

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

KATEDRA JADERNÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studium účinku terapeutických radionuklidů v terapii onkologických onemocnění

Autor: Natálie Bublová

Vedoucí práce: Ing. Lukáš Ondrák

Konzultant specialista: Ing. Marie Davidková, CSc.

Praha, 2022

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Ing. Lukáše Ondráka, a že jsem použila pouze uvedenou literaturu.

V Praze dne

.....
Natálie Bublová

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Lukáši Ondrákovi za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a připomínky, které tuto práci obohatily a pomohly mi při jejím psaním.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Davídkové, CSc. a celému kolektivu Oddělení dozimetrie záření, Ústavu jaderné fyziky AV ČR, v.v.i. za poskytnutí nádorových buněk, zázemí a pomoci při práci s nádorovými buněčnými liniemi. V neposlední řadě děkuji RNDr. Martinu Vlkovi, Ph.D. z KNME FN Motol za poskytnutí ^{177}Lu a projektu ELECTTRA a jejím řešitelům za poskytnutí ^{161}Tb .

Název práce: **Studium účinku terapeutických radionuklidů v terapii onkologických onemocnění**

Autor: Natálie Bublová

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Lukáš Ondrák

Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská,
České vysoké učení technické v Praze

Konzultant specialista: Ing. Marie Davidková, CSc.

Oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky, Akademie věd
ČR, v.v.i.

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývá srovnáním terapeutického účinku ^{161}Tb a ^{177}Lu při ozařování buněk lidského maligního multiformního glioblastomu U251. Rešeršní část této bakalářské práce je zaměřena na nukleární medicínu a radionuklidy používané k diagnostice nádorů. Dále je diskutována terapie v nukleární medicíně, především cílená alfa částicová terapie, beta terapie a terapie Augerovými elektrony a s tím související radionuklidy používané v terapii jako jsou ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{131}I , ^{90}Y a ^{153}Sm . Rešeršní část je také zaměřena na biologické účinky ionizujícího záření vedoucí k buněčné smrti. Blíže je provedena rešerše radionuklidů ^{161}Tb a ^{177}Lu , jejichž terapeutický účinek byl experimentálně podložen ozařováním buněčné linie U251. Pro tuto experimentální část byla aplikována objemová aktivita 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 a 800 kBq/ml jak pro ^{161}Tb , tak ^{177}Lu . Výsledkem těchto experimentů je křivka buněčného přežití porovnávající účinek těchto radionuklidů v závislosti na dávce. Experimentální data přinesla srovnatelné terapeutické účinky ^{161}Tb s ^{177}Lu při vyšších dávkách od 2 Gy.

Klíčová slova: nukleární medicína; terapie; Terbium-161; Lutecium-177; nádorová buňka; terapeutické radionuklidy; glioblastom; buněčná smrt

Title: **Study of the therapeutic radionuclides impact in the therapy of oncological diseases**

Author: Natálie Bublová

Field of study: Nuclear Chemistry

Type of thesis: Bachelor thesis

Supervisor: Ing. Lukáš Ondrák

Department of Nuclear Chemistry, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University in Prague

Consultant specialist: Ing. Marie Davidková, CSc.

Department of Radiation Dosimetry, Nuclear Physics Institute CAS

Abstract: This bachelor thesis is based on a comparison of the effects of ^{161}Tb and ^{177}Lu on a human multiform malign glioblastoma cell line U251. The research part of this bachelor thesis is focused on a nuclear medicine and radionuclides used for tumour diagnostics. Therapy in nuclear medicine is further discussed, especially targeted alpha particle therapy, beta therapy and Auger electron therapy and related radionuclides used in therapy such as ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{131}I , ^{90}Y and ^{153}Sm . The research part is also focused on the biological effects of ionizing radiation leading to cell death. In more detail are researched radionuclides ^{161}Tb and ^{177}Lu , of which the therapeutic effect was experimentally substantiated by irradiation of the U251 cell line. Irradiation on the cell line was performed with volume activity 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 and 800 kBq/ml for both ^{161}Tb and ^{177}Lu . The results of these experiments are cell survival curves comparing the effect of these radionuclides in a dose-dependent manner. Experimental data yielded comparable therapeutic effects of ^{161}Tb with ^{177}Lu at higher doses from 2 Gy.

Key words: nuclear medicine; therapy; Terbium-161; Lutetium-177; tumor cell; therapy radionuclides; glioblastoma; cell death

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	NUKLEÁRNÍ MEDICÍNA	11
2.1.1	IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ V MEDICÍNĚ	13
2.1.2	DIAGNOSTIKA	15
2.1.3	TERAPIE	21
2.2	LUTECIUM-177	28
2.3	TERBIUM-161	31
2.4	BUNĚČNÁ SMRT	33
2.4.1	BIOLOGICKÉ ÚČINKY ZÁŘENÍ	35
2.5	GLIOBLASTOMY	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	MATERIÁLY A METODY	38
3.1.1	KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE U251	38
3.1.2	OZAŘOVÁNÍ POMOCÍ ^{60}Co	39
3.1.3	OZAŘOVÁNÍ POMOCÍ ^{161}Tb A ^{177}Lu	41
3.2	ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5	ZÁVĚR	49
6	SEZNAM LITERATURY	51

Seznam použitých zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
CT	Výpočetní tomografie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOPA	Dihydroxy-fenylalanin
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTA-GA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan,1-(glutarová kyselina)-4,7,10-trioctová kyselina
DOTA-NOC	DOTA-1-NaI ₃ -oktreotid
DOTA-TATE	DOTA-Tyr ₃ -oktreotid
DOTA-TOC	DOTA-Phe-Tyr-oktreotid
DTPA	Diethylentriamin pentaacetát
EC	Elektronový záchyt
ECD	Ethylcystein dimer
EDTMP	Ethylendiamin tetra(methylenfosfonová) kyselina
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FDG	Fluordeoxyglukóza
FET	Fluorethyl-tyrosine
GBM	Glioblastoma multiforme (Multiformní glioblastom)
GEP-NET	Neuroendokrinní tumory gastroenteropankreatického původu
HER2	Humánní epidermální receptor 2
HIBA	Kyselina α -hydroxymáselná

IP	Izomerní přechod
LET	Lineární přenos energie
mCRPC	Metastatický kastračně rezistentní karcinom prostaty
MET	Methionin
MIBI	Methoxyisobutylisonitril
MRI	Magnetická rezonance
MT	Methyl-tyrosine
NET	Neuroendokrinní tumory
NMT	Nuclear medicine technique (Diagnostika v nukleární medicíně)
PET	Pozitronová emisní tomografie
PSMA	Prostatický specifický membránový antigen
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie
TAT	Targeted alfa particle therapy (Cílená alfa částicová terapie)
ZN	Zhoubný novotvar

1 Úvod

Nukleární medicína se dostává do popředí díky každoročnímu nárůstu výskytu nádorových onemocnění. Právě onkologická nádorová onemocnění obsazují první místa hlavních příčin smrti osob ve věku pod 70 let ve více než polovině zemí světa. Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) patří v mezinárodním srovnání Česká republika v incidenci zhoubných nádorů (ZN) v Evropě na 16.-17. místo. U řady rakovin ale obsazuje Česká republika první příčky mezi evropskými zeměmi. Příkladem může být 2. místo u ZN ledvin, 3. místo u ZN slinivky břišní a 8. místo u ZN prostaty^[1].

Incidence onkologických onemocnění v ČR vykazuje v posledních letech rostoucí trend. Podle dostupných dat ÚZIS z roku 2018 bylo nově diagnostikováno 87 361 ZN, což odpovídá incidenci 822,1 na 100 000 osob. Pozitivnější statistiku přináší mortalita, kdy počet zemřelých oproti minulým letům klesá. Na 100 000 osob zemřelo v roce 2018 v ČR na ZN 260,7 pacientů, což celkově dává 27 699 osob. Z dlouhodobého hlediska jsou ZN druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR po kardiovaskulárních onemocnění. Mezi nejrozšířenější druhy rakoviny v ČR v roce 2018 patřily ZN tlustého střeva a konečníku, ZN prostaty, ZN prsu u žen a ZN průdušnice, průdušky a plic. Dohromady tvoří všechny tyto rakoviny 49,0 % všech diagnostikovaných ZN. Číselně se jedná o 7 700 rakoviny tlustého střeva, 7 500 rakoviny prostaty, 7 200 rakoviny prsu u žen 6 600 onemocnění ZN průdušnice, průdušky a plic. Nejčastějším ZN v roce 2018 u mužů byla rakovina prostaty, která tvořila čtvrtinu všech nově diagnostikovaných ZN u mužů. Incidence tedy odpovídá 151,8 na 100 000 mužů. Na rakovinu prostaty zemřelo v roce 2018 v ČR 1 372 mužů a jedná se tak o třetí nejčastější příčinu smrti v rámci onkologických onemocnění tohoto pohlaví. U ženského pohlaví byla v roce 2018 nejčastější diagnostika rakoviny prsu. Toto onemocnění představovalo u žen 26,5 % všech nově diagnostikovaných ZN a incidence tedy byla 133,1 na 100 000 žen. Rakovina prsu byla v roce 2018 2. nejčastější příčinou smrti v rámci onkologických onemocnění u žen. Zemřelo na ni 1 621 žen^{[1],[2]}.

Co se týče celosvětové statistiky dostupné z roku 2018, tak nově diagnostikováno bylo 18,1 milionu případů ZN, kdy více než polovina pacientů v důsledku toho zemřela. Incidence všech typů zhoubných nádorů byla přibližně o 20 % vyšší u mužů než u žen. První tři příčky nejčastějších ZN vyskytujících ve světě obsazuje rakovina plic, rakovina prsu u žen a kolorektální karcinom. Karcinom plic je diagnostikován v 11,6 % případů celkového počtu nově diagnostikovaných ZN a je i nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění

(18,4 % z celkového počtu úmrtí na rakovinu). Druhá rakovina prsu u žen je diagnostikována také v 11,6 % případů, ale z hlediska mortality se nachází na 5. místě (6,6 % z celkového počtu úmrtí na rakovinu). Z hlediska incidence následuje karcinom prostaty u mužů (7,1 %) a kolorektální karcinom (6,1 %). Rakovina tlustého střeva je ovšem druhou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění s 9,2 % z celkového počtu úmrtí na onkologická onemocnění^{[2],[3]}.

Z pohledu rozšíření rakoviny ve světě vede Asie, kde byla diagnostikována polovina všech ZN, téměř čtvrtina poté v Evropě a více než pětina všech nově diagnostikovaných ZN byla zjištěna na americkém kontinentě^[3].

S ohledem na uvedené statistiky vyplývá, že každoročně narůstá i počet pacientů nukleární medicíny, kteří jsou odkázáni na kurativní léčbu a paliativní léčbu, jejímž cílem je především zmírnění příznaků nemoci a zvyšování kvality života pacientů. Oba případy jsou spojeny s nutností vývinu a vývoje dalších radiofarmak pro diagnostické a terapeutické účely. V posledních letech přibývá ke klasické beta terapii a cílené částicové alfa terapii také léčba pomocí Augerových zářičů.

V souvislosti výzkumu nových terapeutických radionuklidů je cílem předkládané bakalářské práce provést srovnání terapeutického účinku radionuklidu ^{161}Tb s ^{177}Lu , které je v nukleární medicíně již komerčně využíváno k léčbě ve formě ^{177}Lu -DOTA-Tyr₃-oktreotidu pod názvem Lutathera. Terbium-161 by mohlo díky svým analogickým fyzikálním a chemickým vlastnostem v budoucnu figurovat v klinické praxi vedle ^{177}Lu . Zároveň kromě vhodné energie beta přeměny je ^{161}Tb i Augerovským zářičem, což otevírá novou možnost terapie v nukleární medicíně s pomocí těchto zářičů.

2 Teoretická část

2.1 Nukleární medicína

Nukleární medicína je již velmi dobře etablovaný lékařský obor využívající k diagnostice a terapii aplikaci radiofarmak pacientovi. Radiofarmakum je léčivý přípravek, jehož účinnou složkou je radionuklid^[1]. Radionuklidy rozdělujeme podle emitovaného záření na α a β zářiče. Tato charakteristika hraje stěžejní roli při rozdělení diagnostické i terapeutické části nukleární medicíny. Princip zobrazování v nukleární medicíně je založen na detekci emitovaného záření z podaného radiofarmaka pomocí scintilační gama kamery, v případě emise fotonů emitovaných při IP, a pomocí PET kamery v případě detekce β^+ záření. Detegované signály jsou zpracovány zobrazovacími metodami, které dělíme podle používaného radionuklidu na PET a SPECT. Výpočetní metoda zajistí převedení signálu do podoby obrazové informace, které slouží dalším lékařským postupům^[5]. Terapeutické metody nukleární medicíny nacházejí rozdělení, stejně jako v případě diagnostiky, podle druhu emitovaného záření použitých radionuklidů. Konvenční léčba využívá účinků β^- zářičů, ale v posledních letech nabývá na zájmu i cílená alfa terapie (TAT) a terapie s využitím zářičů Augerovských elektronů.

Za zakladatele nukleární medicíny je považován maďarský radiochemik George de Hevesy, který se s příchodem antropogenních radionuklidů začal zabývat značením chemických látek radionuklidy, za což dostal i v roce 1943 Nobelovu cenu za chemii. Možnost využití indikace látek značených radionuklidy brzo přenesl do biologických procesů. Díky trasování biologických pochodů pomocí radionuklidu ^{32}P odhalil v té době neznámé informace o metabolismu růstu kostí^[6].

S objevem cyklotronu (E. Lawrence) a řetězových štěpných reakcí (E. Fermi) v 30., resp. 50., letech 20. století došlo k nárůstu produkce radionuklidů pro lékařské využití, v té době hlavně ^{32}P , ^{24}Na a ^{131}I . Důsledkem toho musely být zlepšovány i metody detekce radionuklidů, kdy přes Geiger-Müllerovy počítače a první scintilační detektory se dostáváme k moderním hybridním gama kamerám umožňujících kombinaci metod SPECT/CT diagnostiky nebo PET/CT či PET/MRI diagnostiky^[6].

Záření emitované radionuklidem obsaženého v radiofarmaku má podle druhu záření různá využití, především ale k diagnostickým účelům jako je zobrazení tkání, metabolismu buněk nebo funkce orgánů, méně potom k samotné terapii. Odhaduje se, že pouze 5 % radiofarmak je používáno právě pro terapeutické účely^[23]. Pojem teranostika poté zahrnuje

spojení diagnostiky a současně terapie onemocnění s využitím vhodných radionuklidů a v poslední době je možné se s ním často setkat právě při diskuzi využití nukleární medicíny^[7]. Důležitými parametry používaných radionuklidů jsou především jejich poločas přeměny, druh a energie záření^[8].

Dalším význačným aspektem radiofarmak je jejich léková forma. Nejčastější je parenterální forma, která je vhodná k intravenózní aplikaci, a to v podobě roztoků, disperzí a suspenzí. Dále je rozšířená perorální forma (roztoky, tobolky), inhalační forma (např. plynů ^{81m}Kr) a dnes již v praxi nepoužívaná folie s ^{32}P pro lokální léčbu (tedy topická forma radiofarmak)^{[9],[13]}.

Důležitou částí radiofarmaka je tzv. nosič (integrální část účinné látky), na který je radionuklid navázán. Právě tento nosič určuje biodistribuci radiofarmaka, tedy kde se radiofarmakum bude kumulovat a jak se bude v lidském organismu chovat^[8]. V případě diagnostiky nebo léčby nádorů bývá nosičem radionuklidu často například glukóza, protože je obecně známo, že nádorové buňky mají zvýšený metabolismus glukózy v porovnání s normálními buňkami. Další možností je značení nano, resp. mikročástic. Jejich hlavní výhodou je jejich velikost, která se pohybuje v rozmezí 1-1000 nm, resp. 1-1000 μm ^[10]. Předpokladem je účinnější a efektivnější doprava radionuklidu do cílové tkáně a omezení radiační zátěže okolních tkání, díky prostupu až do těsné blízkosti ohniska nádoru. Zajímavou možností je značení částic, které reagují na změnu teploty nebo pH prostředí, čímž dochází ke jejich konformačním změnám a uvolnění navázaného radionuklidu jako jsou např. lipozomy^[10]. Jako další nosiče jsou využívány komplexní sloučeniny, organické i anorganické sloučeniny, proteiny a krevní elementy, například ^{99m}Tc značené leukocyty, které snadno zobrazí rozsah a rozložení zánětu v tkáni^[11].

Jak pro diagnostické, tak terapeutické účely je třeba příprava radionuklidů s vysokou specifickou aktivitou. Jednou z takových možností příprav je ostřelování terčového jádra protony nebo jinými nabitými částicemi urychlenými v cyklotronu (např. příprava ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{111}In nebo ^{123}I)^[12]. Další možností přípravy medicínálních radionuklidů je jejich produkce v jaderném reaktoru (např. ^{123}I , ^{125}I , ^{51}Cr a ^{99}Mo). Krátkodobé radionuklidy (např. ^{99m}Tc) jsou získávány další cestou – pomocí radionuklidových generátorů, které fungují na principu trvalé nebo posuvné radioaktivní rovnováhy mezi mateřským a dceřiným radionuklidem (např. $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$, $^{81}\text{Rb} - ^{81m}\text{Kr}$, $^{68}\text{Ge} - ^{68}\text{Ga}$ generátory)^{[13],[14]}.

V neposlední řadě musí být při výrobě radiofarmak splněna jak kritéria pro běžné léčivé přípravky, tak navíc je nutné dbát zvláštních požadavků pro práci s radioaktivními látkami, se zdroji ionizujícího záření a sledovat aspekty radiochemické a radionuklidové čistoty, sterility a apyrogenity připravovaných radiofarmak^[14].

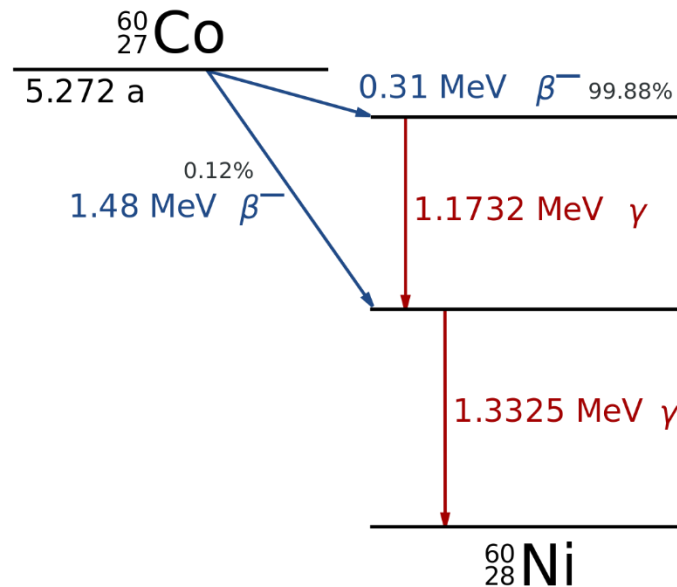
2.1.1 Ionizující záření v medicíně

Kromě využití emise záření z výše uvedených radiofarmak se také v nukleární medicíně uplatňují další zdroje ionizujícího záření. Mezi ně spadá hlavně fotonové záření z urychlovačů částic a z kobaltových a cesiových ozařovačů.

