

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

***In vitro* vēža šūnu modeļsistēmas izstrāde molekulāri
mērķētu radionuklīdu testēšanai**

Bakalaura darbs

Autors: Elza Marija Rubena

Stud. Apl. Nr. er16049

Darba vadītāji: Dr. biol. Zane Kalniņa un MSc. biol. Kārlis Švirksts

Rīga 2019

SATURS

Saīsinājumi.....	4
Kopsavilkums.....	5
Summary	6
Ievads	7
1. Literatūras apskats.....	9
1.1. Vēzis, tā veidošanās un fizioloģiskās pazīmes	9
1.2. Radionuklīdi, to raksturojums un pielietojums kodolmedicīnā	11
1.2.1. Ar PSMA ligandiem konjugēti radionuklīdi	15
1.2.2. Ar somatostatīna receptoru ligandiem konjugēti radionuklīdi	16
1.2.3. Radionuklīdu izraisītie blakusefekti.....	18
1.3. FTIS un vēža šūnu biomolekulārie profili	19
2. Materiāli un metodes.....	22
1.1 Materiāli.....	22
2.1.1. Vēža šūnu līnijas	22
2.1.2. Barotnes.....	23
2.1.3. Ķīmiskie reaģenti	23
2.1.4 Reaģentu komplekti un antivielas	24
2.1.5. Aprīkojums un materiāli	24
2.1.6. Darba drošība	25
2.2. Metodes	27
2.2.1. Zīdītāju vēža šūnu līniju kultivēšana	27
2.2.2. Imūncitoķīmija	29
2.2.3. Radiofarmaceitisko preparātu sintēze	30
2.2.4. Radiofarmaceitisku preparātu kvalitātes kontrole.....	32

2.2.6. Radionuklīdu saistīšanās reakcija	33
2.2.5. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija.....	34
3. Rezultāti un diskusija	36
3.1. Virsmas proteīnu PSMA un SSTR2 ekspresijas noteikšana	36
3.2. Radionuklīdu saistīšanās reakcija	39
3.4. Paraugu analīze ar FTIS metodi	45
Secinājumi.....	49
Pateicības.....	50
Izmantotā literatūra	51
Pielikumi	55

SAĪSINĀJUMI

^{68}Ga HA-DOTATATE – [$^{68}\text{GaIII}$] DOTA-DPhe-Cys-Tyr(3-Iodo)-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr (cyclo 2-7);
APS - amonija persulfāts;
ATF - adenozintrifosfāts;
Bp - bāzu pāri;
Bq – bekerels;
BSA - liellopu seruma albumīns (*bovine serum albumin*);
CRPC - ķirurģiski neoperējams prostatas vēzis (Castration resistant prostate cancer)
D - dozas jauda;
DMSO – dimetilsulfoksīds;
DNS – dezoksiribonukleīnskābe;
FBS - fetālais liellopu serums (*fetal bovine serum*);
FTIS - – Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (*Fourier-transform infrared spectroscopy*);
Gy – grejs;
GRP – Laba radiofarmācijas prakse (Good Radiopharmacy Practice);
H un H_T – ekvivalentā un efektīvā doza;
HEPES – 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-etānsulfonskābe (*ethanesulfonic acid*);
IAL - individuālie aizsardzības līdzekļi;
ICRP - Internacionālā radiobioloģiskās aizsardzības komisija
IS spektroskopija - infrasarkanā spektroskopija;
J – džouls;
KK – kvalitātes kontrole;
LRP – Laba ražošanas prakse
PBS – fosfāta buferšķīdums *phosphate buffered saline*;
PET - Pozitronu emisijas tomogrāfija (*Positron emission tomography*);
pH - ūdeņraža jonu koncentrācija šķīdumā;
PSMA - prostatas specifiskais membrānas antigēns;
PV - prostatas vēzis (*Prostate cancer*);
rcf - relatīvais centrifugēšanas spēks;
RNS – ribonukleīnskābe;
SDS - nātrija dodecilsulfāts;
SSTR - Somatostatīna receptors;
Sv – zīverts;
UV gaisma - ultravioletā gaisma;

KOPSAVILKUMS

Prostatas vēzis ir ceturtais biežāk diagnosticētais vēzis Eiropā, 2018. gadā un tas ir kļuvis par visbiežāk sastopamo vēzi vīriešu vidū. Nozīmīgi klīnisko pētījumu rezultāti prostatas vēža diagnostikā un terapijā ir sasniegti ar radioaktīvi iezīmētu PSMA ligandu ⁶⁸Ga-PSMA – diagnostikai un ¹⁷⁷Lu-PSMA – terapijai.

Neiroendokrīnie audzēji ir neviendabīga agresīvu audzēju grupa, kam raksturīgi dažādi un bieži nespecifiski simptomi, kas apgrūtina precīzu audzēja primāro diagnostiku un saslimšanas stadijas precizēšanu. Pašlaik šo audzēju diagnostikā un ārstēšanā izmanto ar SSTR2 ligandiem (somatostatīna analogiem) konjugētus radionuklīdus.

Šī darba mērķis bija izveidot uz dažādām šūnu līnijām balstītu in vitro modeļsistēmu, kas varētu tikt izmantota molekulāri mērķētu radionuklīdu īpašību raksturošanā un to funkcionālās ietekmes izvērtēšanā. Šī darba ietvaros tika kultivētas sešas dažādas šūnu līnijas, kurās imūncitoķīmiski tika raksturota mērķreceptoru PSMA un SSTR2 ekspresija, un iegūtie rezultāti tālāk validēti molekulāri mērķētu radionuklīdu saistīšanās reakcijās un analizēti ar Furjē transformācijas infrasarkanās (FTIS) spektroskopijas metodi.

Darba rezultātā izvēlētajās šūnu līnijās tika noteikta SSTR2 un PSMA ekspresija, kas tika validēta, izvērtējot radionuklīdu saistīšanās reakciju. Balsoties uz šiem rezultātiem, tika izveidoti prostatas vēža un neiroendokrīno šūnu līniju paneli, kas ietvēra vēža šūnas ar izteiktu un vāji izteiktu mērķreceptoru ekspresiju, kā arī normālu šūnu kontroli. Prostatas vēža šūnu panelī tika iekļautas PC šūnu līnijas LNCaP (PSMA⁺⁺), PC3 (PSMA^{+/-}) un dermālie fibroblasti Hs68; neiroendokrīno audzēju panelī – NET šūnu līnijas AR42J (SSTR2⁺⁺), NCI-H69 (SSTR2⁺), CorL23 (SSTR2⁻) un Hs68. Izmantojot prostatas vēža modeļsistēmu, tika parādīta radionuklīda ¹⁷⁷Lu-PSMA I&T iespējamā ietekme uz šūnu biomolekulāro profilu izmaiņām. Izstrādātās modeļsistēmas paver iespēju tālākiem jauniem molekulāri mērķētu radionuklīdu funkcionālās ietekmes pētījumiem šūnu līmenī.

Atslēgas vārdi: Prostatas vēzis, neiroendokrīnais vēzis, in vitro modeļsistēma, SSTR2 un PSMA; ⁶⁸Ga un ¹⁷⁷Lu radionuklīdi, FTIS.

SUMMARY

Prostate cancer is the fourth most commonly diagnosed cancer in Europe in 2018 and has become the most common cancer among men. Significant results of clinical trials in diagnostics and treatment of prostate cancer have been achieved with radiolabelled PSMA ligands for ^{68}Ga -PSMA - diagnostics and ^{177}Lu -PSMA - therapy.

Neuroendocrine tumours are a heterogeneous group of aggressive tumours with different and often non-specific symptoms that makes it difficult to pinpoint the diagnosis of primary tumour and the stage of disease. Currently, these radionuclides conjugated to SSTR2 ligands (somatostatin analogues) are used in the diagnosis and treatment of these tumours.

The aim of this work was to create an in vitro model system based on different cell lines that could be used to characterize molecularly targeted radionuclides and to assess their functional effects. Six different cell lines were cultivated within this work, in which the expression of the target receptors PSMA and SSTR2 were tested by immunocytochemical method and the results obtained were further validated by molecularly targeted radionuclide binding reactions. Results were analysed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

As a result of the work, the expression of SSTR2 and PSMA, which was validated, was determined in the selected cell lines and evaluated for the radionuclide binding reaction. Based on these results, panels of prostate cancer and neuroendocrine cell lines were created, including cancer cells with pronounced and weakly expressed target receptors as well as normal cell control. The prostate cancer cell panel included PC cell lines LNCaP (PSMA ++), PC3 (PSMA +/-) and dermal fibroblasts Hs68; neuroendocrine tumour panel - NET cell lines AR42J (SSTR2 ++), NCI-H69 (SSTR2 +), CorL23 (SSTR2-) and Hs68. Using the prostate cancer model system, the potential effect of radionuclide ^{177}Lu -PSMA I&T on changes in cellular biomolecular profiles was demonstrated. The developed model systems provide an opportunity for further research on the functional effects of molecularly targeted radionuclides at the cellular level.

Keywords: Prostate cancer, neuroendocrine cancer, in vitro model system, SSTR2 and PSMA; ^{68}Ga and ^{177}Lu Radionuclides, FTIR.

IEVADS

Visā pasaulē 2018. gadā tika diagnosticēti 17 miljoni jaunu vēža gadījumu (visi vēža veidi apvienoti, izņemot ādas melanomu): 8,8 miljoni (52%) vīriešiem un 8,2 miljoni (48%) sievietēm (“Worldwide cancer incidence statistics” 2018). Katru gadu vēzis paņem aptuveni 9,5 miljonus cilvēku dzīvības, Eiropas Savienībā aptuveni 1,3 miljonus cilvēku dzīvības un aptuveni 6000 – Latvijā. Visbiežāk sastopamie audzēji vīriešiem ir prostatas un plaušu vēzis bet sievietēm – krūts vēzis (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2018).

Prostatas vēzis (PV) ir ceturtais biežāk diagnosticētais vēzis Eiropā, 2018. gadā (Ferlay et al., 2018). Tā kā PV ir ļoti izplatīta slimība, tā daudzus gadus ir bijusi pētījumu uzmanības centrā. Ir tikuši publicēti daudzi zinātniski raksti, kuros PV ir ticis pētīts, izmantojot dažādus modeļus, kā, piemēram, testa sistēmas, kas balstītas uz vēža šūnu līnijām, kas iegūtas no metastātiskiem cilvēka PV audzējiem (Tai et al., 2011), kā arī dažādas atšķirīgas *in vivo* modeļsistēmas.

Vēl viena aktuāla tēma onkoloģijā ir neuroendokrīnie audzēji (NET), kas ir neviendabīga audzēju grupa, kurai ir raksturīgi nespecifiski simptomi un dažāda klīniskā norise. Dēļ šīs nespecifiskas, šos audzējus ir sarežģīti diagnosticēt un tā ir bieži novēlota (Purkalne et al, 2015). Pašlaik NET diagnostikā izmanto ar SSTR2 ligandiem (somatostatīna analogiem) konjugētus radionuklīdus (Fani, Peitl, & Velikyan, 2017).

Radiofarmaceutisku preparātu pieejamībai un izstrādei ir būtiska nozīme nukleārās medicīnas attīstībā un izplatībā. PET kombinācijā ar sistēmiski ievadītiem radionuklīdiem ļauj diagnosticēt audzējus un tā metastāzes ar augstu precizitāti, tādējādi atvieglojot precīzas diagnozes uzstādīšanu un stadijas noteikšanu (Baum & Kulkarni, 2012). Personalizētajā medicīnā, pacientiem veicot individuālo dozimetriju un novērojot specifisko atbildi uz terapiju, un agrīni diagnosticējot atkārtotu saslimšanu, var panākt efektīvāku ārstēšanu (Velikyan, 2015).

Šī darba mērķis bija izveidot uz dažādām šūnu līnijām balstītu *in vitro* modeļsistēmu, kas varētu tikt izmantota molekulāri mērķētu radionuklīdu īpašību raksturošanā un to funkcionālās ietekmes izvērtēšanā. Šī darba ietvaros tika kultivētas sešas dažādas šūnu līnijas, kurās imūncitoķīmiski tika raksturota mērķreceptoru ekspresija, un kuras tika tālāk izmantotas radionuklīdu saistīšanās reakcijas eksperimentiem un Furjē transformācijas infrasarkanās (FTIS) spektroskopijas metodi.

Lai sasniegtu izvirzīto mērķi, tika uzstādīti sekojoši darba uzdevumi:

- Kultivēt un sagatavot eksperimentiem šūnu kultūras imūncitoķīmijas analīzēm, radionuklīdu saistīšanās reakcijas eksperimentiem un FTIS analīzēm;

- Ar imūncitoķīmijas metodi pārbaudīt prostatas specifiskā membrānas antigēna (PSMA) un somatostatīna 2. tipa receptora (SSTR2) ekspresiju modeļsistēmai izvēlētajās šūnu līnijās;
- Izmantojot raksturoto šūnu modeļsistēmu, testēt molekulāri mērķētu radionuklīdu spēju saistīties pie specifiskajiem receptoriem;
- Izmantojot Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopiju, noteikt molekulāri mērķētu radionuklīdu izraisītās makromolekulārās izmaiņas izvēlētajās šūnu līnijās.

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā un SIA Kodolmedicīnas klīnika Radiofarmācijas laboratorijā laika posmā no 2018. gada marta līdz 2019. gada maijam.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes fonda SIA «Mikrotīkls» ziedojuma projekta: “Inovātīvu metožu attīstīšana un ieviešana klīniskajā praksē ļaundabīgo audzēju diagnostikai un terapijai, izmantojot Latvijā ražotus molekulāri mērķētus radionuklīdus” ietvaros.

Darba rezultāti ir tikuši ziņoti starptautiskās konferencēs (1. - 3. pielikums):

Z. Kalnina, T. Kusins, K. Shvirksts, **E. Rubena**, R. Kovaldins, G. Kizane, A. Berzina, A. Grinbergs. *Personalized medicine: method of in vitro determination of receptor binding for Lu-177 radio-pharmaceuticals therapy efficacy estimation*, EANM18, 2018. gada 13.–17. oktobris, Diseldorfā, Vācija.

Z. Kalnina, K. Shvirksts, **E. Rubena**, M. Grube, T. Kusins, A. Berzina, R. Kovaldins, L. Mazkalnina, G.Kizane, A. Grinbergs. *Development of in vitro test system for peptide receptor targeting radionuclide quality control and functional research*, 8th Balkan Congress of Nuclear Medicine, 2019. gada 10.-14. aprīlis, Bodruma, Turcija.

Z. Kalnina, K. Shvirksts, **E. Rubena**, R. Kovaldins and M. Grube, *Estimation of the Cancer Cell Metabolic Response to the Growth Environment by FTIR Spectroscopy*, EUCMOS 2018 - XXXIV European Congress On Molecular Spectroscopy, 2018. gada 19.-24. augusts, Koimbra, Portugāle.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Vēzis, tā veidošanās un fizioloģiskās pazīmes

Vēzi raksturo kā vairāku attīstības stadiju slimību, kas ietekmē dažādus šūnā esošus gēnus un noved pie ļaundabīgi izmainītu šūnu nekontrolējamās dalīšanās (Hejmadi, 2010). Ģenētiskās izmaiņas, kas veicina vēzi, ietekmē trīs gēnu veidu: proto-onkogēnus (ras), audzēja supresijas gēnus (p53) un DNS labošanas gēnus. Proto-onkogēni ir iesaistīti normālā šūnu augšanā un to dalīšanās procesā. Ja šie gēni tiek mainīti vai ir aktīvāki nekā parasti, tie var kļūt par vēzi izraisošiem gēniem (onkogēniem), ļaujot šūnām augt un izdzīvot brīdī, kad tām nevajadzētu. Šūnu augšanas un dalīšanās kontrolē ir iesaistīti audzēja supresijas gēni. Ja šūnas dalīšanās procesā tiek konstatēts DNS bojājums, šūnu dalīšanās tiek pārtraukta līdz brīdim kad šī kļūda tiek izlabota; ja šīs kļūdas nav iespējas labot, šūnā tiek inducēta apoptoze. Notiekot izmaiņām gēnos, šūnas spēj nekontrolēti dalīties (Markowitz, 2000). DNS labošanas gēni ir iesaistīti bojāta DNS noteikšanā. Šūnām, ar šo gēnu mutāciju, ir tendence veidot mutācijas citos gēnos. Mutēto gēnu kopums veido vēža šūnu.

Sekmīga vēža šūnu proliferācija rezultējas audzēja izveidē (Hejmadi, 2010). Ir klasificēti vairāk kā 100 dažādi vēža veidi, no tiem aptuveni 85% aizsākas epiteliālajās šūnās un tiek klasificētas kā karcinomas. Audzējus, kas veidojušies muskuļu vai kaulu šūnās sauc par sarkomām, savukārt, audzējus, kuri veidojas no dziedzerepitēlijiem, sauc par adenokarcinomām (Lauren, 2012). Pēc veida, kā audzējs attīstās, var izšķirt labdabīgus un ļaundabīgus audzējus. Labdabīgi audzēji neveido metastāzes, kamēr ļaundabīgi audzēji tās veido. Metastāzes veidojas vēža šūnām atdaloties no audzēja un nonākot citās organisma vietās ar asinsrites vai limfātiskās sistēmas palīdzību. Labvēlīgu audzēja veidošanās gadījumā, vietā kur šūnas ir nonākušas var veidoties jauns audzējs (Hanahan & Weinberg, 2011).

Vēža izveidošanos un attīstību var ietekmēt dažādi organisma apkārtējās vides faktori (radiācija, ķīmikālijas, tabakas dūmi) un organisma iekšējie faktori (hormoni, ģenētiskas mutācijas, metabolisma izraisītas mutācijas, imunitāte). Šo dažādo faktoru mijiedarbības rezultātā ir iespējamas šūnu ģenētiskās mutācijas, kas noved pie abnormālu šūnu izveidošanās un to nekontrolējamās augšanas. Šūnām augot un izplatoties telpā, tās sāk ietekmēt apkārt esošos audus. Tomēr jāņem vērā, ka audzēji attīstās vairākus mēnešus un gadus, līdz tos ir iespējams detektēt. Statistiski vienam no trim cilvēkiem dzīves laikā izveidosies vēzis. DNS mutācijas normāli veidojas vienā no 20 miljoniem gēnu katrā šūnas dalīšanās reizē, ik sekundi desmit miljoni šūnu tiek aizvietotas. Tādēļ var pieņemt, ka visās populācijās būtu līdzīgi saslimšanas rādītāji, tomēr,

vēža gadījumu skaits dažādās valstīs ir ļoti atšķirīgs (Hejmadi, 2010). Pēc Latvijas slimību profilakses un kontroles centra (SPKC) datiem jāsecina, ka no jauna reģistrēto onkoloģisko slimību skaits rēķinot un 100 000 iedzīvotāju, laika periodā no 2001. gada līdz 2017. gadam ir audzis no 352 līdz 530 cilvēku (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2018). Pēc centrālās statistikas pārvaldes datiem, 2017. gadā Latvijā dzīvoja 1,934 miljoni iedzīvotāju, kas nozīmē, ka kopējais onkoloģisko pacientu skaits valstī sasniedz 10 335 cilvēkus gadā un pēdējos gados nav būtiski mainījies (Centrālā statistikas pārvalde, 2017; Slimību profilakses un kontroles centrs, 2018). Pēc SPKC datiem uzskaitē ar onkoloģiskām slimībām Latvijā 2017. gadā ir 67 717 pacientu, no kuriem aptuveni 44 000 cilvēku diagnoze ir uzstādīta pirms pieciem gadiem Vēzis katru gadu paņem aptuveni 1,3 miljonus cilvēku dzīvības ES, 9,5 miljoni pasaulē un 6000 – Latvijā. Visbiežāk sastopamie audzēji vīriešiem ir prostatas vēzis un plaušu vēzis bet sievietēm – krūts vēzis. (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2018).

Visiem dažādajiem ļaundabīgajiem audzējiem ir vairākas kopīgas pazīmes, kas raksturo to attīstību un metastāžu izplatīšanos (Hanahan & Weinberg, 2011). Viena no galvenajām vēža šūnu iezīmēm ir to spēja saglabāt hronisku proliferāciju. (Feitelson et al., 2015). Normālas organisma šūnas ļoti stingri kontrolē savu augšanu, homeostāzi un šūnu dalīšanos, kas vēža gadījumā netiek stingri kontrolēts. Vēža šūnas spēj ietekmēt apkārtesošās šūnas, liekot tām uz audzēju piegādāt papildus augšanas faktoros uz audzēju (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; WC et al., 2008).

Vairākas desmitgades bija pieņemts uzskatīt, ka vēža šūnām ir nepieciešama neierobežota dalīšanās, lai spētu veidot ļaundabīgus audzējus. Šī parādība ir pretstats veselām organisma šūnām, kuras spēj augt un dalīties tikai noteiktu reižu skaitu. Vairāki pētījumi liecina, ka telomēras, kas aizsargā hromosomas galus, ir iesaistītas šūnu neierobežotā proliferācijā (Blasco, 2005; Shay & Wright, 2000). Šūnām daloties, telomēras pakāpeniski samazinās līdz brīdim, kad vairs nespēj pasargāt DNS no noārdīšanās. Telomēru garums nosaka, cik daudz veiksmīgu šūnu dalīšanos var notikt, līdz tās vairs nespēj veikt savu funkciju (Hanahan & Weinberg, 2011).

Tā pat kā veselām šūnām, vēža šūnām ir nepieciešams skābeklis un barības vielas, kā arī atkritumvielu (CO₂ un metabolisma gala produktu) aizvadīšana prom no šūnām. Lai to nodrošinātu, vēža šūnas veicina neoangiogēzi – jaunu asinsvadu veidošanos ap audzēju. Pakļaujot sev veselās šūnas, ļaundabīgs audzējs izveido sev labvēlīgu mikrovidi, veselās šūnas ap audzēju izdala augšanas faktoros, citokīnus un hemokīnus, kas ir labvēlīgi audzēja attīstībai. Audzēja mikrovidē esošie procesi ir līdzīgi procesiem, kas norisinās iekaisuma gadījumā (Hanahan & Folkman, 1996; Hanahan & Weinberg, 2011).

Viena no raksturojošajām vēža iezīmēm ir šūnu izplatīšanās uz attālākiem organisma audiem jeb metastazēšanās. Metastāžu veidošanās ir galvenā atšķirība starp labdabīgu un ļaundabīgu audzēju, primāros audzējus bieži ir viegli ķirurģiski izņemt no organisma, tomēr, ja tas jau ir metastazējies, to ir praktiski neiespējami izņemt ķirurģiskā ceļā. Lielākā daļa no ļaundabīgo audzēju gadījumiem diagnozes uzstādīšanas brīdī jau ir metastazējušies. Metastāzes konkurē pār skābekli un barības vielām ar veselām šūnām, kas ietekmē konkrētā orgāna darbību, turklāt var tiešā veidā (mehāniski) traucēt orgāna normālu funkcionēšanu. Pēdējā laikā ir aprakstīti vēl divi vēža šūnu raksturojoši faktori: izmaiņas enerģijas metabolisma regulācijā un pretvēža imunitātes supresija (Hanahan & Weinberg, 2011; Lauren, 2012).

Prostatas vēzis (PV) ir ceturtais izplatītākais vēzis, kas ir diagnosticēts Eiropā, 2018. gadā (Ferlay et al., 2018); tas ir kļuvis par visbiežāk sastopamo vēzi vīriešu vidū (Dasari et al., 2017). Prostatas vēzis kopš 2014. gada Latvijā izvirzījies pirmajā vietā starp biežāk diagnosticētajām onkoloģiskajām saslimšanām vīriešiem un ap 30% pacientu saslimšana tiek diagnosticēta III un IV slimības stadijā (Slimību profilakses un kontroles centrs, 2018)

Neiroendokrīnie audzēji (NET) (prevalence vidēji 2,5 - 5 gadījumi uz 100 000 cilvēkiem) ir neviendabīga audzēju grupa, kam raksturīgi dažādi un bieži nespecifiski simptomi, kas apgrūtina precīzu audzēja primāro diagnostiku un saslimšanas stadijas precizēšanu. NET ietver gastrointestinālā trakta NET, medullāru vairogdziedzera vēzi, plaušu NET, aizkuņģa dziedzera saliņu šūnu audzējus, feohromocitomu un paragangliomu.

