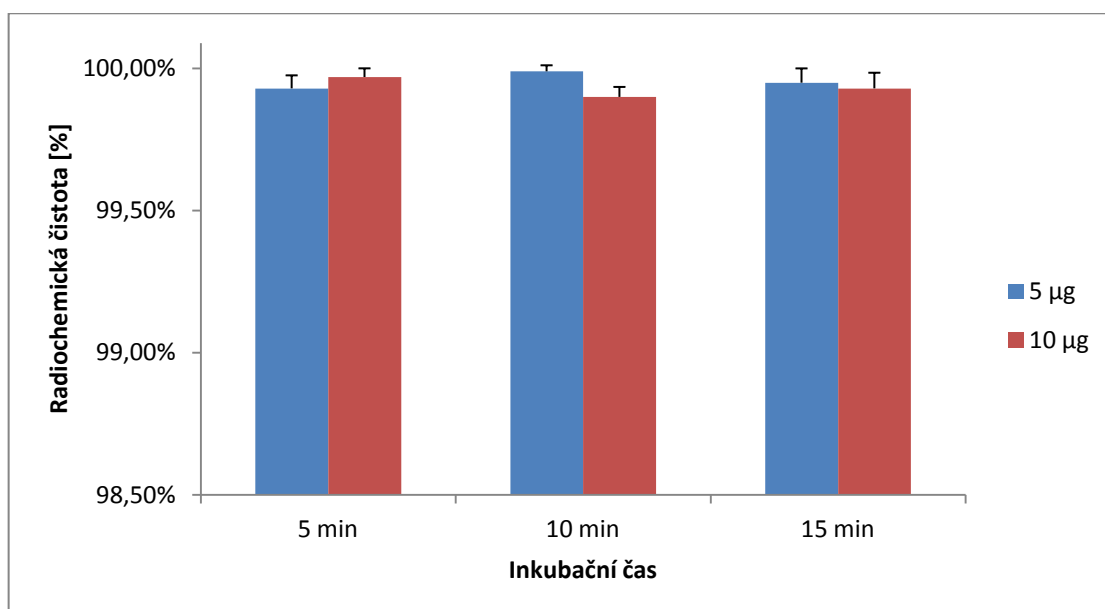
Graf 1. Kalibrační křivka použita pro výpočet koncentrace buněčného proteinu.

4 Výsledky

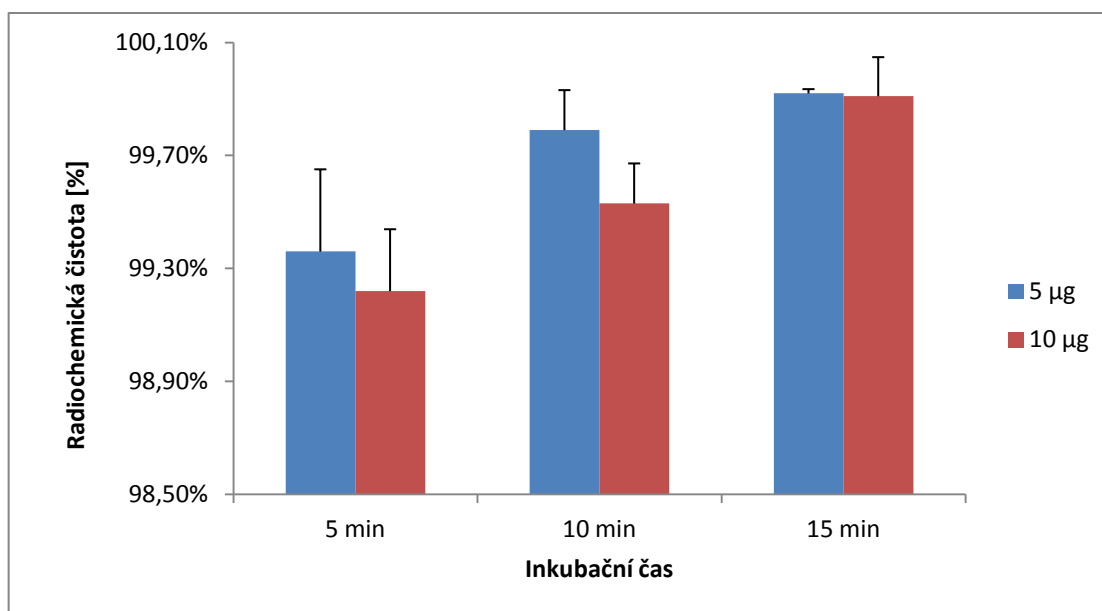
4. 1 Vhodné podmínky pro značení vybraných peptidů galliem-68



Graf 2. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro NODAGA-RGD dimer acetát pro následné testování (n=3).



Graf 3. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro NODAGA-RGD trifluoroacetát pro následné testování (n=3).

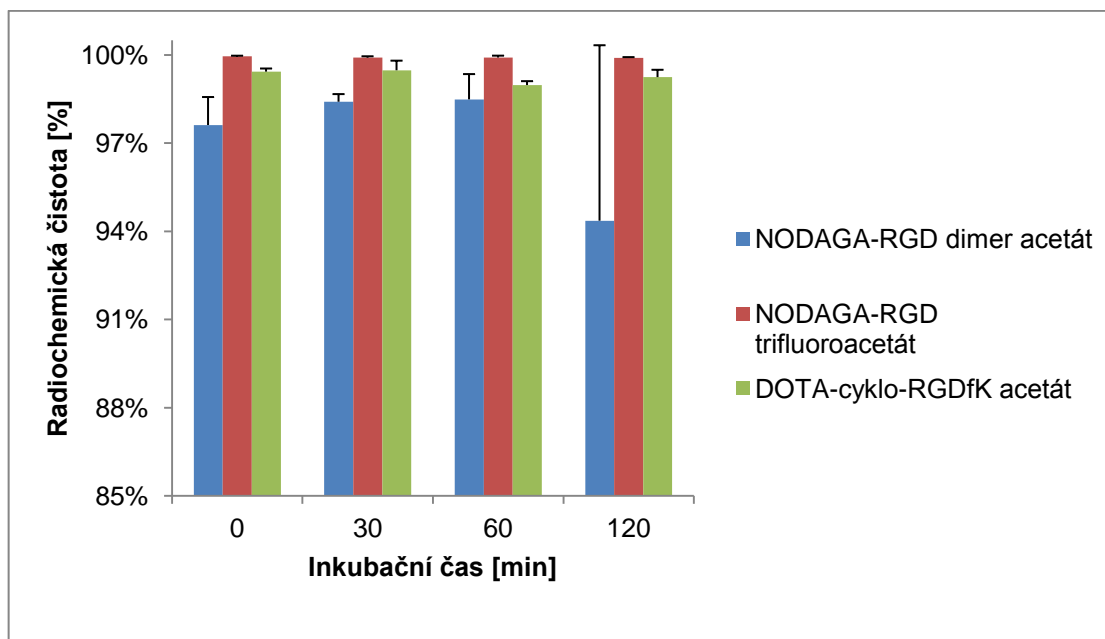


Graf 4. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro DOTA-cyklo-RGDfK acetát pro následné testování (n=3).