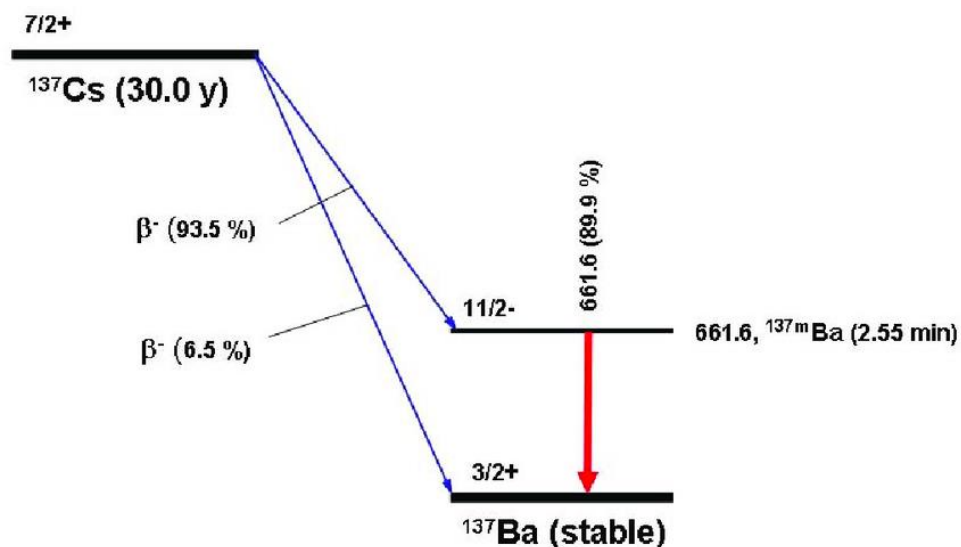
Existuje několik typů urychlovačů pro výrobu radionuklidů, ale všechny jsou založeny na stejném principu, urychlováním nabitých částic působením elektrického pole s případným ovlivněním dráhy nabitých částic vlivem magnetického pole. Pro přípravu radionuklidů pro radiofarmaka je nejrozšířenější urychlovač s cyklickou dráhou zvaný cyklotron, kdy se nabitě částice pohybují mezi dvěma polokruhovými dutými elektrodami (duanty) uloženými nejčastěji v konstantním magnetickém poli. Částice jsou urychlovány při průletu mezery mezi duanty, kdy se zvyšující se rychlostí se zvětšuje kruhová dráha částic, a tudíž jejich energie. Na podobném principu funguje betatron, kde elektrony urychlovány elektromagnetem dopadají na terčik z těžkého kovu, který je umístěn přímo v komoře^[15]. V současné době nabývají na popularitě lineární urychlovače. Nabitě částice jsou urychlovány elektrostatickým polem mezi vysokofrekvenčními elektrodami. Urychlená částice může být použita přímo k lékařskému zákroku nebo může být vedena na terč^{[15],[16]}.

Zdrojem gama záření v kobaltových ozařovačích je ^{60}Co , který emituje fotony o energiích 1,33 MeV a 1,17 MeV. Poločas přeměny je 5,27 roku, díky čemuž intenzita záření γ neklesá rapidně stejně jako u ^{137}Cs , který má poločas přeměny dokonce 30,08 roku. Cesium-137 je zdrojem fotonů v cesiových ozařovačích a emitované záření má energii 0,66 MeV. Přeměnové schéma ^{60}Co a ^{137}Cs uvádí Obr. 1 a Obr. 2. Jinou možností rozložení ^{60}Co je umístění 201 zdrojů ^{60}Co do polosférického prostoru, kdy energie jednotlivých svazků je malá a biologicky neškodná, zatímco dávka v ohnisku kolimovaných svazků je již schopná zneškodnit nádor. Tento přístroj se nazývá gama nůž a vykazuje vysokou přesnost cílení paprsků a zároveň snižuje radiační zátěž okolních tkání. Historie prvního konceptu gama nože se datuje do 60. let 20. století. S nápadem přišel švédský chirurg Lars Leksell, proto je přístroj někdy také označován jako Leksellův gama nůž. Právě díky jeho vysoké přesnosti kolimovaných paprsků bývá gama nůž využíván v radiochirurgii k léčbě nádorů a metastáz

v mozku. Metastáze v mozku doprovázejí většinu typů rakovin v 15 % až 40 % případů. Jejich léčba je ovšem velmi náročná a v případě chemoterapie často neúčinná. Řešením je využití Leksellova gama nože, kdy lze říct, že tento radiochirurgický zákrok je méně invazivní a rozhodně účinnější^{[17]-[19]}.



Obr. 1: Hladinové schéma ^{60}Co ^[20]



Obr. 2: Hladinové schéma ^{137}Cs ^[21]

Rovněž nelze opomenout konvenční rentgenové záření X využívané jak k zobrazování kostí, tak měkkých tkání. Rozdíl mezi zářením γ a zářením X je hlavně v jejich původu. Záření γ má původ v jádře, kdežto záření X vzniká v elektronovém obalu při přechodu elektronu z vyšší energetické hladiny na nižší nebo při zpomalení elektronu v látce^[22]. Zdrojem rentgenového záření je rentgenka, která se skládá z evakuované trubice,

ve které je žhavená katoda emitující elektrony dopadající na většinou wolframovou anodu. Energie uvolněná při dopadu elektronů je přeměněna v rentgenové záření, které je fokusováno z rentgenové lampy ve tvaru kužele. Záření je pohlceno nebo zeslabeno při průchodu tělem pacienta, přičemž vycházející záření je zachyceno detektory a zpracováno do vizuální podoby. Popsaná metoda zobrazování se nazývá skiografie. Metoda, při které je rentgenový záznam zpracováván kontinuálně a hodí se pro zobrazování např. orgánů v reálném čase se nazývá skioskopie. Pokročilejší zobrazovací technika zvaná výpočetní tomografie (CT) umožňuje rekonstruovat pomocí rentgenového záření snímky v různých vrstvách těla pacienta^[23].

2.1.2 Diagnostika

Diagnostika v nukleární medicíně (NMT) je založena na detekci emitovaného záření z radionuklidu podaného pacientovi formou radiofarmaka. Díky emisi vhodného záření lze v NMT diagnostikovat postižené místo nebo orgány často již na molekulární úrovni a zachytit tak i počátky nově vznikajících metastáz. Časté je propojení emisních diagnostických metod s MRI nebo CT (např. SPECT/CT) pro doplnění diagnostiky o morfologii tkání^[23].

Jak bylo již popsáno v kapitole 2.1, radiofarmakum se skládá z dvou hlavních komponent, a to z radionuklidu a z nosiče, kterým mohou být molekuly a biomolekuly nejrůznějších druhů. V případě diagnostických aplikací radiofarmak je detegováno záření gama emitované radionuklidem zabudovaným do radiofarmaka gama kamerami. Příkladem diagnostického gama zářiče může být ^{99m}Tc, které je používáno k diagnóze v 85 % a to i z důvodu, že splňuje níže uvedené vlastnosti, jako je vhodný poločas přeměny nebo energetický rozsah emitovaných γ paprsků. Pro terapeutické účely mohou být nosiče značeny α a β^- zářiči a v poslední době jsou ve výzkumu i emitory Augerových elektronů^[23].

Vhodný radionuklid pro diagnostické účely by měl splňovat následující předpoklady:

- snadná dostupnost,
- nízká cena,
- specifická aktivita,
- biokompatibilita,
- poločas přeměny delší než doba potřebná k přípravě materiálu pro značení a jeho distribuci,

- efektivní poločas přeměny delší než délka vyšetření a biodistribuce radiofarmaka,
- vhodné energetické rozpětí emitovaného záření a absence nebo nízká emise α či β částic,
- odpovídající chemická forma a reaktivita k tvorbě vazeb s nosičem^[25].

Efektivní poločas přeměny je stěžejní pro vyšetření a je specifický pro jednotlivá radiofarmaka. Efektivní poločas přeměny T_e je definován následujícím vztahem

$$T_e = \frac{T_f \cdot T_b}{T_f + T_b}, \quad (1)$$

kde T_b je biologický poločas přeměny, který odkazuje na čas potřebný k eliminaci právě poloviny množství podávané sloučeniny čistě na základě biologických procesů, tedy vyloučením z těla nejčastěji močí, potem atp. Symbolem T_f je značen fyzikální poločas přeměny příslušného radionuklidu. Efektivní poločas přeměny bude vždy kratší než T_f nebo T_b ^[25].

Nejužívanější zobrazovací zařízení v NMT jsou scintilační gama kamery. Pacient, kterému bylo podané radiofarmakum, je zdrojem fotonového záření. Emitované fotony jsou zachyceny gama kamerou a konvertovány do světelných pulsů následovaných napěťovými signály. K nejdůležitějším technickým součástkám gama kamery patří scintilační krystal, dále různé zesilovače signálu a kolimátory usměrňující záření emitované z pacienta. Scintilační krystal bývá nejčastěji z NaI dopovaného Tl. Kolimované γ záření interaguje s krystalem, ve kterém způsobuje fotoefekt, a to vyvolá záblesky fluorescence úměrné energii γ paprsků. Fotonásobiče zachycují světlo, které zesílí a konvertují do měřitelného elektrického signálu. Analyzátor výšky pulsu analyzuje elektrický signál, který je pak dále zpracováván počítači. Ty následně pomocí výpočetních metod a algoritmů rekonstruují signály do vizuální obrazové podoby. Alternativou k scintilačnímu krystalu je využití pevných polovodičových součástek, které přímo konvertují γ záření do elektrického signálu. Nevýhodou je ovšem nízká účinnost při vyšších energiích záření gama a jejich vysoká výrobní cena^{[25],[26]}.

2.1.2.1 SPECT

Jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) je diagnostická zobrazovací metoda v nukleární medicíně. Přístroj se skládá z gama kamery umístěné v rotačním portálu. Díky rotaci detekční hlavy gama kamery umožňuje SPECT rekonstruovat transverzální,

frontální i sagitální řezy a vytvořit tak trojrozměrný model postiženého orgánu nebo místa v těle, kde bylo vychytáno podané radiofarmakum. Spojením anatomicky a strukturně vysoce přesných metod CT a SPECT dostáváme hybridní zobrazovací metody. Výhodou SPECT/CT je větší anatomická přesnost obrazu díky CT a také lepší kvantifikace množství stopovače^{[25],[27]}.

Jako nejběžnější radionuklidy pro SPECT se používají ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I a ^{67}Ga , jejichž podrobná charakteristika je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Charakteristika radionuklidů používaných pro SPECT^{[23],[29]}

Radionuklid	Poločas přeměny [h]	Způsob přípravy	Energie gama záření [keV]	Pravděpodobnost emise γ [%]
^{111}In	67,31	Cyklotron	171 245	90,6 94
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,01	$^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátor	140	89
^{123}I	13,22	Cyklotron	159	83,3
^{67}Ga	78,24	Cyklotron	93	39

SPECT zobrazování má široké využití jak např. v preklinické tak v klinické aplikaci. Zobrazování SPECT v preklinické fázi je široce užívané pro studium dynamických biologických procesů na molekulární i buněčné úrovni. Tento postup přináší informace o efektivnosti léčby, o biologických účincích podávaných léků a také hraje klíčovou roli v implementaci studií modelovaných *in-vitro* do klinických stádií. Konkrétními příklady užití SPECT v preklinické fázi je zobrazování kmenových buněk pomocí ^{111}In -oxychinolinu, široce se k diagnostice kostních metastáz používá $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hydroxymethyldifosfonát. SPECT nachází aplikaci i v onemocněních centrálního nervového systému. Příkladem klinicky užívaného radiofarmaka je ^{123}I -ioflupan, pod obchodním názvem DaTSCAN, používaný např. k diagnóze Parkinsonovy choroby. Dalším příkladem je preklinické ověření toxických účinků apoptických buněk, ke kterému je používáno radiofarmakum $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin^{[27],[28],[30]}.

V klinické praxi hraje SPECT významnou roli např. v zobrazování mozku. SPECT např. umožňuje poskytnout nové informace o průběhu epilepsie. Při epileptickém záchvatu je zvýšená neuronová aktivita spojena se zvýšeným metabolismem a regionálním prokrvením mozku, jež je prostřednictvím radiofarmak měřeno. Pro toto vyšetření jsou

používána radiofarmaka ^{99m}Tc -hexamethylpropylenamin-oxim a ^{99m}Tc -ethylcystein dimer (^{99m}Tc -ECD)^{[31],[32]}.

Stopovače pro grading (stupeň diferencovatelnosti) a diagnózu mozkových nádorů vykazující vysokou afinitu k nádoru jsou ^{201}Tl , ^{99m}Tc -sestamibi (^{99m}Tc -MIBI), ^{99m}Tc -ECD, ^{99m}Tc -tetrafosmin, ^{123}I - α -methyl-tyrosine (^{123}I -MT) a ^{111}In -pentetreotid. Thallium-201 se chová jako analog draslíku a je aktivně transportován do buněk sodnodraselnou pumpou. Tato pumpa vyžaduje životaschopnost buněk k nashromáždění stopovače. Sorpce ^{201}Tl je nezávislá na hematoencefalické bariéře, ale pouze na rychlosti růstu buněk, čímž je výsledně specifická pro mozkové nádory. Thallium-201 se kumuluje v maligních buňkách bez významné afinity k zdravému mozkovému parenchymu. Aktivní difúzi k překonání hematoencefalické bariéry vykazuje také ^{99m}Tc -MIBI. Kumuluje se v mitochondriích a zviditelňuje perfuzi a buněčnou aktivitu. Navíc se nehromadí v nádorových buňkách, které nejsou schopny života. Další syntetický kationtový komplex, který vykazuje aktivní difúzi, je ^{99m}Tc -tetrafosmin. Kumulace je přímo úměrná lokálnímu průtoku krve a vychytává se pouze v životaschopných nádorových buňkách. Iod-123-MT proniká hematoencefalickou bariérou pomocí aminokyselinového transportního systému a vychytává se v gliomech a mírně v normálním parenchymu, což umožňuje rozlišit životaschopný nádor od nekrotické tkáně. Indium-111-penetetreotid se váže na somatostatinové receptory, které se vyskytují v bazálních gangliích, limbickém systému a kortexu. Tento stopovač je omezen na intrakraniální nádory díky neprostupnosti skrz hematoencefalickou bariéru. K intrakraniálním nádorům exprimujícím somatostatinové receptory patří např. meningeomy, oligodendrogliomy, meduloblastomy a další^[33].

SPECT nabízí klinické vyšetřování kardiovaskulárního systému včetně studia funkce srdeční svaloviny nebo onemocnění koronárních tepen, s kterým souvisí i abnormality jako je ischemie nebo infarkt. Mezi klinicky dostupné stopovače k vizualizaci perfuze myokardu řadíme ^{201}Tl -chlorid a kationtové komplexy značené ^{99m}Tc (^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -tetrafosmin)^[34].

Ačkoli zobrazování PET/CT disponuje lepším zobrazováním modalit, SPECT/CT přináší výhodu v nižší radiační zátěži, čehož je ceněno především u dětských pacientů. Důvodem jsou radiofarmaka značená ^{99m}Tc , kdy pacient obdrží menší dávku v porovnání s většinou PET zářičů. Další výhodou jsou finanční náklady. Jak gama kamery, tak

radiofarmaka značená ^{99m}Tc , jsou levnější než PET/CT a PET/MRI snímače, resp. než PET zářiče připravované v cyklotronu^[35].

2.1.2.2 PET

Pozitronová emisní tomografie (PET) je diagnostická zobrazovací metoda založená na detekci fotonů při anihilaci pozitronu emitovaného pozitronovým zářičem. Pozitrony vzniklé při β^+ přeměně jsou pružnými rozptyly zpomalovány a při kolizi s elektronem tvoří elektron-pozitronový pár. Protože se jedná o pár částice-antičástice, tak dochází k anihilaci za vzniku dvou fotonů o energii 511 keV, které jsou emitované pod úhlem 180° . Z energie anihilovaných fotonů vyplývá, že prahová energie pro β^+ přeměnu je rovna 1022 keV.

Pozitrony nejsou emitovány se stejnou energií, a proto se liší Dosah pozitronu v tkáni před tím, než dojde k anihilaci se různí v závislosti na jeho počáteční energii. Na příklad pozitrony z ^{18}F jsou emitovány s maximální energií 640 keV a jejich maximální dosah v tkáni je okolo 2,4 mm. Naproti tomu pozitrony ^{82}Rb mají maximální energii 3,35 MeV a průnik v tkáni 16 mm^[25]. Charakteristika zmíněných a dalších radionuklidů používaných pro PET zobrazování je uvedena v Tab. 2.

Tab. 2: Charakteristika radionuklidů používaných pro PET^{[25],[29]}

Radionuklid	Poločas přeměny [min]	Průměrná energie pozitronů [keV]	Průměrný průnik v tkáni [mm]	Pravděpodobnost emise pozitronu [%]
^{11}C	20,4	386	1,1	100
^{13}N	9,97	492	1,5	100
^{15}O	2,04	735	2,5	100
^{18}F	110	250	0,6	97
^{64}Cu	762	278	0,6	18
^{68}Ga	68	836	2,9	88
^{82}Rb	1,26	1536	5,9	82

Většina PET zařízení bývá dostupná v hybridní PET/CT formě. Výhodou je větší preciznost lokalizace nádorových ložisek a získávání diagnózy CT i PET v jednom kroku. PET/MRI snímače vyžadují vývoj komponent, které by nereagovaly s magnetickým polem MRI. Ovšem díky rychlému pokroku vědy a techniky je současně již PET/MRI využíváno

v klinické praxi řadou medicínských center. Výhodou je redukce radiační zátěže pacienta oproti PET/CT a vynikající kontrast měkkých tkání díky MRI^{[25],[36]}.

Stojí za povšimnutí, že řada radionuklidů používaných pro PET (viz Tab. 2) jsou biogenní prvky, což přináší výhodu při studiu metabolismu. Široce používaný je ^{18}F , a to nejčastěji ve formě ^{18}F -fluorodeoxyglukózy (^{18}F -FDG). Protože ^{18}F -FDG je analog glukózy, je tak vychytáván především právě v místech se zvýšeným metabolismem glukózy. To na druhou stranu může být omezení při diagnostice mozkových nádorů díky zvýšenému fyziologickému vychytávání glukózy v mozku. Alternativou k zobrazování mozkových tumorů jsou značené aminokyseliny jako je ^{11}C -methionin (^{11}C -MET), ^{18}F -fluorethyl-tyrosin (^{18}F -FET) a L-3,4-dihydroxy-6-(^{18}F)-L-fenylalanin (^{18}F -DOPA). Jejich významnou výhodou oproti ^{18}F -FDG je nízká absorpce v pozadí a rozlišení i nádorů nízkého histopatologického stupně. Limitem pro širší klinické využití ^{11}C -MET je velmi krátký poločas přeměny ^{11}C . Dalším syntetickým analogem aminokyseliny využívaným v PET diagnostice je analog leucinu, ^{18}F -fluciklovin, který je také využíván jako radiofarmakum běžně využívané k diagnostice rakoviny prostaty. Nicméně se ukázalo, že mimo výše uvedené disponuje i vysokým kontrastem při vychytávání v gliomech oproti pozadí, díky čemuž by mohl být potenciálním radiofarmakem právě při zobrazování gliomů v mozku^{[33],[35]}.