1.2. Radionuklīdi, to raksturojums un pielietojums kodolmedicīnā

Radionuklīdi ir ķīmiskie elementi ar nestabilu kodolu, kas ir pakļauti radioaktīvajai sabrukšanai, kā rezultātā tie izstaro jonizējošo starojumu. Tie ir sastopami gan dabā, gan arī tiek ražoti atomreaktoros, ciklotronos, daļiņu paātrinātājos un radionuklīdu ģeneratoros. Izotopu sabrukšanas procesā tiek izstarotas dažāda veida daļiņas, α - daļiņas, β^- daļiņas, pozitronu emisija (β^+) un γ stari.

α - daļiņas ir identiskas hēlija - 4 atoma kodolam, tās sastāv no diviem protoniem un diviem neitroniem; α - sabrukšanas gadījumā atoma kodols emitē α - daļiņu. β^- sabrukšanas gadījumā no kodola tiek emitēts β^- starojums, tas iedalās β^+ (izdalās pozitrons) un β^- (izdalās elektrons). Pozitronu emisija jeb β^+ sabrukums ir radioaktīvās sabrukšanas apakštīps, ko sauc par β^+ degradāciju, kur radionuklīda kodolā esošais protons tiek pārveidots par neitronu, atbrīvojot pozitronu un elektronu. Savukārt γ stari ir elektromagnētiskie viļņi, kā viļņu garums ir mazāks, kā

rentgenstariem, bet tiem ir lielāka caurspiešanās spēja. γ staru viļņa garums ir 0,01 nm un to frekvence ir lielāka par 2,42 EHz. Tie ir caurspiedīgāki par α un β starojumu, taču ir mazāk jonizējoši (Beiser, 2003).

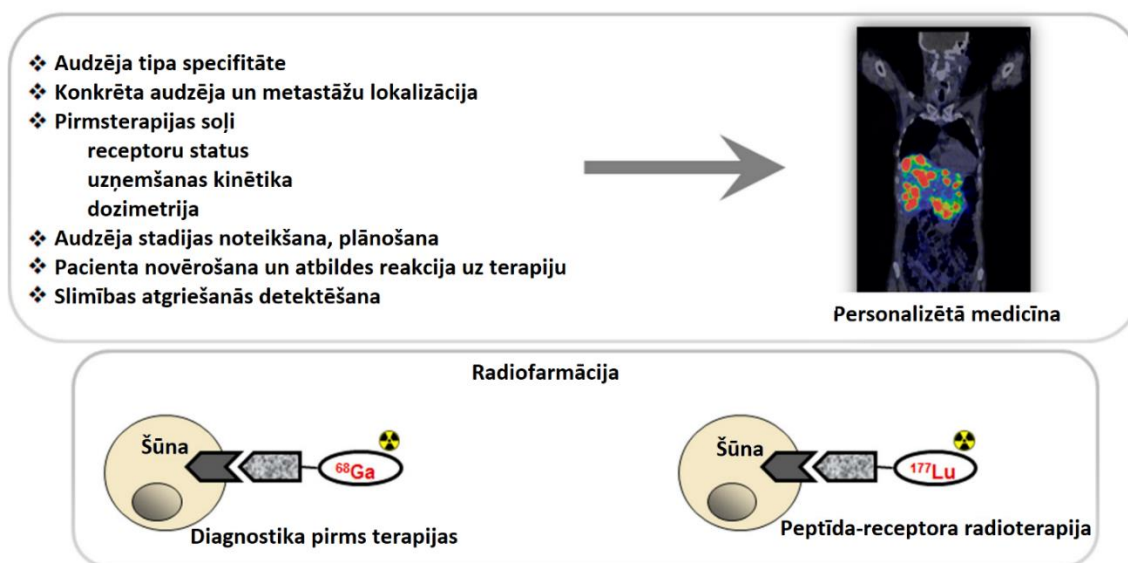
Pozitronu izstarojošus radionuklīdus izmanto pozitronu emisijas tomogrāfijā (PET), tiem ir liela nozīme radiofarmācijā (Mosby's Medical Dictionary, 8th edition, 2009). Radionuklīdi, kas saistīti ar organiskām molekulām tiek plaši izmantoti vēža diagnostikā un ārstēšanā; šīs organiskās molekulas specifiski saistās ar konkrētām šūnām, audiem vai orgāniem. Vēža diagnostikā izmanto molekulāri mērķētus radionuklīdus, kas ir ātri sabrūkoši β^+ un γ emiteri (^{68}Ga - pozitronu emiteris (β^+), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - γ emiteris, ^{18}F - pozitronu emiteris (β^+), u.c.). Savukārt terapijā izmanto α un β^- emiterus. Terapijā izmantotie radionuklīdi tiek izvēlēti pateicoties to spējai zaudēt enerģiju nelielā attālumā, tādā veidā radot lielus bojājumus sev apkārt (Radiopharmaceuticals in nuclear medicine, 2019). Ar specifiskām molekulām (piem., ligandiem) iezīmēti radionuklīdi tiek mērķēti un piesaistās specifiski vēža šūnām, kas uz plazmatiskās membrānas ekspresē noteiktu, dotajam ligandam specifisku virsmas molekulu (t.i., marķieri – piem., antigēnu vai specifisku receptoru), kas ekspresējas gan audzējā, gan tā metastāzēs. Šādi molekulāri mērķētu radionuklīdu emitētais jonizējošais starojums terapijas gadījumā bojā šūnu DNS, kas noved pie vēža šūnu nāves un audzēja samazināšanās (“Radionuclide therapy, how it works, IAEA,” n.d.). Visbiežāk izmantotie molekulāri mērķētie radionuklīdi vēža terapijā ir ^{177}Lu (β^- emiteris), ^{90}Y (β^- emiteris), ^{131}I (γ emiteris).

Radiofarmaceutisku preparātu pieejamībai un izstrādei ir būtiska nozīme nukleārās medicīnas attīstībā un izplatībā. Pēdējās desmitgades laikā ir pierādīta ^{68}Ga nozīmīgā loma klīniskajos pētījumos un ikdienas PET izmeklējumos visā pasaulē. Šī radionuklīda pielietojuma palielināšanos ietekmēja komerciāli pieejamie $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ģenerators, kā rezultātā ir iespējams to iegūt lielākos apjomos un pielietot to personalizētajā medicīnā (Velikyan, 2014, 2015).

PET kombinācijā ar šiem radionuklīdiem ļauj diagnosticēt audzējus un tā metastāzes ar augstu precizitāti, tādējādi atvieglojot precīzas diagnozes uzstādīšanu un stadijas noteikšanu. Šūnu virsmas ekspresijas receptoru daudzuma noteikšana, preparāta uzņemšanas kinētikas noteikšana un pirms terapijas dozimetrija nevestu pie veiksmīgākas un efektīvākas ārstēšanas.

Personalizētajā medicīnā pacientiem veicot individuālo dozimetriju un novērojot specifisko atbildi uz terapiju, un agrīni diagnosticējot atkārtotu sasilšanu var panākt efektīvāku ārstēšanu (1. attēls) (Velikyan, 2015). Sarežģītu un bīstamu slimību gadījumā, kā piemēram vēzis, ārsti pielieto teranostiku. Tā ir disciplīna, kas apvieno slimības diagnostiku un pacienta personalizēto ārstēšanu

ar augstu efektivitāti un drošumu. Teranostika radusies pēdējās desmitgadēs, kā jauna medicīnas stratēģija, kas veidojusies strauji progresējot dažādām nozarēm: slimību molekulāro mehānismu pētījumi, vizualizējošo iekārtu tehniskā attīstība un jaunu specifisko vizualizācijas aģentu izstrāde. Kodolmedicīnas kontekstā tas attiecas uz molekulāro mērķa vektoru (piemēram, peptīdu) izmantošanu, kas marķēti vai nu ar diagnostiskiem radionuklīdiem (piemēram, pozitroniem vai gamma emiteriem), vai ar terapeitiskiem radionuklīdiem, kas paredzēti konkrētas slimības diagnostikai un terapijai. Šādā veidā var efektīvi sekot līdzi personalizētai ārstēšanai, izmantojot molekulāros vektorus. Viens no klasiskajiem teranostikas piemēriem ir ^{68}Ga marķieru izmantošana, kur diagnostikā pielietojot šo marķieri var sekot terapija ar terapeitiskajiem radionuklīdiem, piemēram, ^{177}Lu un ^{90}Y . Šie terapeitiskie radionuklīdi ir marķēti ar to pašu molekulāro mērķa vektoru, ko izmanto diagnostikā. Divu svarīgu aspektu pievienošana, proti, individualizēta pacienta dozimetrija (pirms un pēc terapijas) un terapijas reakcijas novērtēšana, izmantojot ^{68}Ga pozitronu emisijas datortomogrāfiju (PET / DT), atbilst personalizētajai medicīnai (Baum & Kulkarni, 2012).



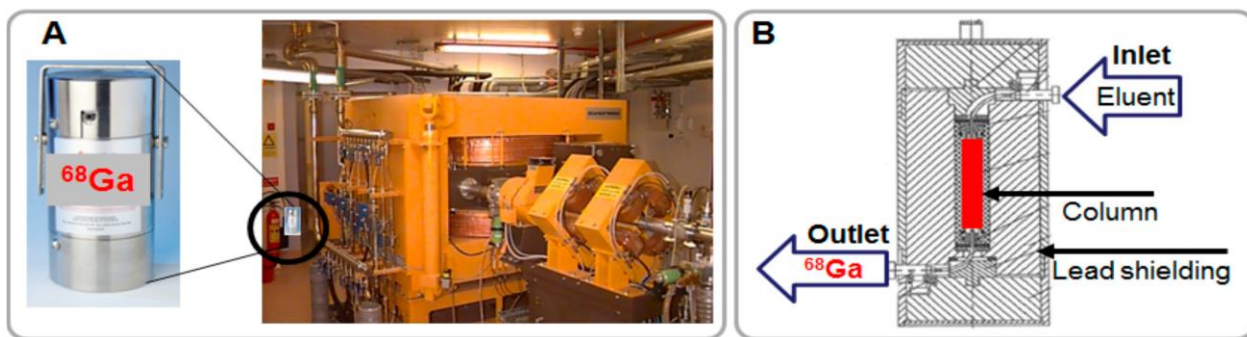
1. Attēls. Personalizētās medicīnas modelis. Augšējais panelis - molekulāri mērķētu radionuklīdu pacientu diagnostikas un terapijas efektivitāte tiek palielināta, attīstot pacientu personalizēto terapiju. Apakšējais panelis - molekulāri mērķētu radionuklīdu saistīšanās ar šūnām, attēls pa kreisi izmantojot ^{68}Ga diagnostiskiem izmeklējumiem, pa labi ^{177}Lu , kas tiek izmantots terapijā (adaptēts no Velikyan, 2015).

Figure 1. Upper panel - peptide receptor targeted imaging and radiotherapy provide personalized and thus more effective and efficient treatment of patients. Lower panel - drawing of the interaction of an agent, either imaging if labelled with ^{68}Ga (left) or radiotherapeutic if labelled with ^{177}Lu (right), with the cell receptor (adapted from Velikyan, 2015).

^{68}Ga iegūst no $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ģeneratoriem. ^{68}Ga ir pozitronu emiteris (89%, E_{max} : 1899 keV, E_{mean} : 890 keV) ar bioloģisko pussabrukšanas periodu 67,63 min (Fendler et al., 2017). Pateicoties šiem parametriem, ^{68}Ga emitē pietiekami daudz radiācijas, lai iegūtu augstas izšķirtspējas attēlus diagnostikā, tajā pašā laikā samazinot radiācijas dozu pacientiem un personālam. Iepriekš minētajiem ģeneratoriem ir ilgs pussabrukšanas periods, $t_{1/2}(^{68}\text{Ge}) = 270.95$ dienas, tos ir viegli izmantot, jo nav nepieciešams ciklotrons (Velikyan, 2015).

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ģenerators ir izolēta sistēma, kur abi elementu maisījumi atrodas līdzsvarā. Modernie komerciālie ģeneratori sastāv no mazas hromatogrāfijas kolonas, kas ir ieslēgta aizsargājošā svina apvalkā (2. attēls). ^{68}Ge tiek ražots augstas enerģijas ciklotronā no stabila ^{69}Ga izotopa ($^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$). Pēc tam ^{68}Ge tiek imobilizēts kolonnā, kas piepildīta ar neorganisku, organisku vai jauktu matricu, kur tas spontāni sabrūk līdz ^{68}Ga (1. vienādojums), ko pēc tam var ekstrahēt ar eluentu. Savukārt sabrūkot ^{68}Ga , tas pārvēršas par stabilu Zn (II) (2. vienādojums) (Velikyan, 2015).

1. $^{68}_{32}\text{Ge} + {}^0_{-1}\text{e} \rightarrow ^{68}_{31}\text{Ga} + \nu$
2. $^{68}_{31}\text{Ga} \rightarrow ^{68}_{30}\text{Zn} + \beta^+ + \nu; p \rightarrow n + \beta^+ + \nu$

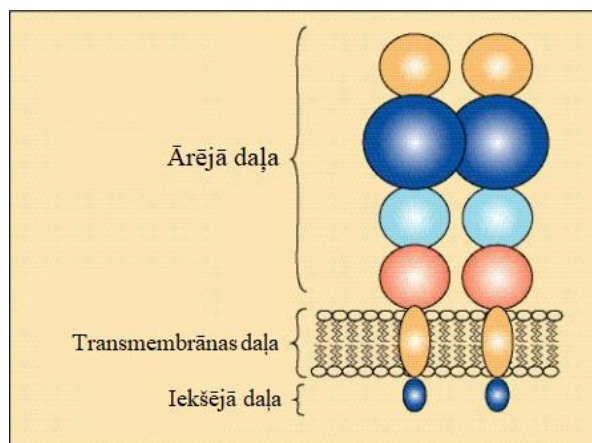


2. Attēls. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ģeneratora - ciklotrona salīdzinājums un ģeneratora sistēmātais attēlojums. (A) $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ģenerators pa kreisi, ciklotrons, pa labi. (B) kolonas tipa ģeneratora sistēmātais attēlojums (no Velikyan, 2015).

Figure 2. Comparison of the $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ generator - cyclotron and systematic representation of the generator (A) Pictures of a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator and a cyclotron; (B) Schematic presentation of the cross section of a column - based generator (from Velikyan, 2015).

1.2.1. Ar PSMA ligandiem konjugēti radionuklīdi

PSMA (prostatas specifiskais membrānas antigēns) ir otrā tipa membrānas proteīns, kas ir ekspresēts visos prostatas audu veidos, ieskaitot karcinomas. PSMA ir unikāla 3-daļu struktūra: 19-aminoskābju gara iekšējā daļa, 24-aminoskābju gara transmembrānas daļa un 707-aminoskābju gara ārējā daļa (3. attēls); PSMA gēns atrodas 11. hromosomas īsajā plecā. (Chang, 2004).



3. attēls. PSMA shematiskais attēlojums.

Fifuge 3. Schematic of prostate-specific membrane antigen (PSMA).

Šis šūnu virsmas proteīns, bieži tiek internalizēts šūnās pēc to saistīšanās ar ligandu. Tas ir 750 aminoskābju garš un 84 kDa smags proteīns, kas tiek pastiprināti ekspresēts PV šūnās, ekspresija būtiski palielinās zemas diferenciacijas pakāpes metastazējošos audzējos, kā arī androgēnu hormonu terapijas rezultātā. (Eder et al., 2012). PSMA stimulē PV šūnu proliferāciju, migrāciju un izdzīvošanu, izmantojot fosfora - p38 (P - p38) MAPK ceļu vēža šūnās. PSMA ietekmē PV metastāžu veidošanos un tā līmenis organismā ir svarīgs rādītājs slimības iznākuma novērtēšanā. Tomēr, tas nav pilnībā prostatas specifisks un tiek ekspresēts arī normālās šūnās, tai skaitā tievajā zarnā, nieru kanāliņos, siekalu dziedzeros un vairogdziedzera neoplāzmās (Virgolini, Decristoforo, Haug, Fanti, & Uprimny, 2018).

Pēdējo gadu laikā pozitronu emisijas tomogrāfijas (PET) analīzēm klīnikā tiek pielietoti dažādi PSMA inhibitori. Visplašāk literatūrā ir aprakstīts tieši ^{68}Ga - PSMA - 11, Eiropas Nukleārās medicīnas asociācijas (EANM) un Kodolmedicīnas Biedrības (SNM) izveidotās vadlīnijas pieņem, ka nav lielas starpības starp ^{68}Ga - PSMA ligandiem, bet nav veikti konkrēti salīdzinoši pētījumi. Pirmie ^{68}Ga radionuklīdi marķēti ar prostatas specifisko membrānas antigēnu (PSMA) saistošu ligandu, tika uzsintezēti un validēti vairāk kā 20 gadus atpakaļ, Džonsa Hopkina

universitātē, ASV (Virgolini et al., 2018). Vēlāk tika aprakstīts ligands ^{68}Ga – PSMA - 11, kas demonstrēja augstu saistīšanās spēju ar cilvēka PSMA un specifisku internalizāciju prostatas vēža šūnās (Eder et al., 2012). ^{68}Ga – PSMA - 11 bioloģiskā izplatība sakrīt ar labi zināmām PSMA ekspresijas vietām orgānos. Citi ligandi, piemēram, ^{68}Ga – PSMA - 617 un ^{68}Ga – PSMA - I&T, uzrāda līdzīgus rezultātus PET (Fendler et al., 2017).

Primārā diagnostika ar ^{68}Ga - PSMA pozitronu emisijas datora tomogrāfijā (PET/CT) ir ļoti nozīmīga pacientiem ar augsta riska prostatas vēzi. Sekundārajā diagnostikā lokālu audzēju diagnostikai biežāk izmantota metode ir PET/mpMR – pozitronu emisijas un vairāku parametru magnētiskās rezonanses kombinācija, kamēr metastāžu diagnostikas gadījumā šīs metodes ir pielīdzināmas viena otrai, bet PET/CT ir lētāka un ātrāka (Virgolini et al., 2018).

Nozīmīgi klīnisko pētījumu rezultāti ir sasniegti ar radioaktīvi iezīmētu PSMA ligandu kastrācijas rezistentā prostatas vēža (CRPC) gadījumā, ārstējot pacientus ar ^{177}Lu - PSMA. Potenciāli rezultātus varētu sniegt α emiteri kombinācijā ar β - emiteriem. (Virgolini et al., 2018). Jaunākie dati ar ^{177}Lu / α – emitera - PSMA ligandiem uzrāda labvēlīgus rezultātus un augstu efektivitāti, pārsniedzot citu ligandu rezultātus pacientiem ar CRPC (Virgolini et al., 2018).

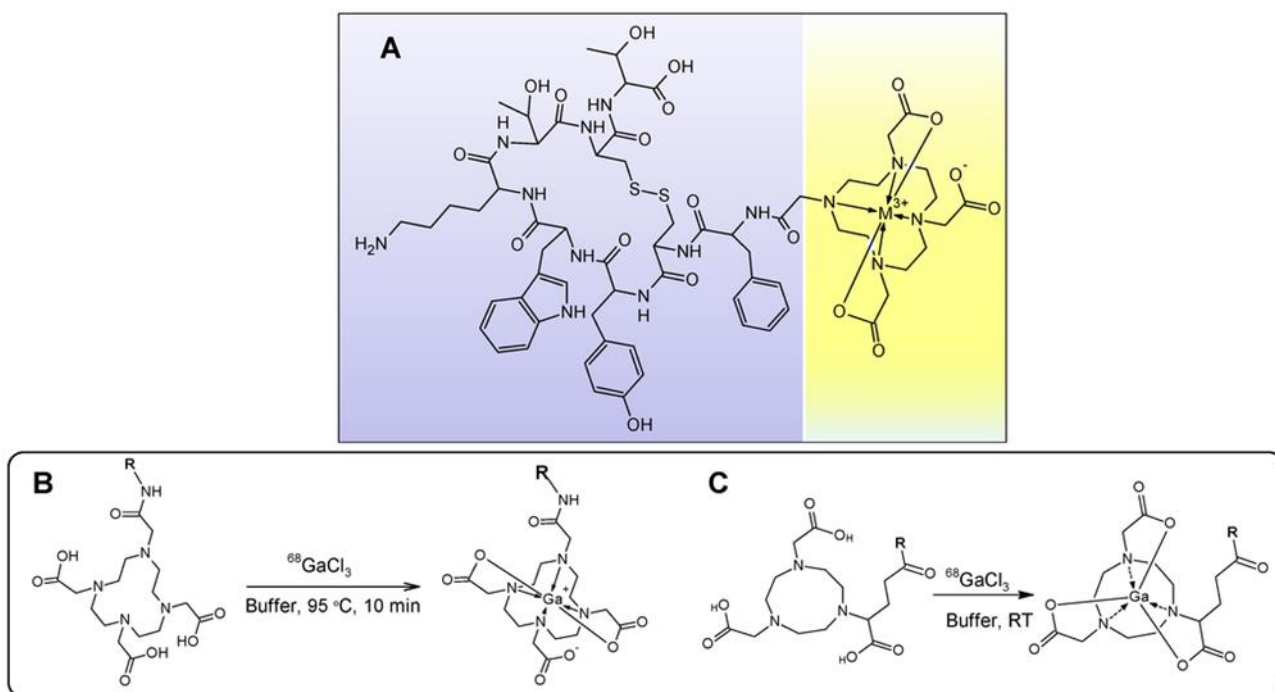
1.2.2. Ar somatostatīna receptoru ligandiem konjugēti radionuklīdi

Somatostatīna receptori (SSTR) ir augsti ekspresēti neuroendokrīnajās šūnās. SSTR ir šūnu virsmas proteīni, kas saistās ar somatostatīnu (SST) un izraisa iekššūnas izmaiņas, kas ietekmē šūnu uzvedību. SST ir hipotalāma un aizkuņģa dziedzera hormons, kā arī centrālais un perifērais neurotransmiters. Aktivētie SSTR hipofīzes šūnās kavē augšanas hormona izdalīšanos; endokrīnās un kuņģa - zarnu trakta šūnas regulē barības vielu uzsūkšanos un izmantošanu; un SST neironos ir neurotransmitera loma (Fani et al., 2017). Ir zināmi pieci somatostatīna receptoru apakštipi (SSTR1 - SSTR5), kur SSTR2 (otrā apakštipa somatostatīna receptors) ir visvairāk ekspresēts neuroendokrīnajos audzējos (NET) (Reubi, Waser, Schaer, & Laissue, 2001). NET tips ar visaugstāko SSTR2 ekspresiju ir aizkuņģa dziedzera vēzis, kam seko hipofīzes adenomas, plaušu karcinomas, sīkšūnu plaušu vēzis, Merkel šūnu karcinomas, medulārās vairogdziedzera karcinomas un neuroblastomas (Pauwels, Cleeren, Bormans, & Deroose, 2018).