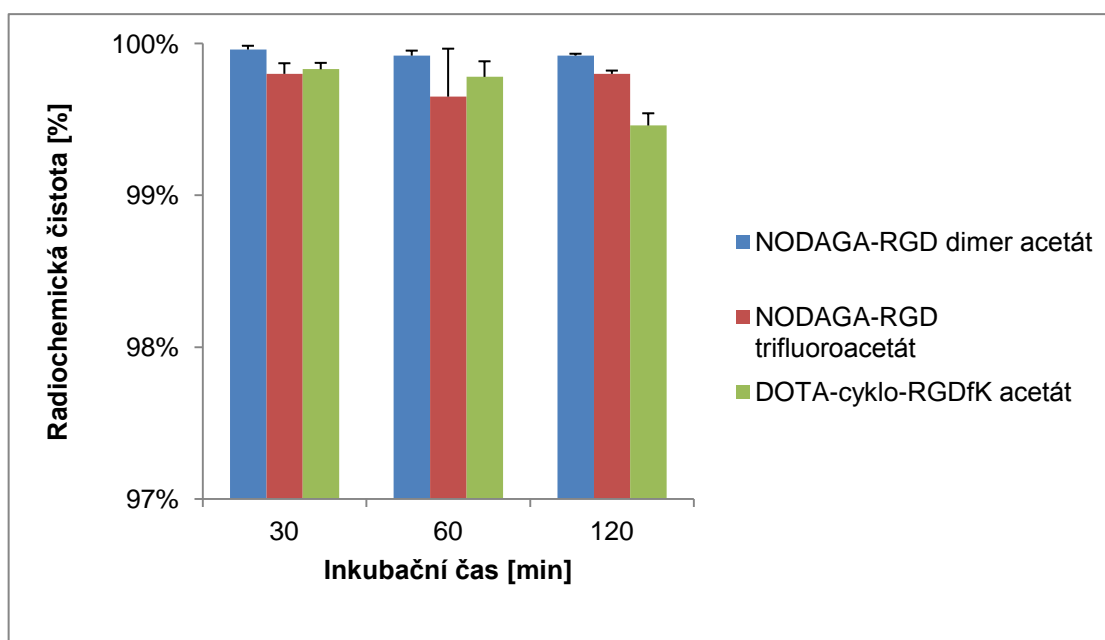
Tabulka 4. Stanovování nejvhodnějších podmínek pro následné testování (n=3). Data jsou ve tvaru aritmetického průměru naměřené čistoty ± směrodatná odchylka.

| NODAGA-RGD dimer acetát | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Množství peptidu [µg] | 15 min [%] | 10 min [%] | 5 min [%] |
| 5 | 99,90±0,0005 | 97,34±0,0088 | 80,50±0,2241 |
| 10 | 99,93±0,0006 | 91,97±0,0744 | 81,49±0,1356 |
| NODAGA-RGD trifluoroacetát | | | |
| 5 | 99,95±0,0005 | 99,99±0,0002 | 99,93±0,0005 |
| 10 | 99,93±0,0006 | 99,90±0,0004 | 99,97±0,0003 |
| DOTA-cyklo-RGDfK acetát | | | |
| 5 | 99,92±0,0002 | 99,79±0,0014 | 99,36±0,0029 |
| 10 | 99,91±0,0014 | 99,53±0,0014 | 99,22±0,0022 |

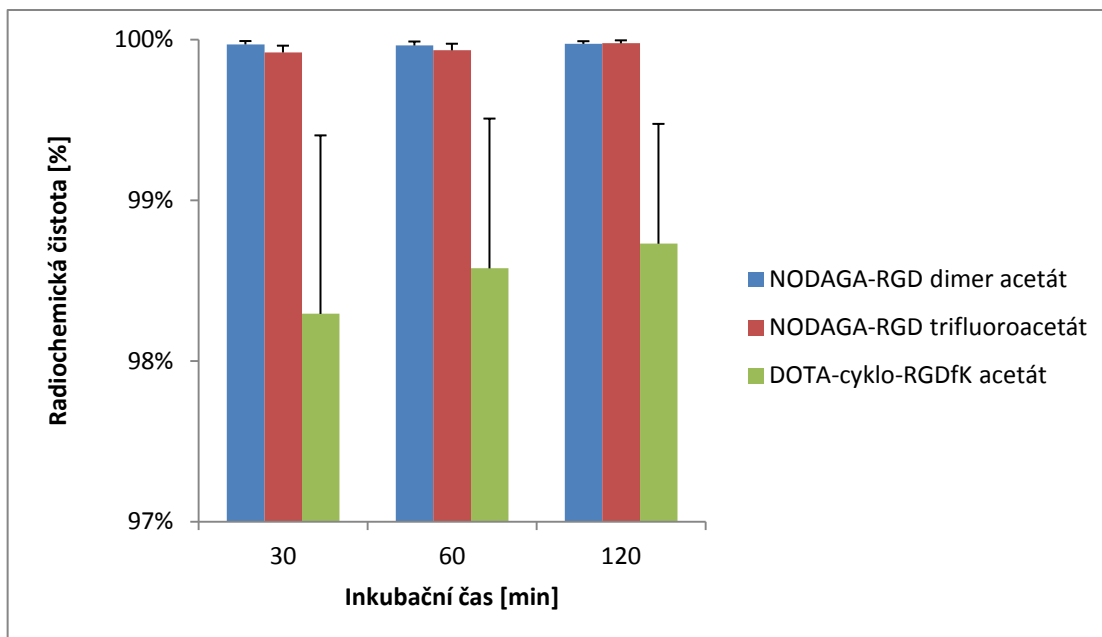
4. 2 Stabilitní testy



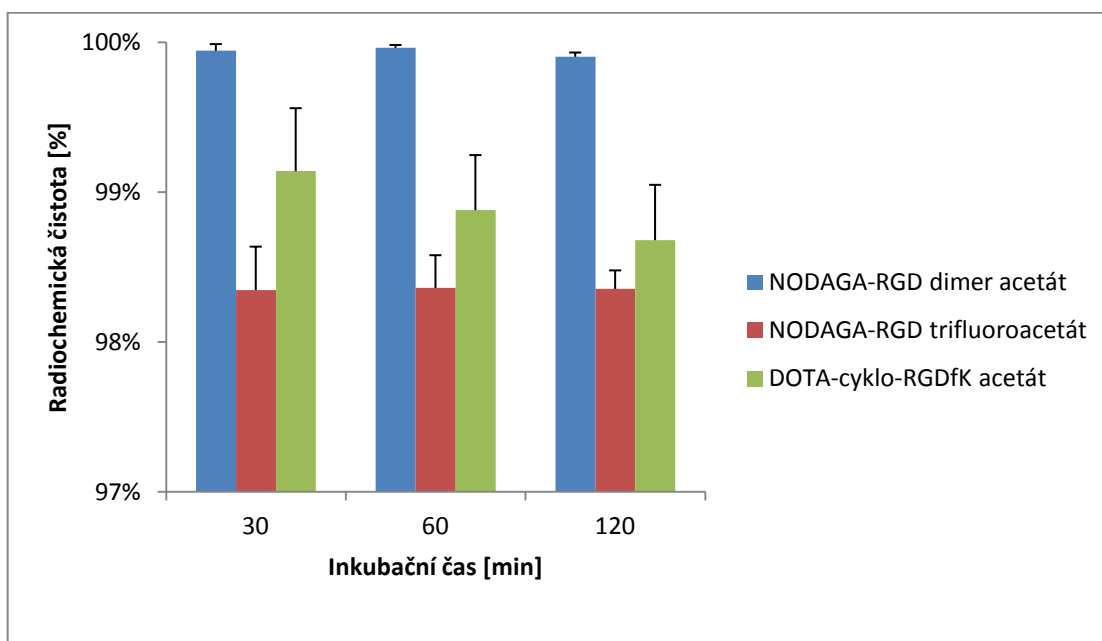
Graf 5. Plazmatická stabilita jednotlivých zkoumaných peptidů při délce inkubace 0, 30, 60 a 120 minut (n=3).