V neposlední řadě je důležité zmínit PET radiofarmaka značená ^{68}Ga . Běžně se pro zobrazování neuroendokrinních nádorů (NET) gastroenteropankreatického původu značí ^{68}Ga analogy somatostatinu (např. DOTA-TATE, DOTA-TOC a DOTA-NOC). Kromě zobrazení nádoru lze také tento přístup použít k plánování terapie a k následně ke sledování léčebné odpovědi. Velkou výhodou ^{68}Ga je jeho získávání z radionuklidového generátoru $^{68}\text{Ge} - ^{68}\text{Ga}$ oproti ostatním PET radionuklidům běžně připravovaných v cyklotronu. Ve scintigrafii somatostatinových receptorů byl po dlouhou dobu používán ^{111}In -DTPA-oktreotid. Ten byl postupně pro svou omezenou dostupnost a nevhodné fyzikální vlastnosti nahrazen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tektrotydem a posléze v posledních letech ^{68}Ga -DOTA-peptidy, které mají navíc i větší afinitu k somatostatinovým receptorům. Somatostatiny jsou růstové hormony, které jsou exprimovány krom normálních tkání i ve větší míře nádorovými tumory. Právě NET spadají do skupiny tkání s největší incidencí exprese somatostatinových receptorů. V případě výše zmíněných NET gastroenteropankreatického původu (GEP-NET) jsou somatostatinové receptory přítomny v 80 % až 100 % případů. Také velká škála hematologických malignit, jako jsou meningiomy, karcinom prsu, plic, vaječníků a prostaty,

exprimuje somatostatinové receptory. Těchto vlastností je využíváno a jsou vyvíjeny analogy somatostatinů s různou afinitou k odlišným podtypům a variantám somatostatinových receptorů exprimovaných nádorovými buňkami. První zmínka o klinické aplikaci ^{68}Ga -DOTA-TOC pochází z roku 2001. Od té doby byl zaznamenán rapidní nárůst značení DOTA-peptidů. V nedávných studiích byla porovnávána diagnostická přesnost ^{64}Cu -DOTA-TATE oproti ^{111}In -DTPA-oktreotidu, kdy při aplikaci ^{64}Cu -DOTA-TATE bylo registrováno dvakrát více lézí než při aplikaci konvenčního ^{111}In -DTPA-oktreotidu. Obdobné výsledky přinesla i studie porovnání ^{64}Cu -DOTA-TATE a ^{68}Ga -DOTA-TOC. Při sledování pacienta po dobu 30 měsíců bylo při aplikaci ^{64}Cu -DOTA-TATE detegováno výrazně více dalších pozitivních lézí. Napříč těmito pozitivními výsledky není ale zatím ^{64}Cu -DOTA-TATE klinicky využíván^{[37],[38]}.

2.1.3 Terapie

Radioterapie využívá radiofarmaka a urychlené nabitě částice ke zneškodnění nádoru nebo maligní tkáně. Je využívána více než v 50 % případů léčby onkologických onemocnění, jak pro kurativní, tak paliativní léčbu. Nejčastěji se využívá terapeutických účinků β^- zářičů, nicméně v poslední době nabývá na oblibě i terapie α radionuklidy^[39].

Zneškodnění nádorových buněk je založeno na radiačních účincích ionizujícího záření. Cílem je poškození DNA maligních buněk přímo ionizujícím zářením nebo nepřímo ionizujícím zářením a vzniklými reaktivními formami kyslíku. Na DNA vystavené radiaci vznikají poškození jako jsou jednoduché (SSB) a dvojité zlomy (DSB). Poškozené buňky odpovídají na poškození DNA reparačními procesy, nejčastěji homologní a nehomologní rekombinací. V případě neúspěchu reparace dochází ke genomové nestabilitě a buňka umírá (apoptóza; nekróza) nebo přechází do senescence (viz 2.4). Uvedený proces zneškodnění nádorových buněk má ovšem vliv i na okolní zdravé buňky, a proto je důležité léčbu co nejvíce zacílit a předejít tak poškození zdravé tkáně^[39].

2.1.3.1 Cílená alfa částicová terapie

Cílená alfa částicová terapie (TAT) má velký potenciál zlepšit nebo doplnit již existující formy terapie a zlepšit kvalitu života pacientů trpících vysoce odolnými nádory nebo rakovinou v pozdním stádiu. TAT využívá α zářičů vhodných energií a biologické účinnosti, jejichž velikou výhodou je přesnější zacílení na nádorové buňky a mikroprostředí tumoru než v případě ostatních záření. Zároveň emitované α částice mají vysoký lineární přenos energie (LET), čehož je u léčebných radiofarmak dožadováno. Částice mající vysoký

LET deponují v malém rozsahu tkáně velké množství energie, díky čemuž je deponovaná energie omezena na oblast cílení. Alfa částice jsou v porovnání s β částicemi a Augerovými elektrony zhruba 7000krát těžší, což se odráží i v jejich LET a dosahu v tkáni. Alfa částice mají LET v rozmezí 50 až 230 keV/ μm a dosah v tkáni obvykle 50 až 100 μm . Naproti tomu β částice mají nízký LET, zhruba 0,2 keV/ μm , a relativně velký dosah v tkáni, 1 až 10 mm. Zároveň alfa částice vyvolává větší destruktivní účinky na DNA, kdežto elektrony způsobují často jen jednoduché zlomy, které jsou snadněji opravitelné. V důsledku toho postačí pro stejné terapeutické účinky výrazně méně emitovaných alfa částic v porovnání s elektrony. Potenciálně výhodných vlastností TAT je známo již desítky let, první klinická zkouška TAT byla provedena již v roce 1993, kdy ^{213}Bi byl navázán na leukemickou protilátku HuM195^{[40],[41]}.

Vhodné vlastnosti pro TAT mají radionuklidy jako ^{225}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{149}Tb a ^{227}Th . Tyto radionuklidy byly zapojeny do mnoha preklinických i klinických studií. Při přeměně α -radionuklidu může odrazová energie dceřiného jádra dosáhnout až 100 keV, což vede k uvolnění nascentního jádra z jeho vektorové molekuly. Mnoho dceřiných radionuklidů se pak dále přeměňuje řadou α přeměn. Tento jev ovšem může vést k negativním důsledkům. Zejména v souvislosti s ^{223}Ra a ^{225}Ac mluvíme o tzv. *in-vivo* generátorech, kdy dceřiné jádro může jadernými odrazy zvyšovat radiační zátěž nebo ozářit okolní zdravé tkáně^{[41],[42]}.

Prvním schváleným radionuklidem pro TAT v ČR je ^{223}Ra . Radium-223 je získáváno z ^{227}Ac v generátoru a má poločas přeměny 11,4 dne a při své přeměně emituje 4 alfa částice. V pokročilejším stádiu rakoviny prostaty (konkrétně metastatického kastračně rezistentního karcinomu prostaty – mCRPC) jsou rakovinné buňky diseminovány do kostní tkáně, kde mohou tvořit metastáze. Radium je chemicky homologem vápníku přirozeně obsaženého v kostech, a proto je využíváno k paliativní léčbě mCRPC doprovázeného kostními metastázemi. Zároveň po zničení maligních buněk v kostních metastázích ^{223}Ra migruje, čímž se omezí cytotoxické účinky pro zdravou okolní kostní tkáň. Právě léčba mCRPC s kostními metastázemi přinesla důkaz v účinnosti konceptu TAT. Jako radiofarmakum byl ^{223}Ra schváleno v roce 2013 a to v chemické formě $^{223}\text{RaCl}_2$ pod obchodním názvem Xofigo[®]^{[40],[42]}.

Aktinium-225 má poločas přeměny 9,9 dne a série jeho 6 přeměn včetně 5 alfa přeměn končí kvazistabilním ^{209}Bi . Energie emitovaných alfa částic se pohybuje v rozmezí

5,8 do 8,4 MeV. Při přeměnách jsou registrovány i gama linky o energii 218 a 440 keV, které jsou využívány pro SPECT detekci rozložení ^{225}Ac radiofarmaka v těle. Bismut-213 je smíšený alfa/beta zářič s poločasem přeměny 46 minut. Pouze zhruba ze 2 % případů podléhá ^{213}Bi alfa přeměně, za to s energií 5,9 MeV. Stejně jako v případě ^{225}Ac je přeměna ^{213}Bi doprovázena gama zářením využívaným k detekci. Bismut-213 tvoří stabilní komplexy s DTPA a DOTA, naproti tomu ^{225}Ac bývá chelatováno hlavně DOTA. V klinické praxi jsou radiokonjugáty značené ^{213}Bi a ^{225}Ac využívány k terapii leukémie, NET, maligních melanomů, gliomů a rakoviny prostaty. Veliký význam v léčbě rakoviny prostaty má značení prostatických specifických membránových antigenů (PSMA) pomocí ^{225}Ac . Především dozimetrie ^{225}Ac -PSMA-617 ukazuje značnou terapeutickou účinnost pro léčbu mCRPC, při níž je PSMA výrazně exprimován. Byl porovnáván účinek ^{225}Ac -PSMA-617 oproti ^{177}Lu -PSMA-617, které je již v léčbě mCRPC široce akceptováno. Podle výsledků studie může být ^{225}Ac -PSMA-617 účinnou alternativou pro pacienty, kteří jsou rezistentní nebo u nich došlo k relapsu během terapie pomocí ^{177}Lu -PSMA-617. Klinicky je testována také terapie NET pomocí $^{213}\text{Bi}/^{225}\text{Ac}$ -DOTA-TOC^{[43],[44]}.

Thorium-227 má poločas přeměny 18,7 dne. Izotop ^{226}Th s poločasem 30,6 min se zdá být také vhodným kandidátem pro TAT, ale díky jeho obtížné přípravě se dále výzkumy zabývají více ^{227}Th . Thorium-227 stabilně tvoří komplexy s chelátorem DOTA a často protilátkou cílenou na nádor. V tomto uskupení hovoříme o tzv. radioimunokonjugátech. Terapeutické účinky ^{227}Th -radioimunokonjugátů byly zkoumány v podmínkách *in-vitro* a *in-vivo* na rakovině prsu, vaječnících a u lymfomu. Příkladem může být ^{227}Th -DOTA-trastuzumab pro léčbu nádorů exprimujících HER2 receptory, jejichž zvýšená exprese je doprovázena při rakovině prsu a vaječnících. Dalším potenciálním radiofarmakem pro léčbu kostních metastáz je ^{227}Th -EDTMP, kdy z výsledků studií vyplývá dlouhá retence přípravku v kostech a rychlá migrace z krve a měkkých tkání^{[42],[45]}.

2.1.3.2 Cílená beta částicová terapie

Beta radioterapie odstartovala novou éru nukleární medicíny. Cílená částicová terapie se zdála být hodnotnou terapeutickou možností v léčbě nádorových onemocnění na rozdíl od chemoterapie a zevní radioterapie. K počátkům beta terapie se datuje používání radionuklidů jako je ^{131}I , ^{32}P a ^{89}Sr . Právě pomocí ^{131}I a ^{32}P byly prováděny počátkem 20. století první experimentální léčby až byly tyto radionuklidy úspěšně vyvinuty k léčbě rakoviny štítné žlázy a dalších malignit. K těmto radionuklidům nyní přibýly do klinické a

preklinické praxi terapie β^- zářiči radionuklidy s vhodnějšími fyzikálními vlastnostmi^{[46],[47]}. Jejich výčet a základní fyzikální vlastnosti uvádí Tab. 3.

Tab. 3: Charakteristika radionuklidů používaných pro beta terapii^[46]

Radionuklid	Poločas přeměny	Energie záření beta [keV]	Průnik v tkáni [mm]
¹⁸⁸ Re	17 h	2120	10,6
¹⁸⁶ Re	3,8 d	1077	5,0
¹⁷⁷ Lu	6,7 d	497	2,5
¹⁶⁶ Ho	28,8 h	1854	9,0
¹³¹ I	8 d	606	3,0
⁹⁰ Y	64,1 h	2284	11,4
⁶⁷ Cu	61,9 h	575	2,8
⁴⁷ Sc	80,4 h	441	2,2
¹⁶¹ Tb	6,9 d	461	2,3
¹⁵³ Sm	46,7 h	810	3,1
⁸⁹ Sr	50,6 d	1460	2,4

Většinu zmíněných radionuklidů doprovází při β^- přeměně i gama záření o energii několika málo desítek až stovek keV. Na základě tohoto doprovodného záření je možné pomocí SPECT sledovat rozložení radiofarmaka v těle. Ačkoli je výčet potenciálně vhodných radionuklidů pro beta terapii široký, pouze ^{186,188}Re, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, ⁸⁹Sr, ¹³¹I, ¹⁶⁹Er a ¹⁷⁷Lu jsou v ČR schváleny pro klinickou aplikaci.

Ytrium-90 emituje při své přeměně elektrony s energií okolo 2,3 MeV, stejně tak průnik v tkáni je přes 1 cm. Právě díky emisi vysokoenergetických β^- částic je ⁹⁰Y vhodné pro léčbu větších nádorů nebo radiační synovektomii větších kloubů. Oblíbenou možností přípravy ⁹⁰Y je z ⁹⁰Sr – ⁹⁰Y generátoru, díky čemuž je možné eluovat ⁹⁰Y v beznosičové formě. Ytrium-90 jsou rovněž značeny peptidy, protilátky a částice, které nacházejí uplatnění v terapii primárních forem rakoviny a revmatoidní artritidy. V zahraniční klinické praxi je ⁹⁰Y chelatována DOTA a její deriváty. Příkladem mohou být radiofarmaka ⁹⁰Y-DOTA-TOC a ⁹⁰Y-DOTA-TATE, která zaznamenala zajímavé výsledky léčby NET. V lékařské praxi v ČR je ovšem k léčbě zmíněných nádorů používáno ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, které disponuje nižší hematologickou toxicitou a nefrotoxicitou, než vykazuje ⁹⁰Y-DOTA-TOC. Dále byla

zahraničními vědci a lékaři studována například léčba gliomů vysokého stupně pomocí ^{90}Y -DOTA-GA navázané na peptidové Substance-P. Výsledky ukázaly vysokou toleranci a relativně nízkou toxicitu. Studie byly zaměřeny i na terapii CRPC a mCRPC navázáním na PSMA. I přes úspěchy ^{90}Y i v tomto ohledu je klinicky používáno k léčbě rakoviny prostaty ^{177}Lu -PSMA-617^{[46],[48]}.

I přes to, že se jedná o jeden z nejstarších radionuklidů využívaných v beta terapii, má ^{131}I významnou roli i dnes. Je získáván ve velkém množství, a to aktivací Te terčů, nebo je produktem štěpení ^{235}U . Ačkoli rozsah průniku tkání ^{131}I je velice vhodný pro léčbu malých nádorů, tak velikou nevýhodou je emise gama o energii 364 keV s vysokým výtěžkem této linky (81 %), což má za následek vyšší radiační zátěž pacienta. Iod-131 může být používán k léčbě rakoviny štítné žlázy nebo její hyperfunkce, protože štítná žláza vychytává právě jód z krevního oběhu, který potřebuje ke své správné funkci. Ačkoli je použití ^{131}I účinné, tak je ale omezené jen pro určitá nádorová onemocnění jako je papilární, folikulární nebo medulární karcinom štítné žlázy, hypertyreóza nebo paragangliomů, feochromocytomů či neuroblastomů^{[48],[49]}.

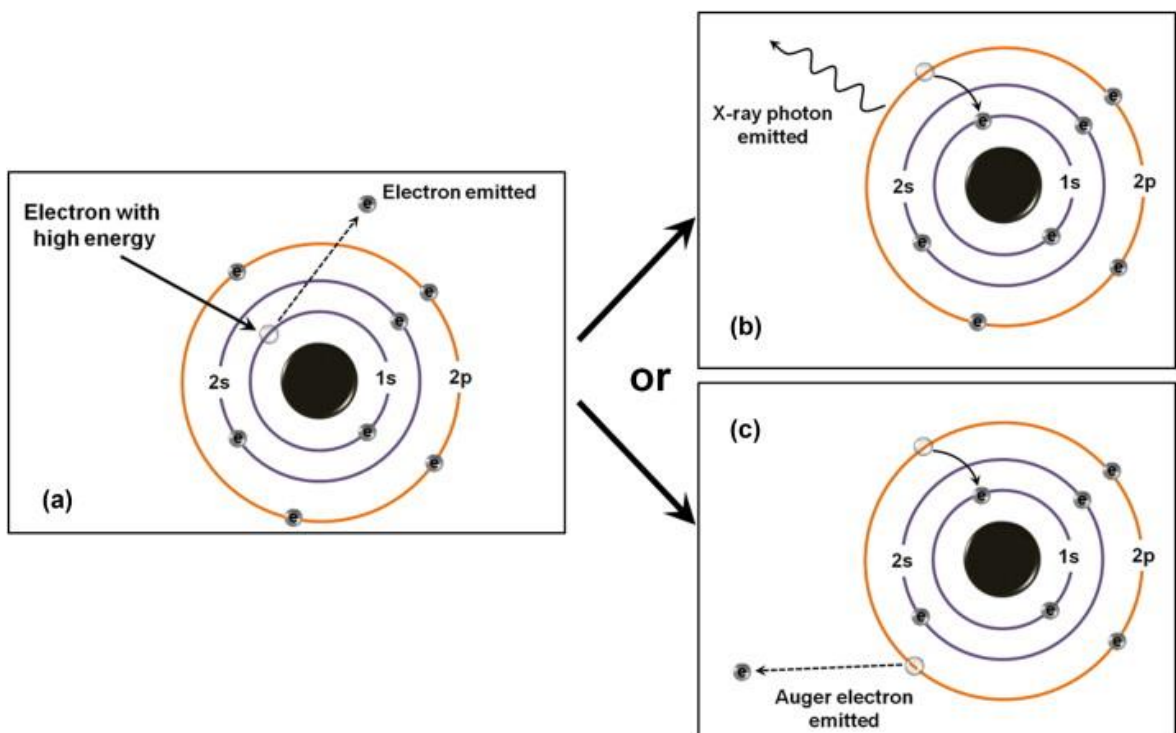
Z výše uvedených radionuklidů v Tab. 3 stojí za zmínku dále ^{153}Sm , které je používáno jako radiofarmakum ^{153}Sm -EDTMP (obchodní název Quadramet[®]) vhodné pro paliativní léčbu bolestí kostí spojenou s metastázemi ve skeletu. Ke stejným léčebným účelům se používá radiofarmakum Metastron[®], což je chemicky $^{89}\text{SrCl}_2$. Nevýhodou ^{89}Sr je absence doprovodné gama linky, tudíž je radiofarmakum detegováno v těle pouze s velmi malým rozlišením^[48].

Radionuklidům ^{177}Lu a ^{161}Tb bude s ohledem na náplň experimentální části této práce věnována samostatná kapitola (2.2, resp. 2.3).