Pašlaik NET diagnostikā izmanto ar SSTR2 ligandiem (somatostatīna analogiem) konjugētus radionuklīdus (Fani et al., 2017). Būtisks solis neuroendokrīno audzēju diagnostikas uzlabošanā bija ^{68}Ga marķēto SSTR2 analogu ieviešana pozitronu emisijas tomogrāfijā (PET) (4. attēls), uzlabojot attēlu izšķirtspēju salīdzinājumā ar iepriekš izmantotajiem radionuklīdiem, piemēram

¹¹¹In un ^{99m}Tc (Pauwels et al., 2018; Sollini et al., 2014). Marķieri, kas pašlaik ir klīniski pieejami: ⁶⁸Ga – DOTA - Tyr3 - oktreotīds (⁶⁸Ga - DOTATOC), ⁶⁸Ga – DOTA - Tyr3 - oktreotāts (⁶⁸Ga - DOTATATE) un ⁶⁸Ga – DOTA – 1 - NaI3 - oktreotīds (⁶⁸Ga - DOTANOC), ko kopā dēvē par ⁶⁸Ga – DOTA - peptīdiem. ⁶⁸Ga – DOTA - peptīds PET izmeklējumos ir aizstājis ¹¹¹In – DTPA - oktreotīdu, tomēr ⁶⁸Ga – DOTA - peptīdu ieviešana ikdienas klīniskajā praksē bieži vien ir ierobežota ar praktiskiem, ekonomiskiem un regulējošiem faktoriem, kas saistīti ar pašreizējās ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ģeneratoru paaudzes izmantošanu. Centralizēta ražošana un izplatīšana ir sarežģīta dēļ zemā ražošanas apjoma un ⁶⁸Ga salīdzinoši īso pussabrukšanas periodu ($T_{1/2}=67,63$ min). Turklāt ⁶⁸Ga ir relatīvi liels pozitronu diapazons (maksimālais - 8.9mm, vidēji - 2.9mm), kas mazina telpisko izšķirtspēju PET (Pauwels et al., 2018). Lai palielinātu SSTR saistīšanās afinitāti, ir rūpīgi jāizvērtē marķiera izvēle. Ir svarīgi saprast, ka pat nelielas izmaiņas peptīda aminoskābju secībā vai atšķirīga peptīdu vai radionuklīda izvēle var izraisīt atšķirīgu afinitātes profilu (Johnbeck, Knigge, & Kjær, 2014).

2017. Gadā FDA un EMA oficiāli atzina “Lutathera” radiofarmaceutiska preparāta izmantošanu NET terapijā. Lutathera (¹⁷⁷Lu oksidotretotīds) ir somatostatīna receptoru ar ¹⁷⁷Lu iezīmēts agonists. Lutathera izmanto, lai ārstētu NET, ko ķirurģiski nav iespējams izņemt un tiem, kas ir metastazējušies uz citiem orgāniem vai nereaģē uz terapiju (European medicines agency, 2017).



4. Attēls. (A) DOTA - TATE ķīmiskā formula, kur bioloģiski aktīvais vektora peptīds (TATE, violets fons) ir savienots ar DOTA helātu (dzeltens fons); (B,C) ^{68}Ga marķēšanas shematiskais attēlojums ar DOTA - un NOTA - bāzes ligandiem, R apzīmē makromolekulu, piemēram peptīdu, proteīnu, glikoproteīnu, antivielu vai mazas molekulas vektoru, kas nogādā radionuklīdu līdz mērķa orgānam (adaptēts no Velikyan, 2015).

Figure 4. (A) Chemical structure of DOTA - TATE where the biologically active vector peptide (TATE, purple background) is conjugated to DOTA chelate moiety (yellow background) encaging the metal cation; (B,C) schematic presentation of ^{68}Ga - labeling, respectively, with DOTA - and NOTA - based ligands, where R stands for a macromolecule such as peptide, protein, oligonucleotide, glycoprotein, antibody or low molecular weight vector that can deliver the radionuclide to the binding site (addapted from Velikyan, 2015).

1.2.3. Radionuklīdu izraisītie blakusefekti

Radiācijas terapijas laikā jonizējošais starojums ietekmē ne tikai šūnas, kam molekulāri mērķētais radionuklīds piesaistījies, bet arī to blakus esošās šūnas, kas nesaņem tiešu starojumu. Tiek uzskatīts, ka šajās šūnās tiek inducēti līdzīgi efekti, kā šūnās, kuras ir tieši apstarotas. Šos procesus dēvē par blakusefektiem (*bystander effect*). Šīs inducētās izmaiņas iekļauj DNS bojājumus, mutācijas, hromosomālās izmaiņas un šo bojājumu ierosinātu šūnu apoptozi (Marín et al., 2015).

Šis radiobioloģiskais efekts pirmoreiz tika aprakstīts 1992. gadā, raksturojot māshromatīdu apmaiņas inducēšanu ar mazās dozas α - daļiņām (Nagasawa & Little, 1992). Kopš šī efekta atklāšanas ir tikuši veikti eksperimenti *in vivo* un *in vitro* izmantojot radionuklīdus kas emitē α un β^- daļiņas. No šiem pētījumiem ir secināts, ka zemas dozas jonizējošais starojums izsauc bioloģiskas izmaiņas gan tieši, gan netieši apstarotajās šūnās (Azzam & Little, 2004). Ir veikti vairāki pētījumi ar molekulāri mērķētiem ^3H radionuklīdiem, piemēram, *in vitro* deoksitimidīns ($^3\text{HTdR}$) vai deoksicitidīns (^3HdC). ^3H emitē β daļiņas ar enerģijas diapazona spektru no 0–18,6 keV (vidējais 5.7 keV), un tam emisijas diapazons ir aptuveni 1 μm ūdenī, tātad, kad tas ir lokalizēts šūnu kodolā, parasti neapstaro blakus esošās šūnas. Šobrīd ^{177}Lu terapiju izmanto kā pēdējās līnijas terapiju termināliem vēža pacientiem.

PV pētniecībā visbiežāk tiek izmantotas PC3 un LNCaP vēža šūnu līnijas. Pētījumiem ir pieejams milzīgs dažādu šūnu līniju skaits ar atšķirīgiem marķieriem un marķieru ekspresijas līmeņiem (Cunningham & You, 2015). Vēža šūnas kultivējot *in vitro*, tām ir viegli mainīt vidi, kurā tās tiek audzētas, tādējādi ietekmējot augšanas apstākļus un pielāgojot tās konkrētām analīzēm (Sandercock et al., 2015). Piemēram, vienas šūnas attēla veidošana un reālā laika biomarķiera monitorings var sniegt precīzākus datus par audzēja atbildes reakciju uz konkrētu savienojumu (Horvath et al., 2016). Augstas jutības analīzes veicina īsāku eksperimenta laiku un ļauj iegūt detalizētāku fenotipa informāciju, salīdzinājumā ar *in vivo* eksperimentiem (Sandercock et al., 2015).

3D šūnu kultūras, bioinženierijas un tehnoloģiju attīstība ir veicinājusi jaunu *in vitro* modeļu attīstību, kas ietver vairākus šūnu tipus, ekstracelulārā matricas olbaltumvielas un citus faktorus, kas labāk atdarina audzēja mikrovidi (Jackson & Thomas, 2017).

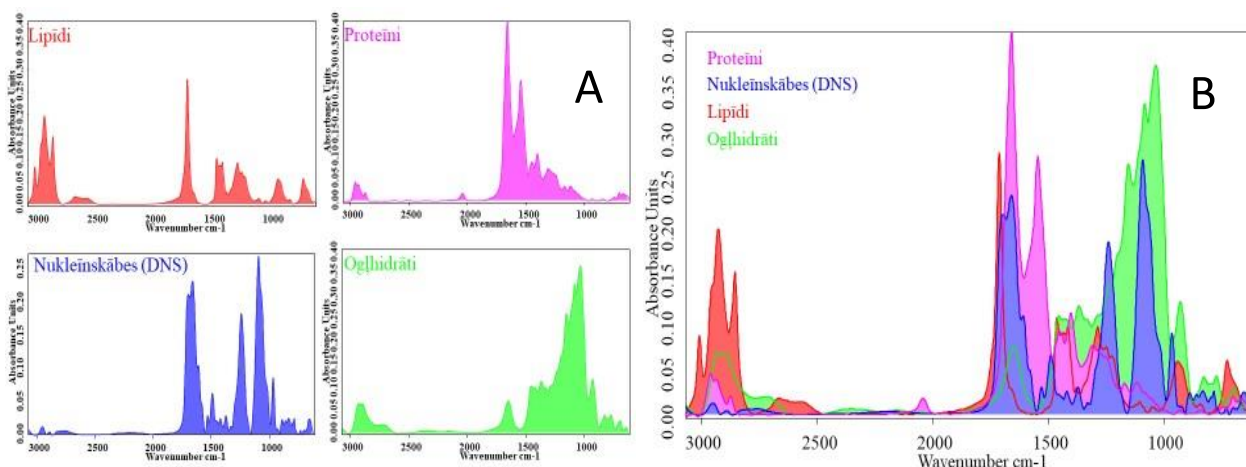
1.3. FTIS un vēža šūnu biomolekulārie profili

Infrasarkanā spektroskopija (IS spektroskopija) ir nozīmīga materiālu analīzes metode jau vairāk kā 70 gadus. Katrai molekulai un ķīmiskajai saitei ir sava īpatnējā svārstību frekvence un amplitūda; svārstības frekvence ir atkarīga no iesaistītajām ķīmiskajām saitēm un savienojuma enerģijas līmeņa stāvokļa. Infrasarkanajā spektroskopijā, lai ierosinātu svārstības, izmanto infrasarkanā starojuma kūli un nosaka molekulu/ķīmisko saišu absorbētās enerģijas maksimumu atkarībā no viļņu garuma. Dažādām ķīmiskajām saitēm ir dažāds to iesvārstīšanai nepieciešamais enerģijas daudzums, tādēļ dažāda viļņa garuma infrasarkanais starojums ierosina dažādas ķīmisko saišu svārstības. Atbilstoši Lamberta - Bēra likumam, savienojumā atrasto ķīmisko saišu daudzums

ir tieši proporcionāls spektra absorbcijas intensitātei. Līdz ar to, infrasarkanā spektroskopiju var izmantot gan kā kvantitatīvu, gan kvalitatīvu analīzes metodi. Datu analizēšanai ir nepieciešams parauga infrasarkanais spektrs. Lai rezultātus varētu precīzi interpretēt, ir nepieciešams atšķirt dažādas frekvences. Tas ir iespējams ar matemātiska pārveidojuma palīdzību – ar Furjē transformāciju. Pārveidojumu veic dators, kas parāda analizētajam no interferences ainas caur Furjē transformāciju ekstrapolēto absorbcijas vai transmisijas spektru (Ganzoury, Allam, Nicolet, & All, 2015).

Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (FTIS) ir plaši pielietota metode; tā ir ātrāka un precīzāka, kā citas spektroskopijas metodes (piemēram, masspektrometrija (MS), un Raman infrasarkanā spektroskopija (RIS)). Mērījuma laikā vienlaicīgi tiek mērītas visas frekvences, tādēļ rezultāti ir ātri iegūstami, mērījums ilgst tikai līdz minūtei (Ganzoury et al., 2015).

Metode tiek plaši pielietota bioloģiskā materiāla makromolekulāro profilu (ogļhidrātu, olbaltumvielu, lipīdu, nukleīnskābju, u.c. molekulu) raksturošanai, kas ļauj vienlaicīgi identificēt konkrētas molekulas un to ķīmisko struktūru izmaiņas. Šūnas ir jutīgas pret augšanas apstākļu izmaiņām, jebkuras izmaiņas provocē šūnās makromolekulārā sastāva izmaiņas, ko ir iespējams noteikt, izmantojot FTIS spektroskopiju. 5. attēlā redzami šūnu makromolekulāro komponentu standartu spektri un to savstarpējā pārklāšanās (Švirksts, 2014).



5. attēls. Makromolekulāro komponentu standartu Furjē transformācijas infrasarkanie spektri (A) un to savstarpējā pārklāšanās (B) (no Švirksts, 2014).

Figure 5. Fourier transform infrared spectra of cell macromolecular component standards (A) and their overlapping (B) (from Švirksts, 2014).

Ar šo informāciju ir iespējams noteikt, kurš infrasarkanā spektra apgabals vislabāk atspoguļo katru no makromolekulārajām komponentēm. Lipīdiem tas ir apgabals no 3000 - 2800 cm^{-1} , proteīniem 1700 - 1500 cm^{-1} , nukleīnskābēm ap 1240 cm^{-1} un ogļhidrātiem 1200 - 900 cm^{-1} (Naumann, 2001).

Kā jau ikkatrai metodei, arī FTIS ir savas priekšrocības un trūkumi (Ganzoury et al., 2015).

Priekšrocības:

- FTIS ir jūtīga metode, tai ir vajadzīgs neliels parauga daudzums (μl , ng, μg);
- Metode ir informatīva, tā vienlaicīgi ļauj detektēt un identificēt ogļhidrātus, proteīnus, lipīdus un nukleīnskābes. Ir iespējams noteikt to aptuveno koncentrāciju paraugā;
- Paraugi var tikt mērīti dažādos agregātos, tie var būt šķidrā, gāzveida vai pulvera veidā. Ir iespējams mērīt polimērus, organiskus un neorganiskus paraugus, kā arī bioloģiskus paraugus;
- Salīdzinoši lēta metode.

Trūkumi:

- Tā kā analīzei ir nepieciešami nelieli tilpumi, nelieli piemaisījumi paraugam ir viegli saskatāmi spektrā;
- Vielu maisījumi dažkārt mēdz veidot spektra pārklāšanos, kas noved pie nepareizas rezultātu analīzes;
- Ūdens un apkārtējā vide var ietekmēt spektra iznākumu, var veidoties nobīdes.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Vēža šūnu līnijas

Šī darba ietvaros tika izvēlētas divas prostatas vēža šūnu līnijas (PC3 un LNCaP), trīs neuroendokrīno audzēju šūnu līnijas (Ar42J, CorL23 un NCI-H69) un ādas fibroblastu šūnu līnija – Hs68.

- PC3 ir prostatas vēža šūnu līnija, kas iegūta no sadarbības partneriem Oslo Universitātē. PC3 oriģināli ir izdalīta no PC kaulu metastāzēm. PC3 tika kultivētas DMEM barotnē ar 10% FBS, 2mM L – glutamīnu un antibiotic – antimycotis (AA) Šūnas aug adherenti un tika kultivētas no 12 līdz 20 pasāžai.
- LNCaP ir prostatas vēža šūnu līnija, izdalīta no limfmezglu metastāzēm. LNCaP tika kultivētas RPMI1640 barotnē ar 10% FBS, 2mM L – glutamīnu un AA. Šūnas aug adherenti, atsevišķi viena no otras vai veidojot šūnu kopas, kas ir viegli pieķērušās pie flaska pamatnes, šūnas kultivētas no 80 līdz 85 pasāžai. CLC
- Hs68 ir ādas fibroblasti; Šūnas saņemtas no BMC šūnu bankas, tās tika kultivētas DMEM barotnē ar 10% FBS, 2mM L – glutamīnu un AA. Tās aug adherenti monoslānī, šūnas kultivētas no 30 līdz 34 pasāžai.
- Ar42J ir žurkas aizkuņģa dziedzera vēzis; Šūnas iegādātas no CLS (Cell line services, Vācija) Ar42J tika kultivētas RPMI1640 barotnē ar 10% FBS, 2mM L – glutamīnu un AA. Šūnas aug lēni, adherenti un veido šūnu kopas, tās tika kultivētas no 35 līdz 40 pasāžai. CLS
- CorL23 ir lielūnu plaušu vēzis Saņemtas no BMC šūnu bankas. CorL23 tika kultivētas DMEM barotnē ar 10% FBS, 2mM L – glutamīnu un AA. Šūnas aug adherenti, monoslānī un tika kultivētas no 11 līdz 15 pasāžai. BMC šūnu banka

NCI-H69 ir sīkūnu plaušu vēzis. Saņemtas no BMC šūnu bankas. NCI-H69 tika kultivētas RPMI1640 barotnē ar 10% FBS, 2mM L līdz – glutamīnu un AA. Šūnas aug suspensijā peldošās šūnu kopās, kultivētas 8 no 12 pasāžai.

2.1.2. Barotnes

1. Tabula. Barotņu sastāvs

Table 1. Contents of the complete medium

Npk.	Šūnu līnija	Izmantotā barotne	Ražotājs	Pilnas barotnes sastāvs
1.	PC3; Hs68	DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV	DMEM; 1% L – glutamīns (2mM); 1% AA (2mM); 10% FBS;
2.	LNCaP; NCI - H69; CorL23	RPMI 1640	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV	RPMI 1640; 1% L – glutamīns (2mM); 1% AA (2mM); 10% FBS;
3.	Sfēru (bezseruma) barotne Visām šūnu līnijām vienāda	DMEM - F12	Lonza, ASV	DMEM - F12; 1% L – glutamīns (2mM); 1% AA (2mM); 0,1% EGF (20ng/ml); 0,05% Insulīns (1μg/ml); 1% Hidrokortizols (96μg/ml); 2% B27 (20 ml/L)
4.	Saldēšanas barotne PC3; Hs68	DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV	DMEM; 20% FBS; 20% DMSO; 1% L – glutamīns (2mM); 1% AA (2mM);
5.	Saldēšanas barotne LNCaP; NCI - H69; CorL23	RPMI 1640	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV	RPMI 1640; 20% FBS; 20% DMSO; 1% L – glutamīns (2mM); 1% AA (2mM);

2.1.3. Ķīmiskie reaģenti

2. Tabula. Ķīmiskie reaģenti un to ražotāji

Table 2. Chemical reagents and their producers

Ķīmiskie reaģenti	Ražotājs
¹⁷⁷ Lu 0,05 M HCl šķīdumā	ITG (Isotope Technologies Garching), Vācija
Antibiotic – antimicotic	Introvigen, ASV
B - 27 piedeva	Thermo Fisher Scientific, ASV
BSA	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
DMEM - F12	Lonza, ASV

DMSO	Thermo Fisher Scientific, ASV
EGF 236 - E6 - 200	R&D Systems, ASV
Etanols (96%)	SIA "Kalsnavas elevators"
FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
L-glutamīns	Lonza, Beļģija
Metanols	Peahim, Krievija
PBS	Fisher BioReagents, Fisher Scientific UK Ltd, Apvienotā karaliste
RPMI 1640	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ASV
Tripsīns	Sigma - Aldrich, ASV
Tween 20	Sigma - Aldrich

2.1.4 Reaģentu komplekti un antivielas

3. Tabula. Reaģentu komplekti, antivielas un to ražotāji

Table 3. Reagent kits, antibodies and their producers

Reaģentu komplekti un antivielas	Ražotājs
Anti - SSTR2 anti viela (ab9550)	Abcam, Lielbritānija
Anti-PSMA anti viela (ab41034)	Abcam, Lielbritānija
Kazas pret-truša IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077)	Abcam, Lielbritānija

2.1.5. Aprīkojums un materiāli

4. Tabula. Aprīkojums, materiāli un ražotājs

Table 4. Equipment, materials and their producers

Aparatūra un aprīkojums	Ražotājs
Autoklāvs	Labo Autoclave MLS - 3020U, SANYO, Japāna
Automātiskais sintēzes modulis	GRP, Scintomics GmbH, Vācija
BSC otrās klases lamināri	Biowizard, KOJAIR, Vācija
Centrifūgas	Avanti J - 30I, BECKMAN COULTER, USA; Microspin – FV - 2400, Biosan, Latvija; Sigma 1 - 15PK, DJB Labcare, UK; Eppendorf Centrifuge 5804 R, Vācija; Eppendorf Ceentrifuge 5415 D, Vācija; Biosan, Latvija
CO2 inkubators	SANYO O2/CO2 incubator MCO - 18AIC, Japāna, Panasonic MCO - 18AC - PE, Japāna;

	Biosan, Latvija
Endosafe® nexgen-PTS™	Charles river, ASV
Fotoluminiscences mikroskops; Inversais gaismas mikroskops	Leica DM 3000, Vācija; Motic MXH - 100, Honkonga
Gāzes deglis	Tecniplast Group, Itālija
Infrasarkanais spektrometrs Vertex 70 ar mikroplašu lasītāju HTS - XT	Bruker Optics, Vācija
Kelvinators	Dairei europe a/s, Dānija
Magnētiskais maisītājs	Labmixer Magnetic stirrer, Labotex, Latvija
Orbitālais kratītājs	Orbital Shaker OS - 20, Biosan, Latvija
Pipetes	Ependorf, Vācija Gilson, ASV
Ražošanas izolators	Tema Sinergie, Itālija
Šķidrā slāpekļa tanks	MVE CryoSystem 6000, ASV
Ūdens termostats	GFL, Biosan, Latvija
Vorteksi	Vortex - Genie 2, Scientific Industries, ASV; Biosan, Latvija
ZnSe mikroplate	Bruker Optics, Vācija
Izolators	NMC50 68Ga, TEMA Sinergie, Vācija
Sintēzes vadības programma	GRP Interface, Scintomics GmbH, Vācija
Dozas kalibrators	Curiementor 4, PTW Freiburg, Vācija

2.1.6. Darba drošība

Darbam laboratorijā ir jālieto individuālie aizsardzības līdzekļi (IAL) - laboratorijas halāts, vienreizlietojamie cimdī, aizsargcepure, darba apavi un, ja nepieciešams, sejas aizsarg maska. Šūnu laboratorijā, šāds apģērbs ir nepieciešams, lai nodrošinātu sterilitāti tīrajās telpās, pasargātu šūnu kultūras un reaģentus no kontaminācijas un pasargātu sevi no kaitīgām vielām. Lai efektīvi uzturētu sterilitāti, šūnu laboratorijās, pirms un pēc darba lamināra darba virsmas dezinficē ar 70% etanola šķīdumu, darbu beidzot, to papildus sterilizē ar UV gaismu. Darbam nepieciešamās sastāvdaļas (reaģenti un iepakojumi) pirms ienešanas laminārā dezinficē ar 70% etanola šķīdumu. Pēc reaģentu un kultūru atvēršanas, atveres zona jāsterilizē liesmā, tādējādi samazinot reaģentu un šūnu kultūru kontaminācijas risku. Strādājot ar vairākām šūnu kultūrām, svarīgi ir dezinficēt lamināra virsmas pēc darba beigšanas ar katru no kultūrām, samazinot kultūru savstarpējo kontamināciju.

Radiācijas drošība

Absorbētā doza (D) ir radiācijas dozimetrijas vienība, kas raksturo enerģijas akumulāciju audos (vienība džouls, J) uz masas vienību (kg), $D=J/kg$, ko apzīmē ar vienību grejs (Gy).

Radiācijas bioloģiskais efekts nav atkarīgs tikai no absorbētās enerģijas daudzuma, bet arī no tās izplatīšanās mikroskopiskā līmenī, kas ir atkarīgs no cilvēka specifiskās biokinētikas un radiācijas īpašībām. Tiek izšķirta ekvivalentā (H_T) un efektīvā doza (H), tās tiek mērītas zīvertos (Sv) (Health Protection Agency et al., 2007). Efektīvo dozu aprēķina ņemot vērā attiecīgā starojuma bioloģisko iedarbību. Efektīvo dozu reizinot ar specifisku faktoru (W_R), kas ir atkarīgs no jonizējošā starojuma veida (skat. 6. tabulu), var pielīdzināt absorbētajai dozai un raksturot bioloģiskās iedarbības efektivitāti (Health Protection Agency et al., 2007).

5. Tabula W_R faktori, kas attiecināmi uz relatīvo bioloģisko efektivitāti dažādiem starojumiem (Health Protection Agency et al., 2007)

Table 5. Radiation weighting factors used to represent relative biological effectiveness (Health Protection Agency et al., 2007)

Starojuma veids	W_R
Rentgena stari, gamma stari, beta daļiņas	1
Neitronu starojums (<1 MeV)	$2,5 + 18,2e^{-1[\ln(E)]^2/6}$
Neitronu starojums (1 - 50 MeV)	$5,0 + 17,0e^{-1[\ln(2E)]^2/6}$
Neitronu starojums (> 50 MeV)	$2,5 + 3,25e^{-1[\ln(0,04E)]^2/6}$
Protoni	2
Alfa daļiņas	20

Internacionālā radiobioloģiskās aizsardzības komisija (ICRP) ir izveidojusi rekomendācijas, pēc kurām ir izveidoti internacionālie (IAEA) un reģionālie (EU) drošības standarti (BSS) (European Commission, 2014; Health Protection Agency et al., 2007; IAEA, 1996). Personāls, kas strādā šajā jomā tiek iedalīts divās kategorijās: A grupa, darbinieki, kuri var saņemt efektīvo dozu, kas ir lielāka par 6 mSv gadā, ekvivalento dozu lielāku par 20 mSv gadā uz acs lēcām un ekvivalento dozu, kas ir lielāka par 150 mSv gadā uz ādas un ekstremitātēm. B grupas darbinieki ir tie kas pārsniegs iedzīvotāju efektīvās un ekvivalentās dozas limitus, bet nepārsniegs A grupas darbinieku limitus (skat. 2. Tabulu) (European Association of Nuclear Medicine, 2018).