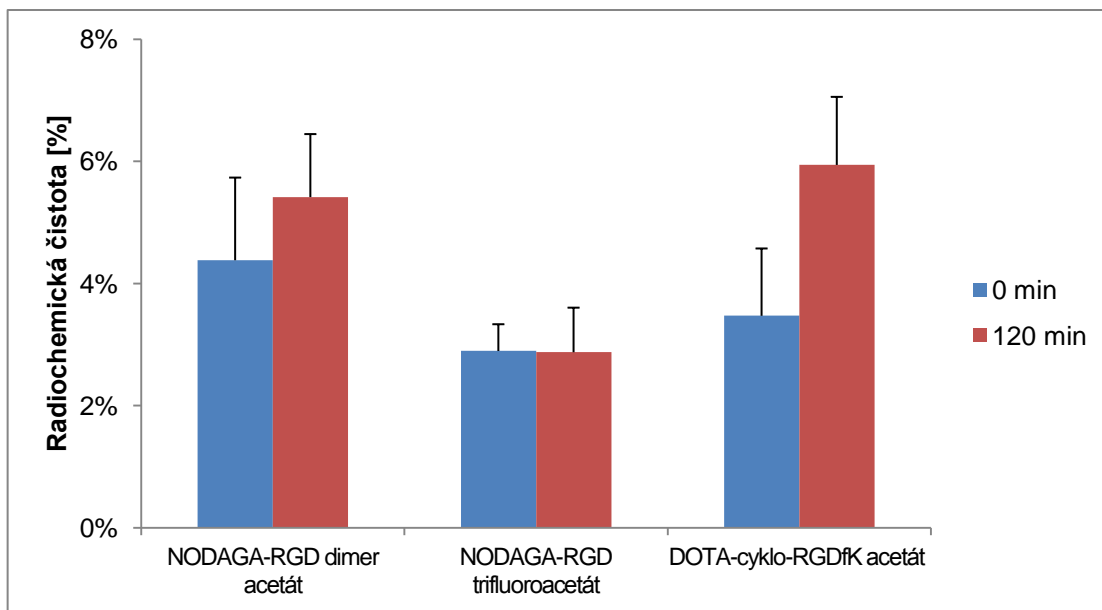
Graf 6. Stabilita značených peptidů v prostředí konkurenčního kationtu Fe^{3+} (0,1 mol/l roztok $FeCl_3$) při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).



Graf 7. Stabilita značených peptidů v prostředí zvýšeného pH (7,0) při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).



Graf 8. Stabilita značených peptidů v prostředí konkurenčního chelátoru (6 mmol/l DTPA), při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).



Graf 9. Stanovení vazby na plazmatické proteiny. Jednotlivé peptidy byly inkubovány po dobu 0 a 120 minut (n=3).

Tabulka 5. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro NODAGA-RGD dimer acetát. Data jsou ve tvaru aritmetického průměru naměřené radiochemické čistoty ± směrodatná odchylka, v případě vazby na plazmatické proteiny, jsou hodnoty ve tvaru aritmetického průměru vazby ± směrodatná odchylka.

| NODAGA-RGD dimer acetát | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Testování | 0 min [%] | 30 min [%] | 60 min [%] | 120 min [%] |
| Plazmatická stabilita | 97,61±0,0095 | 98,41±0,0026 | 98,49±0,0086 | 94,36±0,0597 |
| Konkurenční kationt | - | 99,96±0,0002 | 99,92±0,0003 | 99,92±0,0001 |
| Prostředí zvýšeného pH | - | 99,97±0,0002 | 99,96±0,0002 | 99,97±0,0002 |
| Konkurenční chelátor | - | 99,94±0,0004 | 99,96±0,0002 | 99,90±0,0003 |
| Vazba na plazmatické proteiny | 4,38±0,0135 | - | - | 5,42±0,0103 |

Tabulka 6. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro NODAGA-RGD trifluoroacetát. Data jsou ve tvaru aritmetického průměru naměřené radiochemické čistoty ± směrodatná odchylka, v případě vazby na plazmatické proteiny, jsou hodnoty ve tvaru aritmetického průměru vazby ± směrodatná odchylka.

| NODAGA-RGD trifluoroacetát | | | | |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Testování | 0 min [%] | 30 min [%] | 60 min [%] | 120 min [%] |
| Plazmatická stabilita | 99,95±0,0002 | 99,91±0,0004 | 99,91±0,0006 | 99,90±0,0002 |
| Konkurenční kationt | - | 99,80±0,0007 | 99,65±0,0032 | 99,80±0,0002 |
| Prostředí zvýšeného pH | - | 99,92±0,0004 | 99,93±0,0004 | 99,98±0,0002 |
| Konkurenční chelátor | - | 98,35±0,0029 | 98,36±0,0022 | 98,35±0,0012 |
| Vazba na plazmatické proteiny | 2,90±0,0044 | - | - | 2,88±0,0073 |

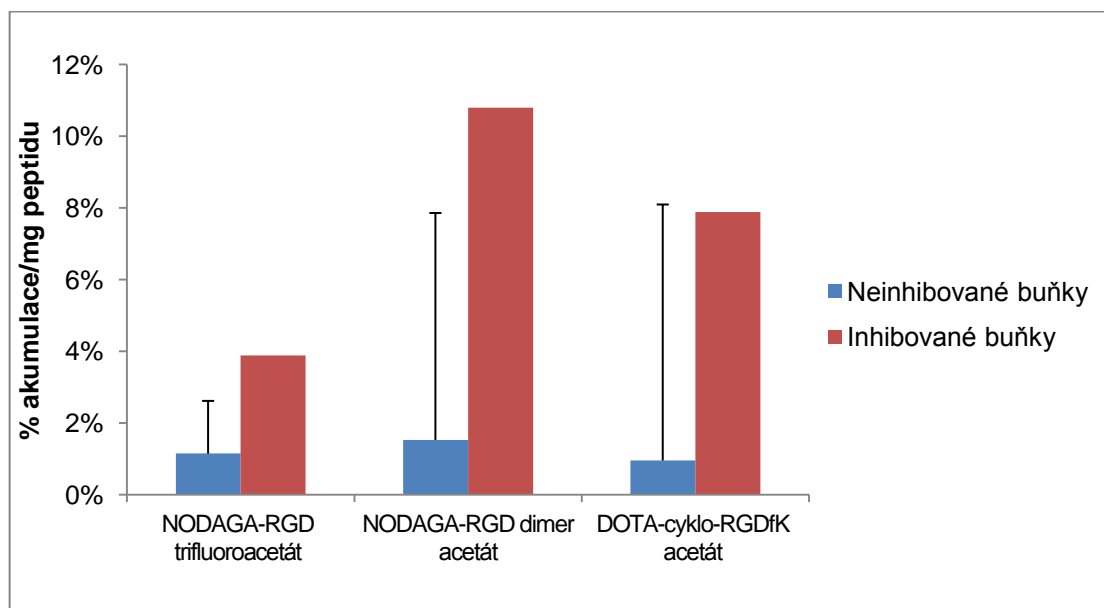
Tabulka 7. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro DOTA-cyklo-RGDfK acetát. Data jsou ve tvaru aritmetického průměru naměřené radiochemické čistoty ± směrodatná odchylka, v případě vazby na plazmatické proteiny, jsou hodnoty ve tvaru aritmetického průměru vazby ± směrodatná odchylka.