2.1.3.3 Terapie Augerovskými zářiči

Terapie pomocí Augerových elektronů je atraktivní a poměrně novou alternativou v cílené částicové terapii nádorových buněk. Augerovy elektrony jsou oproti α a β^- částicím emitovány odlišným způsobem. U atomů, které se přeměňují elektronovým záchytem (EC) nebo izomerním přechodem (IP), dochází ke vzniku vakancí v elektronovém obalu (a), nejčastěji na K slupce. Vakance jsou zaplňovány elektrony z vyšších energetických hladin, při čemž dochází k emisi energie. Tato energie může být přenesena na elektrony ve vnějších vrstvách za současné emise právě Augerových elektronových kaskád (c), nebo může být

emitována jako fluorescenční rentgenové záření (b). Uvedený princip emise Augerových elektronů uvádí Obr. 3. Díky emisi elektronů v kaskádě se pohybuje energie Augerových elektronů v úzkém rozmezí jednotek až několika desítek keV. Augerovy elektrony mají dosah v tkáni (nm) a jsou považovány za částice se středním až vysokým LET, který nabývá hodnot 4 až 26 keV/ μm . To má za výsledek vysokou lokální hustotu ionizace v tkáni, která způsobuje destruktivní účinky na DNA a buněčnou membránu. Tímto se liší Augerovy elektrony od vysokoenergetických β^- částic, které deponují svoji energii na delší dráze (mm). Ačkoli více než 50 % radionuklidů emituje Augerovy elektrony, tak klinickou praxi zatím nezaujal žádný kandidát. Hlavní nevýhodou terapie na bázi Augerových elektronů by mohla být nutnost podání radiofarmaka o vysoké aktivitě a jeho přímá inkorporace do cílové organely, vzhledem ke krátkému dosahu a nedostatečnému cross-fire a bystander efektu (cross-fire a bystander efekt nastává v případě částic s velmi vysokým LET a dosahem, kdy jsou ovlivněny i nepřímo ozářené buňky). Zároveň by ideální Augerovský zářič neměl emitovat jiné typy záření, které by způsobovaly nespecifické ozáření, a tak zvyšovaly radiační zátěž pacienta^{[50],[51]}.



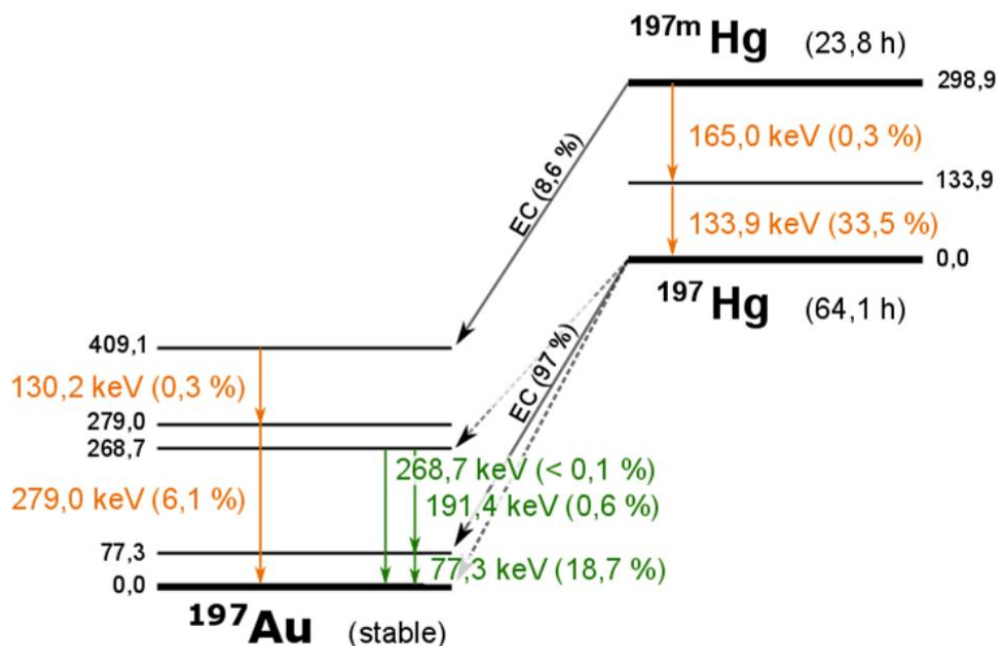
Obr. 3: Princip emise Augerových elektronů^[52]

Téměř všechny medicínální radionuklidy emitují Augerovské elektrony. Některé z nich, např. ^{125}I , ^{111}In , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{123}I , byly podrobeny studiím, ale přesto pro Augerovskou terapii nejsou vhodné z důvodu doprovodné emise jiného záření a poločasu

nekompatibilního s přípravou radiofarmak. Naproti tomu probíhají preklinické studie s radionuklidy, které mají slibnější fyzikální vlastnosti, dostupnost, možnost přípravy, chemickou stabilitou a vhodnou formou pro terapii Augerovskými elektrony. Do této skupiny můžeme zařadit např. ^{119}Sb , ^{103}Pd , ^{197}Hg a ^{161}Tb ^{[53],[54]}.

Antimon-119 se přeměňuje EC s poločasem 38 hodin. Výhodou je doprovodná emise pouze nízkoenergetického gama a rentgenového záření, což snižuje nežádoucí nespécifické ozáření. Dalším výhodným aspektem ^{119}Sb je možnost produkce ve vysoké radionuklidové čistotě pomocí cyklotronu nebo potenciálního radionuklidového generátoru $^{119\text{m}}\text{Te} - ^{119}\text{Sb}$. Výzvou by mohlo být hledání vhodného chelatačního činidla, protože získaný ^{119}Sb může figurovat v oxidačním stavu 3+ a 5+^[53].

Za další vhodný zářič pro Augerovskou terapii lze považovat ^{103}Pd , které je možné připravit s vysokou specifickou aktivitou pomocí protonového urychlovače. Paladium-103 podléhá EC s poločasem přeměny 17 dní, což je jeho hlavní nevýhodou. Vhodnými vlastnostmi disponuje také $^{197\text{m}}\text{Hg}$ a ^{197}Hg . Průměrné energie emitovaných Augerových elektronů těmito izotopy jsou 13,5 keV, resp. 16,1 keV. Pro terapeutické účely se hodí více ^{197}Hg , protože jak energie, tak počet emitovaných Augerových elektronů je větší než u metastabilního stavu, a co je důležité, základní stav nemá emisi gama záření, které by ovlivňovalo dozimetrii. Přeměnové schéma uvedených izotopů rtuti včetně procentuální pravděpodobnosti jednotlivých přeměn uvádí Obr. 4^{[53],[54]}.

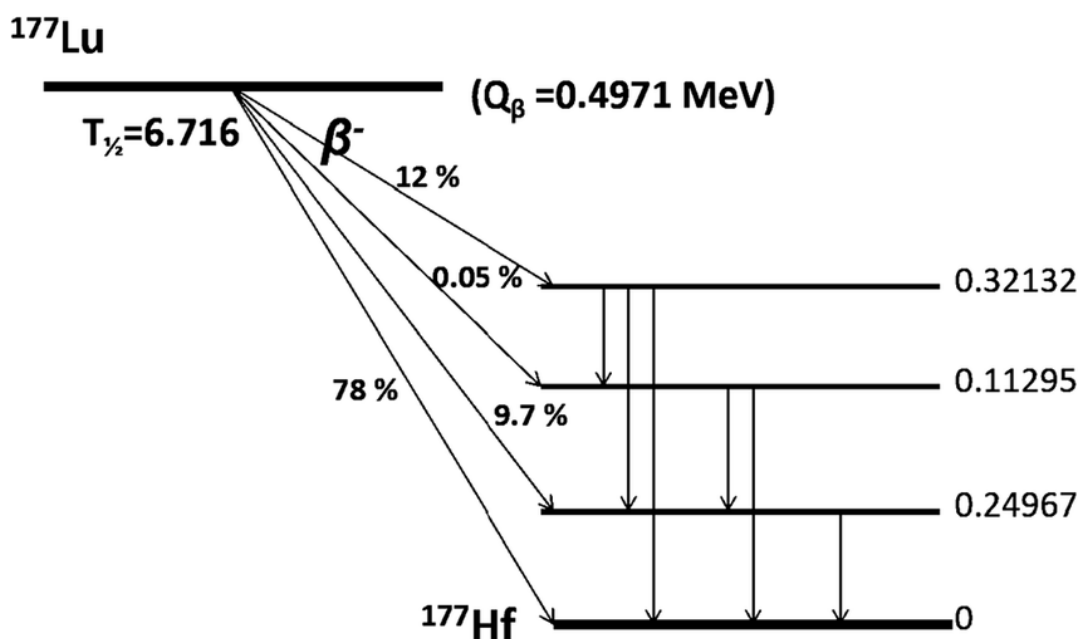


Obr. 4: Hladinové schéma radionuklidů $^{197\text{m}}\text{Hg}$ a ^{197}Hg ^[55]

Vzhledem k chemické podobnosti ^{161}Tb k velmi úspěšnému terapeutickému radionuklidu ^{177}Lu roste počet preklinických studií s možností vyšší terapeutické účinnosti díky emisi Augerových elektronů při přeměně ^{161}Tb . Na ^{161}Tb z pohledu terapeutických účinků bude vyčleněna samostatná kapitola 2.3.

2.2 Lutecium-177

Díky vynikajícím fyzikálním vlastnostem je ^{177}Lu velmi oblíbeným radionuklidem cílené částicové beta radioterapie. Lutecium je prvek ze skupiny lanthanoidů, jehož přírodní varianta je izotopovou směsí 2,6 % stabilního ^{176}Lu a 97,4 % radioaktivního ^{175}Lu s poločasem přeměny $3 \cdot 10^{10}$ let. Je známo 37 umělých izotopů lutecia včetně avizovaného ^{177}Lu . Lutecium-177 je β^- zářič a přeměňuje se s poločasem 6,7 dne na stabilní ^{177}Hf . V 78 % případů podléhá ^{177}Lu β^- přeměně na základní hladinu a je emitováno záření o energii 497 keV. Ve zbylém procentu případů dochází k přeměně na excitované hladiny ^{177}Hf , kdy deexcitace probíhá za emise fotonů o energii 208 a 113 keV a jež bývají detegovány gama kamerami při zobrazování distribuce radiofarmak značených ^{177}Lu . Hladinové schéma ^{177}Lu je znázorněno na Obr. 5^[55].



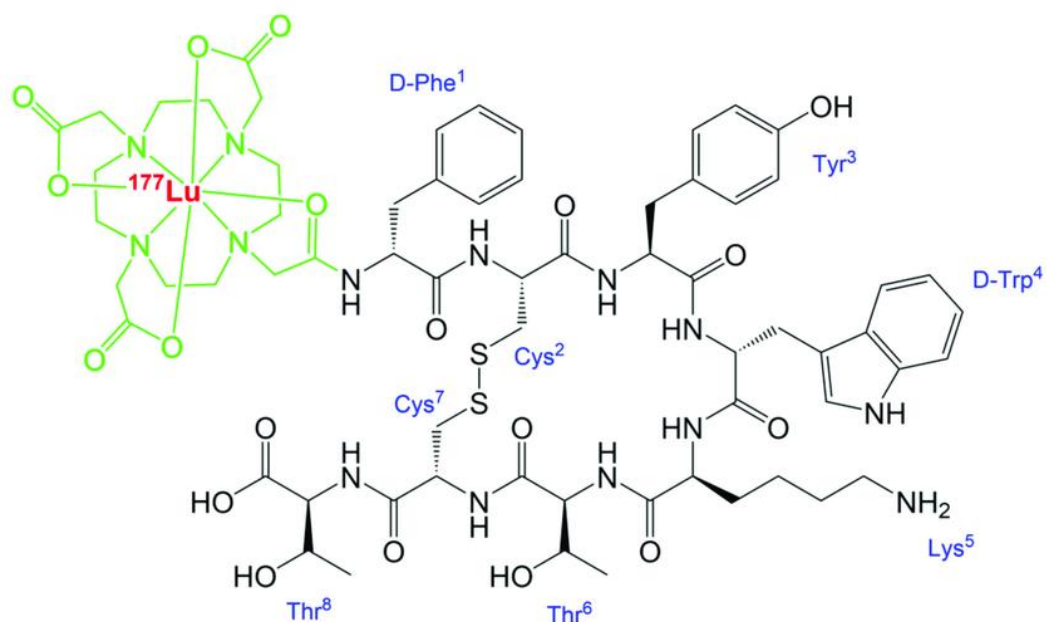
Obr. 5: Hladinové schéma radionuklidu ^{177}Lu ^[55]

Rostoucí zájem o ^{177}Lu v cílené částicové terapii přišel s nedávným pokrokem v molekulární a buněčné biologii, především s využitím cílení peptidů na povrchové receptory buněk, které jsou nadměrně exprimovány nádorovými buňkami. Lutecium-177 je klíčovým radionuklidem v cílené částicové terapii hned z několika důvodů:

- ^{177}Lu vykazuje efektivní cytotoxicitu na nádorové buňky v relativně malém objemu, díky čemuž jsou okolní zdravé buňky ušetřeny ozářením,
- je emitováno nízkoenergetické gama záření vhodné pro SPECT detekci biodistribuce radiofarmaka v těle,
- ^{177}Lu se nachází výhradně v oxidačním stavu 3+ a běžně tvoří devět stabilních komplexů s chelatačními činidly DOTA a DTPA, což usnadňuje možnosti pro radioaktivní značení nosičů; $^{177}\text{Lu}^{3+}$ je vhodné pro značení peptidů a proteinů prostřednictvím metabolicky odolné kovalentní vazby,
- fyzikální poločas přeměny 6,7 dne poskytuje čas i pro zdlouhavější nebo náročnější značení farmak a zároveň pro logistiku radionuklidu z výrobních zařízení do míst zpracování a distribuce^[55].

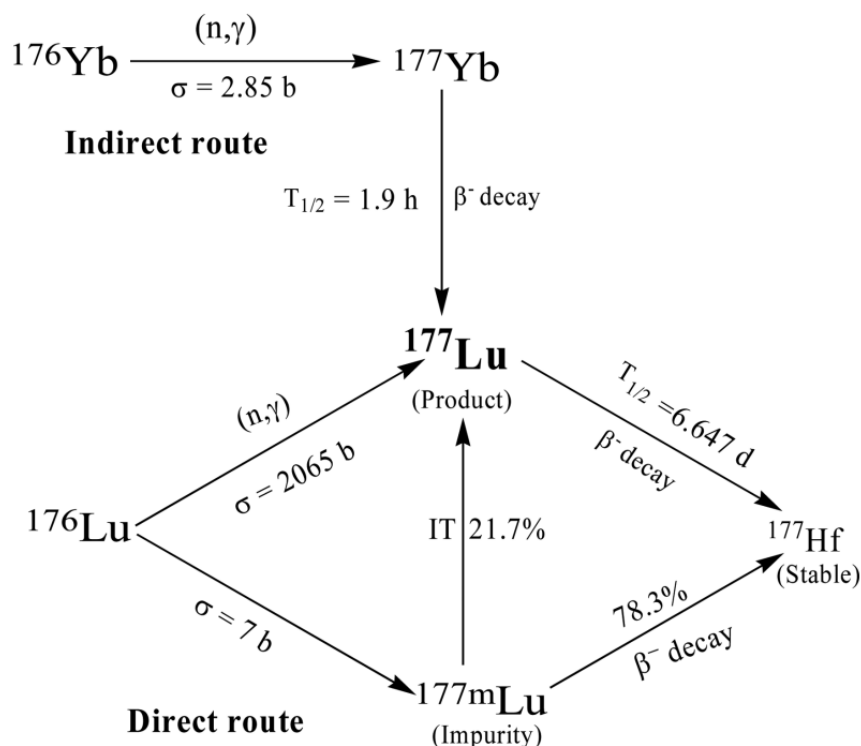
Díky terapeutickým vlastnostem β^- částic a zároveň emisi nízkoenergetické gama linky vhodné pro detekci má ^{177}Lu i teranostický potenciál.

Ačkoli ^{177}Lu má potenciál pro mnoho nových aplikací, doposud jediným klinicky využívaným radiofarmakem je ^{177}Lu -DOTA-TATE, kde je prokázána účinnost u pacientů s metastatickými nebo neresekovatelnými NET. Lutecium-177 značený analog somatostatinu, DOTA-TATE, je známý pod obchodním názvem Lutathera[®] (Obr. 6). Současně jsou prováděny výzkumy možnosti terapie i jiných nádorů pomocí Lutathery, jako melanomu a rakoviny štítné žlázy. Další slibné výsledky přináší preklinická studie terapie mCRPR pomocí ^{177}Lu -PSMA-617. Studie z roku 2018, které se účastnilo 455 pacientů trpících mCRPR uvedla, že u dvou pacientů ze tří byla již po prvním cyklu aplikace ^{177}Lu -PSMA-617 výrazně prodloužena doba přežití. Zároveň při pokračování léčby aplikací 6 cyklů ^{177}Lu -PSMA-617 v šestitýdenních intervalech byla prokázána nižší toxicita v porovnání s Cabazitaxelem, který je běžně používán k léčbě mCRPC. Tyto a další výsledky přináší obrovský potenciál pro terapii ligandem ^{177}Lu -PSMA. Jako biologicky bezpečné a klinicky účinné je označováno i ^{177}Lu -EDTMP pro paliativní léčbu bolesti kostí při mCRPR. Výsledky toxicity byly vyhodnoceny jako přijatelné porovnáním s toxicitou ^{153}Sm -EDTMP, které je pro paliativní léčbu bolestí kostí spojenou s metastázemi ve skeletu již komerčně používáno^{[57],[58]}.



Obr. 6: Chemická struktura Lutathery[®][59]

Lze tedy soudit, že poptávka po ^{177}Lu jak pro produkci Lutathery, tak pro výzkumné účely, bude narůstat. Současne jsou evidovány dva způsoby výroby ^{177}Lu ozařováním terčového materiálu v reaktoru neutrony, a to způsob s přidáním nosiče (přímá cesta) nebo způsob bez přidání (nepřímá cesta). Pro cestu s přidáním nosiče je jako terčový materiál použito přírodní lutecium obohacené o ^{176}Lu . Tato metoda přináší hned dvě výhody a to, že reakce probíhá s vysokou pravděpodobností; účinný průřez neutronového zachytu na ^{176}Lu je více než 2000 b. Dále je zpracování omezeno na přípravu $^{177}\text{LuCl}_3$, jehož chemická příprava je jednoduchá. Naopak nevýhodou je, že produktem této reakce je kromě ^{177}Lu i pro radiofarmaceutické účely nežádoucí $^{177\text{m}}\text{Lu}$, které je dlouhodobým beta zářičem s poločasem 160 dní. Pro beznosičovou nepřímou výrobu je neutrony ozařováno yterbium obsahující více než 99 % izotopu ^{176}Yb . Reakcí vzniká ^{177}Yb , které se s poločasem 2 hodiny přeměňuje β^- přeměnou na ^{177}Lu . Výhodou je získání ^{177}Lu s vysokou specifickou aktivitou, na druhou stranu má reakce nízkou pravděpodobnost a současně je třeba lutecium chemicky náročně oddělit od yterbia. Ačkoli je tato cesta výroby preferovanější, tak negativem jsou také vysoké náklady na získání obohaceného ^{176}Yb . Možnosti výroby ^{177}Lu shrnuje schéma na Obr. 7^{[57],[58]}.