6. Tabula Rekomendētie dozas limiti, plānotas iedarbības gadījumā (IAEA, 2011)

Table 6. Recommended dose limits in planned exposure situations (IAEA, 2011)

Limitējošais faktors	Speciālistam		Pilsonim
	A grupas darbinieks	B grupas darbinieks	
Efektīvā doza	20 mSv gadā	6 mSv gadā	1mSv gadā
Gada ekvivalentā doza:			
Acs lēcā	20 mSv	20 mSv	15mSv
Ādā	500 mSv	150 mSv	50 mSv
Rokas un kājas	500 mSv	150 mSv	Nav definēts

Radiācijas izmantošana kodolmedicīnā ir plānota radiācijas iedarbības situācija, tā tiek regulēta specifiskos darba apstākļos, lai limitētu darbinieku saskari ar radioaktīvo preparātu, kā arī lai nodrošinātu produkta tīrību un sterilitāti (IAEA, 2011). Lai samazinātu radiācijas iedarbību strādājot ar radioaktīvu preparātu, ir izvirzītas sekojošas darbības (European Association of Nuclear Medicine, 2018):

1. Samazināt pavadīto laiku pie radiācijas avota;
2. Palielināt attālumu starp sevi un radiācijas avotu;
3. Izmantot aizsargbarjeras un IAL.

Darbam laboratorijā lieto, laboratorijas apģērbu, uz apaviem uzvelkamās bahilas, mutes aizsargus, aizsargcepuri un gumijas cimdus. Strādājot radiofarmācijas laboratorijā, darbiniekiem ir jāizmanto individuālie dozimetri, kurus piestiprina pie darba tērpa.

Ja tīrajās telpās vai izolatorā konstatēta piesārņojuma (mikrobioloģiskais piesārņojums un/vai gaisa piesārņojums ar daļiņām) gadījumā veic ārpuskārtas tīrīšanas un dezinfekcijas darbus saskaņā ar atbilstošo instrukciju. Ražošanas procesu ir atļauts turpināt, kad viss piesārņojums ir novērsts un monitoringa rezultāti atbilst noteiktajām normām.

2.2. Metodes

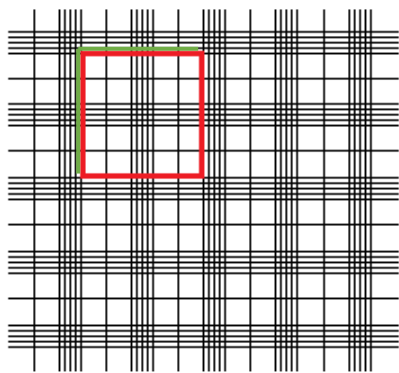
2.2.1. Zidītāju vēža šūnu līniju kultivēšana

Eikariotu šūnu kultivēšana laboratorijā mūsdienās ir plaši izmantota metode, ar kuras palīdzību ir iespējams kultivēt šūnas ārpus samniekorganisma. Pētījumos izmantotās vēža šūnu līnijas ir komerciāli pieejamas un var tikt pasūtītas no dažādām kompānijām. Ir pieejamas plašas šūnu bankas. Šūnas no ražotāja tiek saņemtas sasaldētas konkrētā skaitā .

Sākot darbu, visas nepieciešamie reaģenti un barotnes tiek uzsildīti ūdens termostatā līdz +37°C. Atsaldējot šūnas, tās tiek ātri pārvietotas no šķidrā slāpekļa uz ūdens vannu(37°C),

pārnestas uz 15 ml stobriņu, kur tām tiek lēnām, pa pilienam, pievienota svaiga barotne. Barotne tiek pievienota lēnām, lai šūnas neaiziet bojā strauja osmotiskā spiediena maiņas rezultātā. Šūnas tiek centrifugētas 5 min, 300 rpm, noņem supernatantu un šūnas resuspendē 5 ml svaigā barotnē. Tās tiek pārnestas 25 cm² flaskā. Šūnas kultivē inkubatorā (+37 °C, 5% CO₂), katrai šūnu līnijai specifiskā barotnē (skat. 1. tabulu) līdz sasniedz 80% konfluenci. Sasniedzot konfluenci, šūnas tiek tripsinizētas un skaitītas.

Šūnu skaitīšanai izmanto Gorjajeva kameru. Kamerā pārnes ~10 μl šūnu suspensijas. Kameru, kurā atrodas šūnas, aplūko inversajā gaismas mikroskopā 20x palielinājumā. Skaita šūnas, kuras atrodas lielajos kvadrātos (attēlā iekrāsots ar sarkanu) un uz katra lielā kvadrāta divām malām (attēlā iekrāsots ar zaļu) (Skatīt 6. attēlu). Aprēķina šūnu vidējo skaitu vienā lielajā kvadrātā (6. attēls). Šūnas skaita četros šādos kvadrātos, aprēķina vidējo šūnu skaitu kvadrātos (n). Šūnu kopējo skaitu uz 1 ml barotnes aprēķina: $n \times 1 \times 10^4$.



6.attēls Gorjajeva kameras lielais kvadrāts, attēlā iekrāsots ar sarkanu.

Figure 6. A big square of Gorjajev cell counting chamber, red square.

Ja šūnas ir nepieciešams pavairot lielākā skaitā, tās tiek pārnestas lielākā flaskā un audzētas līdz nepieciešamajam daudzumam. Šūnas priekš eksperimentiem tiek iesētas flaskos vai bedrīšu platēs konkrētā skaitā, flasku un bedrīšu plašu parametrus skatīt 7. tabulā.

Kad tās vairs nav nepieciešamas eksperimentiem, tiek sasaldētas konkrētā skaitā. Parasti saldē 1x10⁶ šūnu vienā saldēšanas stobriņā. Svarīgi ir saldēšanas barotnes lēna pievienošana esošajai barotnei, līdzīgā kā šūnas atsaldējot, lai tās neaiziet bojā strauja osmotiskā spiediena maiņas rezultātā. Saldēšanas barotni parasti sagatavo divās daļās - puse no tilpuma sastāv no barotnes ar 20% FBS, otra puse sastāv no parastās barotnes ar 20% DMSO. Šūnas pēc skaitīšanas tiek centrifugētas un resuspendētas barotnē ar 20% FBS, kurai lēnām tiek pievienota barotne ar 20% DMSO. Stobriņus ievieto speciālā saldēšanas traukā, kas nodrošina vienmērīgu un lēnu šūnu

sasalšanu. Saldēšanas trauku vismaz 24 stundas ievieto kelvinatorā (- 80°C), tālāk tiek pārvietotas uz šķidrā slāpekļa tanku.

7. Tabula. Šūnu kultūru uzturēšanas flasku un bedrīšu plašu parametri.

Table 7. Parameters of cell culture maintenance in flasks and multiple well plates.

	Kultivēšanas flasku un plašu izmēri	Ieteicamais barotnes daudzums (ml)	Sēšanas daudzums (šūnu skaits)	šūnu daudzums sasniedzot konfluenci (šūnu skaits)	Aptuvenais augšanas laukums (cm ²)
Flaski	25 cm ² flasks	3 - 5	0,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	25
	75 cm ² flasks	8 - 15	2,1 x 10 ⁶	8,4 x 10 ⁶	75
	175 cm ² flasks	35 - 53	4,9 x 10 ⁶	23,3 x 10 ⁶	175
Plates	6 bedrītes	1 - 3	0,3 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	9,6
	12 bedrītes	1 - 2	0,1 x 10 ⁶	0,5 x 10 ⁶	3,5
	24 bedrītes	0,5 - 1	0,05 x 10 ⁶	0,24 x 10 ⁶	1,9

2.2.2. Imūncitoķīmija

Imūnocitoķīmija (ICC) ir plaši izmantota laboratorijas metode proteīnu un antigēnu vizualizēšanai interesējošajā paraugā, izmantojot dažādas antivielas. Šī metode tika izmantota, jo, salīdzinot ar citām metodēm, tā ir ātra un lēta, jo neprasa daudz izejvielas, reaģentus, kā arī rezultāti ir ātri iegūstami. Šo metodi ir viegli atkārtot, ja izstrādes procesā ir pieļautas kļūdas. Izšķir divu veidu imūnocitoķīmijas testus: Netiešā un tiešā imūnocitoķīmija. Netiešās imūnocitoķīmijas protokols ietver šūnu paraugu sagatavošanu, šūnu fiksēšanu, seruma bloķēšanu, primārās antivielas inkubēšanu, marķētas sekundārās antivielas inkubēšanu, krāsošanu un attēlu uzņemšanu, analīzi. Tiešās imūnocitoķīmijas testa protokols ietver iepriekš minētos soļus, izņemot sekundārās antivielas inkubāciju. Tiešajā imūnocitoķīmijas protokolā izmanto tikai marķētu primāro antivielu.

Darba izstrādē ir pielietota netiešā imūnocitoķīmija, ar sekojošu darba protokolu.

Šūnu sagatavošana:

Kultivētas šūnas tripsinizē, skaita un sēj 24 bedrīšu platē, katrā pa 5 x 10⁴ šūnu 500 µl barotnes, inkubē pa nakti CO₂ inkubatorā (37 °C, 5% CO₂).

Paraugu apstrāde:

Protokolā sekojoši darbības soļi atšķiras adherentām un suspensijā augošām šūnām, aprakstīti darbības soļi tiek apzīmēti ar burtiem A - adherentām šūnām; B - suspensijas šūnām.

1. A – Noņem barotni, šūnas mazgā ar siltu PBS (37°C) 500 µl;

B – Šūnas savāc stobriņā, centrifugē un resuspendē 50ul PBS; paraugu uznes uz stikliņiem, kurus centrifugē 6 min, 1000 rpm.

2. Šūnas transportē uz bioķīmijas laboratoriju (A; B);
3. PBS noņem un pievieno ledus aukstu metanola – acetona šķīdumu (- 20°C), šūnas inkubē 20 min, saldētavā (A; B);
4. Šūnas mazgā ar aukstu PBS trīs reizes - 5 min, 90 rpm (A; B);
5. Šūnu paraugus bloķē 2% BSA/PBS (300 - 500ul uz bedrīti) uz kratītāja 30 min, istabas temperatūrā, 60 rpm(A; B);
6. Pievieno primāro antivielu, kas ir atšķaidīta 1% BSA/PBS, 300 µl uz katru bedrīti (PSMA un SSTR antivielu atšķaidījumi - 1:250), inkubē pa nakti, +4°C, uz kratītāja - 60 rpm (A; B);
7. Pēc inkubācijas paraugus mazgā PBS trīs reizes, 5 min, uz kratītāja - 90rpm (A; B);
8. Pievieno sekundāro antivielu, kas ir atšķaidīta 1% BSA/PBS, 300ul uz katru bedrīti (Kazas pret-truša antivielas atšķaidījums - 1:1000), inkubē vienu stundu, tumsā, istabas temperatūrā, uz kratītāja - 60 rpm (A; B);
9. Paraugus mazgā ar PBS, trīs reizes, 5 min, uz kratītāja - 90 rpm (A; B);
10. Paraugiem uzpilina pilienu DAPI, inkubē 5 min, tumsā (A; B);
11. Pievieno 300 µl PBS, stikliņus žāvē istabas temperatūrā, tumsā (A; B);;
12. A – Marķē priekšmetstikliņus, uz tiem uzliek paraugu mikroskopēšanas vidi, nožāvētos stikliņus ar paraugu uz leju uzliek uz priekšmetstikla, tādējādi tās ieslēdzot mikroskopēšanas vidē;
B – Marķē priekšmetstikliņus, uz paraugiem uzpilina paraugu ieslēgšanas vidi un uzliek segstikliņus.

Pēc ieslēgšanas mikroskopēšanas vidē, paraugus glabā ledusskapī, tumsā.

2.2.3. Radiofarmaceutisko preparātu sintēze

Ražošanu veic ar automātisko sintēzes moduli, kas ražots Scintomics GmbH, kontrolētā telpā (A klases Izolators, kas atrodas C klases tīrajā telpā). Katrai ražotajai sērijai izmanto vienreizēju ražošanas materiālu un reaģentu komplektu - kaseti, kas ražota ABX, saskaņā ar labas ražošanas prakses (GMP) prasībām. Katru sintēzes procesu kontrolē, izmantojot GRP lietotāja interfeisu (GRP User Interface Software) ar sintēzes sekvences programmu, kas izstrādāta Scintomics GmbH. Pirms sērijas ražošanas izolatorā un tam pieguļošajā C klases telpā veikta tīrīšana, lai

nodrošinātu telpu tīrības klases atbilstību. Preparātu sintēzi un kvalitātes kontroli veic apmācīts un sertificēts personāls.

⁶⁸Ga - Gallijs

⁶⁸Ga radionuklīdu iegūst, sabrūkot „mātes” radionuklīdam ⁶⁸Ge, ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ģeneratorā. ⁶⁸Ga galliju iegūst, eluējot ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ģeneratoru ar HCl (0,6 M), ⁶⁸Ga GaCl₃ šķīduma veidā, ⁶⁸Ge paliekot ģeneratora organiskajā matricā.

Ģeneratoram pirms izmantošanas jābūt kvalificētam pēc vairākiem parametriem:

- vizuālais novērtējums;
- eluāta kopējā aktivitāte un pH;
- identitāte (pussabrukšanas periods, γ spektrometrija);
- radioķīmiskā tīrība;
- [⁶⁸Ge] germānija un citu metālu koncentrācija eluātā;
- bakteriālo endotoksīnu kontrole.

Katras sintēzes sagaidāmo sākuma aktivitāti aprēķina pēc formulas: $A = \frac{A_0}{2^{\left(\frac{\Delta t}{T_{1/2}}\right)}}$, kur: A₀ – nomērītā

ģeneratora sākuma aktivitāte (MBq); Δt – laiks dienās kopš ģeneratora sākuma aktivitātes nomērīšanas; T_{1/2} - ⁶⁸Ge pussabrukšanas periods (271 dienas).

Sintēzi uzsāk ar ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ģeneratora eluēšanu ar HCl (0,05M). Šķīdumu laiž caur spēcīgu katjonu apmaiņas kārtidžu protonu ciklā (PSH+), kur ⁶⁸Ga koncentrējas kārtidžā, lai pēc tam tiktu eluēts ar eluēšanas šķīdumu uz iepriekš sakarsētu reaktoru, kur atrodas 20 μ g PSMA I&T vai DOTATATE un HEPES buferšķīdums (1,5 M,). Sintēze notiek 10 min sildītājā ievietotā reakcijas šūnā (sildītāja temperatūra = 130 °C). Tālāk kārtidžu kondicionē ar injekciju ūdeni. Pēc sintēzes šķīdumu no reaktora laiž cauri “C18 Light SPE” cietās fāzes ekstrakcijas kārtidžu, kur peptīda substance, kolloidālais ⁶⁸Ga un iespējamais brīvais ⁶⁸Ge paliek matricē, kamēr ⁶⁸Ga jonus un HEPES buferšķīdumu izskalo, izmantojot ūdeni. Tālāka šī kārtidža eluēšana ar ūdens/etanola šķīdumu (1:1) nodrošina ⁶⁸Ga-PSMA I&T izskalošanu no matricē un novadīšanu caur sterilo filtru “produkta flakonā”.

¹⁷⁷Lu - Lutēcijs

¹⁷⁷Lu 0,05 M HCl šķīdumā piegādā no ITG (Isotope Technologies Garching). ¹⁷⁷Lu iegūst no ¹⁷⁶Y nukleārās pārveidošanās par ¹⁷⁷Y nuklīdu. ¹⁷⁷Y sabrūk par ¹⁷⁷Lu.

Ražošanas protokolā reģistrē produkta piegādes numuru un datumu, kalibrācijas datumu un laiku, šķīduma tilpumu, tā aktivitāti un laiku kad mērīts.

Radiosintēze balstās uz kompleksu veidošanos starp prekursoru HA-DOTATATE vai PSMA I&T (acetāta sāls formā) un [¹⁷⁷Lu] Lutēciju. Sintēzi uzsāk ar automātisku Na askorbāta un Na acetāta trihidrāta atšķaidīšanu ar 0,04 M etiķskābi (CH₃COOH). Izmantojot automatizēto šļirces sūkni, ¹⁷⁷Lu pārnēs reakcijas šūnā, kur iepildīts, nepieciešamais daudzums peptīda injekciju ūdenī koncentrācijā 1 µg/µL. Atlikušo ¹⁷⁷Lu no ¹⁷⁷Lu flakona skalo un pārvieto uz reakcijas šūnu, izmantojot etiķskābes šķīdumu. Sintēze notiek, reakcijas šūnā, 100 °C temperatūrā, 20 min. Reakcijas šķīdums uz produkta flakonu tiek padots caur 0,22 µm sterilo filtru. Reakcijas šūnu skalo ar 0,9% NaCl šķīdumu, kas satur 1 mg DTPA, un visu pārvieto uz produkta flakonu caur 0,22 µm sterilo filtru. Produkta tilpums ir 15 ± 1 mL.

2.2.4. Radiofarmaceutisku preparātu kvalitātes kontrole

Materiālu un reaģentu sagatavošana kvalitātes kontrolē (KK) notiek pēc standarta procedūras, pirms ražošanas un kvalitātes kontroles procesa sākšanas. Paraugu no ražošanas telpas nodod uz KK telpu; Laikā 30 – 40 minūtēs no parauga saņemšanas brīža, jānodrošina visu iespējamo darbību izpilde. KK darbības veic pēc atbilstošām instrukcijām, noteiktā secībā. Augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija (HPLC), plānslāņa hromatogrāfija (TLC) un gamma spektrometrija

1. Parauga vizuālā pārbaude: Darbību veic kvalitātes kontroles telpā, laminārās plūsmas skapī, uzreiz pēc kontroles parauga saņemšanas. Vizuālā inspekcija notiek caur svinu saturošu stiklu pret vienkrāsainu, vienmērīgi apgaismotu fonu. Vizuāli tiek novērtēti, vai paraugs ir dzidrs, brīvs no nogulsnēm un daļiņām. Pieļaujamie limiti paraugam: caurspīdīgs, bezkrāsains, bez nogulsnēm un daļiņām tajā.

2. Tiek veikts baktēriju endotoksīnu tests, lai pārbaudītu, vai preparāts ir apirogēns un endotoksīni nepārsniedz noteiktos endotoksīnu limitus.

3. Nosaka parauga pH līmeni izmantojot divu veidu pH testa indikatora papīrus ar diapazoniem: pH 3,6-6,1 un pH 3,1-8,3. Uz testa indikatora papīra uznes 10 µl parauga, salīdzina indikatora papīra krāsu ar krāsu kodu pH vērtībām. Rezultāti tiek fiksēti, tos fotografējot. Pieļaujamais pH diapazons ir no četri (ieskaitot) līdz astoņi (ieskaitot).

4. Veic radiofarmaceutiska preparāta tīrības pārbaudi un sintēzes iznākuma invertējumu ar augstspiediena šķidrums hromatogrāfijas (HPLC) iekārtu.

5. Radioķīmiskā tīrība ar plānslāņa hromatogrāfiju (TLC) Nosaka piesaistīto un nepiesaistīto radionuklīdu attiecību, izmantojot plānslāņa hromatogrāfiju (TLC).

6. Gamma spektrometrijas analīze. Spektru mēra diapazonā 10-1024 kanālam 60 sekunžu ilgā laika periodā.

2.2.5. Radionuklīdu saistīšanās reakcija

Radionuklīdu saistīšanās reakcijas tiek izmantotas, lai raksturotu šūnu receptoru un radionuklīdu specifisko un nespecifisko saistīšanos. Ar šādu metodi ir iespējams pierādīt vai izslēgt interesējošā preparāta saistīšanos pie konkrētiem šūnu tiem. Nosakot specifisko saistīšanos radionuklīdam ar šūnām tiek izmantots interesējošo šūnas receptoru inhibitors, kuru pievienojot šūnās, tiek bloķēta konkrētā receptora darbība. Pēc inhibitora pievienošanas var secināt cik liela ir šūnu specifiskās un nespecifiskās saistīšanās attiecība

Šajā darbā sākotnēji tika aprīkota un izvērtēta radionuklīdu saistīšanās ar dažādām šūnu līnijām. Tika testēta arī šūnu specifiskā saistīšanās konkrētās šūnu līnijās izmantojot inhibitoru. Paraugu sagatavošanas un apstrādes protokoli būtiski neatšķiras, protokolā – paraugu apstrāde, atšķiras atsevišķi soļi, kas ir aprakstīti protokola beigās.

Šūnu paraugu sagatavošana:

Šūnas tiek kultivēta tām paredzētajos apstākļos, līdz sasniedz 80% konfluenci. Tās tiek tripsinizētas, skaitītas un iesētas 25 cm² flaskos, katrā flaskā sēj 1×10^6 šūnu, 5 ml bezseruma barotnē.

Paraugu apstrāde:

Šūnas pēc iesēšanas ievieto inkubatorā līdz nākamajai dienai; aprēķina pievienojamo preparāta aktivitāti un tilpumu, uz zināmo šūnu daudzumu.

Produkts- ⁶⁸Ga – PSMA I&T, ⁶⁸Ga-DOTA – TATE, ¹⁷⁷Lu – PSMA I&T, ¹⁷⁷Lu – DOTA - TATE, aktivitāte - 10 MBq/ ml

1. Šūnām pievieno 1 ml produkta;
2. Inkubē 40 min inkubatorā (+37°C, 5% CO₂).
3. Pēc inkubācijas šūnas pārnes 15 ml stobrā; flaskus skalo ar 2 ml silta PBS, pārnes tajā pašā stobrā;
4. Paraugus centrifugē 4 min, 300 g;
5. Noņem supernatantu, nogulsni mazgā trīs reizes 2 ml PBS, pēc katras mazgāšanas šūnas centrifugē 4 min, 300 g;
6. Pēc pēdējās centrifugēšanas paraugus resuspendē 2 ml auksta PBS;
7. Veic aktivitātes mērījumu ar gamma spektrometru.

Specifiskās saistīšanās testā tika izmantots tikai ^{68}Ga PSMA I&T, ar aktivitāti 7,2 MBq. Pirms produkta pievienošanas šūnām pievieno 20 μl , 2-PMPA (2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid), kas ir selektīvs PSMA inhibitors. Paraugi tālāk tika apstrādāti pēc pamatprotokola. Rezultāti tika salīdzināti ar šūnu kontroli, kurai tika pievienots tikai ^{68}Ga PSMA I&T.

2.2.6. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija

Šūnu sagatavošana un apstrāde:

Šūnas tiek kultivēta tām paredzētajos apstākļos, līdz sasniedz 80% konfluenci. Tās tiek tripsinizētas, skaitītas un iesētas 6 bedrīšu platē, katrā bedrītē 1×10^6 šūnu, tiek izmantota 2 ml bezseruma barotne. Lai novērstu savstarpēju kontamināciju, katra šūnu līnija tiek iesēta atsevišķā platē. Tiek sagatavoti kontroles paraugi, kuriem netiek pievienots molekulāri mērķētais radionuklīds, un paraugi, kuriem tālāk pievieno molekulāri mērķēto radionuklīdu.

1. Šūnas pēc iesēšanas platēs ievieto inkubatorā (37°C , 5% CO_2) līdz nākamajai dienai; aprēķina šūnu daudzumam pievienojamo aktivitāti un preparāta daudzumu.
2. Aprēķināto daudzumu pievieno katrai bedrītei, bedrītes saturu viegli apmaisa un inkubē 24 stundas (37°C , 5% CO_2 atmosfērā).
3. Šūnas pārnes stobriņos, plates bedrītes skalo ar 2 ml siltu PBS, ko pārnes stobriņos ar šūnām.
4. Paraugus centrifugē 4 min, 600 rpm,
5. Centrifugētajiem paraugiem noņem supernatantu un šūnu nogulsni mazgā trīs reizes ar 2 ml aukstu PBS,
6. Pēc katras mazgāšanas šūnas centrifugē 4 min, 600 rpm.
7. Pēc pēdējās centrifūšanas supernatantu noņem, paraugus strauji sasaldē šķidrā slāpekļī.
8. Šūnas tiek uzglabātas pie -20°C , līdz tālākai analīzei.