| DOTA-cyklo-RGDfK acetát | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Testování | 0 min [%] | 30 min [%] | 60 min [%] | 120 min [%] |
| Plazmatická stabilita | 99,43±0,0011 | 99,48±0,0033 | 98,97±0,0013 | 99,24±0,0025 |
| Konkurenční kationt | - | 99,83±0,0004 | 99,78±0,0010 | 99,46±0,0008 |
| Prostředí zvýšeného pH | - | 98,29±0,0111 | 98,58±0,0093 | 98,73±0,0074 |
| Konkurenční chelátor | - | 99,14±0,0042 | 98,88±0,0037 | 98,68±0,0037 |
| Vazba na plazmatické proteiny | 3,47±0,0110 | - | - | 5,94±0,0112 |

Tabulka 8. Hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol/voda u jednotlivých peptidů (n=6).

| Testování | NODAGA-RGD dimer acetát | NODAGA-RGD trifluoroacetát | DOTA-cyklo-RGDfK acetát |
|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Rozdělovací koeficient oktanol/voda | -2,24±0,0521 | -2,45±0,4061 | -3,02±0,2569 |

4. 3 Vazba na buněčnou linii U87 MG in vitro



Graf 10. Podíl akumulace značeného peptidu v buňkách U87 MG vyjádřený v procentech podané dávky na mg buněčného proteinu (n=4).¹⁰

Tabulka 9. Podíl akumulace značeného peptidu v buňkách U87 MG vyjádřený v procentech podané dávky na mg buněčného proteinu (n=4). Data jsou ve tvaru aritmetického průměru vypočítané % akumulace na mg proteinu ± směrodatná odchylka.

| | NODAGA-RGD trifluoroacetát [%] | NODAGA-RGD dimer acetát [%] | DOTA-cyklo-RGDfK acetát [%] |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Neinhibované buňky | 1,15±0,0147 | 1,53±0,0633 | 0,96±0,0714 |
| Inhibované buňky | 3,89±2,4595 | 10,80±5,7243 | 7,89±2,0259 |

¹⁰ Směrodatná odchylka saturovaných buněk nebyla vložena do grafu 10 z důvodu extrémně vysokých hodnot.

5 Diskuze

Multiformní glioblastom je fatální rakovinné onemocnění mozku vznikající v 90% případů *de novo*, tedy jako primární glioblastom. Zbýlých 10% vzniká transformací z nádorů nižší třídy (Urbanska et al., 2014). Prognóza je velmi špatná a pacienti ve většině případů umírají do 15ti měsíců. K prodloužení této krátké doby a k zlepšení kvality života pacienta může přispět včasná diagnostika.

Diagnostika se provádí histopatologickým vyšetřením chirurgicky odstraněné části nádoru nebo pomocí biopsie a prostřednictvím zobrazovacích metod jako je MRI, CT nebo PET. V současné době se také začíná využívat hybridních technik, spojující základní CT, MRI a PET zobrazování (např. PET/CT, PET/MRI).

Se zobrazovací metodou PET je spojeno použití radiofarmak, která umožňují zobrazování až na molekulární úrovni, čímž výrazně dopomáhají k lepší diagnostice a tedy i léčbě.

Radionuklidem značené RGD peptidy, jakožto potencionální radiofarmaka pro diagnostiku GBM, tvoří vazbu prostřednictvím RGD sekvence k povrchovým receptorům nádorových buněk, integrinům. Ideálním radionuklidem pro značení RGD peptidů je izotop gallium-68 s poločasem přeměny 67,71 minut.

Struktura RGD peptidů může významně ovlivnit následnou vazbu na integriny (multimerizace), vazbu s radionuklelem nebo farmakokinetiku (Haubner et al., 2014). Je tedy snaha o optimalizování struktury RGD peptidů pro dosažení co nejlepších vlastností těchto peptidů.

⁶⁸Ga-RGD peptidy mají velké šance pro translaci do klinických studií. Již bylo pro klinické studie využito galliem značeného [⁶⁸Ga]NOTA-RGD a z peptidů značených fluorem-18 [¹⁸F]Galacto-RGD (Chen et al., 2016).

Ve své práci jsem se zaměřila na tři RGD peptidy značené galliem-68 a to konkrétně na NODAGA-RGD dimer acetát (cykloRGDyK), NODAGA-RGD trifluoroacetát (cykloRGDyK) a DOTA-cyklo-RGDfK acetát. NODAGA-RGD dimer acetát, jak už z názvu vyplývá, je dimer obsahující dvě RGD sekvence, což zlepšuje jeho vazebné schopnosti k $\alpha_v\beta_3$ integrinům. NODAGA-RGD trifluoroacetát je monomer, tudíž by afinita k integrinům měla být o něco nižší. DOTA-cyklo-RGDfK acetát se liší od předchozích dvou RGD peptidů přítomností fenylyalaninu v jeho struktuře. Má vysokou afinitu k $\alpha_v\beta_3$ integrinům, ale také k plazmatickým proteinům,

což vede k vyšší koncentraci aktivity v krvi (Clarke & Martell, 1991; Haubner et al., 2014).

Prvním krokem v praktické části této práce bylo testování radiochemických podmínek značení galliem-68, které budou nejvhodnější pro následné stabilitní a akumulační testy. U tří testovaných peptidů NODAGA-RGD dimer acetát, NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát byla zjišťována nejvhodnější doba inkubace s galliem-68 a použité množství peptidu, tedy doba a množství ve kterém by značený peptid vykazoval vysokou radiochemickou čistotu a zároveň by mohlo být použito co nejmenší množství peptidu a nejkratší inkubační doba. Byly zvoleny tři časy – 5, 10 a 15 minut a množství peptidu 5 µg nebo 10 µg. Všechny testy byly prováděny v triplicátech ze kterých se následně provedl aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Pro zjišťování radiochemické čistoty peptidu s navázaným galliem-68 bylo používáno HPLC s radiodetekcí.

U NODAGA-RGD dimer acetátu byla jako nejvhodnější zvolena délka inkubace 15 minut. Ze získaných výsledků jsme určili, že nejvhodnější dávkování peptidu bude 10 µg. V případě 5ti minutové inkubace a 10ti i 5ti µg peptidu a 10ti minutové inkubace a 10ti µg množství peptidu, nebyly výsledky příliš příznivé. Radiochemická čistota peptidu s navázaným galliem-68 se pohybovala v hodnotách <95%. V takovém případě není možné značený peptid použít, jelikož nesplňuje podmínky pro biologickou aplikaci díky vysokému podílu radiochemických nečistot, což by mohlo mít za následek nežádoucí chování peptidu.