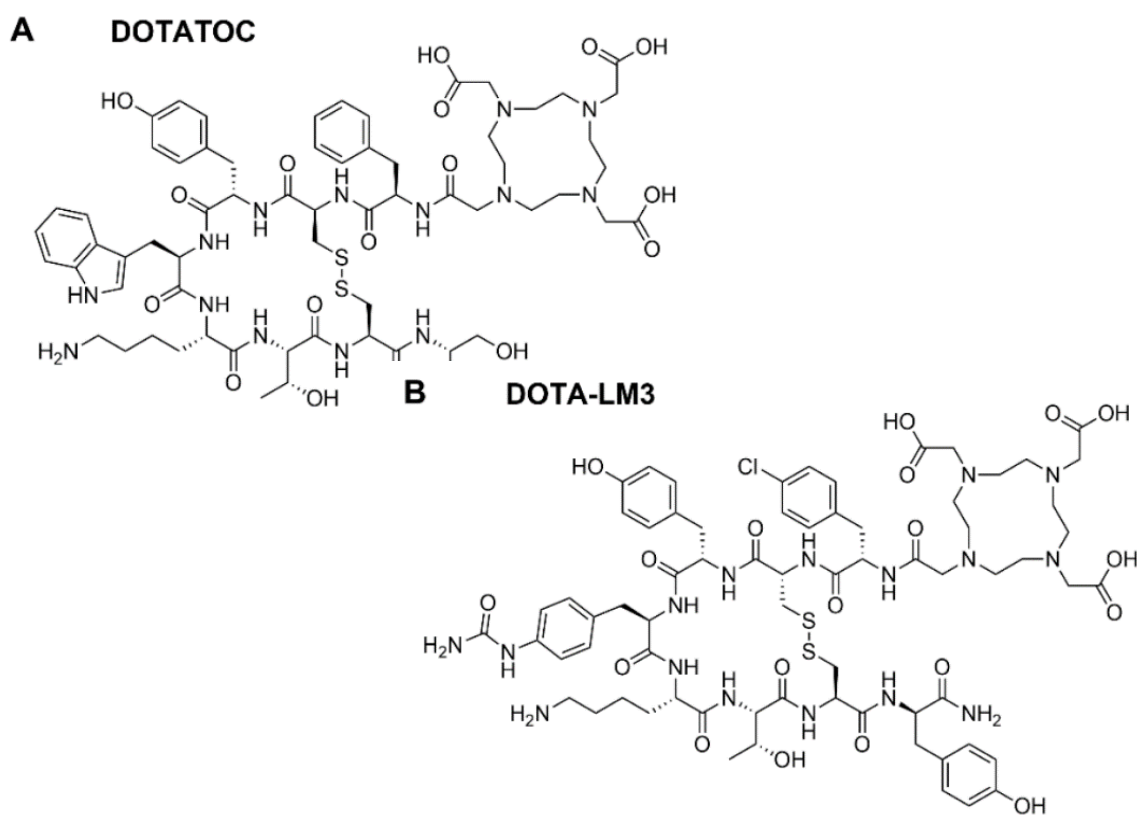
Obr. 7: Schéma výroby ^{177}Lu pro radiofarmaceutické účely^[58]

2.3 Terbium-161

Terbium řadíme stejně jako lutecium do skupiny lanthanoidů. Současně probíhají výzkumy krátkodobých radioizotopů ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb a ^{161}Tb , z nichž u všech lze uvažovat budoucí aplikaci v oblastech nukleární medicíny. Především u ^{161}Tb byly vyzdvihnuty jeho možnosti v β^- a Augerově terapii. Terbium-161 je β^- zářič a s poločasem 6,9 dne se přeměňuje na stabilní ^{161}Dy . Průměrná energie emitovaných β^- částic má energii 461 keV, což je vhodná energie částic pro terapeutické účely. Současně s pravděpodobností 17 %, resp. 10 %, dochází k emisi nízkoenergetického gama ideálního pro SPECT detekci. V tomto ohledu se ^{161}Tb velmi podobá terapeutickému radionuklidu ^{177}Lu , s rozdílem, že doprovodné gama záření má nižší energii; 49 keV a 75 keV. Co dělá ^{161}Tb ještě zajímavějším, je emise konverzních a Augerových elektronů s energií do 50 keV, které, jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.3.3, mají také terapeutické vlastnosti. Na jeden β^- rozpad připadá v průměru 2,24 Augerových a konverzních elektronů. Dalším benefitem ^{161}Tb oproti ^{177}Lu je existence diagnostického protějšku, zahrnující ^{152}Tb ($T_{1/2} = 17,5$ h; $E_{\beta^+} = 1140$ keV) a ^{155}Tb ($T_{1/2} = 5,32$ d; $E_{\gamma} = 87$ a 105 keV) pro PET, resp. SPECT detekci^{[60],[61]}.

Díky obdobným chemickým a farmakokinetickým vlastnostem ^{161}Tb s ^{177}Lu se *in-vitro* a *in-vivo* studie zabývají značením PSMA, což je glykoprotein nadměrně

exprimovaný u karcinomu prostaty. Existují náznaky, že hladina exprese PSMA by mohla korelovat se stádiem a rizikem progresu rakoviny, a proto je PSMA zajímavým cílem značení radionuklidu v radioterapii mCRPC. Preklinické studie porovnávající terapeutické účinnosti ^{161}Tb -PSMA-617 a ^{177}Lu -PSMA-617 přináší pozitivní výsledky, a totiž, že ^{161}Tb -PSMA-617 prokázalo lepší výsledky než ^{177}Lu -PSMA-617, zároveň stabilita radioligandu značeného ^{161}Tb je podobná jako při značení ^{177}Lu a emise Augerových elektronů nemá vliv na farmakokinetiku přípravku^[60]. Další studie testovaly značení somatostatinových analogů DOTA-TOC a DOTA-LM₃ (viz Obr. 8) pomocí ^{161}Tb . Cílem byla identifikace nejvhodnější kombinace peptidu a ^{161}Tb k léčbě novotvarů neuroendokrinního původu. Opět pro porovnání byly použito značení stejných látek ^{177}Lu . *In-vitro* výsledky odhalily, že ^{161}Tb -DOTA-LM₃ je více než 100x účinnější než jeho protějšek značený ^{177}Lu . Výsledky byly potvrzeny i *in-vivo* výsledky; ^{161}Tb -DOTA-LM₃ významně oddálilo růst NET a tím prodloužilo dobu přežití myši, na kterých byly studie prováděny. Na základě těchto preklinických údajů by mohlo ^{161}Tb -DOTA-LM₃ překonat klinicky používané ^{177}Lu -DOTA-TOC pro léčbu pacientů s neuroendokrinními novotvary^[62].



Obr. 8: Chemická struktura somatostatinových analogů DOTA-TOC (A) a DOTA-LM₃ (B)^[64]

Produkce ^{161}Tb jako většiny terapeutických radionuklidů probíhá reaktorovou záchytnou reakcí (n,γ). V případě ^{161}Tb probíhá výroba neutronovou aktivací obohaceného Gd; přírodní Gd obsahuje jen 21,7 % terčového ^{160}Gd . Reakcí vzniká ^{161}Gd , které se s poločasem 3,6 minuty β^- přeměňuje na ^{161}Tb . Pro radiochemické účely je důležitá následná separace, především by měl být radionuklid zbaven terčového materiálu. Co se týče separace izotopů terbia a obecně separace lanthanoidů, tak informací zatím není mnoho, a zdá se, že právě separace by tak mohla sehrát klíčovou roli ve výrobě radiofarmak značených ^{161}Tb . Možnost separace NCA ^{161}Tb od gadoliniového terče je pomocí kationtoměničové chromatografie za použití eluentu HIBA při pH 4,5. Jímané frakce jsou míchány s 1 M HCl, následně odpařeny dusíkem a opětovně rozpuštěny v 0,04M HCl. Výsledná radiochemická čistota separovaného NCA ^{161}Tb v 0,04M HCl je srovnatelná s komerčním NCA ^{177}Lu v 0,04 M HCl a činí více než 99 %^{[61],[63]}.

2.4 Buněčná smrt

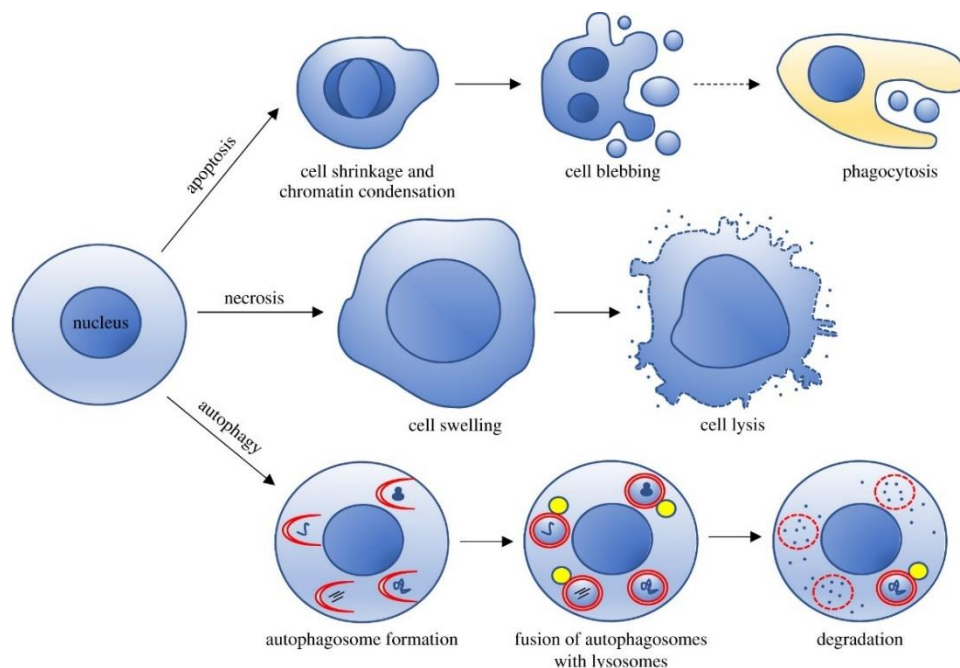
Buněčná smrt je soubor procesů vedoucích k zániku buňky nejčastěji jako odezva na poškození DNA. Nejrozšířenější klasifikace smrti savčích buněk zahrnuje dva typy: apoptózu a nekrózu. Jako třetí způsob buněčné smrti byla popsána autofagie, kdy se jedná o adaptivní reakci na subletální stres, kdy buňky získávají energii a metabolity trávením vlastních organel a makromolekul. Ačkoli jsou díky autofagii schopné přežít i hladovějící buňky nebo buňky strádající růstové faktory, tak stejně po strávení všech dostupných živin zemrou. Tento proces je nazýván autofagie asociovaná s buněčnou smrtí (autophagy-associated cell death). Svou roli hraje autofagie v i v potlačení růstu nádoru, odstranění toxických proteinů a eliminaci intracelulárních mikroorganismů. Apoptóza, nekróza a autofagie se odlišují ve způsobu a průběhu smrti, což má za následek lišící se morfologické, biochemické a molekulární aspekty. Důležitým konceptem, kam patří apoptóza a autofagie, je programovaná buněčná smrt, při které je buněčná smrt řízena geneticky^[65].

Hlavním morfologickým znakem apoptózy je smršťování buňky a jejího jádra. Nekróza se naopak vyznačuje bobtnáním buňky a organel, což vede k jejímu prasknutí a rozlité intracelulárního obsahu. Lýze buňky může vést k zánětlivým onemocněním. Právě ruptura plazmatické membrány je to, co odlišuje druhy buněčné smrti navzájem od sebe. V případě nekrózy je plazmatická membrána částečně porušena, což umožňuje příliv extracelulárních iontů a tekutin, které zapříčiňují výsledné bobtnání buňky. Při apoptóze je integrita plazmatické membrány dělicí buňku od okolí zachována až do pozdní fáze procesu.

Klíčovým parametrem při apoptóze je štěpení cytoskeletu buňky specifickými proteázami, kondenzace chromatinu (pyknóza) a jaderná fragmentace. Proces apoptózy je zakončen rozpadem buňky na apoptotická tělíska, která jsou pohlcena fagocytujícími buňkami. Apoptóza má široké klinické aplikace. Příkladem může být souvislost apoptózy s rakovinou. Více než 50 % novotvarů je zapříčiněno defekty v apoptotickém aparátu. K nejlépe popsaným abnormalitám patří mutace tumor-supesorového genu TP53, který kóduje nádorový protein p53. Zmíněný gen, označovaný také jako „strážce genomu“, iniciuje apoptózu jako odpověď na poškození DNA způsobené radiací, chemickými činidly, oxidativním stresem a dalšími příčinami. Řada novotvarů včetně gliomů a sarkomů je také důsledkem dědičných vad na genu TP53^[65].

Nekróza je obvykle považována za náhodnou, tedy na rozdíl od apoptózy neprogramovanou, buněčnou smrt. Nekróza je často výsledkem metabolického selhání s rychlým vyčerpáním ATP, dále nastává při ischemických poranění jako je infarkt myokardu a mrtvice. ATP je nezbytné pro řadu efektorových procesů v apoptóze, zatímco absence ATP více posouvá buňku od apoptózy k nekróze. S nekrózou buněk se lze setkat u nádorových novotvarů, kdy buněčná proliferace převyšuje angiogenezi. K nekróze také přispívá vystavení buněk extrémním fyziologickým podmínkám, např. teplu, chladu a mechanické síle^{[65],[66]}.

Všechny zmíněné možnosti buněčné smrti shrnuje jednoduché schéma na Obr. 9.



Obr. 9: Schéma různých principů buněčné smrti^[67]

2.4.1 Biologické účinky záření

Účinky ionizujícího záření na živé organismy se zabývá radiobiologie. Působení ionizujícího záření zahrnuje řadu mechanismů a procesů jak na fyzikální, tak na biomolekulární, buněčné i tkáňové úrovni^[68].

Záření dělíme na přímo ionizující, kam spadá záření nabitých částic, a nepřímo ionizující, které zahrnuje fotony a neutrony. Jestliže jakákoli forma záření; rentgenové nebo γ , nabitě nebo nenabitě částice, je absorbována biologickými materiály, tak existuje možnost přímé interakce s buňkami. Např. atomy ionizované nebo excitované vlivem záření mohou spustit sled událostí vedoucí k biologické změně. Tyto přímé účinky záření jsou dominantní především pro částice s vysokým LET, jako jsou neutrony a α částice. Při nepřímém působení záření dochází interakcí záření s atomy nebo molekulami v buňce k produkci volných radikálů. Protože buňka obsahuje až 80 % vody, tak s vysokou pravděpodobností vznikají iontové radikály vody H_2O^+ , které mají nepárový elektron, jsou tak vysoce reaktivní a mají krátkou dobu života 10^{-10} sekundy. Tyto iontové radikály reagují s dalšími molekulami vody za vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů $\text{OH}\cdot$ s dobou života 10^{-9} sekundy. Jedná se o vysoce reaktivní radikál, který je schopen difundovat na krátké vzdálenosti a kriticky tak poškodit místa v buňce. Může také reagovat s dalšími ionty a radikály, při čemž reakcí s $\text{OH}\cdot$ vzniká vysoce oxidační činidlo peroxid vodíku H_2O_2 . Je odhadováno, že přibližně dvě třetiny biologických účinků rentgenového záření na savčí buňky jsou způsobeny právě hydroxylovými radikály. Vzniklé DNA radikály; přímou ionizací i nepřímou reakcí s $\text{OH}\cdot$ radikály, mají dobu života zhruba 10^{-5} sekundy. Období mezi porušením chemických vazeb a expresí biologického efekt může trvat hodiny, dny, měsíce, roky ale i generace. Jestliže poškození vyústí ve smrt buňky, biologický efekt může být prokázán v řádech hodin až dnů. Pokud se jedná o onkogenní poškození doprovázené rakovinným bujením, může být exprese zpožděna až 40 let. Na rozdíl od rentgenového záření, neutrony interagují přímo s jádry atomů tvořící tkáň. Energie neutronů přenesená na jádro uvolní protony nebo produkty štěpení jako jsou α částice. Protony reagují jak s jádry atomů, tak přímo ionizují atomy interakcí s elektrony. Pro těžké částice může být biologický efekt důsledkem přímé nebo nepřímé interakce stejně jako u rentgenových paprsků s rozdílem, že u těžkých nabitých částic se zvyšuje hustota ionizace a tím i dominuje přímá interakce^{[68],[69]}.

Biologické efekty záření vyplývají především z poškození DNA buňky, která je kritickým cílem. Ionizující záření vyvolává na DNA velké množství lézí, z nichž většina je

buňkou opravitelná. Nejdůležitějším typem poškození je přerušení fosfodiesterové vazby na jednom nebo obou vláknech dvoušroubovice DNA. V případě jednoduchého zlomu (SSB) je zachován komplementární řetězec DNA, podle kterého může být zlom opraven. V případech, že se zlomy nacházejí na obou vláknech a dělí je od sebe jen několik nukleových bází, může to vést k rozdělení chromatinu na dvě části a mluvíme proto o dvojitém zlomu (DSB). DSB jsou považovány za důležité léze produkované ionizujícím zářením na chromozomech. Interakce nebo spojení dvou DNA s DSB může vést k buněčné smrti, karcinogenezi nebo mutaci. K dalším významným poškozením DNA patří modifikace bází a síťování molekul DNA. Savčí buňky vyvinuly řadu specializovaných procesů k rozpoznání a opravě základních poškození, SSB, DSB a síťování DNA. Mezi tyto procesy spadá: oprava chybného párování, oprava vyjmutím báze, oprava vyjmutím nukleotidů, homologní rekombinace a nehomologní spojování volných konců. Buněčné reparativní procesy nejsou neomylné a problémem může být např. chybná oprava DSB vedoucí k chromozomálním aberacím, které představují posléze problémy při dělení buněk^[70].

Alternativou k buněčné smrti, jež byla popsána výše (2.4), je přechod buňky do stavu senescence. Jedná se o jev, kdy buňky v průběhu času trvale ztrácí schopnost dělit se, ale zůstávají přítomny, jsou metabolicky intaktní a mohou nebo nemusí vykazovat funkční změny. Kromě replikativní senescence způsobené v důsledku stárnutí buňky a zkracování telomer, existuje také předčasná senescence způsobená buněčným stresem jako je aktivace onkogenu nebo radiační poškození DNA. V obou případech dochází k trvalému zastavení proliferace. Princip senescence se vyznačuje aktivací proteinu p53 a retinoblastomu, které způsobují modifikace chromatinu vedoucí k umlčení genů nezbytných k pokračování buněčného cyklu. I z tohoto důvodu je senescence označována jako programovaná reakce, tzn. geneticky řízená^{[68],[70]}.

2.5 Glioblastomy

Glioblastoma multiforme (GBM) je nejčastější a nejagresivnější mozkový nádor. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je GBM kategorizován jako astrocytom IV. stupně. GBM představuje téměř 50 % všech maligních primárních nádorů mozku. Pacienti bez terapie umírají do tří měsíců. Celosvětová incidence GBM u dospělých pacientů se pohybuje okolo 3–4 na 100 000 obyvatel/rok. Průměrný věk pacientů se pohybuje v rozmezí 45 až 75 let. Nejvyšší incidence je zaznamenána u pacientů ve věku 75 až 84 let, naopak u dětí je toto onemocnění celkem vzácné^{[71],[72]}.