FTIS datu ieguve:

Šūnu infrasarkanie spektri tika pierakstīti, izmantojot Vetex 70 spektrometru, kas savienots ar HTS - XT mikroplašu lasītāju. Visi spektri pierakstīti reģionā no $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ un ir kā vidējais spektrs no 64 atsevišķiem mērījumiem.

1. Spektroskopijas laboratorijā šūnu paraugus atkausē istabas temperatūrā, pievieno 50 μl destilēta ūdens un savorteksē.
2. 10 μl parauga tiek pārnesti uz mikroplates un nožāvēti istabas temperatūrā.

3. *Opuslab* datorprogrammā ievada attiecīgos datus par katru paraugu un veic mērījumu, kad paraugi ir pilnībā nožuvuši.
4. Iegūtos rezultātus apstrādā datorprogrammā *Opus 6.5*.
5. Ja parauga intensitāte spektrā nav robežās no 0,30 līdz 0,80 absorbcijas vienību, tad atkārtos soļus 2 - 6, līdz tiek sasniegta nepieciešamā spektra intensitāte.

Lai nodrošinātu ticamākus rezultātus, no viena atkārtojuma mērījumiem tika izvēlēti vidējie spektri, kuriem veikta bāzes līnijas korekcija un vektoru normalizācija lai pielīdzinātu intensitātes. Šūnu makromolekulārā sastāva analīzes (ogļhidrātu, nukleīnskābju, proteīnu un lipīdu procentuālais daudzums paraugos)

(Grube, Bekers, Upite, & Kaminska, 2002).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Darba ietvaros tika izveidotas uz dažādām šūnu līnijām balstītas *in vitro* modeļsistēmas, kas tika izmantotas molekulāri mērķētu radionuklīdu (^{68}Ga -PSMA I&T, ^{68}Ga -HA-DOTATATE, ^{177}Lu -PSMA I&T un ^{177}Lu -HA-DOTATATE) specifiskās saistīšanās izvērtēšanā, un to ietekmes uz dažādām sūnām - izvērtēšanā. Darba ietvaros tika izveidoti divi modeļsistēmas paneļi - prostatas vēža (PV) un neuroendokrīno audzēju (NET) izvērtēšanai. Šajos paneļos tika pārbaudīta šo šūnu virsmas proteīnu ekspresija (PV – PSMA ekspresija, NET – SSTR ekspresija) ar imūncitoķīmiskām analīzēm, šūnas tālāk tika izmantotas radionuklīdu saistīšanās reakcijas eksperimentiem un Furjē transformācijas infrasarkanajai (FTIS) analīzei. Darbā tika izvēlētas šūnu līnijas, kas pēc literatūrā pieejamās informācijas eksperēs konkrētos šūnu virsmas proteīnus (PSMA eksperēs LNCaP šūnu līnija; SSTR eksperēs Ar42J un NCI H69 šūnu līnijas) un šūnas kas šos proteīnus neekspresē.

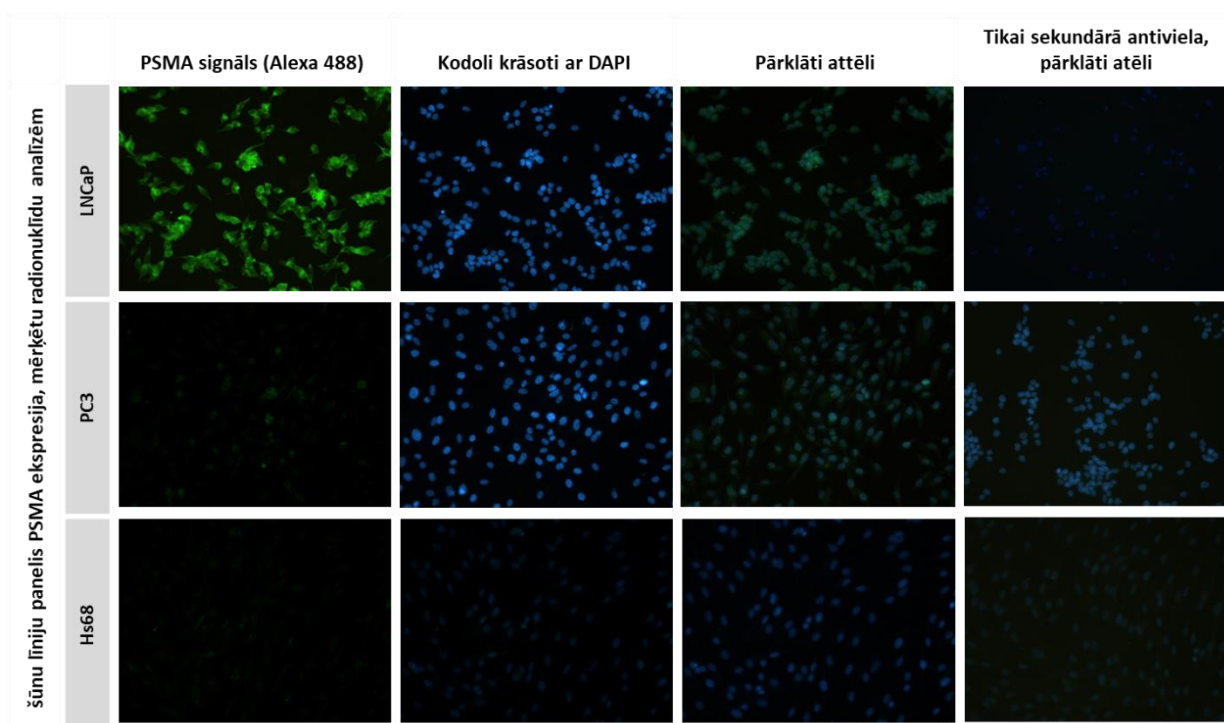
3.1. Virsmas proteīnu PSMA un SSTR2 ekspresijas noteikšana

Darba ietvaros tika kultivētas un sagatavotas eksperimentiem piecas dažādas vēža šūnu līnijas un viena fibroblastu šūnu līnija, kas eksperimentos kalpoja, kā normālu šūnu kontrole, jo teorētiski neekspresē interesējošos receptorus un antigēnus. PSMA ekspresijas noteikšanai ar imūncitoķīmijas metodi tika kultivētas PC3, LNCaP un Hs68 (normālu šūnu kontrole) šūnu līnijas, savukārt Ar42J, CorL23, NCI-H69 un Hs68 šūnu līnijās tika analizēta SSTR2 ekspresija. Šūnu līnijas tika izvēlētas, pamatojoties uz līdz šim publicētajiem datiem (Eder et al., 2012; Schottelius et al., 2015). Informācija par izmantoto šūnu izcelsmi apkopota sadaļā 2.1.1. (vēža šūnu līnijas).

Rezultātu ieguvei tika izmantots fluorescentais mikroskops. Pēc iegūtajiem attēliem tika apstiprināts, ka LNCaP eksperēs PSMA - iegūtajos attēlos šūnās ir redzams izteikti spēcīgs signāls, salīdzinot ar normālu šūnu kontroli – Hs68 (7. attēls). Šūnu līnijā Hs68 netika novērota specifiska saistīšanās ar PSMA, attēlos ir vērojama neliela nespecifiskā saistīšanās (t.i., fona signāls). PC3 šūnu līnijas paraugos tika novērota neliela PSMA ekspresija, attēlos šūnās redzams vāji izteikts signāls. Rezultāti ir apkopoti 7. attēlā.

Ir publicēti vairāki zinātniskie raksti, kuros pētīts prostatas vēzis, izmantojot dažādus modeļus, tostarp šūnu kultūru modeļus, kas iegūtas no metastātiskiem cilvēka PV; turklāt vēža šūnu līnijas var tikt izmantotas arī *in vivo* modeļos (ksenograftu un ģenētiski modificētos PV modeļos). No šiem minētajiem modeļiem visplašāk pielieto šūnu līniju modeļus, kas balstās uz

PC3 un LNCaP šūnu līnijām. PSMA ekspresijas un molekulas saistīšanās novērtēšanai šūnu līnija LNCaP tiek pielietota visbiežāk, jo šīs šūnas ekspresē PSMA ļoti augstā līmenī. (Tai et al., 2011).



7. Attēls. PV šūnu panelis. PSMA ekspresiju ataino AlexaFluor488 (zaļš), kodoli – DAPI (zils).

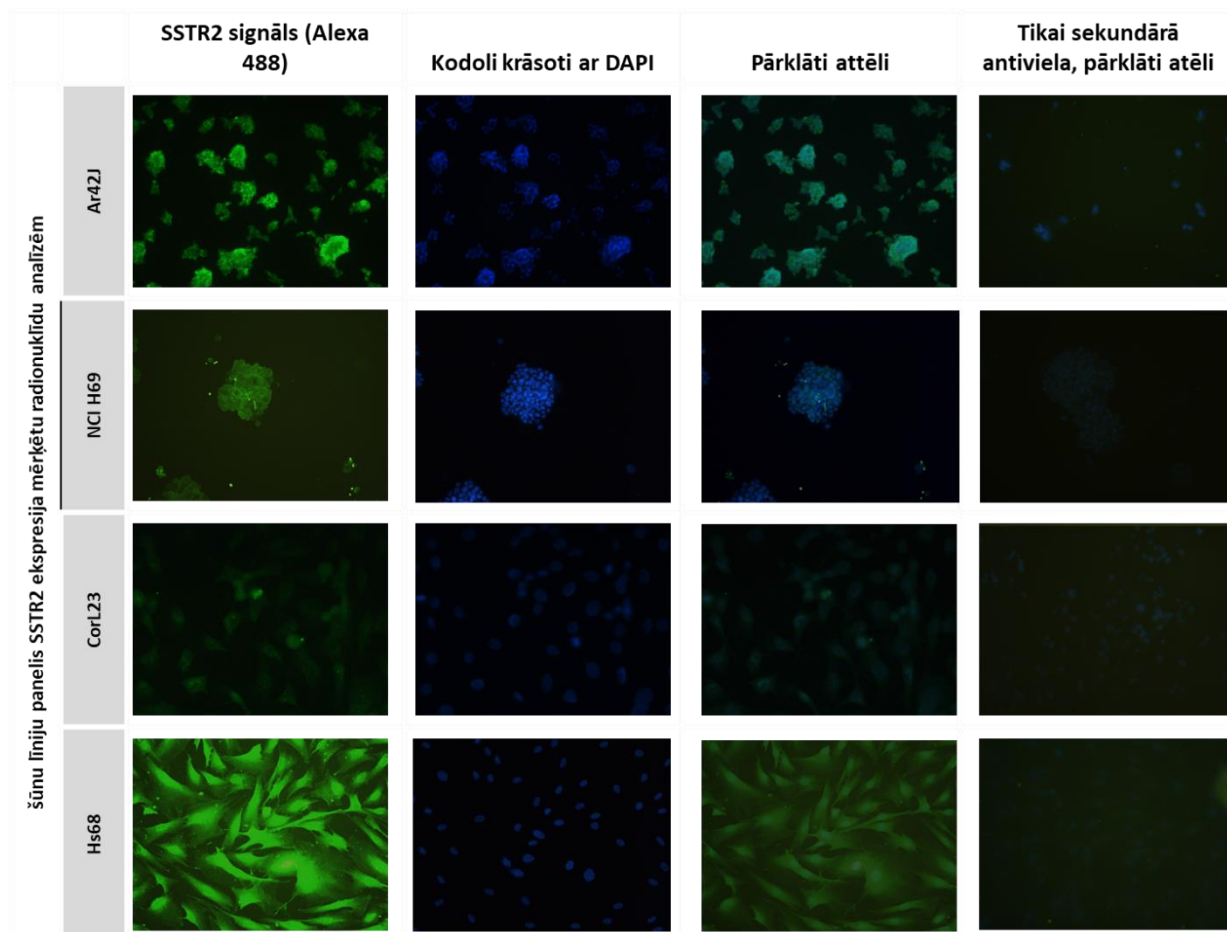
Figure 7. PSMA expression in different cell lines. PSMA signal – AlexaFluor488 (green), nucleus – DAPI (blue).

PSMA ekspresijas iegūtie rezultāti korelē ar publikācijās pieejamajiem rezultātiem. Piemēram, Tobiasa M. Gorgesa (2016) pētījumā, mērķis bija izstrādāt ticamu testu sistēmu PSMA noteikšanai izmantojot vairākas šūnu līnijas, t. sk., PC3 un LNCaP. Kā viena no metodēm tika izmantota ICC. Rezultāti pierādīja, ka PC3 šūnu līnijā netika novēroti PSMA specifiski signāli, savukārt LNCaP šūnām bija novērojami vidēji izteikti vai spēcīgi signāli. Pētījumos iegūtie rezultāti ar LNCaP šūnu līnijām sakrīt ar darbā iegūtajiem rezultātiem un šūnas izteikti ekspresē PSMA (Gorges et al., 2016). Savukārt PC3 šūnu līnijā, salīdzinot ar literatūru, tika novērots neliels PSMA signāls. Šo signāla klātbūtni varētu izskaidrot ar nespecifisko saistīšanos, kas tālāk tika apstiprināta radionuklīdu saistīšanās eksperimentos.

LNCaP, PC3 un Hs68 šūnu līnijas tādējādi tika izlemts iekļaut modeļsistēmā, kas izmantojama tālākajos eksperimentos ar PSMA ligandu konjugēto radionuklīdu testēšanā, jo sasniedza gaidāmo rezultātu, kas sakrīt ar literatūras datiem. Šajā kontekstā modeļsistēma ietver

PSMA pozitīvu vēža šūnu līniju LNCaP (PSMA++), PSMA vāji pozitīvu vēža šūnu līniju PC3 (PSMA +/-), kā arī PSMA negatīvu dermālo fibroblastu šūnu līniju Hs68 (PSMA-).

ICC protokols tika izmantots arī, lai raksturotu SSTR2 ekspresiju četrās dažādās šūnu līnijās. Divas vēžas šūnu līnijas pieder neuroendokrīnajiem audzējiem (NET) – AR42J reprezentē žurku aizkuņģa dziedzera vēzi, kamēr NCI-H69 – cilvēka sīkšūnu plaušu vēzi. Šūnu līnija CorL23 reprezentē cilvēka plaušu adenokarcinomu, kas ir epiteliālas izcelsmes. Papildus šim panelim tika pievienota arī dermālo fibroblastu līnija Hs68 (kā normālu šūnu kontrole). Iegūtie rezultāti liecina, ka vispēcīgāk SSTR2 receptorus ekspresē šūnas Ar42J (8. attēls). Nedaudz zemāks signāls tika novērots NET vēža šūnu līnijai NCI-H69, kas arī pēc literatūrā pieejamās informācijas ekspresē šos receptorus. Savukārt plaušu epiteliālā audzēja CorL23 šūnās ir novērojams neliels antivielas signāls. Pēc iegūtajiem attēliem var spriest, ka Hs68 fibroblastu šūnu līnija ekspresē SSTR2 receptorus, jo attēlos ir redzams izteikts signāls. Rezultāti ir aplūkojami 8. attēlā.



8. Attēls. NET šūnu panelis. SSTR2 ekspresiju ataino AlexaFluor488 (zaļš), kodoli – DAPI (zils).

Figure 8. SSTR2 expression in diferent cell lines. SSTR2 signal – AlexaFluor488 (green), nucleus – DAPI (blue).

Ekspimentos iegūtie rezultāti atbilst literatūrā pieejamajai informācijai; SSTR2 ekspresijas novērtēšanā pētījumos ir publicēti rezultāti, kas pārlicinoši parāda SSTR2 ekspresiju AR42J un NCI H69 šūnu līnijās (Fottner et al., 2010).

Interesanti, ka šūnu līnijā Hs68 ir novērots izteikti spēcīgs signāls. Literatūrā nav pieejamas konkrētas informācijas, kas liecinātu, ka Hs68 šūnu līnija ekspresē šādus receptorus. Tomēr pētījumos, kur ir pētītas normālas ādas šūnas, ir pierādīts, ka dažādu tipu šādās šūnās tiek ekspresēti visa veida SSTR veidi (Hagströmer, Emtestam, Stridsberg, & Talme, 2007). Hs68 šūnas tādējādi var kalpot izstrādājamajā modeļsistēmā kā normālu šūnu pozitīvā kontrole, kas ļautu salīdzināt uz SSTR2 mērķētu radionuklīdu ietekmi SSTR2+ vēža šūnās un ļaundabīgi netransformētās šūnās.

Visas analizētās šūnu līnijas tika izvērtētas kā atbilstošas iekļaušanai modeļsistēmā, kas izmantojama tālākajos ekspimentos ar SSTR2 ligandu konjugēto radionuklīdu testēšanā. Lai arī šūnu līnijas AR42J un NCI-H69 abas ir SSTR2 pozitīvas, tās tālākajos pētījumos varētu tik izmantotas, balsoties uz to kultivēšanas īpatnībām, jo NCI-H69 aug suspensijas veidā, kamēr AR42J ir izteikti adherentas šūnas, un atsevišķos testos tam varētu būt priekšrocības (piemēram, šūnu atmazgāšanai NCI-H69 gadījumā nepieciešami papildus centrifugēšanas soļi, kamēr AR42J gadījumā tas nav nepieciešams). Šūnu līnijas CorL23 un Hs68 dotajā modeļsistēmā var kalpot kā attiecīgi SSTR2-negatīva vēža šūnu kontrole un SSTR2-pozitīvā normālu šūnu kontrole, kas ļautu salīdzināt un izvērtēt SSTR2 mērķētu radionuklīdu ietekmes atšķirības.

3.2. Radionuklīdu saistīšanās kapacitātes noteikšana

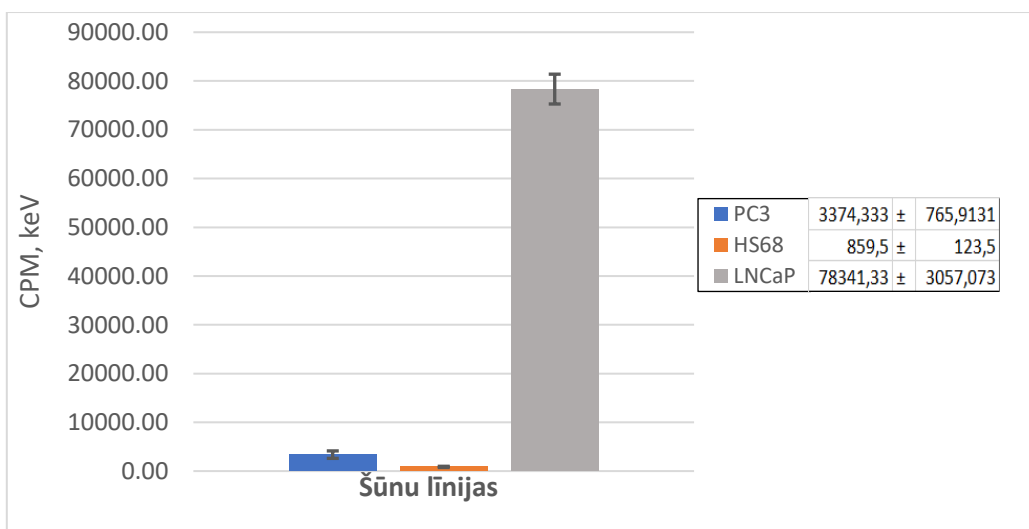
Lai validētu PV un NET *in vitro* modeļsistēmu piemērotību tālākajam eksperimentālajam darbam ar molekulāri mērķētiem radionuklīdiem, šūnu līnijas tika pārbaudītas saistīšanās reakcijā, kas ataino reālu mērķligandu spēju saistīties pie šūnām, kā arī ļauj salīdzināt saistīto molekulu proporciju starp dažādām šūnu līnijām.

¹⁷⁷Lu-HA-DATATATE, ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T un ⁶⁸Ga-HA-DOTATATE, ¹⁷⁷Ga-PSMA-I&T tika sintezēti TEMA, A klases izolatorā, ievērojot GMP apstākļus un izmantojot Scintomics GRP automātisko sintēzes moduli. Kvalitātes kontrolei izmantotas Eiropas Farmakopejas ieteiktās metodes. Preparātu sintēzi un kvalitātes kontroli veica apmācīts un sertificēts personāls. Kvalitātes kontroles rezultāti redzami 4.-7. pielikumā.

Saistīšanās reakcija ar ^{68}Ga radionuklīdiem

Ekspērimētā tika izmantotās sekojošas šūnu līnijas: LNCaP (PSMA⁺⁺), PC3 (PSMA^{+/-}), CorL23 (SSTR2⁻), NCI-H69 (SSTR2⁺), Ar42J (SSTR2⁺⁺). Hs68 dermālie fibroblasti, tika izmantota kā normālo šūnu kontrole. Vienāds daudzums šūnu (1×10^6) tika sētas triplikātos bezseruma vidē, un tām pievienoti radionuklīdi ^{68}Ga -PSMA-I&T un ^{68}Ga -HA-DOTATATE ar kopējo aktivitāti 10 MBq attiecīgi izveidotajiem PV un NET šūnu līniju paneļiem (8. un 9. attēls). Pēc 40 minūšu inkubācijas, šūnas tika trīs mazgātas un šūnu suspensijai mērīta radioaktivitāte, kas ataino saistījušos radionuklīdu, kas grafikos (sk. zemāk) izteikta kā CPM (*counts per minute*).

Rezultātā tika apstiprināts, ka ^{68}Ga -PSMA-I&T saistās ar LNCaP šūnām; ar normālu šūnu kontroli – Hs68 radionuklīds nesaistās, un PC3 šūnu līnijai tika novērota neliela saistīšanās, kas pilnībā atbilst iegūtajiem imūncitoķīmijas datiem (7. attēls). Rezultāti apkopoti 9. attēlā. PC3 un LNCaP šūnu līnijai tālākā eksperimentālā darba ietvaros tika pārbaudīta radionuklīda specifiskā saistīšanās ar šūnām, lai izvērtētu nespecifiskās saistīšanās fona signāla apmēru.

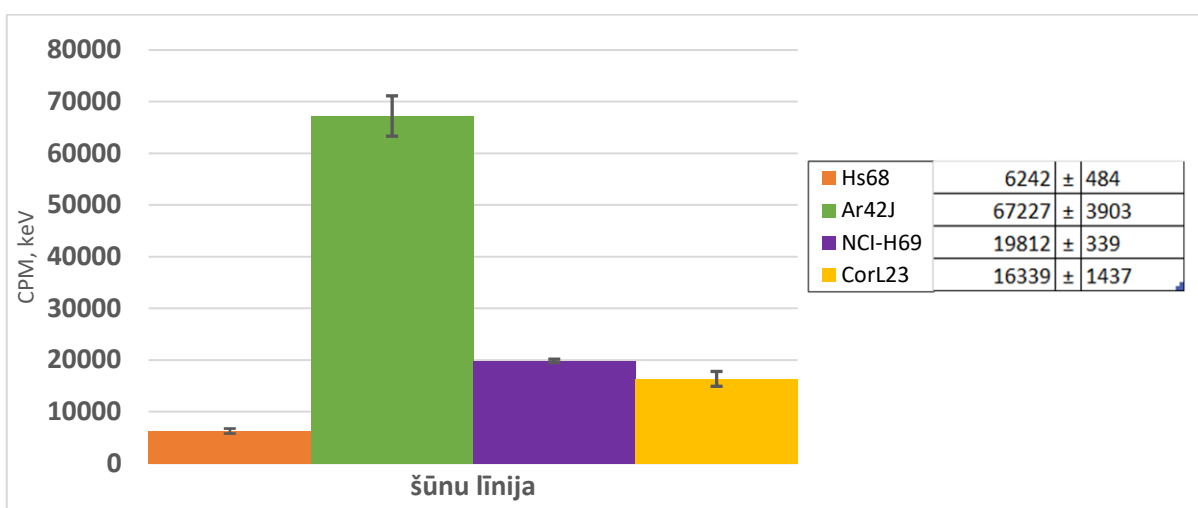


9. attēls. ^{68}Ga -PSMA-I&T saistīšanās ar dažādām šūnu līnijām. PC3 (PSMA^{+/-}; n=3) un LNCaP (PSMA⁺⁺; n=3) - Prostatas vēža šūnu līnijas, Hs68- fibroblasti (n=2), kā normālu šūnu kontrole. Stabiņu augstums atbilst vidējai vērtībai no mērījumiem, nogriežņi ataino standartnovirzi. CPM – *counts per minute*.