V bakalářské práci Jany Štěpánkové (Štěpánková, 2015) byl použit pro NODAGA-RGD dimer acetát 15ti minutový doba inkubace, stejné jako v mém případě, množství RGD peptidu však použila poloviční. Při porovnání výsledků jsou patrné rozdíly u vazby na plazmatické proteiny, kde má Štěpánková uvedenou hodnotu 3,97% po 120ti minutách inkubace v lidské plazmě. Mé výsledky byly o něco vyšší, konkrétně 5,42%. Malý rozdíl ve výsledcích byl ještě patrný u stability v lidské plazmě, kde v případě Štěpánkové dosahují hodnoty téměř 100% i po 120ti minutách inkubace. V mnou provedených testech dosahoval NODAGA-RGD dimer acetát po 120ti minutové inkubaci pouze 94,36%.

U peptidu NODAGA-RGD trifluoroacetát byla určena nejvhodnější doba inkubace 10 minut a množství peptidu 5 µg. Jelikož byla u všech testovaných inkubačních časů a množství peptidu čistota navázaného peptidu >98%, mohlo být

zvoleno jakékoli množství peptidu a jakýkoli inkubační čas. Pro následující testy bylo zvoleno použití 5 µg peptidu a 10 minutová doba inkubace.

Stejně jako u předchozího peptidu, bylo za nejpříznivější inkubační čas u DOTA-cyklo-RGDfK acetátu zvoleno 10 minut a 5 µg množství peptidu, jelikož opět výsledky vykazovaly velmi vysokou čistotu peptidu s navázaným galliem-68 přesahující 98%. V odborné publikaci C. Decristofora je uvedeno použité množství DOTA-RGD peptidu 20-40 µg, ovšem i množství použitého acetátového pufru a eluátu gallia je 4x vyšší, doba inkubace je 7 minut při 80°C (Decristoforo et al., 2008). Výsledky jsou téměř shodné. Výrazný rozdíl je však patrný u testu vazby na plazmatické proteiny, jehož výsledky jsou uvedeny níže.

Aby bylo možné značené peptidy používat jako radiofarmaka pro zobrazování nádorů prostřednictvím PET a tedy aby je bylo možné podat pacientovi, je nutné otestovat jejich stabilitu v různých podmínkách, které jsou v lidském těle běžné.

Je velmi důležité, aby byly značené peptidy, potencionální diagnostická radiofarmaka, stabilní v lidské plazmě. Tři zkoumané peptidy byly tedy inkubovány v časech 0, 30, 60 a 120 minut v lidské plazmě pro prověření jejich stability. NODAGA-RGD trifluoroacetát i DOTA-cyklo-RGDfK acetát měli ve všech testovaných časech radiochemickou čistotu >95%. NODAGA-RGD dimer acetát měl čistotu >95% při inkubaci 0, 30 a 60 minut. Při délce inkubace 120 minut, byla radiochemická čistota <95%. NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát jsou tedy velmi stabilní v plazmě, stabilita NODAGA-RGD dimer acetátu je vysoká pouze hodinu, po dvou hodinách v plazmě jeho stabilita klesá (Graf 5).

V roztoku FeCl_3 (0,1 mol/l), tedy v prostředí kationtu kovu, který by potencionálně mohl odsunout radionuklid z vazby na chelátor (Pruszynski et al, 2012), vykazovaly peptidy vysokou stabilitu. Radiochemická čistota všech tří značených peptidů byla velmi vysoká, ve všech třech inkubačních časech byla >98% (Graf 6), k transmetalaci tedy nedošlo.

Značení galliem-68 se běžně provádí při pH 2-4, krev má však pH mnohem vyšší, konkrétně 7,4. Z toho důvodu byla testována stabilita označených peptidů v prostředí s pH 7. Radiochemická čistota byla opět velmi vysoká (Graf 7), u všech tří peptidů byla >98%. Značené peptidy jsou tedy i v prostředí se zvýšeným pH (7,0) stabilní.

V prostředí konkurenčního chelátoru, konkrétně diethylenetriaminpentaoctové kyseliny (DTPA), byla testována schopnost značených peptidů udržet navázané gallium-68, jakožto radioaktivní kov. Jak je patrné z výsledků (Graf 8) stabilita všech peptidů byla velmi vysoká. Analýza radiochemické čistoty na HPLC ukázala, že všechny tři zkoumané peptidy jsou velmi stabilní i v přítomnosti chelátoru, jelikož hodnoty čistoty překračovaly 98%.

Výsledky stability v lidské plazmě, v prostředí konkurenčního chelátoru, konkurenčního kationtu a zvýšeného pH zkoumaných galliem-68 značených RGD peptidů se shodují s výsledky uvedenými v bakalářské práci Jany Štěpánkové z roku 2015 a výsledky z odborné publikace C. Decristofora a jeho kolegů (Decristoforo et al., 2008).

Na plazmatické proteiny se značené peptidy příliš nevázaly (Graf 9). NODAGA-RGD dimer acetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát měly po 120 minutové inkubaci vyšší procento vazby než NODAGA-RGD trifluoroacetát, hodnoty však nepřekračovaly 6%. Nejmenší vazbou na proteiny se vyznačoval NODAGA-RGD trifluoroacetát, vazba peptidu na plazmatické proteiny po 120 minutách ještě poklesla z původních $2,90 \pm 0,0044\%$ na $2,88 \pm 0,0073\%$.

DOTA-cyklo-RGDfK acetát by měl vykazovat vyšší afinitu k plazmatickým proteinům, což sice oproti NODAGA-RGD trifluoroacetátu vykazoval, ale v porovnání s výsledky testů uvedených v publikaci profesora Decristofora, (Decristoforo et al., 2008) jsou hodnoty velmi nízké. Po 30ti minutách inkubace v lidské plazmě dosahovala vazba na plazmatické proteiny 10%, po 180 minutách dokonce 23%, v našem případě to bylo po 30 minutách pouze 3,47% a po 120 minutách 5,94%.

Rozdělovací koeficient ($\log P$) všech tří peptidů byl <1 (Tabulka 8), což vypovídá o hydrofilitě peptidů.

Nádorová angiogeneze je velmi důležitým procesem pro výživu, růst nádoru a metastázování, bez angiogeneze není nádor schopen překročit velikost 1-2 mm (Liu et al., 2008; Carmeliet and Jain, 2000; Sharma et al., 2001). Při angiogenezi dochází na povrchu aktivovaných endoteliálních buněk a v nově vznikajících cévách k vysoké expresi integrinů, z nichž nejdůležitějším je integrin $\alpha_v\beta_3$ (Brooks et al., 1994; Kumar, 2003). Jak už bylo řečeno, k $\alpha_v\beta_3$ integrinům vykazuje vysokou afinitu tripeptidové sekvence RGD. Ve své bakalářské práci jsem se též zabývala akumulací tří značených RGD peptidů v $\alpha_v\beta_3$ integriny exprimujících nádorových buňkách U87 MG.