Nově vzniklé GBM mají původ z gliových buněk centrální nervové soustavy. Sekundární glioblastomy vznikají maligní transformací nižších glioblastomů. GBM jsou vysoce rezistentní vůči většině terapeutických procedur, jako je radioterapie a chemoterapie. I díky tomu bývá často léčba jen na paliativní úrovni, a tedy jde především o zmírnění příznaků nemoci a zvyšování kvality života pacientů s těžkou nebo neléčitelnou nemocí. Medián přežití pacientů postižených GBM je pouhých 12 až 14 měsíců, zároveň pouze 3 až 5 % pacientů přežívá déle než tři roky^[73].

GBM jsou charakteristické vysokou patologickou vaskularizací tkáně, díky čemuž je možné nádor diagnostikovat radiofarmaky na bázi glukózy (např. ^{18}F -FDG) a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. Další metody používané k diagnostice GBM je CT a MRI. Samotná léčba mozkových nádorů se potýká s omezeními, zejména díky přítomnosti hematoencefalické bariéry, která odděluje krev od mozku. Hematoencefalická bariéra je vysoce selektivní semipermeabilní membrána a zároveň neprostupná pro molekuly větší jak 400 Da. Současný léčebný postup začíná neurochirurgickou resekci nádoru, která ovšem není kurativní, a proto pokud je to možné, tak následuje chemoterapie nebo radioterapie. Standardní radioterapeutická dávka pro GBM je stanovena jako 60 Gy. Podle randomizovaných studií byl medián přežití pacientů, kteří dostávali dávku nižší jak 45 Gy, pouze 3–4 měsíce. U pacientů léčených 50; 55 a 60 Gy byla střední doba přežití 8–9 měsíců. Naopak dávka nad 60 Gy vedla ke zvýšené toxicitě bez významného prodloužení doby přežití. Zajímavou myšlenkou je využití radiosenzibilizačního účinku kovových částic s vysokým protonovým číslem (Z). Na základě studií bylo zjištěno, že radiační dávka byla zvýšena po ozařování kovových nanočástic s vysokým Z, protože bylo generováno sekundární rentgenové záření, fotoelektrony a Augerovy elektrony. Toto ionizující záření má za důsledek poškození DNA nebo vznik reaktivních forem kyslíku, které jsou také schopné způsobit oxidační poškození DNA a defekty jako je modifikace proteinů vedoucí k buněčné smrti buňky. Augerovy elektrony vykazují terapeutické účinky díky vysokému LET, které způsobuje nápadnou cytotoxicitu. Chemoterapeutická léčba probíhá současně s radioterapií a je založena na podávání alkylačního cytostatika temozolomid, které alkyluje DNA, což vede k jejímu poškození. Preklinické studie se také zabývají možností imunoterapie a potenciálním cílením na receptory GBM. Pro další možnosti léčby GBM jsou ovšem nutné podrobnější studie o samotné biologii, tumorogenezi a mikroprostředí multifonního glioblastomu^{[72],[74]}.

3 Experimentální část

3.1 Materiály a metody

V experimentální části bakalářské práce byla sledována závislost přežití (formou křivek přežití) lidského maligního multiformního glioblastomu (buněčná kultura s označením U251) získaného American Type Culture Collection (ATCC HTB-17) na objemové aktivitě A_v použitého radionuklidu a na obdržené dávce D [Gy], kdy obdržená dávka byla určena na základě vztahu

$$D = 1,602 \cdot 10^{-19} \cdot E \cdot A \cdot T_{1/2} \cdot \frac{\left[1 - e^{-\left(\frac{t \cdot \ln(2)}{T_{1/2}}\right)}\right]}{2 \cdot m \cdot \ln(2)}, \quad (2)$$

kde E [eV] je střední uvolněná energie na jednu přeměnu daného radionuklidu, A [Bq] je aktivita daného radionuklidu, $T_{1/2}$ [s] je poločas přeměny daného radionuklidu, t [s] je doba ozařování a m [g] je hmotnost ozařovaného objektu.

Platnost vztahu (2) je omezena několika předpoklady:

- žádné částice neunikají z ozařovaného systému, tj. veškerá energie je deponována v ozařovaném systému
- distribuce daného radionuklidu je homogenní přes celý objem ozařovaného vzorku
- dochází pouze k externímu ozařování, tj. použité radionuklidy nejsou nijak inkorporovány ozařovanými buňkami
- vzhledem k tomu, že se jedná o adherentní buněčnou linii a radionuklid byl rozptýlen v živném médiu, byla geometrie ozařování 2π (buňky jsou ozařovány jen z jedné strany – ze shora)

Objemová aktivita použitého ^{161}Tb a ^{177}Lu se pohybovala v rozmezí 0-800 kBq/ml. Radionuklid ^{161}Tb byl používán ve formě TbCl_3 , radionuklid ^{177}Lu byl aplikován v chemické formě značeného konjugátu DOTA-Tyr₃-oktreotid. Jako referenční radionuklid byl zvolen ^{60}Co , kdy byla použita dávka 0-8 Gy.

3.1.1 Kultivace buněčné linie U251

Buňky U251 byly kultivovány za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkost) v Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Biowest)

doplněném 10 % Fetal Bovine Serum America Origin, 1 % Penicillin-Streptomycinu, 1 % L-glutaminem, 1 % neesenciálních aminokyselin a 1 % pyruvátu.

3.1.2 Ozařování pomocí ^{60}Co

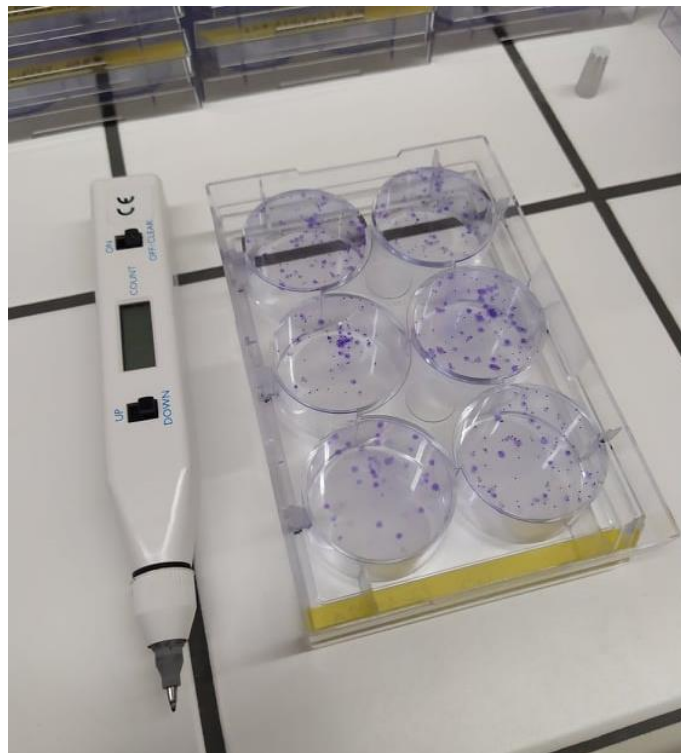
Buňky byly vytaženy z tekutého dusíku, ve kterém jsou skladovány, a zahřátím v dlani rychle rozmrazeny. Následně byly napipetovány do 25ml kultivační lahvičky spolu s 5 ml výživného média. Po uplynutí dvou až tří dnů byly buňky zpasážovány a přeneseny do nové kultivační lahve s médiem. Za další dva dny byly buňky opět zpasážovány a byla stanovena jejich výsledná koncentrace, z níž byl vypočítán potřebný objem pro nasazení buněk do kultivačních lahviček na ozáření.

Na experiment bylo připraveno osm 25ml kultivačních lahviček (VWR) s koncentrací 3000 buněk/cm² dna lahve a objemem kultivačního média 5 ml. Vzorky byly ozářeny ^{60}Co (Isostat Chirana) dávkou v rozmezí 0-8 Gy, kdy dávková rychlost byla 31,25 mGy/s. Vzorky byly během ozařování umístěny 5 cm od primární clony ve vodním fantomu při teplotě 37 °C.

Po ozáření bylo médium slito a buňky byly dvakrát opláchnuty 5 ml 10x zředěného fosfátového pufru 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) (AccuGENE). Následně byly buňky trypsinizovány pomocí 1 ml roztoku trypsinu (Sigma-Aldrich). Pro aktivaci trypsinu byly kultivační lahve umístěny na 3 minuty do inkubátoru s teplotou 37 °C. Trypsinizace byla zastavena 5 ml média, přičemž celý objem lahvičky byl rozpipetován a tím byly buňky od sebe důkladně rozděleny a homogenizovány. Koncentrace buněk byla stanovena na průtokovém cytometru MUSE Cell Analyzer (EMD Millipore), kdy 100 μl zhomogenizovaných buněk bylo přidáno k 100 μl MUSE Count & Viability Assay Kit (EMD Millipore) a po kultivaci trvajících 5 minut byly pomocí průtokového cytometru spočteny. Dále byly příslušné objemy ozářených buněk nasazeny do kultivačních šestijamkových testovacích destiček (TPP) naplněných 3 ml kultivačního média. Do každé jamky bylo nasazeno přibližně 200 buněk. Posléze byla zahájena kultivace buněk nasazených v testovacích destičkách k tvorbě kolonií (Obr. 10). Tvorba kolonií buněčné kultury U251 s respektem k době zdvojení této buněčné kultury trvala 12 dnů. Po uplynutí 12 dnů byly narostlé buněčné kolonie obarveny krystalovou violetí (Crystal Violet) v 95% roztoku methanolu. Za kolonii byl považován útvar čítající alespoň 50 buněk.



Obr. 10: Testovací destičky s nasazenými buňkami v inkubátoru



Obr. 11: Proces počítání obarvených kolonií

3.1.3 Ozařování pomocí ^{161}Tb a ^{177}Lu

Pro ozaření buněk ^{161}Tb bylo připraveno devět 25ml kultivačních lahvíček (VWR) s koncentrací 3000 buněk/cm² dna lahve a objemem kultivačního média 5 ml. Po vytvoření monovrstvy buněčné kultury U251 na dně kultivační lahve, byl přímo do kultivační lahve napipetován odpovídající objem roztoku ^{161}Tb s objemovou aktivitou 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 a 800 kBq/ml. Buňky byly ozařovány ^{161}Tb po dobu 24 hodin, poté bylo radioaktivní médium slito.

Následující proces zpracování ozářených buněk a jejich kultivace se shoduje jako ve výše uvedeném případě při ozaření buněk ^{60}Co (3.1.2).

V případě ozaření buněk ^{177}Lu byly experimentální podmínky a postupy totožné jako při ozaření ^{161}Tb ; bylo připraveno devět vzorků buněčné linie U251 ozářených roztokem ^{177}Lu s objemovou aktivitou 0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700 a 800 kBq/ml.

3.2 Zpracování experimentálních dat

Pro vypočítání potřebného objemu pro nasazení cca 200 buněk do každé jamky se vycházelo z hodnot koncentrace buněk stanovených na přístroji MUSE Cell Analyzer (EDM Millipore). Vztah pro pipetovaný objem buněk V [μl] uvádí vzorec (3)

$$V = \frac{N_p}{N_n} \cdot 1000, \quad (3)$$

kde N_p [buněk] je požadovaný počet buněk v jedné jamce a N_n [buněk/ml] je naměřený počet buněk na přístroji.

Jednotlivé experimenty byly prováděny jako sextuplety (z každého ozářeného vzorku byly nasazeny na tvorbu kolonií buňky do šesti jamek testovacích destiček). Navíc všechny experimenty byly opakovány ve třech nezávislých provedeních.

Při zpracování získaných experimentálních dat byly počty narostlých kolonií v jednotlivých jamkách testovacích destiček průměrovány a dále bylo pracováno s tímto aritmetickým průměrem \bar{X} . Směrodatná odchylka aritmetického průměru byla vypočítána v programu Excel použitím funkce SMODCH.

V závislosti na aplikované aktivitě radionuklidu se mění parametr přežití buněk P , pro který platí vztah (4)

$$P_a = \frac{\overline{X}_a}{N_p}, \quad (4)$$

kde index a udává použitou objemovou aktivitu 0-800 kBq/ml a N_p nabývá stejného významu jako v rovnici (3). Užitím výpočtu (4) lze získat hodnotu přežití buněk SF [%] (Survival fraction) definovanou vztahem (5):

$$SF_a = \frac{P_a}{P_0} \cdot 100, \quad (5)$$

kde P_0 je přežití neozářených buněk, tzn. při objemové aktivitě radionuklidu 0 kBq/ml.

Vypočítané hodnoty přežití buněk SF byly zpracovány graficky v podobě křivek přežití a následně proloženy pomocí lineárně-kvadratického modelu (LQ), který je definovaný vztahem (6)^[75]

$$\ln(SF) = -(\alpha D + \beta D^2), \quad (6)$$

kde parametry α a β charakterizují radiosenzitivitu buněk. Veličina D [Gy] v rovnici (6) představuje dávku, která byla určena na základě vztahu (2).

4 Výsledky a diskuze

Normované procentuální přežití buněčné linie U251 jednotlivých experimentů po ozáření ^{161}Tb , ^{177}Lu a ^{60}Co uvádí Tab. 4 až Tab. 6.

Tab. 4: Procentuální přežití buněk po ozáření ^{161}Tb

A_v [kBq/ml]	0	100	200	300	400	500	600	700	800
Dávka [Gy]	0,00	0,39	0,78	1,17	1,56	1,95	2,34	2,73	3,12
Přežití 1. exp. [%]	100,00	128,78	118,9	126,06	154,04	164,34	131,10	96,67	70,91
Přežití 2. exp [%]	100,00	89,42	99,63	103,18	114,04	130,00	108,96	103,72	89,51
Přežití 3. exp [%]	100,00	93,57	101,98	70,78	78,74	77,60	65,29	59,60	66,84

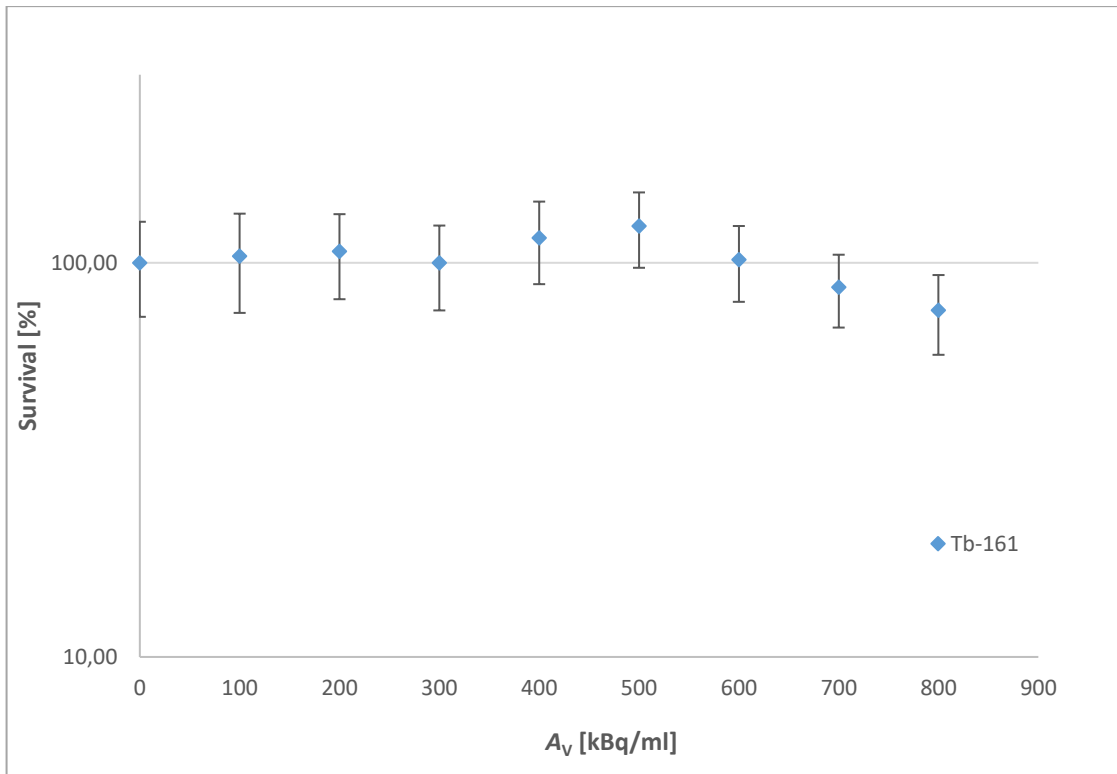
Tab. 5: Procentuální přežití buněk po ozáření ^{177}Lu

A_v [kBq/ml]	0	100	200	300	400	500	600	700	800
Dávka [Gy]	0,00	0,33	0,66	0,98	1,31	1,64	1,97	2,29	2,62
Přežití 1. exp. [%]	100,00	108,47	110,63	97,33	77,78	95,89	75,64	89,06	95,54
Přežití 2. exp [%]	100,00	75,80	107,56	77,62	86,94	69,44	81,63	75,08	69,52
Přežití 3. exp [%]	100,00	71,53	72,23	66,35	59,23	61,74	50,30	46,44	51,12

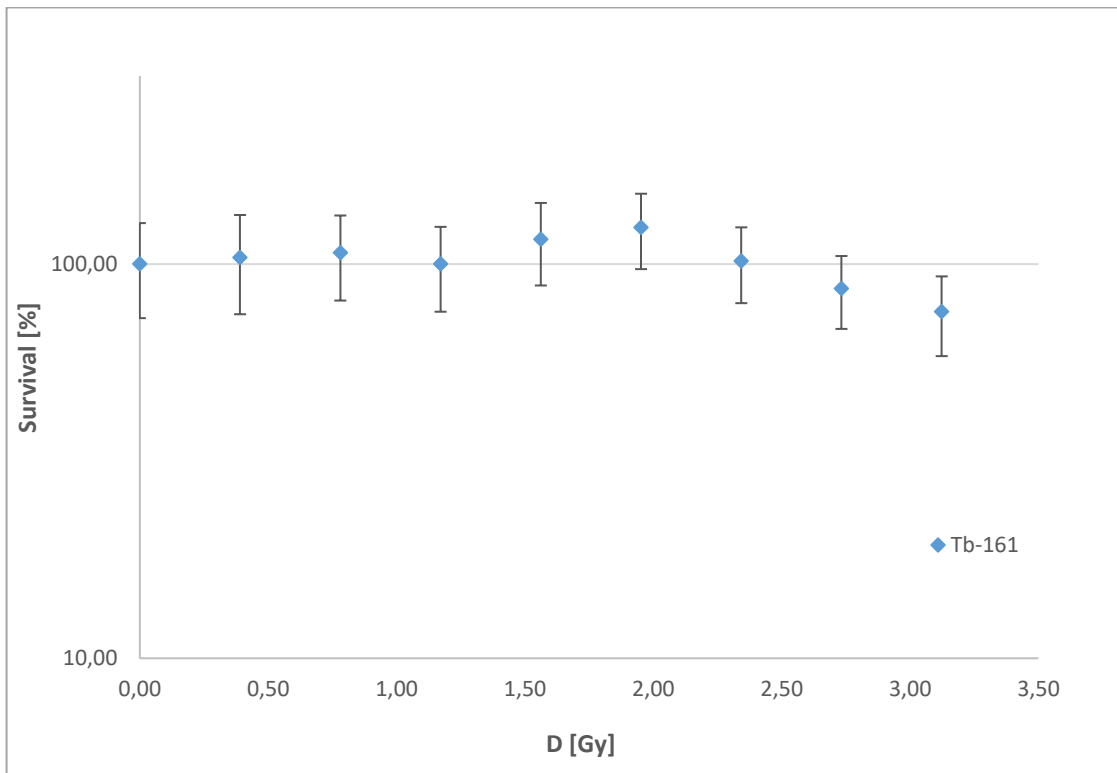
Tab. 6: Procentuální přežití buněk po ozáření ^{60}Co