Figure 9. ^{68}Ga -PSMA-I&T binding data with different cell lines. PC3 (PSMA^{+/-}; n=3) and LNCaP (PSMA⁺⁺; n=3) are metastatic prostate cancer cell lines, Hs68- non-malignant dermal fibroblast cell line (n=2). Whisker bars depict mean values from measurements, and standard deviation. CPM – *counts per minute*.

Kā redzams 10. attēlā, saistīšanās reakcijā ar ^{68}Ga -HA-DOTATATE tika iegūti sekojoši rezultāti: ^{68}Ga -HA-DOTATATE saistās ar Ar42J šūnām un daļēja saistīšanās tika novērota ar NCI-

H69 šūnu līniju un CorL23. Ar42J un NCI-H69 tiek aprakstītas kā SSTR2 pozitīvas un saistās ar somatostatīna ligandu analogiem konjugētiem radionuklīdiem, bet par CorL23 šūnu līniju šādas informācijas nav (Stelter et al., 2008). Mūsu eksperimentā Hs68 šūnās saistīšanās netika novērota, kas neatbilst ICC rezultātiem (8. attēls). Literatūrā nav pieejamas konkrētas informācijas, kas liecinātu, ka Hs68 šūnu līnija ekspresē šādus receptorus. Pētījumos, kur ir pētītas normālas ādas šūnas, ir pierādīts, ka dažādu tipu ādas šūnās tiek ekspresēti visa pieci SSTR veidi (SSTR1-5) (Hagströmer, Emtestam, Stridsberg, & Talme, 2007). Pastāv iespēja, ka šī šūnu līnijas ekspresē kādu no šiem pieciem SSTR veidiem un ICC izmantotā poliklonālā antivielā nav saistījusies konkrēti ar SSTR2 tipu, bet gan kādu citu. ⁶⁸Ga-DOTA-TATE rezultāti apkopoti 10 attēlā.



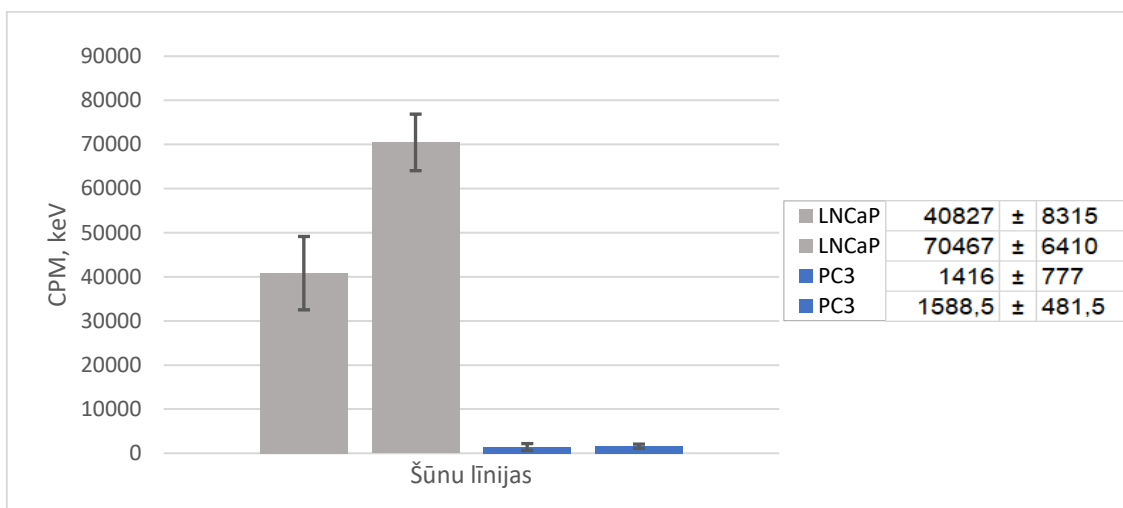
10. Attēls. ⁶⁸Ga-HA-DOTA-TATE saistīšanās ar šūnu līnijām. Hs68-fibroblasti; Ar42J (SSTR2⁺⁺) - žurkas aizkuņģa dziedzera vēža šūnu līnija; NCI-H69 (SSTR2⁺) – cilvēka plaušu sīkšūnu vēzis; CorL23 (SSTR2⁻) – cilvēka plaušu lielšūnu vēzis. Stabiņu augstums atbilst vidējai vērtībai no 3 mērījumiem, nogriežņi ataino standartnovirzi. CPM – counts per minute.

Figure 10. ⁶⁸Ga-DOTA-TATE binding with different cell lines. Hs68 (SSTR2⁻)- nonmalignant fibroblast cell line; Ar42J (SSTR2⁺⁺)- rat pancreas cancer cell line; NCI-H69 (SSTR2⁺)- human small cell lung carcinoma; CorL23 (SSTR2⁻)- human large cell lung carcinoma. Whisker bars depict mean values from 3 measurements, and standard deviation. CPM – counts per minute.

Saistīšanās reakcija ar ¹⁷⁷Lu radionuklīdiem

Šajā eksperimentā tiks izmantotas atsevišķas šūnu līnijas (ne pilnie PV un NET šūnu līniju paneli), kas pamatojās uz tehniskajiem ierobežojumiem (¹⁷⁷Lu radionuklīdu ierobežoto daudzumu un atbilstošā daudzuma šūnu pieejamību ierobežotā laika brīdī, lai nodrošinātu replikātu skaitu).

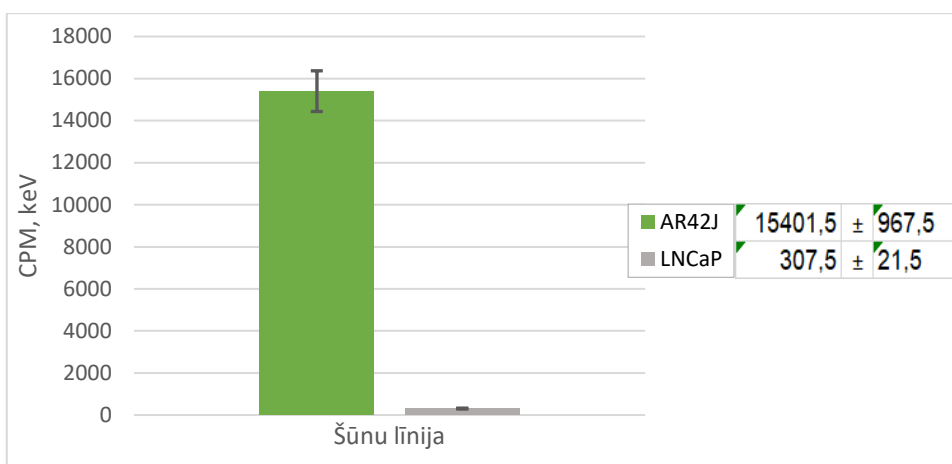
Eksperimentu sērijā ar ^{177}Lu -PSMA-I&T un ^{177}Lu -HA-DOTATATE, preparāts tika pievienots šūnām vienādā aktivitātē, abos gadījumos 10 MBq. Ar ^{177}Lu -PSMA-I&T tika pārbaudīta PSMA saistīšanās PC3 un LNCaP šūnu līnijās, rezultāti apkopoti 11. attēlā. Rezultāti konkrēti norāda LNCaP šūnu saistīšanos ar ^{177}Lu -PSMA-I&T, kamēr PC3 šūnu līnijai šī saistīšanās netika novērota. PC3 zema saistīšanās līmenis atbilst nespecifiskās saistīšanas fona signālam, kā tas tika apstiprināts eksperimentā ar klāt pievienotu PSMA saistīšanās inhibitoru PMPA (sk. rezultātus zemāk apakšnodaļā *Saistīšanās reakcija specifiskuma izvērtēšana*).



11. Attēls. ^{177}Lu -PSMA-I&T saistīšanās ar šūnu līnijām. PC3 (PSMA^{+/-}) un LNCaP (PSMA⁺⁺) - Prostatas vēža šūnu līnijas, Hs68 – fibroblasti kā normālu šūnu kontrole. Stabiņu augstums atbilst vidējai vērtībai no 2 mērījumiem, nogriežņi ataino standartnovirzi. CPM – counts per minute.

Figure 11. ^{177}Lu -PSMA-I & T binding data with Cell Lines. PC3 (PSMA^{+/-}) and LNCaP (PSMA⁺) - Prostate cancer cell lines, Hs68- fibroblasts as normal cell control. Whisker bars depict mean values from 2 measurements, and standard deviation. CPM – counts per minute.

Radionuklīda ^{177}Lu -DOTATATE saistīšanās tika pārbaudīta AR42J un LNCaP šūnu līnijās. LNCaP šūnas šajā eksperimentā tika izmantota kā negatīvā vēža šūnu kontrole (literatūrā dati par SSTR2 ekspresiju CorL23 šūnās netika atrasti). Šūnu līnijā Ar42J apstiprinājās gaidāmais rezultāts un tika novērota pārliecinoša preparāta saistīšanās ar šūnām, kā tas tika parādīts arī ^{68}Ga -HA-DOTATATE gadījumā (10. un 12. attēls). Tā kā mēs nesagaidījām SSTR2 ekspresiju LNCaP šūnās, tika sagaidīts, ka saistīšanās ar preparātu nenotiks. Šis uzstādījums apstiprinājās un, kā redzams 12. attēlā, LNCaP šūnu līnijai radionuklīdu saistīšanās praktiski nav novērojama.



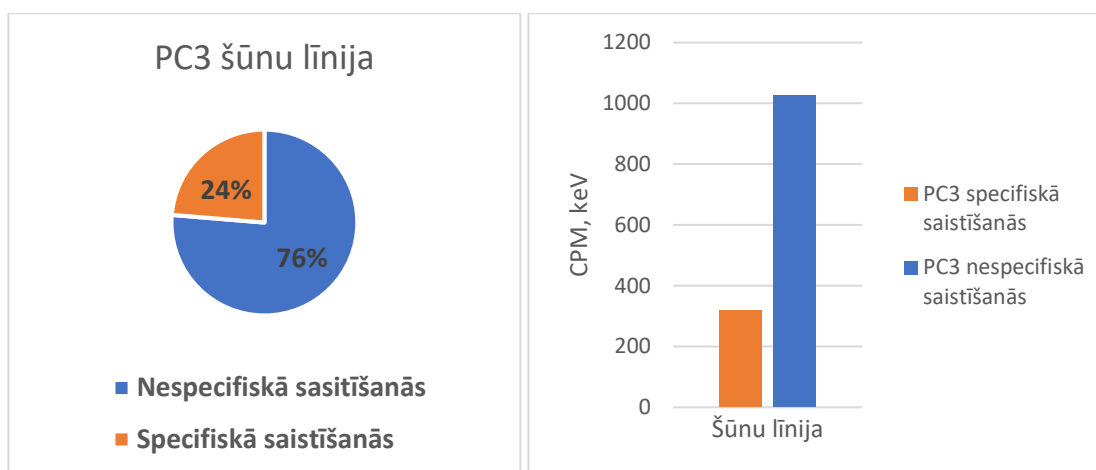
12. Attēls. ^{177}Lu -DOTATATE saistīšanās ar šūnu līnijām. AR42J (SSTR⁺⁺) un LNCaP (SSTR⁻) - Prostatas vēža šūnu līnijas, Hs68- fibroblasti, kā normālu šūnu kontrole. Stabiņu augstums atbilst vidējai vērtībai no 2 mērījumiem, nogriežņi ataino standartnovirzi. CPM – counts per minute.

Figure 12. ^{177}Lu -DOTATATE binding data with Cell Lines. PC3 (PSMA^{+/-}) and LNCaP (PSMA⁺) - Prostate cancer cell lines, Hs68- fibroblasts as normal cell control. Whisker bars depict mean values from 2 measurements, and standard deviation. CPM – counts per minute.

Saistīšanās reakcija specifiskuma izvērtēšana

Lai pārbaudītu ^{68}Ga -PSMA I&T radionuklīda specifisko saistīšanos ar membrānas PSMA, tika izmantots inhibitors 2-PMPA. 2-PMPA ir spēcīgs (IC₅₀ ~ 1 nM) un selektīvs inhibitors PSMA, kas ir glutamāta karboksipeptidāze II. Šajā eksperimentā tika izmantotas divas prostatas vēža šūnu līnijas – PC3 un LNCaP. Nespecifiskās saistīšanās rezultāti apkopoti 13. un 14. attēlā.

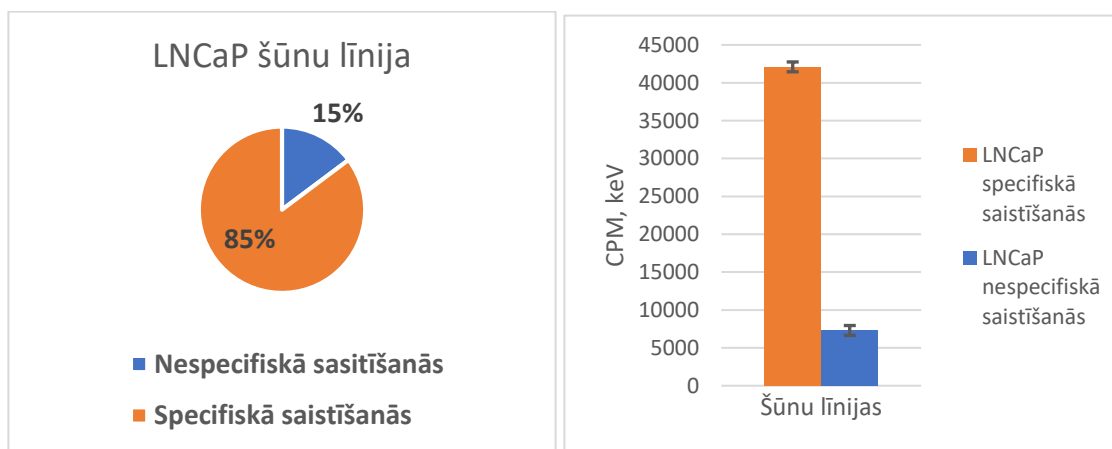
14. attēlā ir redzama PC3 šūnu līnijas specifiskā saistīšanās salīdzinot ar nespecifisko saistīšanos, rezultāti ir izteikti procentuāli. Pēc iegūtajiem rezultātiem var spriest, ka PC3 šūnu līnija ļoti nespecifiski saista radionuklīdu ^{68}Ga -PSMA I&T. Šīs šūnas 76% nespecifiski saista radionuklīdu un tikai 24% ir notikusi specifiskā saistīšanās, kas saskan arī ar sākotnēji ar imūncitoķīmiju parādīto salīdzinoši zemu PSMA ekspresiju (8. attēls). Šie iegūtie rezultāti papildina iepriekšējos radionuklīdu saistīšanās eksperimentos iegūtos rezultātus, respektīvi, pēc iepriekšējiem rezultātiem varēja secināt, ka PC3 šūnu līnija saistās (lai arī salīdzinoši zemā līmenī) ar radionuklīdu. Tomēr šis eksperiments pierādīja, ka iepriekš uzskaitītā saistīšanās lielākoties ir bijusi nespecifiska.



13. Attēls. Specifiskās un nespecifiskās radionuklīda saistīšanās ar PC3 šūnu līniju. Specifiskās saistīšanās noteikšanai tika pievienots PSMA inhibitors – 2-PMPA.

Figure 13. Specific and Non-Specific radionuclide binding to PC3 Cell Line. PMPA was added to determine the specific binding.

Matias Eder (2012) ar kolēģiem pārbaudot vēža šūnu (PC3 un LNCaP) specifisko saistīšanos ar ^{68}Ga -PSMA un izmantojot 2-PMPA, ar kuru šūnas tika bloķētas, secināja, ka PC3 šūnas uzrāda nespecifisko saistīšanos ar radionuklīdu. Pretēji rezultāti tika iegūti ar LNCaP šūnu līniju; Pievienojot LNCaP šūnām inhibitoru – 2-PMPA, varēja novērot nelielu nespecifisko saistīšanos (Eder et al., 2012). Šajā darbā iegūtie rezultāti līdzinās literatūrā atrodamajiem; LNCaP, salīdzinājumā ar PC3 šūnu līniju, uzrādīja tikai nelielu nespecifisko saistīšanos, kamēr, 85% no piesaistītā radionuklīda ir saistījies specifiski (skatīt 14. attēlu).



14. Attēls. Specifiskās un nespecifiskās radionuklīda saistīšanās ar LNCaP šūnu līniju. Specifiskās saistīšanās noteikšanai tika pievienota inhibitors – PMPA.

Figure 14. Specific and Non-Specific radionuclide binding to LNCaP Cell Line. PMPA was added to determine the specific binding.

3.3. Biomolekulāro profilu analīze

Eksperimentā tika izmantotas sekojošas šūnu līnijas: LNCaP (PSMA⁺⁺), PC3 (PSMA⁺), CorL23(SSTR2⁻), NCI-H69 (SSTR2⁺), AR42J (SSTR2⁺⁺). Hs68 – dermālie fibroblasti tika izmantota kā normālu šūnu kontrole.

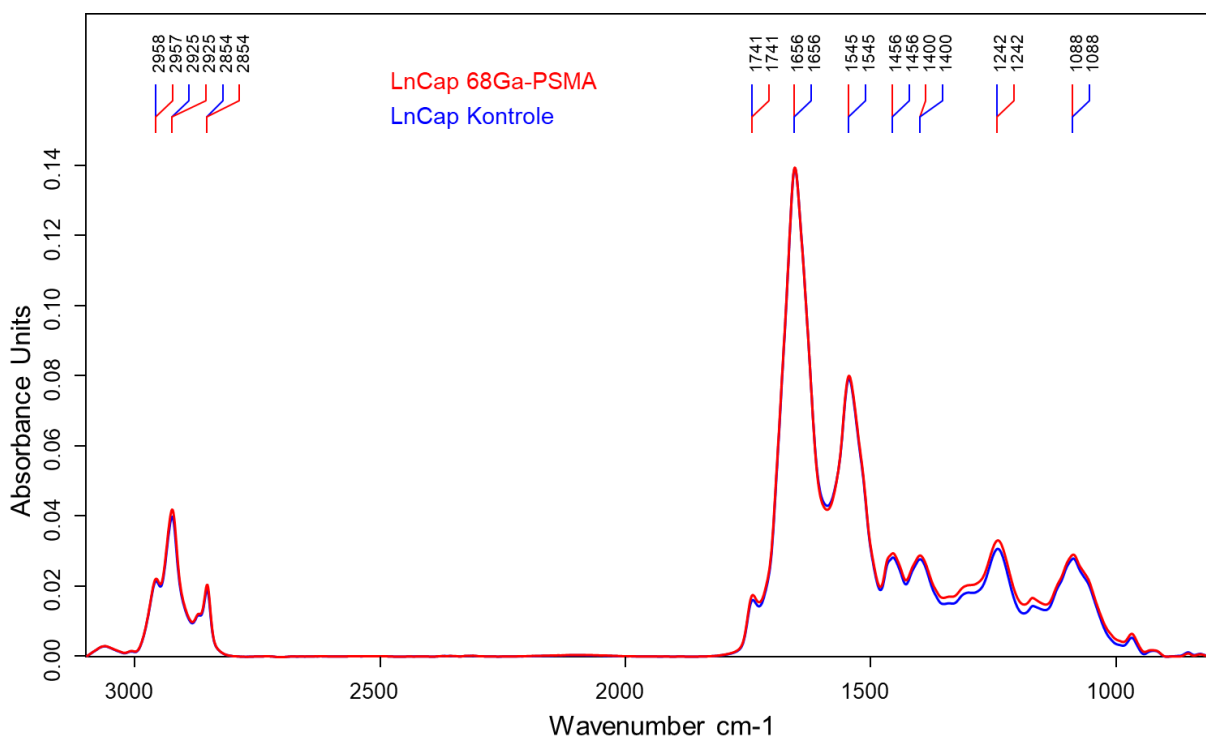
Biomolekulāro profilu analīze salīdzinot šūnas ar pievienotu ⁶⁸Ga-PSMA-I&T vai negatīvās kontroles šūnām (pievienotu radionuklīdu buferi).

Šūnām (1 x 10⁶) tika pievienots vai nu radionuklīdu sintēzes buferis (negatīvā kontrole) vai ⁶⁸Ga-PSMA-I&T vienādā aktivitātē visās bedrītēs 10 MBq. Šūnas 24 h pēc radionuklīda pievienošanas tika mazgātas un strauji sasaldētas šķidrā slāpekļī. ⁶⁸Ga-PSMA-I&T un kontroles FTIS rezultāti apkopoti 8. tabulā. FTIS reprezentatīvs LNCaP šūnu spektrs ar pievienotu ⁶⁸Ga-PSMA-I&T un kontroles šūnām bez pievienota radionuklīda redzams 16. attēlā. PC3 un Hs68 FTIS spektri ir atrodami 6. pielikumā.

8. Tabula. Biomolekulārais sadalījums dažādās šūnu līnijās.

Table 8. Biomolecular profile changes in different cell lines.

	Ogļhidrāti, %ss	NS, % ss	Proteīni, % ss	Lipīdi, % ss
Hs68 ⁶⁸Ga-PSMA I&T	15,099	6,6011	53,105	15,195
	11,959	7,4656	54,573	16,002
	15,568	6,5554	53,794	14,082
Hs68 Kontrole	14,258	7,8434	55,123	12,776
	14,58	8,1189	51,036	16,266
LNCaP ⁶⁸Ga-PSMA I&T	6,4493	10,994	57,595	14,961
	6,5313	11,441	57,509	14,519
LNCap Kontrole	5,9901	11,659	58,023	14,328
	6,492	11,067	57,977	14,463
	7,2369	11,216	58,097	13,45
PC3 ⁶⁸Ga-PSMA I&T	10,086	9,6217	59,306	10,986
	9,6986	9,7981	60,394	10,11
	8,2825	10,529	59,085	12,104
PC3 Kontrole	8,0872	10,445	60,122	11,345
	8,8131	10,646	60,082	10,459
	8,7488	10,235	60,079	10,938



15. Attēls. FTIS LNCaP šūnu līnijas spektra līkne. Ar sarkanu līkni apzīmēta LNCaP šūnu līnija ar ^{68}Ga -PSMA-I&T; Ar zilu līkni apzīmēta LNCaP kontroles šūnu līnija.

Figure 15. FTIR LNCaP cell line spectra. Red line – LNCaP cell line with ^{68}Ga -PSMA-I&T; Blue line LNCaP cell line, control.

Nevienā no šūnu līnijām pēc ietekmes ar ^{68}Ga -PSMA-I&T netika novērotas būtiskas vizuālās spektra izmaiņas, salīdzinājumā ar kontroles šūnām (15. att.), ko apstiprināja arī iegūtie mērījumu skaitliskie dati (8. tabula). Šāds rezultāts liecina, ka ^{68}Ga -PSMA neizraisa fundamentālas biomolekulārā sastāva izmaiņas šūnās. Tā kā audzēju diagnostikā ir svarīgi noteikt konkrētu audzēju atrašanās vietu, neierosinot tajos nezināmas pārmaiņas, tad šis radionuklīds ir tam pilnībā piemērots. 8. tabulā vērojamas nelielās izmaiņas varētu būt saistītas ar paraugu sagatavošanu mērījumiem. Precīziem mērījumiem nepieciešama augsta parauga homogenitāte uznesot to uz mikroplates, vienmērīgi žāvēšanas apstākļi visiem paraugiem, kā arī mērījumu var ietekmēt šūnu daudzuma izmaiņas paraugā.

Biomolekulāro profilu analīze salīdzinot šūnas ar pievienotu ^{177}Lu -PSMA-I&T vai negatīvās kontroles šūnām (pievienotu radionuklīdu buferi).