Buněčná linie U87 MG je velmi dobře popsána a je běžně užívána pro studium mozkových nádorů IV. třídy (Clark et al., 2010). Využívá se především pro studium angiogeneze a antiangiogenní léčby díky vysoké expresi integrinu $\alpha_v\beta_3$ na povrchu nádorových buněk. Dr. Zhang a jeho kolegové porovnávali počet integrinových receptorů $\alpha_v\beta_3$ na povrchu buněk 6ti buněčných linií (U87 MG, MDA-MB-435, C6, PC-3, NCI-H1975, a A549) *in vitro* a množství integrinů $\alpha_v\beta_3$ v korespondující nádorové tkáni. V obou případech dosahovala nejvyšších hodnot buněčná linie U87 MG. Počet integrinů $\alpha_v\beta_3$ na buňku *in vitro* byl $(1,28 \pm 0,46) \times 10^5$ (Zhang et al., 2006). Míra exprese integrinu $\alpha_v\beta_3$ je u vývojově nižších nádorů menší než u vyšších, koreluje tedy s malignitou nádoru (Liu, 2015). V mnohých studiích je používána buněčná linie M21 (lidský melanom) jako pozitivní kontrola, díky své vysoké expresi integrinu $\alpha_v\beta_3$ (Schnell, et al., 2008).

Byly provedeny *in vitro* testy akumulční schopnosti tří peptidů na RGD saturevaných a nesaturevaných buňkách U87 MG. Nejvyšší akumulční schopnost vykazoval peptid NODAGA-RGD dimer acetát, což odpovídá předpokladům. Dle provedených studií bylo zjištěno, že zvyšující se multiplicita peptidů má za následek i zvyšující se afinitu k receptorům na povrchu nádorové buňky (Liu, 2009). NODAGA-RGD trifluoroacetát a DOTA-cyklo-RGDfK acetát jsou monomery, tedy obsahují pouze jednu sekvenci RGD, očekávalo se tedy, že jejich akumulace bude o něco nižší, což se i potvrdilo. Dle provedených studií nebyl výrazný rozdíl v akumulaci mezi NODAGA-RGD trifluoroacetátem a DOTA-cyklo-RGDfK acetátem zjištěn, jelikož nahrazení chelátoru DOTA- za NODAGA- nemá žádný vliv na afinitu nebo specifitu vlastního peptidu (Dijkgraaf et al., 2013; Oxboel et al., 2014). NODAGA-RGD trifluoroacetát a NODAGA-RGD dimer acetát se však od DOTA-cyklo-RGDfK acetátu liší také aminokyselinovou sekvencí. DOTA-cyklo-RGDfK acetát má ve své struktuře fenylalanin namísto tyrosinu, který obsahují oba NODAGA-RGD peptidy. Fenylalanin negativně ovlivňuje farmakokinetiku radioaktivně značeného peptidu a zapříčiňuje jeho hromadění v játrech (Domnanich et al., 2016).

Akumulační *in vitro* testy RGD peptidů neproběhly podle našeho očekávání. Předpokládalo se, že nanesením neznačeného peptidu na buňky dojde k jeho navázání na $\alpha_v\beta_3$ integriny a na takto saturevané buňky poté nebudou moci navázat galliem-68 značené analogy, což se projeví jejich sníženou akumulací. Po nanesení nadbytku neznačeného RGD peptidu a následné inkubaci (90 minut) však došlo k odloučení buněk ode dna kultivační jamky u všech tří zkoumaných peptidů, což

pravděpodobně svědčí o toxickém působení použité koncentrace peptidů. Koncentrace neznačených peptidů (18 – 25,7 μM) aplikovaná na buňky byla 100x vyšší než koncentrace značených peptidů následně aplikovaná na inkubované buňky. V publikaci Dr. Knetsche a jeho kolegů však uvádějí použití koncentrace neznačeného peptidu prakticky totožnou (22 μM), která je v jejich studii ovšem 1000x vyšší než koncentrace peptidu značeného (22 nM) při použití M21 buněčné linie. Akumulaci [^{68}Ga]FSC-(RGD)₃ uvádějí $5.3 \pm 0.5\%$ u nesaturovaných buněk, řádově jsou tedy tato data v souladu s našimi výsledky. Akumulace [^{68}Ga]FSC-(RGD)₃ u buněk inhibovaných c(RGDyV) peptidem nedosahuje ani 0,5%. O toxickém účinku RGD peptidu se však nezmiňují (Knetsch et al., 2015). Směrodatná odchylka nebyla vložena do grafu (Graf 10), z důvodu velmi vysokých hodnot, které byly zapříčiněny odstraněním naprosté většiny buněk během odstranění kultivačního pufru a následného oplachu PBS. Díky toho byly hodnoty proteinu na jamku extrémně nízké až na hranici měřitelnosti, což vedlo k velmi nesourodým výsledkům.

Řešením problému s nízkou adhezí buněk by mohla být úprava použité koncentrace neznačeného peptidu nebo přidání látky zvyšující adhezi buněk U87 MG ke dnu jamky (tzv. coating), popřípadě použití jiné buněčné linie či použití suspenzí modifikace buněčného modelu.

6 Závěr

Tato práce je zaměřená na testování stability a akumulace galliem-68 značeného NODAGA-RGD dimer acetátu, NODAGA-RGD trifluoroacetátu a DOTA-cyklo-RGDfK acetátu, jakožto potencionálních radiofarmak pro diagnostiku multifornního glioblastomu (GBM).

Po stanovení vhodných podmínek značení pro jednotlivé RGD peptidy, byly provedeny stabilitní testy, které jsou nezbytnou součástí testování radiofarmak, jež by mohla mít potencionální využití v klinické medicíně. Stabilita všech tří značených peptidů byla ve všech provedených testech velmi uspokojivá. Nejstabilnější se však jevil galliem-68 značený NODAGA-RGD trifluoroacetát, jehož radiochemická čistota ve všech stabilitních testech přesahovala 98% a vykazoval malou vazbu na plazmatické proteiny. V případě [⁶⁸Ga]DOTA-RGD peptidu byla vazba na plazmatické proteiny také nízká, což ale v tomto případě příliš nekoreluje s výsledky uvedenými v publikacích.

Dalším důležitým faktorem, který musí značený RGD peptid splňovat, je dostatečná vazba na cílové transmembránové receptory – integriny $\alpha_v\beta_3$. Byla tedy zkoumána akumulační schopnost značených peptidů v *in vitro* buněčném modelu glioblastomu. Nejvyšší procento akumulace vykazoval NODAGA-RGD dimer acetát. Důvodem je přítomnost dvou RGD sekvencí ve struktuře peptidu a tedy i dvě vazebná místa pro $\alpha_v\beta_3$ integriny.

Inhibiční testy akumulace nedopadly podle očekávání, jelikož došlo k odloučení buněk ze dna jamky po aplikaci neoznačeného peptidu a to u všech tří testovaných peptidů. Příčina bude pravděpodobně ve vysoké koncentraci aplikovaného neoznačeného RGD peptidu, ačkoliv jsem nenalezla publikace, které by toto tvrzení potvrdily. Konfluence použitých buněk dosahovala uspokojivých hodnot (cca 80%), neměla by tedy mít negativní vliv na buňky a jejich adhezi k podkladu.