Dávka [Gy]	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	8,00
Přežití [%]	100,00	107,66	99,40	77,75	67,96	59,95	48,39	17,75

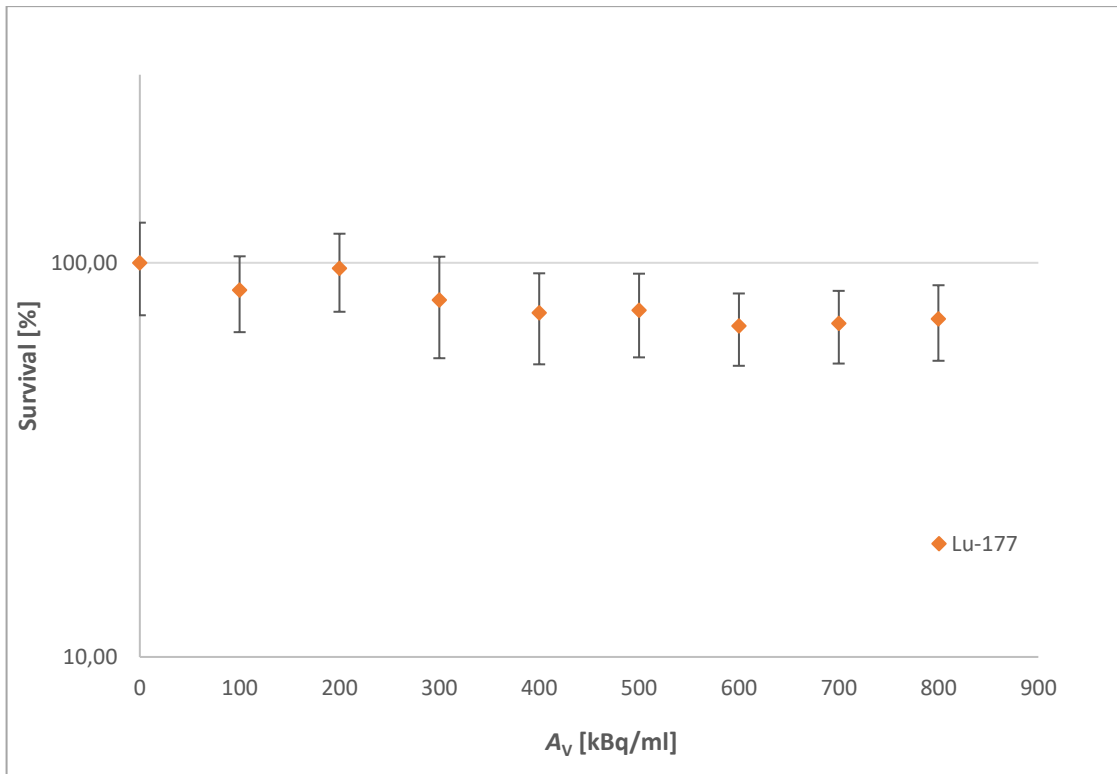
Průměrné hodnoty přežití po ozáření ^{161}Tb a ^{177}Lu z Tab. 4 a Tab. 5 byly vyneseny do grafu a proloženy pomocí LQ modelu. Na Obr. 12 a Obr. 14 jsou uvedeny závislosti buněčného přežití na objemové aktivitě pro jednotlivé radionuklidy a Obr. 13 a Obr. 15 uvádí závislosti buněčného přežití na dávce také zvlášť pro ^{161}Tb a ^{177}Lu .



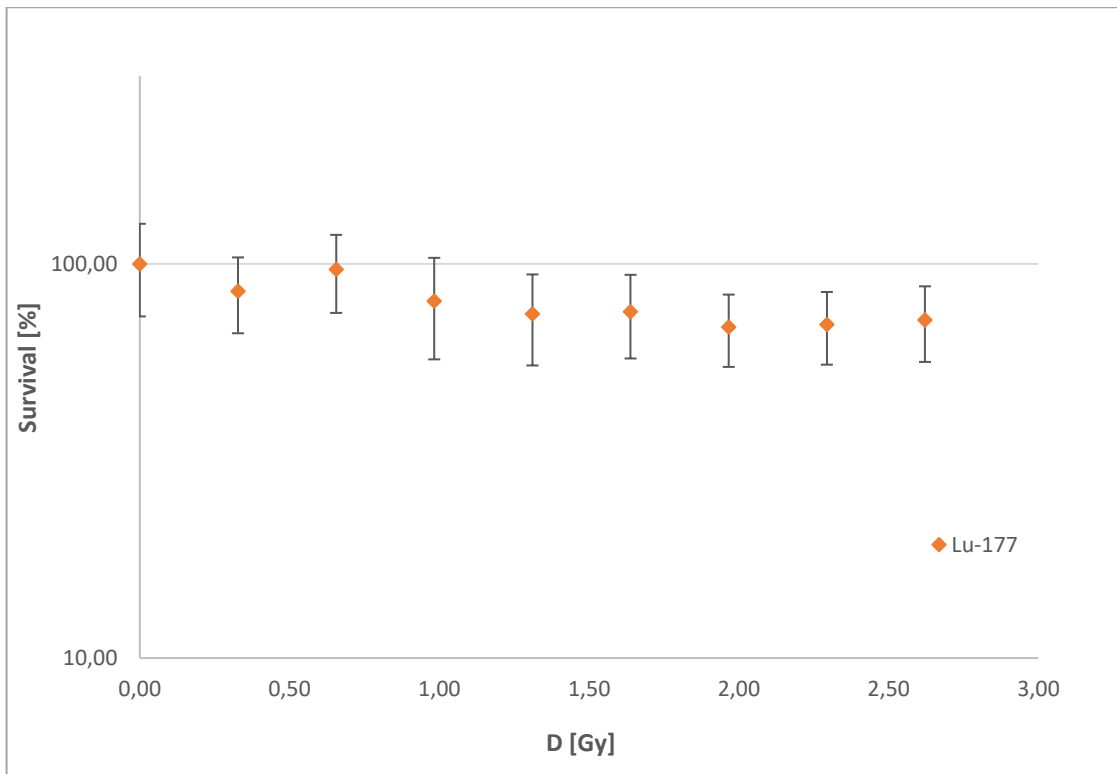
Obr. 12: Aktivitně závislá křivka přežití po ozáření ^{161}Tb



Obr. 13: Dávkově závislá křivka přežití po ozáření ^{161}Tb

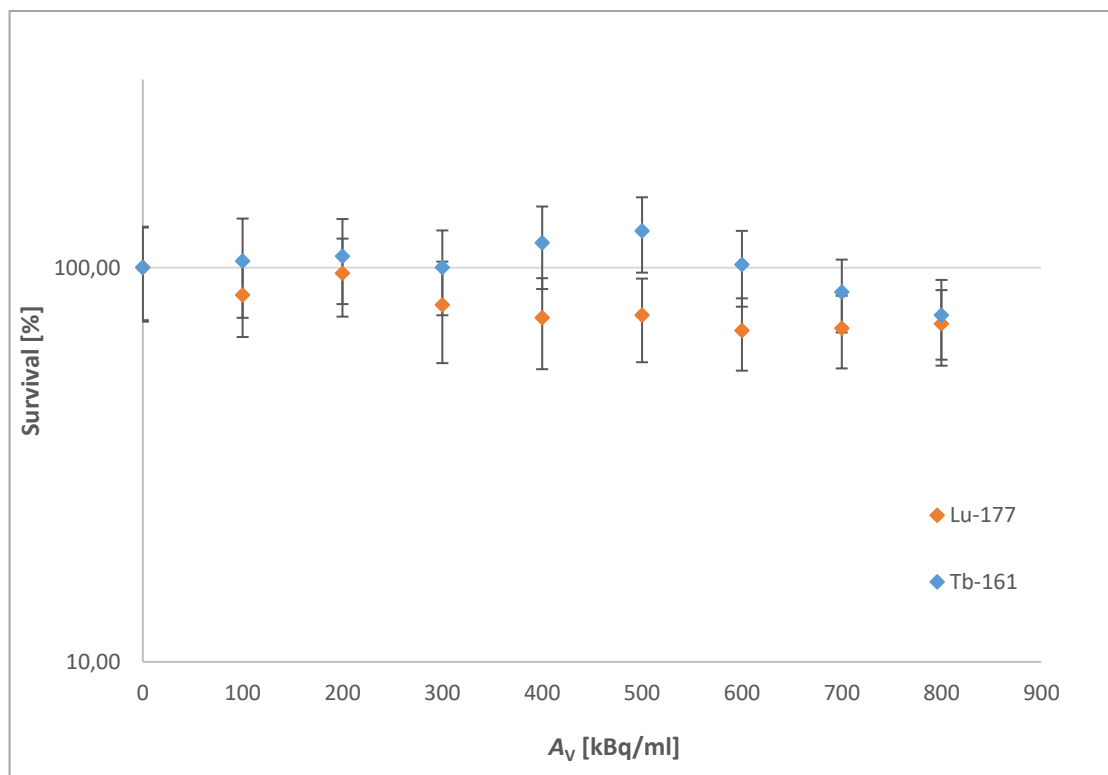


Obr. 14: Aktivně závislá křivka přežití po ozáření ^{177}Lu



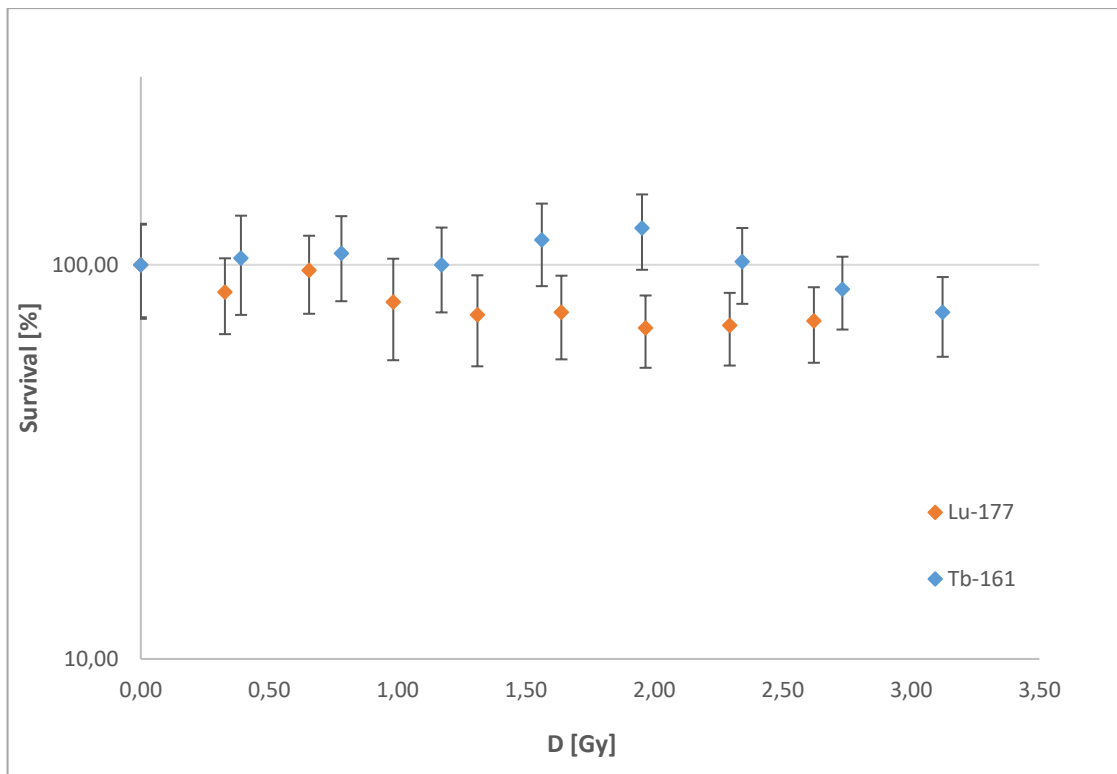
Obr. 15: Dávkově závislá křivka přežití po ozáření ^{177}Lu

Dále Obr. 16 a Obr. 17 uvádí vzájemné porovnání účinku těchto radionuklidů v závislosti na objemové aktivitě a dávce. Na Obr. 18 byly účinky těchto radionuklidů srovnány s referenčním ^{60}Co , kdy aplikovaná dávka byla 0 až 8 Gy. Pro tento graf byly použity experimentální hodnoty přežití po ozáření ^{60}Co z Tab. 6.



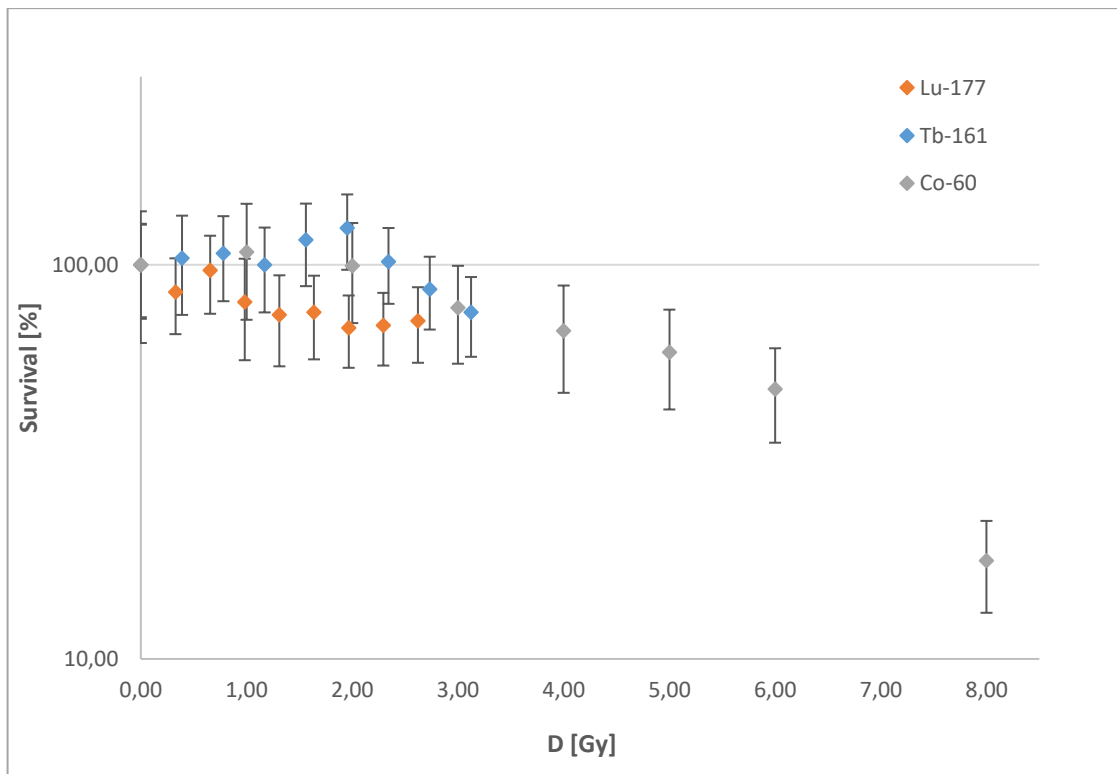
Obr. 16: Aktivitně závislá křivka přežití buněčné linie U251

Oranžové body na grafu na Obr. 16 odpovídají průměrným hodnotám přežití po ozáření ^{177}Lu a modré body přísluší přežití po ozáření ^{161}Tb . Jak si lze z grafu všimnout, v případě ^{161}Tb bylo při nižších objemových aktivitách zaznamenáno přežití nad 100 %. Zhruba od objemové aktivity 500 kBq/ml ovšem vidíme pokles přežití. Můžeme tak předpokládat, že nižších hodnot přežití by bylo dosaženo po aplikaci vyšších objemových aktivit ^{161}Tb nebo při prodloužení doby ozařování, která je v klinické praxi vzhledem k biologickému poločasu terapeutických radiofarmak běžná. Nicméně případ radiační hormeze v oblasti nižších dávek ^{161}Tb je zajímavým jevem, který si do budoucna zaslouží detailnější studium. V případě ^{177}Lu se přežití pohybuje pod 100 %. Při objemové aktivitě 800 kBq/ml bylo dosaženo téměř totožných účinků jak pro ^{161}Tb , tak pro ^{177}Lu a buněčné přežití se pohybovalo okolo 70 %.



Obr. 17: Dávkově závislá křivka přežití buněčné linie U251

Na Obr. 17 je uvedena dávkově závislá křivka přežití porovnávající účinky ^{161}Tb a ^{177}Lu . Při vyšších dávkách si můžeme všimnout srovnatelného terapeutického účinku obou radionuklidů. V případě ^{161}Tb lze předpokládat vyšší terapeutický účinek při vyšších dávkách z důvodu doprovodné emise Augerových elektronů. Zároveň ale může hrát roli nutnost inkorporace ^{161}Tb přímo do cílové organely pro dosažení těchto terapeutických účinků, což s ohledem na chemickou povahu ^{161}Tb v případě uváděných experimentů v této bakalářské práci, kdy se jednalo o iontovou formu $^{161}\text{Tb}^{3+}$, nelze předpokládat ve zvýšené míře vzhledem k tomu, že ionty ^{161}Tb bez nosiče nemají zajištěn aktivní transport přes buněčnou membránu. Lutecium-177 bylo pro tyto experimenty aplikováno v chemické formě značeného konjugátu DOTA-Tyr₃-oktreotidu, což by mohlo vést ke zvýšené akumulaci radionuklidu v těsné blízkosti buňky a docílení tak nižších hodnot buněčného přežití v porovnání s ^{161}Tb . Terbium-161 bylo oproti ^{177}Lu homogenně roz distribuováno v celém objemu kultivační lahvičky.



Obr. 18: Porovnání terapeutického účinku ^{161}Tb a ^{177}Lu s referenčním ^{60}Co

Na grafu na Obr. 18 představují šedivé body procentuální přežití buněčné linie U251 po ozáření ^{60}Co v dávkovém intervalu 0 až 8 Gy. Jedná se o experimentální hodnoty uvedené v Tab. 6. Pro lepší srovnání přežití po ozáření ^{161}Tb a ^{177}Lu s přežitím po ozáření ^{60}Co by bylo vhodné provést ozáření vybranými radionuklidy dvojnásobnou dávkou. I takto můžeme z grafu vypočítat, že trend přežití po ozáření ^{161}Tb nabývá podobného trendu jako po ozáření ^{60}Co v případě dávky 2 Gy a více. Přežití po ozáření ^{177}Lu jeví neměnný trend přežití okolo 70 % nicméně můžeme též předpokládat, že s vyšší dávkou tato hodnota klesne.