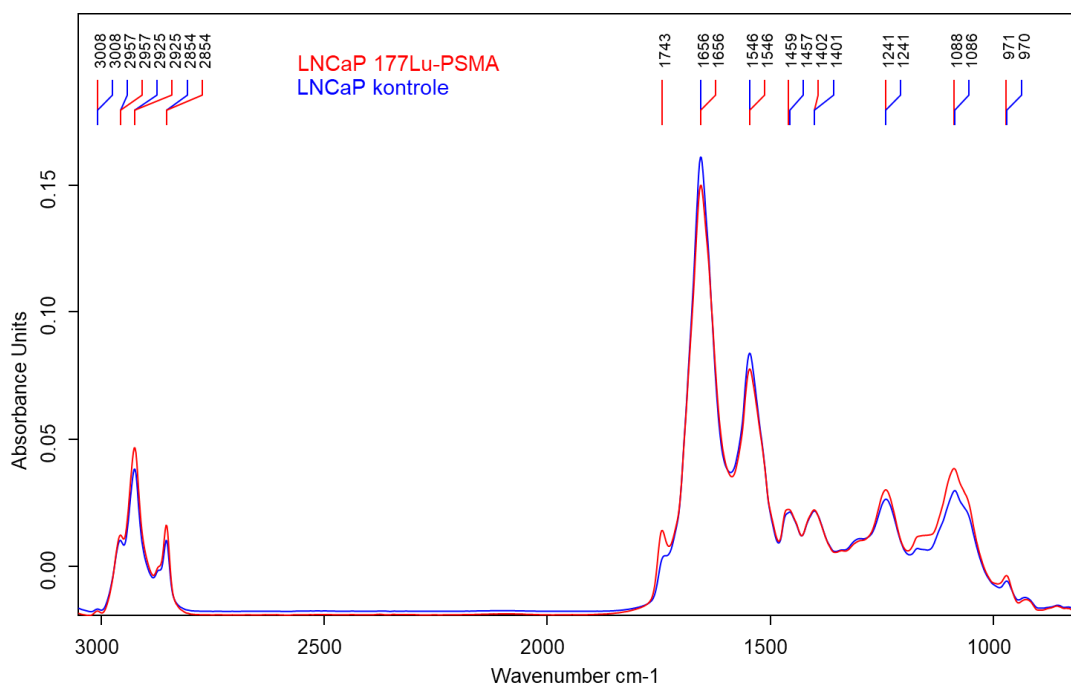
Šūnām (1×10^6) tika pievienots vai nu radionuklīdu sintēzes buferis (negatīvā kontrole) vai ^{177}Lu -PSMA-I&T vienādā aktivitātē visās bedrītēs 10 MBq. Šūnas 24 h pēc radionuklīda

pievienošanas tika mazgātas un strauji sasaldētas šķidrā slāpekļī. ^{177}Lu -PSMA-I&T un kontroles FTIS rezultāti apkopoti 9. tabulā. FTIS reprezentatīvs LNCaP šūnu spektrs ar pievienotu ^{68}Ga -PSMA-I&T un kontroles šūnām bez pievienota radionuklīda redzams 17. attēlā. PC3 un Hs68 FTIS spektri ir atrodami 7. pielikumā.

9. Tabula. Biomolekulārais sadalījums dažādās šūnu līnijās.

Table 9. Biomolecular profile changes in different cell lines.

	Ogļhidrāti, % s s	NS, % ss	Proteīni % ss	Lipīdi % ss
Hs68 kontrole	11,52	7,62	43,86	27,00
	12,69	6,81	41,18	29,31
Hs68 ^{177}Lu-PSMA I&T	11,55	11,27	50,27	16,91
LNCaP kontrole	8,77	10,53	54,75	15,94
	9,83	10,44	54,13	15,61
LNCaP ^{177}Lu-PSMA I&T	12,16	11,04	47,99	18,81
	9,99	13,01	47,44	19,57
PC3 kontrole	7,90	10,74	55,69	15,68
	7,91	10,86	55,21	15,95
	6,95	10,93	56,67	15,46
PC3 ^{177}Lu-PSMA I&T	7,58	11,47	58,32	12,64
	8,85	10,76	57,81	12,58
	7,31	11,06	59,10	12,53



16. Attēls. FTIS LNCaP šūnu līnijas spektra līkne. Ar zilu līkni apzīmēta LNCaP šūnu līnija ar $^{177}\text{Lu-PSMA-I\&T}$; Ar sarkanu līkni apzīmēta LNCaP kontroles šūnu līnija.

Figure 16. FTIR LNCaP cell line spectra. Blue line – LNCaP cell line with $^{177}\text{Lu-PSMA-I\&T}$; Red line - LNCaP cell line, control.

Pēc iegūtajiem rezultātiem redzams, ka LNCaP šūnu līnijai, paraugam ar pievienotu aktivitāti, salīdzinājumā ar kontroli ir ievērojami palielināts kopējais lipīdu daudzums šūnās, pieaugums no $\sim 15,8\%$ uz $\sim 19,2\%$. Savukārt PC3 šūnās 48h pēc radionuklīda pievienošanas lipīdu kopējais daudzums ir samazinājies no $\sim 15,7\%$ uz $\sim 12,5\%$. Vēl krasākas lipīdu sastāva izmaiņas redzamas Hs68 šūnās, tām pievienojot $^{177}\text{Lu-PSMA-I\&T}$, lipīdu daudzums no $\sim 28\%$ 48 stundu laikā samazinās līdz $16,9\%$. Atšķirīgās izmaiņas lipīdu daudzumā, pieaugumu LNCaP šūnās un samazinājumu PC3 un Hs68 šūnās varētu skaidrot ar to, ka $^{177}\text{Lu-PSMA-I\&T}$ tieši saistās ar LNCaP šūnām, savukārt pie PC3 un Hs68 šūnām tas nepiesaistās un ir brīvi peldošs šūnu barotnē. Šie rezultāti korelē ar $^{68}\text{Ga-PSMA-I\&T}$ saistīšanās eksperimenta rezultātiem, kur tika novērots, ka $^{68}\text{Ga-PSMA-I\&T}$ specifiski saistās ar LNCaP šūnām savukārt ar PC3 un Hs68 šūnām novērojama tikai neliela nespecifiskā saistīšanās.

Šīs izveidotās modeļsistēmas turpmākos pētījumos varētu veidot 3D kultūrās, vairāku šūnu kultūrās (Cocultures) vai integrēt in vivo modeļsistēmās. Piemēram, šūnu līniju Ar42J turpmākos pētījumos varētu izmantot in vivo žurku modeļos, jo tā ir žurkas aizkuņģa dziedzera vēža šūnu līnija un šādā modeļsistēmā tiek bieži izmantota.

SECINĀJUMI

1. Ar imūncitoķīmijas metodi pārbaudot SSTR2 un PSMA ekspresiju modeļsistēmām izvēlētajās šūnu līnijās, tika secināts, ka SSTR2 ir pārliecinoši ekspresēts neuroendokrīno audzēju šūnās AR42J un NCI-H69, un PSMA – LNCaP šūnās, kas tādējādi neuroendokrīnā un prostatas vēža modeļsistēmās var kalpot kā pozitīvā kontrole.
2. Pārbaudot PSMA un SSTR2 ekspresiju attiecīgi PC3 un CorL23 vēža šūnās, tika novērots vājš receptoru ekspresijas signāls, kas šīs šūnas padara par piemērotām to izmantošanai tālākos pētījumos kā negatīvo vēža šūnu kontroli.
3. Ādas dermālajos fibroblastos Hs68 tika konstatēta vāja PSMA ekspresija un spēcīga SSTR2 ekspresija, tomēr SSTR2 ekspresija netika validēta radionuklīdu saistīšanās reakcijā, kas ļauj domāt, ka iegūtie imūncitoķīmijas rezultāti saistāmi ar iespējamu poliklonālās antivielas nespecifisku saistīšanos pie citiem SSTR tipiem šajās šūnās, un Hs68 tādējādi modeļsistēmā var kalpot kā negatīva normālo šūnu kontrole.
4. Izvēlētajās šūnu līnijās testējot diagnostisko (^{68}Ga saturošo) un terapeitisko (^{177}Lu saturošo) radionuklīdu spēju saistīties pie PSMA un SSTR2, tika validēti šo receptoru ekspresijas dati un pierādīta radionuklīdu specifiskā saistīšanās.
5. Izmantojot prostatas vēža in vitro modeļsistēmu (LNCaP, PC3 un Hs68 šūnas) un FTIS metodi, tika parādīts, ka diagnostiskā preparāta ^{68}Ga -PSMA-I&T klātbūtne 24h garumā neietekmē šūnu makromolekulāro sastāvu, neatkarīgi no PSMA receptoru ekspresijas.
6. Analizējot terapeitiskā radionuklīda ^{177}Lu -PSMA-I&T klātbūtnes ietekmi 24h garumā prostatas vēža šūnās, tika novērota tendence inducēt lipīdu sintēzi PSMA-pozitīvās šūnās, bet ne PSMA-negatīvajās šūnās.
7. Radionuklīda ^{177}Lu -PSMA-I&T klātbūtne ir spējīga ietekmēt blakus esošās normālās stromālās šūnas (fibroblastus), kam netiek novērota specifiska saistīšanās ar šo preparātu.
8. Izstrādātās in vitro prostatas un neuroendokrīno audzēju modeļsistēmas ir piemērotas izmantošanai tālākajos uz PSMA un SSTR2 mērķētu radionuklīdu pētījumos.

PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību darba vadītājiem Zanei Kalniņai un Kārlim Švirkstam, par sniegto palīdzību, metožu apmācīšanu, sniegtajiem ieteikumiem, padomiem bakalaura darba tapšanas laikā un doto iespēju izstrādāt šo bakalaura darbu Latvijas biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Latvijas universitātes mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā un SIA kodolmedicīnas klīnikas, radiofarmācijas laboratorijā. Lielu palies izsaku Ramonai Petrovscai par konsultācijām šūnu kultivēšanas jautājumos, Zanei Simsonei, par konsultācijām paraugu mikroskopēšanas jautājumos. Līvai Mazkalniņai par darbā izmantoto radiofarmaceutisko preperātu sintēzi, Tomam Kusiņam par ieteikumiem radiācijas drošības jomā un Andrejam Grīnbergam, par konsultācijām un padomiem pētījuma metožu izstrādē. Pateicos Guntai Ķizānei par iespēju izstrādāt bakalaura darbu Latvijas Universitātes fonda SIA «Mikrotīkls» ziedojuma projekta: “Inovatīvu metožu attīstīšana un ieviešana klīniskajā praksē ļaundabīgo audzēju diagnostikai un terapijai, izmantojot Latvijā ražotus molekulāri mērķētus radionuklīdus” ietvaros.

IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

- Azzam, E. I., & Little, J. B. (2004). The radiation-induced bystander effect: Evidence and significance. *Human and Experimental Toxicology*, 23(2), 61–65. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht418oa>
- Baum, R. P., & Kulkarni, H. R. (2012). THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, 2(5), 437–447. <https://doi.org/10.7150/thno.3645>
- Beiser. (2003). *Concepts_of_Modern_Physics_by_Beiser.pdf*.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6, 611. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1656>
- Chang, S. S. (2004). Overview of prostate-specific membrane antigen. *Reviews in Urology*, 6 Suppl 10(Suppl 10), S13-8. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1621745>
- Cunningham, D., & You, Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of Biological Methods*, 2(1), e17. <https://doi.org/10.14440/jbm.2015.63>
- Dasari, A., Shen, C., Halperin, D., Zhao, B., Zhou, S., Xu, Y., ... Yao, J. C. (2017). Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncology*, 3(10), 1335–1342. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>
- Eder, M., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Hull, W.-E., Wängler, C., Mier, W., ... Eisenhut, M. (2012). 68Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 23(4), 688–697. <https://doi.org/10.1021/bc200279b>
- European Association of Nuclear Medicine. (2018). *European Nuclear Medicine Guide*. Retrieved from <https://www.nucmed-guide.app/#!/home>
- European Commission. (2014). Council Directive 2013/59/Euratom of 5 December 2013. *Official Journal of the European Union*, (December 1990), 1–73. https://doi.org/doi:10.3000/19770677.L_2013.124.eng
- European medicines agency. (2017). *Lutathera*, 44(0).
- Fani, M., Peitl, P. K., & Velikyan, I. (2017). Current Status of Radiopharmaceuticals for the Theranostics of Neuroendocrine Neoplasms, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ph10010030>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Fendler, W. P., Eiber, M., Beheshti, M., Bomanji, J., Ceci, F., Cho, S., ... Herrmann, K. (2017). 68Ga-PSMA PET/CT: Joint EANM and SNMMI procedure guideline for prostate cancer imaging: version 1.0. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(6), 1014–1024. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3670-z>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., ... Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 103, 356–387.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>

- Fottner, C., Mettler, E., Goetz, M., Schirmacher, E., Anlauf, M., Strand, D., ... Weber, M. M. (2010). In Vivo Molecular Imaging of Somatostatin Receptors in Pancreatic Islet Cells and Neuroendocrine Tumors by Miniaturized Confocal Laser-Scanning Fluorescence Microscopy. *Endocrinology*, *151*(5), 2179–2188. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1313>
- G.Purkalne, I.Kudaba, I.Konrāde, A.Lejnieks, A.Derovs, J.Gardovskis, A.Ozoliņš, H.Plaudis, I.Siliņš, I.Štrumfa, M. S. (2015). *Neiroendokrīno audzēju diagnostikas, ārstēšanas un dinamiskās novērošanas rekomendācijas*.
- Ganzoury, M. A., Allam, N. K., Nicolet, T., & All, C. (2015). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *50*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.073>
- Gorges, T. M., Riethdorf, S., von Ahsen, O., Nastał Y, P., Röck, K., Boede, M., ... Pantel, K. (2016). Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells: a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*, *7*(23), 34930–34941. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9004>
- Grube, M., Bekers, M., Upite, D., & Kaminska, E. (2002). IR-spectroscopic studies of *Zymomonas mobilis* and levan precipitate. *Vibrational Spectroscopy*, *28*(2), 277–285. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(02\)00005-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2031(02)00005-X)
- Hagströmer, L., Emtestam, L., Stridsberg, M., & Talme, T. (2007). *Expression pattern of somatostatin receptor subtypes 1-5 in human skin: An immunohistochemical study of healthy subjects and patients with psoriasis or atopic dermatitis*. *Experimental dermatology* (Vol. 15). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00487.x>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Health Protection Agency, Jr, J. D. B., Clarke, R. H., Cousins, C., Gonza, A. J., Lee, J., ... Dicus, G. J. (2007). *Recomendations of the Internacional Commision on radiation protection*.
- Hejmadi, M. (2010). *Introduction to cancer biology*.
- Horvath, P., Aulner, N., Bickle, M., Davies, A. M., Nery, E. Del, Ebner, D., ... Carragher, N. O. (2016). Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*, 751. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.175>
- IAEA. (1996). Categories in the Iaea Safety Series.
- IAEA. (2011). ---- Nuclear Medicine Physics. Handbook. *Iaea*, *38*(8), 4904. <https://doi.org/10.1118/1.3611048>
- Iedzīvotāju skaita izmaiņas Latvijā 2017. gadā | Centrālā statistikas pārvalde. (n.d.). Retrieved May 18, 2019, from <https://www.csb.gov.lv/lv/statistika/statistikas-temas/iedzivotaji/iedzivotaju-skaitis/meklet-tema/2402-iedzivotaju-skaita-izmainas-latvija-2017>
- Jackson, S. J., & Thomas, G. J. (2017). Human tissue models in cancer research: looking beyond the mouse. *Disease Models & Mechanisms*, *10*(8), 939 LP-942. <https://doi.org/10.1242/dmm.031260>
- Johnbeck, C. B., Knigge, U., & Kjær, A. (2014). PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: Current status and review of the literature. *Future Oncology*, *10*(14), 2259–2277. <https://doi.org/10.2217/fon.14.139>

- Lauren, P. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford University Press, (Third Edition), 1–342. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Marín, A., Martín, M., Liñán, O., Alvarenga, F., López, M., Fernández, L., ... Cerezo, L. (2015). Bystander effects and radiotherapy. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 20(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.08.004>
- Markowitz, S. (2000). *DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (Vol. 18).
- Nagasawa, H., & Little, J. B. (1992). Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α -Particles Advances in Brief Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α -Particles1. *Cancer Research*, 6394–6396.
- Naumann, D. (2001). FT-INFRARED AND FT-RAMAN SPECTROSCOPY IN BIOMEDICAL RESEARCH. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36(2–3), 239–298. <https://doi.org/10.1081/ASR-100106157>
- Pauwels, E., Cleeren, F., Bormans, G., & Deroose, C. M. (2018). Somatostatin receptor PET ligands - the next generation for clinical practice. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 8(5), 311–331.
- Radionuclide therapy, how it works | IAEA. (n.d.). Retrieved April 25, 2019, from <https://www.iaea.org/topics/radionuclide-therapy>
- Radiopharmaceuticals in nuclear medicine - diagnosis ,therapeutic,specific imaging devices. (n.d.). Retrieved April 25, 2019, from <http://www.whatisnuclearmedicine.com/Whatis-61-Radiopharmaceuticals>
- Reubi, J., Waser, B., Schaer, J.-C., & Laissue, J. A. (2001). Somatostatin receptor sst1–sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European Journal of Nuclear Medicine*, 28(7), 836–846. <https://doi.org/10.1007/s002590100541>
- Sandercock, A. M., Rust, S., Guillard, S., Sachsenmeier, K. F., Holoweckyj, N., Hay, C., ... Minter, R. (2015). Identification of anti-tumour biologics using primary tumour models, 3-D phenotypic screening and image-based multi-parametric profiling. *Molecular Cancer*, 14(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0415-0>
- Schottelius, M., Šimeček, J., Hoffmann, F., Willibald, M., Schwaiger, M., & Wester, H.-J. (2015). Twins in spirit - episode I: comparative preclinical evaluation of [(68)Ga]DOTATATE and [(68)Ga]HA-DOTATATE. *EJNMMI Research*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/s13550-015-0099-x>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 72. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35036093>
- Sollini, M., Erba, P. A., Fraternali, A., Casali, M., Di Paolo, M. L., Froio, A., ... Versari, A. (2014). PET and PET/CT with 68gallium-labeled somatostatin analogues in Non GEP-NETs Tumors. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 194123. <https://doi.org/10.1155/2014/194123>
- Statistikas dati - Slimību profilakses un kontroles centrs. (n.d.). Retrieved May 18, 2019, from <https://www.spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/statistika/veselibas-aprupes-statistika1>
- Stelter, L., Amthauer, H., Rexin, A., Pinkernelle, J., Schulz, P., Michel, R., ... Scholz, A. (2008). An Orthotopic Model of Pancreatic Somatostatin Receptor (SSTR)-Positive Tumors Allows Bimodal Imaging Studies Using 3T MRI and Animal PET-Based Molecular Imaging of SSTR Expression. *Neuroendocrinology*, 87(4), 233–242. <https://doi.org/10.1159/000111502>

- Švirks, K. (2014). Furjē transformācijas infrasarkanās (FTIS) spektroskopijas izmantošana bioparaugu makromolekulārā sastāva kvalitatīvām un kvantitatīvām analīzēm.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., & Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, *71*(15), 1668–1679. <https://doi.org/10.1002/pros.21383>
- Velikyan, I. (2014). T h e r a n o s t i c s Prospective of 68 Ga-Radiopharmaceutical Development, *4*(1). <https://doi.org/10.7150/thno.7447>
- Velikyan, I. (2015). ⁶⁸Ga-based radiopharmaceuticals: Production and application relationship. *Molecules* (Vol. 20). <https://doi.org/10.3390/molecules200712913>
- Virgolini, I., Decristoforo, C., Haug, A., Fanti, S., & Uprimny, C. (2018). Current status of theranostics in prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *45*(3), 471–495. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3882-2>
- WC, C., Teng, X., HK, P., CM, T., MJ, D., & JM, H. (2008). Fis1 deficiency selects for compensatory mutations responsible for cell death and growth control defects. *Cell Death and Differentiation*, *15*(12), 1838–1846.
- Worldwide cancer incidence statistics | Cancer Research UK. (n.d.). Retrieved May 16, 2019, from <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence#ref-1>

PIELIKUMI

EANM18, 2018. gada 13.–17. oktobris, Diseldorfā, Vācija.

4/25/2018

cOASIS, The Online Abstract Submission System

[Print this Page for Your Records](#)[Close Window](#)**Control/Tracking Number:** 2018-S-713-EANM**Activity:** Scientific Programme**Current Date/Time:** 4/25/2018 1:32:23 AM**Personalized medicine: method of in vitro determination of receptor binding for Lu-177 radio-pharmaceuticals therapy efficacy estimation****Author Block:** Z. Kalnina¹, T. Kusins², K. Svirks², E. Rubena¹, R. Kovaldins², G. Kizane³, A. Berzina⁴, A. Grinbergs²;¹Latvian Biomedical Research and Study centre, Riga, LATVIA, ²Kodolmedicinas klinika, Riga, LATVIA, ³Institute of Chemical Physics, University of Latvia, Riga, LATVIA, ⁴Riga East University Hospital, Clinical Department of Nuclear Medicine, Riga, LATVIA.**Abstract:**

Introduction Lu177-PSMA and Lu177-DOTA-TATE are currently used for treating mPC and mNET when other therapeutic approaches fail. However, there is interindividual heterogeneity even of a specific cancer type, e.g., among patients with mPC, 5-10% there is no profound PSMA expression on metastatic cancer cells. The aim is to develop a simple, sensitive and accurate in vitro test system that is based on the determination of receptor binding affinity of synthesized radionuclides to be used for functional quality control and further as the reference for accurate prediction of the targeted radionuclide binding potential to individual patients' cancer cells. **Materials and methods** Lu177-DOTA-TATE, Lu177-PSMA-617 were synthesized. For quality control, methods suggested by European Pharmacopeia have been used. The test system was based on the usage of stable cancer cell lines: mPC PC3(PSMA+/-) and LNCaP(PSMA+), NCI-H69(SSTR2+) and CorL23(SSTR2-) were seeded in triplicates in 6-well plates. Radioactive labelling of cells was done in serum-free medium adding 0.5-5MBq. Cells were incubated in standard conditions for 1h at 37°C, medium was withdrawn, and cells washed with PBS. Cells were collected by centrifugation or lysing, samples were measured in gamma spectrometer. The level of the specific receptor expression on cancer cells was visualised by immunocytochemistry using mouse monoclonal antibody against human PSMA and SSTR2 and visualised by anti-mouse-Cy5-labelled secondary antibody. Results were assessed by fluorescence microscopy. **Results** Quantitative and qualitative assessment of RP receptor binding reaction dynamics was performed. By differentiating activity fractions (bound/unbound) and observing changes in value dependant on added RP amount and type of cells, various parameters were obtained: (i)confirmation of receptor expression, in regard to respective RP; (ii)receptor binding constant Kd via Wolf plot; (iii)practically achievable maximum saturation value of cell surface receptors and lowest plateau of detectable added radionuclide activity; (iv)unspecific binding values; (v)absolute deviation for measured values. For the specific receptor-negative cell lines, activity measurements yielded values less than 300Bq while for cell lines positive for specific receptors it was up to a maximum of ~15kBq. **Conclusions** Study shows that in vitro test can be used for the express quality control of the synthesized Lu177-RPs, the results are comparable with the receptor expression levels in corresponding cell lines determined by immunocytochemistry. By using Lu177-RPs, it is possible to qualitatively and quantitatively assess the binding capacity on live cells. Further elaboration of this methodology would enable the prediction of the efficacy of the molecularly targeted radionuclide diagnostics and therapy in individual patients.

8th Balkan Congress of Nuclear Medicine, 2019. gada 10.-14. aprīlis, Bodruma, Turcija.