Galliem-68 značené RGD peptidy mají velký potenciál stát se klinicky užívanými diagnostickými radiofarmaky. Předností v této aplikaci je jistě i krátký poločas přeměny gallia-68. Vědci se také snaží o optimalizaci struktury RGD peptidů pro dosažení co nejvýhodnějších vlastností. Aby bylo možné spekulovat o případném použití v této práci zkoumaných RGD peptidů v klinické praxi, je nutné vyřešit problém s nízkou adhezí buněk po aplikaci neoznačeného RGD peptidu, popřípadě

vylepšit akumulční schopnosti RGD-peptidů. Také by bylo nutné provést biodistribuční experimenty na myších modelech a další nezbytné studie.

Použitá literatura

- ANGER, Hal O.; GOTTSCHALK, Alexander. Localization of brain tumors with the positron scintillation camera. *Journal of Nuclear Medicine (US)*, 1963, 4.
- ATCC. U-87 MG. ATCC. [Online] 2014. [Citace: 20. března 2016] Dostupné na URL: <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/5037A09C51B742988E2534FBEA5E9C60.ashx>
- AVRAAMIDES, Christie J.; GARMY-SUSINI, Barbara; VARNER, Judith A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8.8: 604-617.
- BANERJEE, Sangeeta Ray; POMPER, Martin G. Clinical applications of gallium-68. *Applied Radiation and Isotopes*, 2013, 76: 2-13.
- BARCZYK, Malgorzata; CARRACEDO, Sergio; GULLBERG, Donald. Integrins. *Cell and tissue research*, 2010, 339.1: 269-280.
- BATCHELOR, Tracy T., et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer cell*, 2007, 11.1: 83-95.
- BATCHELOR, Tracy T., et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, JCO. 2009.26. 3988.
- BELLIS, Susan L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 2011, 32.18: 4205-4210.
- BEYER, Thomas, et al. The future of hybrid imaging—part 2: PET/CT. *Insights into imaging*, 2011, 2.3: 225-234.
- BOCKISCH, Andreas, et al. Hybrid imaging by SPECT/CT and PET/CT: proven outcomes in cancer imaging. In: *Seminars in nuclear medicine*. WB Saunders, 2009. p. 276-289.
- BROOKS, Peter C.; CLARK, R. A.; CHERESH, David A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 1994, 264.5158: 569-571.
- CANDOLFI, Marianela, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology*, 2007, 85.2: 133-148.
- CARMELIET, Peter; JAIN, Rakesh K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature*, 2000, 407.6801: 249-257.

- CLARK, Michael James, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet*, 2010, 6.1: e1000832.
- CLARKE, Eric T.; MARTELL, Arthur E. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13-and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorganica Chimica Acta*, 1991, 190.1: 37-46.
- DECRISTOFORO, Clemens; GONZALEZ, Ignacio H.; CARLSEN, Janette; RUPPRICH, Marco; HUISMAN, Marc; VIRGOLINI, Irene; WESTER Hans-Jürgen; HAUBNER, Roland. 68Ga-and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of $\alpha\beta 3$ integrin expression. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2008, 35.8: 1507-1515.
- DE VRIES, Nienke A.; BEIJNEN, Jos H.; VAN TELLINGEN, Olaf. High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing. *Cancer treatment reviews*, 2009, 35.8: 714-723.
- DIJKGRAAF, Ingrid, et al. Imaging integrin alpha-v-beta-3 expression in tumors with an 18F-labeled dimeric RGD peptide. *Contrast media & molecular imaging*, 2013, 8.3: 238-245.
- DOMNANICH, Katharina A., et al. 44Sc for labeling of DOTA-and NODAGA-functionalized peptides: preclinical in vitro and in vivo investigations. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 2016, 1.1: 1-19.
- ENWEREM, Isioma; WANG, Jing; LESZCZYNSKI, Jerzy. In search of active RGD peptides: Theoretical study of hydrogen bonding in five-member ring Cyclic-RGD isomers. *Computational and Theoretical Chemistry*, 2012, 998: 141-147.
- FROCHOT, Céline, et al. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorganic chemistry*, 2007, 35.3: 205-220.
- FANI, Melpomeni; MAECKE, Helmut R. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2012, 39.1: 11-30.
- FRIEDMAN, Henry S., et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27.28: 4733-4740.
- GAERTNER, F. C., et al. Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2012, 39.1: 126-138.

- GIJS, Marlies, et al. Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. *Nuclear medicine and biology*, 2015.
- HAUBNER, Roland; MASCHAUER, Simone; PRANTE, Olaf. PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. *BioMed research international*, 2014.
- HAUTANEN, Aarno, et al. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264.3: 1437-1442.
- HERMANN, P., et al. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *The Journal of cell biology*, 1999, 144.4: 767-775.
- HOUCHENS, David P., et al. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1983, 19.6: 799-805.
- HYNES, Richard O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110.6: 673-687.
- CHEN, Haojun, et al. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha\beta 3$. *Theranostics*, 2016, 6.1: 78.
- ISHII, Nobuaki, et al. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain pathology*, 1999, 9.3: 469-479.
- JACOBS, Valerie L., et al. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN neuro*, 2011, 3.3: AN20110014.
- KANZAWA, T., et al. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *British journal of cancer*, 2003, 89.5: 922-929.
- KLENER, Pavel. Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia*, 2002a, 12.1: 2-8.
- KLENER, Pavel. *Klinická onkologie*. Galén, 2002b.
- KNETSCH, Peter A., et al. [^{68}Ga] FSC-(RGD) 3 a trimeric RGD peptide for imaging $\alpha v \beta 3$ integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold—synthesis and evaluation. *Nuclear medicine and biology*, 2015, 42.2: 115-122.

- KOUL, Dimpy, et al. Inhibition of Akt survival pathway by a small-molecule inhibitor in human glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics*, 2006, 5.3: 637-644.
- KREISL, Teri N., et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27.5: 740-745.
- KUMAR, C. Integrin $\alpha\beta3$ as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Current drug targets*, 2003, 4.2: 123-131.
- LANG, Frederick F., et al. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *Journal of neurosurgery*, 1994, 81.3: 427-436.
- LIU, Shuang. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 2004, 33.7: 445-461.
- LIU, Shuang. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha\beta3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjugate chemistry*, 2009, 20.12: 2199-2213.
- LIU, Shuang. Radiolabeled cyclic RGD peptide bioconjugates as radiotracers targeting multiple integrins. *Bioconjugate chemistry*, 2015, 26.8: 1413-1438.
- LIU, Zhaofei; WANG, Fan; CHEN, Xiaoyuan. Integrin $\alpha\beta3$ -targeted cancer therapy. *Drug development research*, 2008, 69.6: 329-339.
- LONSDALE, Markus Nowak; BEYER, Thomas. Dual-modality PET/CT instrumentation—today and tomorrow. *European journal of radiology*, 2010, 73.3: 452-460.
- LUKEŠOVÁ, Š., et al. Nádorová angiogeneze. *Vnitř Lék*, 2006, 52.s 797.
- M – The Explorer Magazine. A possible therapy for glioblastomas: The end of communication and networking. *M – The Explorer Magazine*. [Online] 2011. [Citace: 20. března 2016] Dostupné na URL: http://www.magazine.emerck/en/innovation/brain_tumors/cilengitide1.html
- MANGIOLA, Annunziato, et al. Invasive tumor cells and prognosis in a selected population of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 2008, 113.4: 841-846.
- MENDEZ, Melissa G.; KOJIMA, Shin-Ichiro; GOLDMAN, Robert D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*, 2010, 24.6: 1838-1851.