5 Závěr

Byla provedena rešerše dané problematiky týkající se využití ionizujícího záření k diagnostice nádorů a terapii v nukleární medicíně. S tím související byly diskutovány radionuklidy používané v nukleární medicíně a blíže byla rešerše zaměřena na ^{161}Tb a ^{177}Lu . V experimentální části této bakalářské práce byl terapeutický účinek vybraných radionuklidů ^{161}Tb a ^{177}Lu experimentálně podložen ozářením nádorové buněčné linie U251, v intervalu objemové aktivity 0 až 800 kBq/ml. Bylo provedeno referenční ozáření ^{60}Co pro srovnání účinku těchto radionuklidů. Při nižších objemových aktivitách aplikovaného ^{161}Tb byla zaznamenána indukce růstu buněk a buněčné přežití tak dosahovalo hodnot nad 100 %. Od objemové aktivity 500 kBq/ml ale došlo k poklesu buněčného přežití a lze tak předpokládat prahovou hodnotu aktivity pro dosažení terapeutického účinku tohoto radionuklidu. V případě ^{177}Lu se hodnoty přežití při nižších dávkách pohybovaly pod 100 %. Účinek ^{161}Tb se zdá být při vyšších dávkách srovnatelný s ^{177}Lu a dosahuje hodnot přežití okolo 70 %. Průběh buněčného přežití po ozáření ^{161}Tb dosahuje obdobného klesajícího trendu jako v případě ozáření ^{60}Co .

Rozdílné hodnoty buněčného přežití mohla ovlivnit také chemická forma použitých radionuklidů. Terbium-161 bylo aplikováno v iontové formě $^{161}\text{Tb}^{3+}$, kdy tato chemická forma nevykazuje aktivní transport přes buněčnou membránu a nedochází tak k inkorporaci radionuklidu do buňky. Lutecium-177 bylo použito ve formě značeného konjugátu DOTA-Tyr₃-oktreotidu, kdy tato chemická forma může vykazovat zvýšenou akumulaci v těsné blízkosti buňky, což by mělo za důsledek dosažení nižších hodnot buněčného přežití v porovnání s ^{161}Tb . Terbium-161 v iontové formě zvýšenou akumulací nedisponuje, ale bylo homogenně roz distribuováno v celém objemu ozařovaného systému.

Pozorování vlivu ^{161}Tb na buněčnou linii je příslibem do budoucna pro tento radionuklid, který by mohl jednou figurovat v klinické praxi při léčbě nádorových onemocnění vedle ^{177}Lu .

V návaznosti na tuto práci budou optimalizovány podmínky ozáření a aplikované objemové aktivity pro získání jasnějších a rozdílnějších údajů, které by hned na první pohled přinesly jednoznačné výsledky o průběhu buněčného přežití v závislosti na dávce. Dále bude na tuto práci navázáno zkoumáním účinku ^{161}Tb a ^{177}Lu na sub/buněčné úrovni s využitím fluorescenční mikroskopie.

Výsledky této bakalářské práce byly rovněž prezentovány na Študentské vedecké konferencii PriF UK 2022 konané v Bratislavě. Příspěvek je součástí recenzovaného sborníku příspěvků ŠVK PriF UK (*Študentská vedecká konferencia 2022: Zborník recenzovaných príspevkov*. Bratislava, Slovenská republika: Univerzita Komenského v Bratislavě, 2022. ISBN 978-80-223-5385-4.).

6 Seznam literatury

- [1] Den boje proti rakovině a statistiky ÚZIS ČR: Celková zátěž zhoubnými novotvory v ČR. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. Praha, 2021 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8466>
- [2] *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/>
- [3] BRAY, Freddie, Jacques FERLAY, Isabelle SOERJOMATARAM, Rebecca L. SIEGEL, Lindsey A. TORRE a Ahmedin JEMAL. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018, **68**(6), 394-424.
- [4] ČESKO. § 2 odst. 2 písm. h) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) - znění od 1. 2. 2022. *Zákony pro lidi.cz*. © AION CS 2010-2022 [cit. 9. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378#p2-2-h>
- [5] IADANZA, Ernesto. *Clinical engineering handbook*. Second edition. London: Academic Press, 2020. ISBN 978-0-12-813467-2.
- [6] CARLSON, Sten. A Glance At The History Of Nuclear Medicine. *Acta Oncologica*. 2009, **34**(8), 1095-1102.
- [7] BALLINGER, James R. Theranostic radiopharmaceuticals: established agents in current use. *The British Journal of Radiology*. 2018, **91**(1091).
- [8] KRAFT, Otakar a Jan PEKÁREK. *Radiofarmaka*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta, 2012. ISBN 9788074641831.
- [9] LÁZNÍČEK, Milan a Pavel KOMÁREK. *Základy radiofarmacie*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-781-x.
- [10] RABIŠKOVÁ, Miroslava. Nanočástice pro léčivé formy. *Remedia*. 2007, 495-501.

- [11] KUSMIREK, Joanna E. a Scott B. PERLMAN. [99mTc]Tc-HMPAO-Labeled Leukocyte Imaging of Infection and Inflammation. *Nuclear Medicine and Immunology*. Cham: Springer International Publishing, 2022, 153-177. ISBN 978-3-030-81260-7.
- [12] BORGNA, F., M. BALLAN, S. CORRADETTI, et al. A preliminary study for the production of high specific activity radionuclides for nuclear medicine obtained with the isotope separation on line technique. *Applied Radiation and Isotopes*. 2017, **127**, 214-226.
- [13] NĚMEC, Mojmir, Kateřina ČUBOVÁ, Miroslava SEMELOVÁ a Pavel BARTL. *Praktikum z jaderné chemie a radiochemie I*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2020. ISBN 978-80-01-06688-1.
- [14] KUPKA, Karel, Jozef KUBINYI a Martin ŠÁMAL. *Nukleární medicína*. Praha: P3K, 2007. ISBN 978-80-903584-9-2.
- [15] MAJER, Vladimír. *Základy jaderné chemie*. Praha: SNTL, 1961.
- [16] KARZMARK, C. J. Advances in linear accelerator design for radiotherapy. *Medical Physics*. 1984, **11**(2), 105-128.
- [17] ŠMORANC, Pavel. *Rentgenová technika v lékařství*. Pardubice, 2004. ISBN 80-85438-19-4.
- [18] LINDQUIST, Christer a Ian PADDICK. The Leksell Gamma Knife Perfexion and Comparisons with its Predecessors. *Operative Neurosurgery*. 2007, **61**(suppl_3), 130-141.
- [19] MATSUNAGA, Shigeo, Takashi SHUTO a Natsuki KOBAYASHI. Gamma Knife Radiosurgery for Metastatic Brain Tumors from Cancer of Unknown Primary. *World Neurosurgery*. 2019, **122**, e1465-e1471.
- [20] YANG, Jiancheng, Gregory J. KOLLER, Chaker FARES, F. REN, S. J. PEARTON, Jinho BAE, Jihyun KIM a David J. SMITH. 60 Co Gamma Ray Damage in Homoepitaxial β -Ga₂O₃ Schottky Rectifiers. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*. 2019, **8**(7), Q3041-Q3045.

- [21] BJØRNSTAD, Tor, J. I. Borroto PORTELA, Patrick BRISSET a Nares CHANKOW. *Radiotracer generators for industrial applications, IAEA Radiation Technology Series No. 5*. International Atomic Energy Agency, 2013. ISBN 978-92-0-135410-5.
- [22] MOTL, Alois. *Úvod do radiační chemie*. Vyd. 2. V Praze: Vydavatelství ČVUT, 2004. ISBN 80-01-02929-8.
- [23] MÚČKA, Viliam. *Aplikace radiačních metod*. Vyd. 2. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2003. ISBN 80-01-02777-5.
- [24] ALI RAZA NAQVI, Syed a Muhammad BABAR IMRAN. Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT) Radiopharmaceuticals. ALI RAZA NAQVI, Syed a Muhammad BABAR IMRANI, ed. *Medical Isotopes*. IntechOpen, 2021. ISBN 978-1-83880-627-9.
- [25] METTLER, Fred A. a Milton J. GUIBERTEAU. *Essentials of nuclear medicine imaging*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. ISBN 978-1-4557-0104-9.
- [26] CHERRY, Simon R., James A. SORENSON a Michael E. PHELPS. *Physics in nuclear medicine*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. ISBN 1416051988.
- [27] KHALIL, Magdy M., Jordi L. TREMOLEDA, Tamer B. BAYOMY a Willy GSELL. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *International Journal of Molecular Imaging*. 2011, **2011**, 1-15.
- [28] BAJAJ, Nin, Robert A HAUSER a Igor D GRACHEV. Clinical utility of dopamine transporter single photon emission CT (DaT-SPECT) with (¹²³ I) ioflupane in diagnosis of parkinsonian syndromes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2013, **84**(11), 1288-1295.
- [29] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Nuclear data services* [online]. [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <https://nds.iaea.org/>
- [30] SCHIMMEL, Kirsten, Roel BENNINK, Kora DE BRUIN, et al. Absence of cardiotoxicity of the experimental cytotoxic drug cyclopentenyl cytosine (CPEC) in rats. *Archives of Toxicology*. 2005, **79**(5), 268-276.

- [31] VAN PAESSCHEN, Wim, Patrick DUPONT, Stefan SUNAERT, Karolien GOFFIN a Koen VAN LAERE. The use of SPECT and PET in routine clinical practice in epilepsy. *Current Opinion in Neurology*. 2007, **20**(2), 194-202.
- [32] LA FOUGÈRE, C., A. ROMINGER, S. FÖRSTER, J. GEISLER a P. BARTENSTEIN. PET and SPECT in epilepsy: A critical review. *Epilepsy & Behavior* . 2009, **15**(1), 50-55.
- [33] ZHANG, Jessica, Katie Suzanne TRAYLOR a James M. MOUNTZ. PET and SPECT Imaging of Brain Tumors. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2020, **41**(6), 530-540.
- [34] KLEIN, Ran, Emel CELIKER-GULER, Benjamin H. ROTSTEIN a Robert A. DEKEMP. PET and SPECT Tracers for Myocardial Perfusion Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2020, **50**(3), 208-218.
- [35] DAVIS, Korbin M., Joshua L. RYAN, Vasantha D. AARON a Justin B. SIMS. PET and SPECT Imaging of the Brain: History, Technical Considerations, Applications, and Radiotracers. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2020, **41**(6), 521-529.
- [36] BROSKI, Stephen M., Ajit H. GOENKA, Bradley J. KEMP a Geoffrey B. JOHNSON. Clinical PET/MRI: 2018 Update. *American Journal of Roentgenology*. 2018, **211**(2), 295-313.
- [37] HENNRICH, Ute a Martina BENEŠOVÁ. [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals*. 2020, **13**(3).
- [38] PAUWELS, Elin, Frederik CLEEREN, Guy BORMANS a Christophe M. DEROOSE. Somatostatin receptor PET ligands – the next generation for clinical practice. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2018, **8**(5), 311-331.
- [39] DE RUYSSCHER, Dirk, Gabriele NIEDERMANN, Neil G. BURNET, Shankar SIVA, Anne W. M. LEE a Fiona HEGI-JOHNSON. Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019, **5**(1).
- [40] PARKER, Christopher, Valerie LEWINGTON, Neal SHORE, et al. Targeted Alpha Therapy, an Emerging Class of Cancer Agents. *JAMA Oncology*. 2018, **4**(12).

- [41] NELSON, Bryce J. B., Jan D. ANDERSSON a Frank WUEST. Targeted Alpha Therapy: Progress in Radionuclide Production, Radiochemistry, and Applications. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(1).
- [42] EYCHENNE, Romain, Michel CHÉREL, Férid HADDAD, François GUÉRARD a Jean-François GESTIN. Overview of the Most Promising Radionuclides for Targeted Alpha Therapy: The “Hopeful Eight”. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(6).
- [43] YADAV, Madhav Prasad, Sanjana BALLAL, Ranjit Kumar SAHOO, Madhavi TRIPATHI, Amllesh SETH a Chandrasekhar BAL. Efficacy and safety of 225 Ac-PSMA-617 targeted alpha therapy in metastatic castration-resistant Prostate Cancer patients. *Theranostics*. 2020, **10**(20), 9364-9377.
- [44] MORGENSTERN, Alfred, Christos APOSTOLIDIS, Clemens KRATOCHWIL, Mike SATHEKGE, Leszek KROLICKI a Frank BRUCHERTSEIFER. An Overview of Targeted Alpha Therapy with 225 Actinium and 213 Bismuth. *Current Radiopharmaceuticals*. 2018, **11**(3), 200-208.
- [45] FRANTELLIZZI, Viviana, Laura COSMA, Gabriele BRUNOTTI, et al. Targeted Alpha Therapy with Thorium-227. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2020, **35**(6), 437-445.
- [46] LACOEUILLE, F., N. ARLICOT a A. FAIVRE-CHAUVET. Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopharmaceutical and clinical aspects. *Médecine Nucléaire*. 2018, **42**(1), 32-44.
- [47] ASADIAN, Samieh, Hamed MIRZAEI, Bagher Aziz KALANTARI, et al. B-radiating radionuclides in cancer treatment, novel insight into promising approach. *Pharmacological Research*. 2020, **160**.
- [48] DAS, Tapas a M.R.A. PILLAI. Options to meet the future global demand of radionuclides for radionuclide therapy. *Nuclear Medicine and Biology*. 2013, **40**(1), 23-32.

- [49] GRZMIL, Michal, Alexander MEISEL, Martin BEHÉ a Roger SCHIBLI. An Overview of Targeted Radiotherapy. LEWIS, Jason S., Albert D. WINDHORST a Brian M. ZEGLIS, ed. *Radiopharmaceutical Chemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 85-100.
- [50] IDRISOU, Malick Bio, Alexandre PICHARD, Bryan TEE, Tibor KIBEDI, Sophie POTY a Jean-Pierre POUGET. Targeted Radionuclide Therapy Using Auger Electron Emitters: The Quest for the Right Vector and the Right Radionuclide. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(7).
- [51] KU, Anthony, Valerie J. FACCA, Zhongli CAI a Raymond M. REILLY. Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2019, **4**(1).
- [52] WANG, Huaiyu a Paul K. CHU. Surface Characterization of Biomaterials. *Characterization of Biomaterials*. Elsevier, 2013, 2013, 105-174. ISBN 9780124158009.
- [53] FILOSOFOV, Dmitry, Elena KURAKINA a Valery RADCHENKO. Potent candidates for Targeted Auger Therapy: Production and radiochemical considerations. *Nuclear Medicine and Biology*. 2021, **94-95**, 1-19.
- [54] RANDHAWA, Parmissa, Aeli P. OLSON, Shaohuang CHEN, Kaley Lexi GOWER-FRY, Cornelia HOEHR, Jonathan W. ENGLE, Caterina F. RAMOGIDA a Valery RADCHENKO. Meitner-Auger Electron Emitters for Targeted Radionuclide Therapy: Mercury-197m/g and Antimony-119. *Current Radiopharmaceuticals*. 2021, **14**(4), 394-419.
- [55] FREUDENBERG, R., M. VOGEL, M. ANDREEFF a J. KOTZERKE. Measurement of Hg-197 and Hg-197m by a dose calibrator. *Technische Universität Dresden*.
- [56] DASH, Ashutosh, Maroor Raghavan Ambikalmajan PILLAI a Furn F. KNAPP. Production of ¹⁷⁷Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015, **49**(2), 85-107.

- [57] VOGEL, W. V., S. C. VAN DER MARCK a M. W. J. VERSLEIJEN. Challenges and future options for the production of lutetium-177. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021, **48**(8), 2329-2335.
- [58] BANERJEE, Sharmila, M. R. A. PILLAI a F. F. (Russ) KNAPP. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chemical Reviews*. 2015, **115**(8), 2934-2974.
- [59] HENNRICH, Ute a Klaus KOPKA. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals*. 2019, **12**(3).
- [60] MÜLLER, Cristina, Christoph A. UMBRICH, Nadezda GRACHEVA, et al. Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2019, **46**(9), 1919-1930.
- [61] NASKAR, Nabanita a Susanta LAHIRI. Theranostic Terbium Radioisotopes: Challenges in Production for Clinical Application. *Frontiers in Medicine*. 2021, **8**.
- [62] BORGNA, Francesca, Stephanie HALLER, Josep M. Monné RODRIGUEZ, et al. Combination of terbium-161 with somatostatin receptor antagonists—a potential paradigm shift for the treatment of neuroendocrine neoplasms. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022, **49**(4), 1113-1126.
- [63] LEHENBERGER, Silvia, Christoph BARKHAUSEN, Susan COHRS, et al. The low-energy β^- and electron emitter ^{161}Tb as an alternative to ^{177}Lu for targeted radionuclide therapy. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011, **38**(6), 917-924.
- [64] BORGNA, Francesca, Patrick BARRITT, Pascal V. GRUNDLER, et al. Simultaneous Visualization of ^{161}Tb - and ^{177}Lu -Labeled Somatostatin Analogues Using Dual-Isotope SPECT Imaging. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(4).
- [65] HOTCHKISS, Richard S., Andreas STRASSER, Jonathan E. MCDUNN a Paul E. SWANSON. Cell Death. *New England Journal of Medicine*. 2009, **361**(16), 1570-1583.
- [66] GOLSTEIN, Pierre a Guido KROEMER. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007, **32**(1), 37-43.

- [67] TETTAMANTI, Gianluca a Morena CASARTELLI. Cell death during complete metamorphosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019, **374**(1783).
- [68] HALL, Eric J. a Amato J. GIACCIA. *Radiobiology for the Radiologist*. 7th Edition. Philadelphia: Lippincott, 2011. ISBN 978-1-60831-193-4.
- [69] PASCIAK, Alexander S., J. Mark MCKINNEY a Yong C. BRADLEY. *Handbook of radioembolization: physics, biology, nuclear medicine, and imaging*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. Imaging in medical diagnosis and therapy. ISBN 978-1-4987-4201-6.
- [70] JOINER, Michael a Albert VAN DER KOGEL. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th edition. London: Hodder Arnold, 2009. ISBN 978-0-340-929-667.
- [71] SMETANOVÁ, Libuše, Pavel RYŠKA a Martin VALIŠ. Glioblastoma grade IV – long-term survival. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2020, **83/116**(3), 332-334.
- [72] CHOI, Jinyeong, Gaeun KIM, Su Bin CHO a Hyung-Jun IM. Radiosensitizing high-Z metal nanoparticles for enhanced radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020, **18**(1).
- [73] POLÍVKA, J., J. POLÍVKA JR, V. ROHAN a O. TOPOLČAN. Multifonní glioblastom –přehled nových poznatků o patogenezi, biomarkerech a perspektivách léčby. *Cesk Slov Neurol N*. 2013, **76/109**(5), 575-583.
- [74] TAYLOR, Olivia G., Joshua S. BRZOZOWSKI a Kathryn A. SKELDING. Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*. 2019, **9**.
- [75] BRENNER, David J. The Linear-Quadratic Model Is an Appropriate Methodology for Determining Isoeffective Doses at Large Doses Per Fraction. *Seminars in Radiation Oncology*. 2008, **18**(4), 234-239.