Development of *in vitro* test system for peptide receptor targeting radionuclide quality control and functional research

Zane Kalnina¹, Karlis Svirkstis², **Elza Rubena**¹, Mara Grube³, Toms Kusins², Antra Berzina⁴, Ricards Kovaldins², Liva Mazkalnina², Gunta Kizane⁵, Andrejs Grinbergs²

1 Latvian Biomedical Study and Research centre, Riga, Latvia

2 Kodolmedicīnas Klinika Ltd, Riga, Latvia

3 Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Riga, Latvia

4 Riga East University Hospital, Clinical Department of Nuclear Medicine, Riga, Latvia

5 Institute of Chemical Physics, University of Latvia, Riga, Latvia

Keywords: Theranostics, peptide receptor radionuclide therapy (PRRT), *in vitro* models, prostate cancer, neuroendocrine tumors, PSMA, SSTR2.

In the modern radio-oncology, proper diagnostics and control of metastatic prostate cancer (mPC) and neuroendocrine tumour (mNET) cannot be imagined without Ga⁶⁸-PSMA and Ga⁶⁸-DOTA-TATE radionuclide-guided PET/CT. In the world's leading clinics Lu¹⁷⁷-PSMA and Lu¹⁷⁷-DOTA-TATE – the theranostic counterparts of the abovementioned radiopharmaceuticals (RP) – are currently used for treating mPC and mNET when other therapeutic approaches fail. Such therapy is capable of substantially improving the patients' quality of life and overall lifespan. This theranostic approach represents a substantial step towards personalized targeted diagnostics and therapy.

In Latvia, in-house RP synthesis protocols in GMP conditions have been introduced recently following the best European practice standards and are made available for their use in clinical oncology. In this study, we aimed to develop a simple, sensitive and accurate *in vitro* test system based on cancer cell lines that could be used as a fast internal biological quality control for the synthesized RP binding capacity as well as for the studying the abovementioned RP-induced physiological effects in cancer cells. The test system was based on stable cancer cell lines: PC3 (PSMA^{+/+}), LNCaP (PSMA⁺⁺), NCI-H69 (SSTR2⁺), AR42J (SSTR2⁺⁺), CorL23 (SSTR2⁻); human dermal fibroblast cell line Hs68 was used as non-malignant control. The cell lines were evaluated for the target receptor PSMA and SSTR2 expression levels by immunocytochemistry and fluorescence microscopy and used for RP binding assays in following experiments. Moreover, the RP treatment-induced biomolecular profile changes in the cell lines were evaluated by FTIR spectroscopy.

As a result, we have approbated an *in vitro* test system suitable for the express quality control of the synthesized RPs for their binding to PSMA and SSTR2 receptors and the binding assay results are comparable with the receptor expression levels in corresponding cell lines. By using Lu¹⁷⁷-RPs, it is possible to qualitatively and quantitatively assess the binding capacity on live cells. It was demonstrated that RP treatment of cancer cells expressing the target receptors, but not cells with low or no receptor expression, is followed by carbohydrate content increase – a finding to be further researched. Further elaboration of the developed *in vitro* test system and protocols is planned to enable the prediction of the efficacy of RP binding in individual patient-derived biopsy material.

Status	:	Accepted
Ref No	:	78
Abstract Language	:	English
Submit Time	:	2019-02-01 19:25:17
Presentation Type	:	Poster Presentation
Category	:	Radionuclide Treatment and Dosimetry
Acknowledgments	:	This study was supported by philanthropist "MIKROTIKLS" Ltd and administered by the University of Latvia Foundation. The travel expenses were covered by the donation of "EKO OSTA" Ltd.



P
8.4

Estimation of the Cancer Cell Metabolic Response to the Growth Environment by FTIR Spectroscopy

Z. Kalnina^a, K. Shvirksts^b, E. Rubena^a, R. Kovaldins^c and M. Grube^b

^aLatvian Biomedical Research and Study Centre, 1 Ratsupites str., Riga LV1067, Latvia

^bInstitute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, 1 Jelgavas str., Riga LV1004, Latvia

^cNuclear Medicine Clinic Ltd, 25 Patversmes str., Riga LV100, Latvia

grube@lu.lv

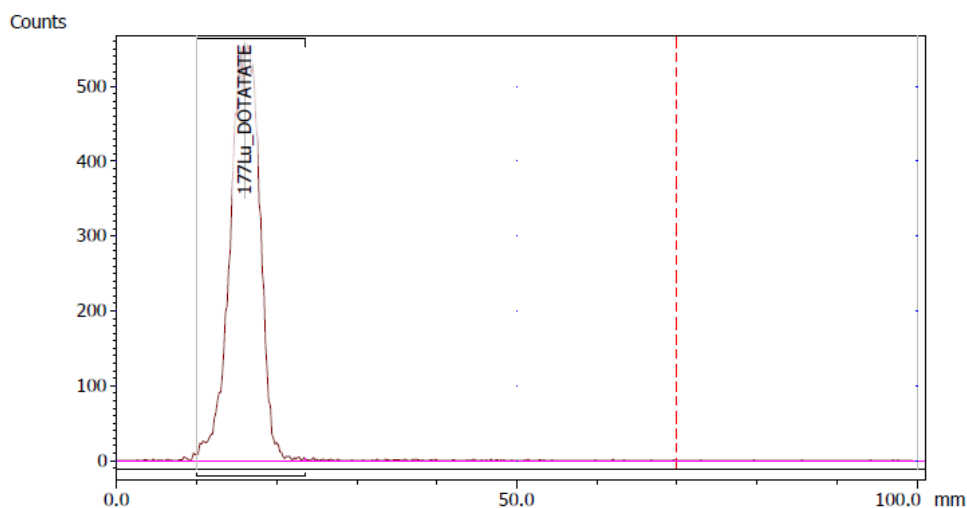
FTIR spectroscopy techniques, methods and data analyses have become widely available, easier to use, and more convenient for studies of various bio-samples and cell metabolic response to the growth environment. In our previous studies, FTIR spectroscopy quantitative analysis was used to evaluate the breast cancer cell response to gold nanoclusters [1] and hypoxia induced effects in human colorectal cancer cell lines. The aim of this study was to estimate the lung and prostate cancer cell response to hypoxia and molecularly targeted Ga68 radionuclides used in radio-oncology. Lung cancer cell lines NCI-H69, COR-L23, prostate cancer cell line PC3, and primary prostate cancer culture NFI-56 were seeded in serum-free medium in density 1×10^6 cells per well in triplicates in 6-well plates and incubated as 3D cell cultures for 48 h under normoxic or hypoxic (5% CO₂, 1% O₂ and 94% N₂) conditions. Ga68-PSMA and Ga68-DOTA-TATE radionuclides were synthesized in TEMA isolators class A zone (Scintomics Ltd); added at the activity of 3 MBq to 1×10^6 cells and incubated for 48 h at 37°C in normoxic conditions. FTIR spectra of $\sim 200\,000$ cells were recorded with HTS-XT microplate reader (Bruker, Germany) in the frequency range of 4000–600 cm⁻¹, with the spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 64 scans. Quantitative analysis of cell macromolecular composition was carried out as in [2]. As characteristic absorption bands were used 1080 cm⁻¹ for carbohydrates, 1250 cm⁻¹ for nucleic acids, 1550 cm⁻¹ for proteins and 2930 cm⁻¹ for lipids.

The results of FTIR spectroscopy quantitative analyses showed initial differences in the biochemical composition of both prostate cancer cell lines as well as among both lung cancer cell lines incubated either under normoxic or hypoxic conditions. Particularly the lipid content lung cancer cell line NCI-H69 grown under normoxic environment was lower than in cells grown under hypoxic environment (10.85 and 13.29% of dry weight (dw) correspondingly). The lipid content in prostate cancer cell line PC3 and NFI-56 was higher than in lung cancer cells incubated under normoxic or hypoxic conditions – 15-17% dw and 11-13% dw correspondingly. Data on metabolic responses of lung and prostate cancer cells to Ga68 radionuclides will be presented. These *in vitro* studies of cancer cells revealed FTIR spectroscopy as a valuable method to elucidate the cell metabolic answers to external factors.

References

1. M. Grube, K. Shvirksts, D. Dapkute, M. Matulionyte, E. Zandberga, A. Line and R. Rotomskis, *J. Biotech.*, 231S (2016) S93.
2. M. Grube, M. Bekers, D. Upite and E. Kaminska, *Vibr. Spectrosc.*, 28 (2002) 277.

Acknowledgments: This study was financed by the project "Sustainable use of nature resources in the context of climate changes" (Nr. ZD2016/AZ03) and the University of Latvia Foundation and "MIKROTĪKLS" Ltd. donation project "Development and introduction of innovative methods in clinical practice for the diagnosis and treatment of malignant tumors using molecularly targeted radionuclides produced in Latvia."

Chromatogram: ^{177}Lu 

Regions: ^{177}Lu Detector: PMT

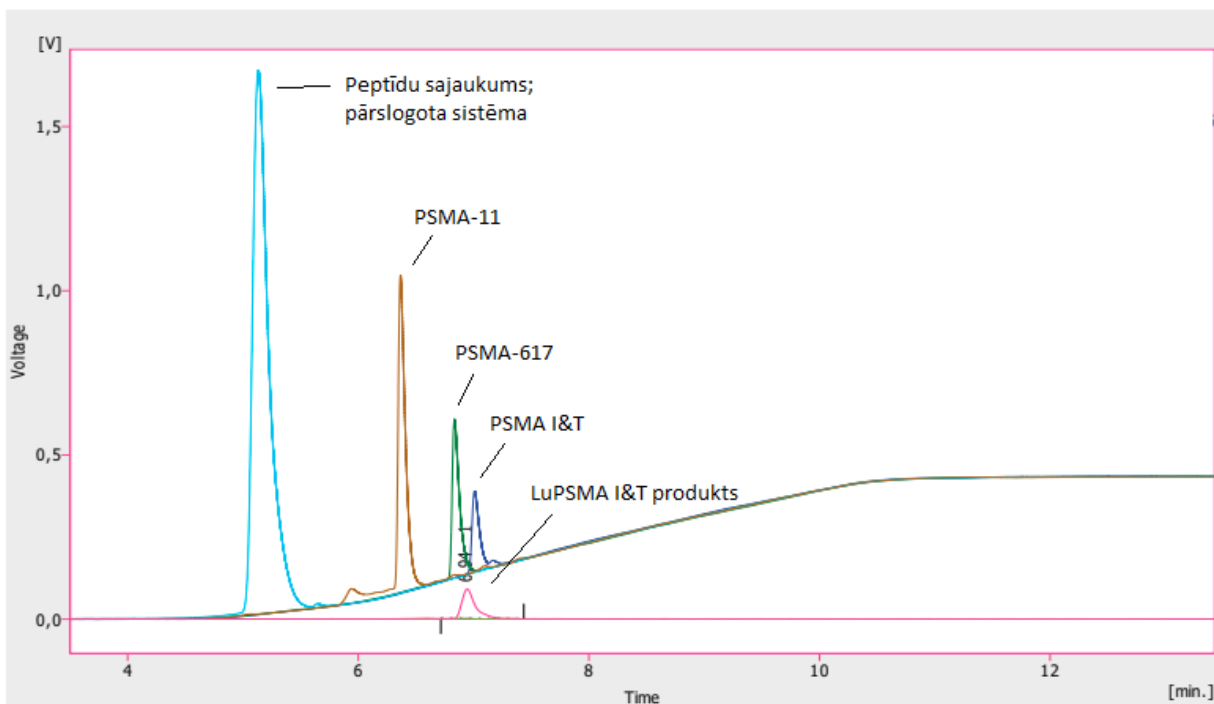
Name	Start (mm)	End (mm)	Retention (RF)	Area (Counts)	%ROI (%)	%Total (%)
177Lu_DOTATATE	10.0	23.6	0.100	12036	100.00	99.24
1 Peak				12036	100.00	99.24

Total Area: 12128 Counts
 Average Background: 0 Counts

Radiofarmaceutisku preparātu kvalitātes kontroles rezultātu paraugs, Plānslāņa hromatogrāfijas (TLC) metode

Example of Quality Control Results for Radiopharmaceuticals, Thin Layer Chromatography (TLC)

Method

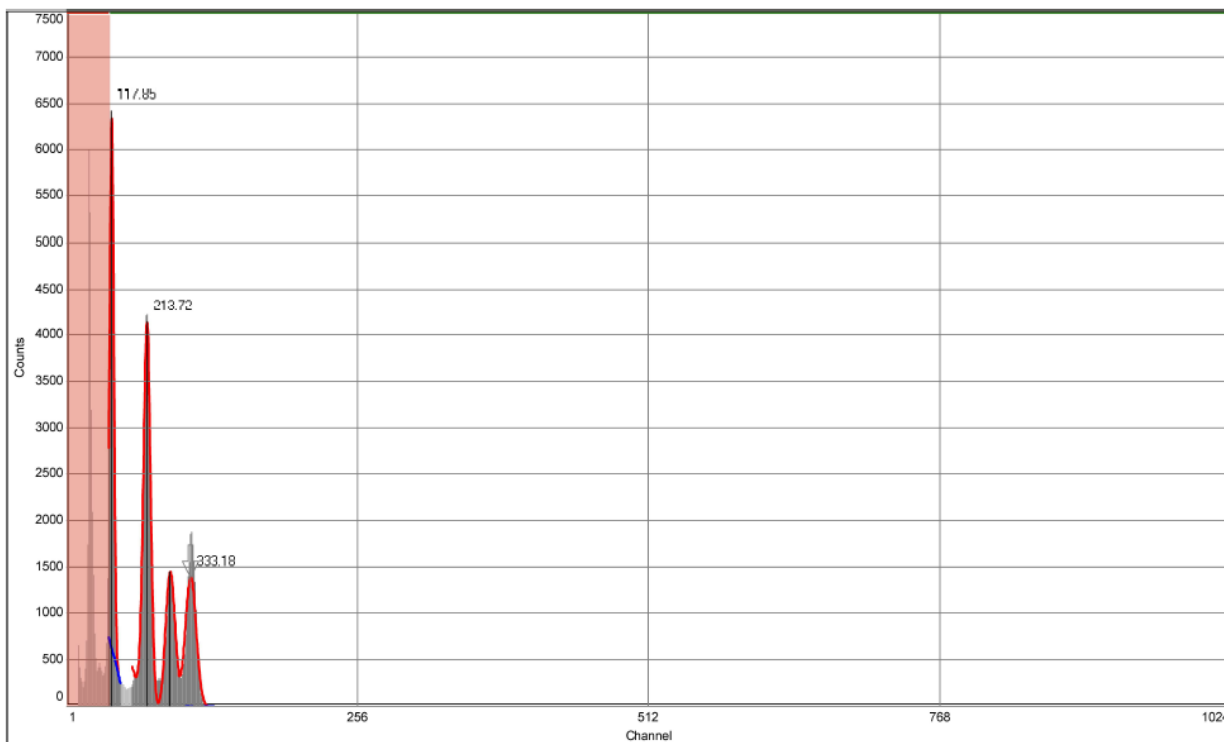


Radiofarmaceutisku preparātu kvalitātes kontroles rezultātu paraugs, Augstas efektivitātes šķidruma hromatogrāfijas (HPLC) metode.

Example of Quality Control Results for Radiopharmaceuticals, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.

Radiofarmaceutisku preparātu kvalitātes kontroles rezultātu paraugs, Gamma spektrometrijas metode.

Example of Quality Control Results for Radiopharmaceuticals, Gamma Spectrometry Method.



301118_QC-DOTATATELu177

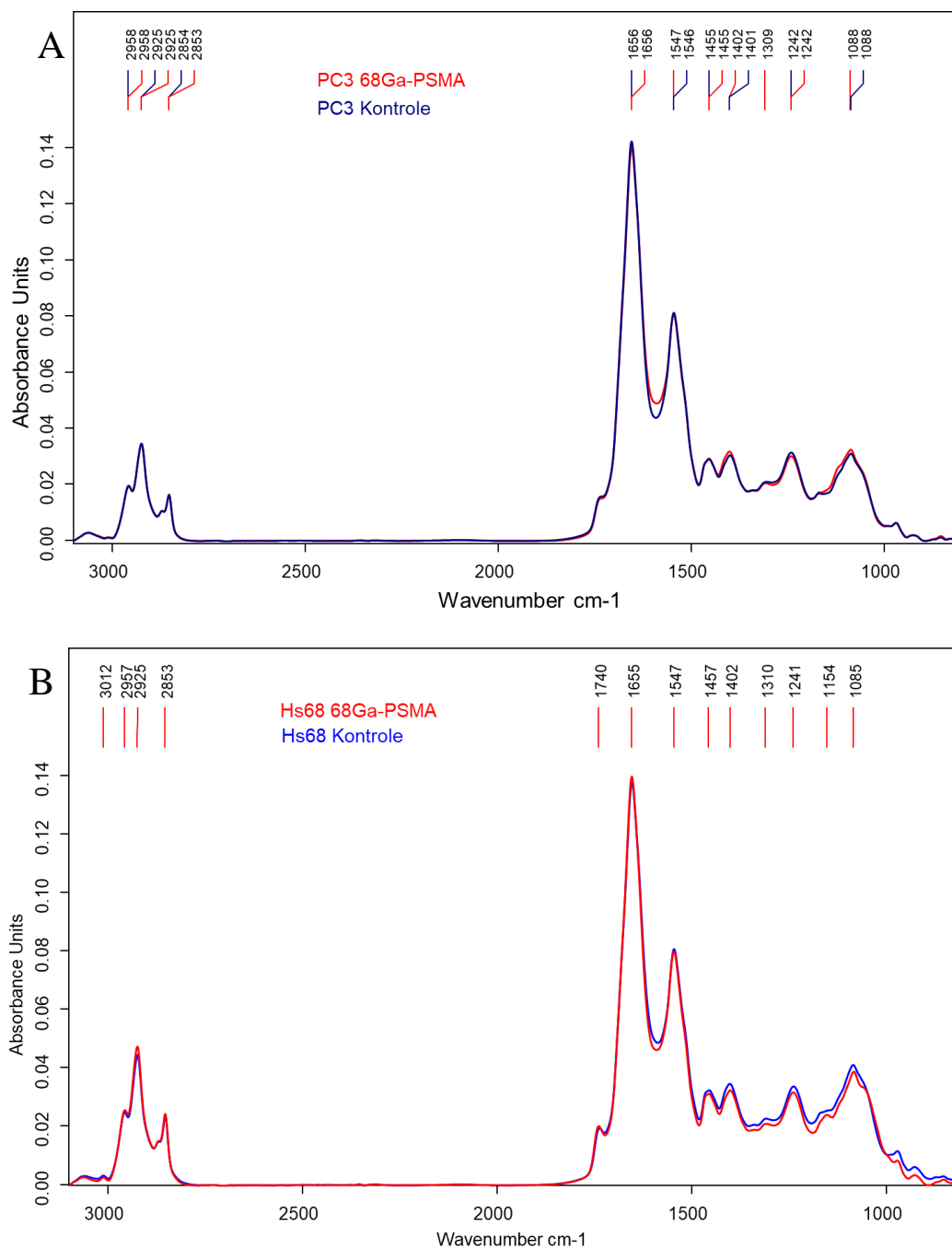
Page 2 of 2

Peaks found in spectrum: 4

Channel	Energy, keV	FW, keV	Area	Area uncert.
40.480	117.847	12.340	25244	614
71.409	213.723	22.910	39094	2937
91.774	276.854	29.579	16257	1821
109.944	333.179	34.968	17253	1820

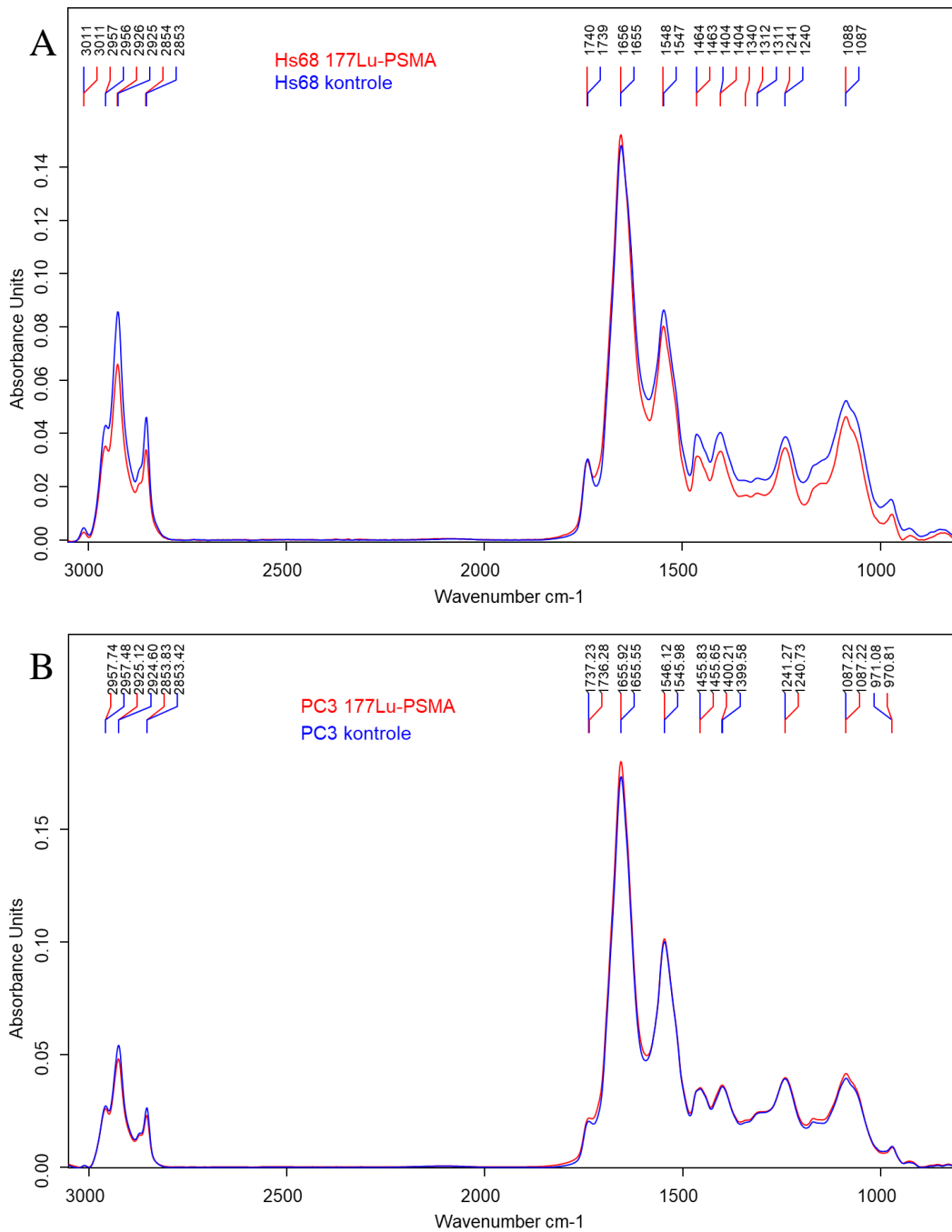
Radiofarmaceutisku preparātu kvalitātes kontroles rezultātu paraugs, Gamma spektrometrijas metode.

Example of Quality Control Results for Radiopharmaceuticals, Gamma Spectrometry Method.



FTIS šūnu līniju spektra līkne. Ar sarkanu līkni apzīmēta šūnu līnija ar ^{68}Ga -PSMA-I&T; Ar zilu līkni apzīmēta kontroles šūnu līnija. A attēls- PC3 šūnu līnijas FTIS spektrs; B – Hs68 šūnu līnijas spektrs.

FTIR cell line spectra. Red line – cell line with ^{68}Ga -PSMA-I&T; Blue line - cell line, control. Figure A - FTIS spectrum of PC3 cell line; B - Hs68 cell line spectrum.



FTIS šūnu līniju spektra līkne. Ar sarkanu līkni apzīmēta šūnu līnija ar ^{177}Lu -PSMA-I&T; Ar zilu līkni apzīmēta kontroles šūnu līnija. A attēls- PC3 šūnu līnijas FTIS spektrs; B – Hs68 šūnu līnijas spektrs.

FTIR cell line spectra. Red line – cell line with ^{177}Lu -PSMA-I&T; Blue line - cell line, control. A - FTIS spectrum of PC3 cell line; B - Hs68 cell line spectrum.