- MORTON, Christopher L.; HOUGHTON, Peter J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature protocols*, 2007, 2.2: 247-250.
- OXBOEL, Jytte, et al. Comparison of two new angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E [c (RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E [c (RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nuclear medicine and biology*, 2014, 41.3: 259-267.
- PIERSCHBACHER, Michael D.; RUOSLAHTI, Erkki. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1983, 309.5963: 30-33.
- PIERSCHBACHER, Michael D.; RUOSLAHTI, Erkki. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81.19: 5985-5988.
- PONTÉN, J. A. N.; MACINTYRE, ELIZABETH H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 1968, 74.4: 465-486.
- PONTÉN, Jan. Neoplastic human glia cells in culture. In: *Human tumor cells in vitro*. Springer US, 1975. p. 175-206.
- RADAELLI, E., et al. Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. 2009.
- RUOSLAHTI, Erkki. Integrins. *Journal of Clinical Investigation*, 1991, 87.1: 1.
- SELIGMAN, Arnold M.; SHEAR, M. J.; ALEXANDER, Leo. Studies in carcinogenesis: VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. *The American Journal of Cancer*, 1939, 37.3: 364-395.
- SHARMA, Ricky A., et al. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. *The lancet oncology*, 2001, 2.12: 726-732.
- SHI, Jiyun, et al. Evaluation of ^{111}In -labeled cyclic RGD peptides: effects of peptide and linker multiplicity on their tumor uptake, excretion kinetics and metabolic stability. *Theranostics*, 2011, 1: 322-340.
- SCHNELL, Oliver, et al. Expression of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathology*, 2008, 18.3: 378-386.

- SCHREIBER, Stefanie, et al. Bilateral posterior RION after concomitant radiochemotherapy with temozolomide in a patient with glioblastoma multiforme: a case report. *BMC cancer*, 2010, 10.1: 1.
- STYLLI, Stanley S., et al. Mouse models of glioma. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 2015, 22.4: 619-626.
- ŠTĚPÁNKOVÁ, Jana. *Preklinický vývoj ⁶⁸Ga značených peptidů pro zobrazování glioblastomu*. Olomouc, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- THAKKAR, Jigisha P., et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2014, 23.10: 1985-1996.
- TSO, Cho-Lea, et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer research*, 2006, 66.1: 159-167.
- URBANSKA, Kaja, et al. Review: Glioblastoma multiforme-an overview. *Współczesna Onkologia*, 2014, 18.5: 307.
- WADAS, Thaddeus J., et al. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chemical reviews*, 2010, 110.5: 2858-2902.
- WALSH et. al 2016 - Handbook of Clinical Neurology 2016, s. 2-446. Abstrakt
- WANG, Fen, et al. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.7: 13447-13462.
- WILSON, Taylor; KARAJANNIS, Matthias; HARTER, David. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical neurology international*, 2014, 5: 64.
- YOUNG, Richard M., et al. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*, 2015, 3.9.
- ZAIDI, Habib. *Monte Carlo Simulation Studies of Scatter Correction in Positron Emission Tomography*. 2000. PhD Thesis.
- ZHANG, Xianzhong, et al. Quantitative PET imaging of tumor integrin $\alpha\beta 3$ expression with ¹⁸F-FRGD2. *Journal of nuclear medicine*, 2006, 47.1: 113-121.

Seznam obrázků

Obrázek 1. Magnetická rezonance zobrazující multiforní glioblastom v pravém spánkovém laloku člověka (Schreiber et al., 2010).

Obrázek 2. Tři základní dráhy ovlivňující tvorbu gliomů (Stylli et al., 2015).

Obrázek 3. Transaxiální řez lidského mozku a jeho vyobrazení pomocí zobrazovacích technik. (Zaidi, 2000).

Obrázek 4. Fungování potencionálního antiangiogenního léčiva cilengitid.

Obrázek 5. Buněčná linie multiforního glioblastomu U87 MG izolovaná v roce 1966 J. Ponténem.

Obrázek 6. RGD peptid (arginin-glycin-aspartát) (Wang et al., 2013).

Obrázek 7. Struktura NODAGA-RGD dimeru (Oxboel et al., 2014).

Obrázek 8. Struktura NODAGA-RGD (Domnanich et al., 2016).

Obrázek 9. Struktura DOTA-cyklo-RGDfK (Domnanich et al., 2016).

Obrázek 10. Schéma průběhu angiogeneze a lymfangiogeneze u nádorů (Avraamides et al., 2008).

Obrázek 11. Znázornění možných kombinací α a β podjednotek, které vytváří 24 různých integrinů (Převzato a upraveno od Barczyk et al., 2010).

Obrázek 12. Schéma vyobrazující základní princip PET detekce (Wadas et al., 2010).

Seznam tabulek

Tabulka 1. Klinicky významné radionuklidy a jejich vlastnosti (Fani et al., 2012).

Tabulka 2. Složení mobilní fáze v závislosti na čase.

Tabulka 3. Přehled radioaktivity, množství použité směsi a koncentrace pro jednotlivé peptidy.

Tabulka 4. Stanovování nejvhodnějších podmínek pro následné testování (n=3).

Tabulka 5. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro NODAGA-RGD dimer acetát.

Tabulka 6. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro NODAGA-RGD trifluoroacetát.

Tabulka 7. Výsledky jednotlivých stabilitních testů pro DOTA-cyklo-RGDfK acetát.

Tabulka 8. Hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol/voda u jednotlivých peptidů (n=6).

Tabulka 9. Podíl akumulace značeného peptidu v buňkách U87 MG vyjádřený v procentech podané dávky na mg buněčného proteinu (n=4).

Seznam grafů

Graf 1. Kalibrační křivka použita pro výpočet koncentrace jednotlivých RGD peptidů a následný výpočet % akumulace v mg peptidu.

Graf 2. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro NODAGA-RGD dimer acetát pro následné testování (n=3).

Graf 3. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro NODAGA-RGD trifluoroacetát pro následné testování (n=3).

Graf 4. Stanovení nejvhodnějších podmínek pro DOTA-cyklo-RGDfK acetát pro následné testování (n=3).

Graf 5. Plazmatická stabilita jednotlivých zkoumaných peptidů, při délce inkubace 0, 30, 60 a 120 minut (n=3).

Graf 6. Stabilita značených peptidů v prostředí konkurenčního kationtu Fe^{3+} (0,1 mol/l roztok FeCl_3) při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).

Graf 7. Stabilita značených peptidů v prostředí zvýšeného pH (7,0), při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).

Graf 8. Stabilita značených peptidů v prostředí konkurenčního chelátoru (6 mmol/l DTPA), při délce inkubace 30, 60 a 120 minut (n=3).

Graf 9. Stanovení vazby na plazmatické proteiny. Jednotlivé peptidy byly inkubovány po dobu 0 a 120 minut (n=3).

Graf 10. Podíl akumulace značeného peptidu v buňkách U87 MG vyjádřený v procentech podané dávky na mg buněčného proteinu (n=4).