



FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

Vakgroep Farmaceutische Analyse
Laboratorium voor Radiofarmacie

Academiejaar 2014-2015

**RELATIE TUSSEN DE DOSIS, DE
PLASMACONCENTRATIE EN DE SERT-
OCCUPANTIE VOOR ESCITALOPRAM: EEN PET
STUDIE MET [¹¹C]DASB IN HONDEN**

Lien LANNOO

Eerste Master in de Farmaceutische Zorg

Promotor
Prof. dr. F. De Vos

Commissarissen
Prof. I. Goethals
Prof. C. Vanhove



FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

Vakgroep Farmaceutische Analyse
Laboratorium voor Radiofarmacie

Academiejaar 2014-2015

**RELATIE TUSSEN DE DOSIS, DE
PLASMACONCENTRATIE EN DE SERT-
OCCUPANTIE VOOR ESCITALOPRAM: EEN PET
STUDIE MET [¹¹C]DASB IN HONDEN**

Lien LANNOO

Eerste Master in de Farmaceutische Zorg

Promotor
Prof. dr. F. De Vos

Commissarissen
Prof. I. Goethals
Prof. C. Vanhove

AUTEURSRECHT

“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit deze masterproef.”

7 mei, 2015

Promotor

Prof. dr. F. De Vos

Auteur

Lien Lannoo

SAMENVATTING

Depressie en angst zijn veel voorkomende psychiatrische aandoeningen waarbij de neurotransmitter serotonine een centrale rol speelt. Naast afbraakenzymes zoals monoamineoxidase (MAO) heeft ook de serotoninetransporter (SERT) een invloed op de serotonineconcentratie in de synaptische spleet. Serotonine reuptake inhibitors (SSRI) zijn de meest gebruikte antidepressieve geneesmiddelen omwille van hun hoge affiniteit en selectiviteit voor de SERT. Via positron emissie tomografie (PET) met de radiotracer [^{11}C]DASB kan het effect van deze geneesmiddelen op de beschikbaarheid van de transporter geëvalueerd en gekwantificeerd worden. [^{11}C]DASB heeft immers een hoge affiniteit en selectiviteit voor de SERT. Humane studies hebben reeds aangetoond dat een transporterbezetting van 80% nodig is om een therapeutisch effect uit te lokken.

In deze masterproef wordt gezocht naar een geschikte dosis en doseringsschema voor escitalopram, de SSRI met de hoogste selectiviteit voor de SERT, die bij honden resulteert in een therapeutisch effect. Hierbij wordt de SERT-bezetting bepaald via PET met [^{11}C]DASB en wordt de plasmaconcentratie bepaald via gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS).

Op de cyclotronafdeling van het UZ-Gent wordt [^{11}C]DASB gesynthetiseerd via een $\text{S}_{\text{N}}2$ -reactie tussen [^{11}C]CH₃OTf, gevormd uitgaande van [^{11}C]CH₄, en MASB, de precursor van [^{11}C]DASB. Om [^{11}C]DASB op te zuiveren uit het reactiemengsel wordt gebruik gemaakt van een analytische HPLC kolom. Ten slotte dienen kwaliteitscontroles uitgevoerd te worden.

Met de gesynthetiseerde radiotracer worden vervolgens twee PET-scans uitgevoerd per hond, één voor de toediening van escitalopram en één na vier dagen therapie. Via beeldverwerking kan de wijziging in bindingspotentiaal van [^{11}C]DASB gekwantificeerd worden waarmee vervolgens de occupantie berekend kan worden voor elke totale dagdosis. Het uitzetten van deze occupantie ten opzichte van de steady state plasmaconcentraties resulteert ten slotte in de bepaling van het optimaal behandelingsschema.

De bekomen resultaten kunnen echter nog niet vertaald worden in een optimale dosis en doseringsschema. Dit is deels te wijten aan de bemoeilijkte beeldvorming bij Jeanine en Jenny door bewegingen tijdens de PET-scan. Ook werden bij Jenny problemen vastgesteld met de fysieke toestand waardoor de vereiste 80% occupantie nog niet bereikt werd.

DANKWOORD

In eerste instantie wil ik mijn promotor Prof. dr. Apr. F. De Vos bedanken voor de mogelijkheid om deze masterproef uit te voeren in het labo Radiofarmacie en voor de lessen medische stralingsfysica en kernchemie.

Mijn begeleider Apr. Nick Van Laeken wil ik enorm bedanken voor de vele hulp en uitleg om mijn masterproef tot een goed einde te brengen alsook voor de vele vragen die hij mij stelde om meer inzicht te krijgen in het onderwerp. Verder wil ik hem bedanken voor de aangename sfeer tijdens de vele uren beeldverwerking en de talrijke momenten in het cyclotron.

In het bijzonder wil ik mijn ouders bedanken om mij de kans te geven deze studies te volgen en mij hierbij jaar na jaar te blijven steunen zijn. Verder wil ik mijn zussen bedanken voor de uren ontspanning en onvoorwaardelijke steun tijdens de afgelopen jaren.

Ook wil ik mijn vrienden bedanken voor alle steun, motivatie en afleiding tussen het harde werken door. Tenslotte wil ik mijn vriend bedanken om er elke dag opnieuw te zijn voor mij.

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING.....	1
1.1 DEPRESSIE.....	1
1.2 SEROTONERG SYSTEEM.....	2
1.2.1 Serotonine.....	2
1.2.2 Serotoninereceptoren.....	3
1.2.3 Serotoninetransporter.....	4
1.2.4 Serotonerg systeem en depressie.....	5
1.3 SELECTIEVE SEROTONINE REUPTAKE INHIBITOREN.....	6
1.3.1 Algemeen.....	6
1.3.2 Escitalopram.....	7
1.4 POSITRON EMISSIE TOMOGRAFIE.....	8
1.4.1 Algemeen.....	8
1.4.2 Radiotracers.....	9
1.5 KINETISCHE MODELLERING.....	11
1.5.1 Algemeen.....	11
1.5.2 Compartimentele modellen.....	13
1.5.3 Grafische modellen.....	14
1.5.4 Referentieweefselmodellen.....	15
2. OBJECTIEVEN.....	17
3. MATERIALEN EN METHODEN.....	18
3.1 PRODUCTIE VAN ^{11}C	18
3.2 PRODUCTIE VAN $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$	19
3.2.1 Isolatie $^{11}\text{CH}_4$	19
3.2.2 Synthese $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	20
3.2.3 Conversie tot $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	21
3.2.4 Synthese $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$	21
3.3 OPZUIVERING VAN $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$	22
3.4 KWALITEITSCONTROLE.....	25
3.4.1 Meting van het gamma-spectrum.....	25
3.4.2 Bepaling van de halfwaardetijd.....	27
3.4.3 Kwaliteitscontrole van de opzuivering via HPLC.....	27
3.4.3.1 Chemische identiteit.....	28
3.4.3.2 Concentratie $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$	28
3.4.3.3 Chemische zuiverheid.....	28
3.4.3.4 Radiochemische zuiverheid.....	28

3.4.3.5	Specifieke activiteit.....	28
3.4.3.6	Percentage SERT-bezetting.....	29
3.4.4	pH meting.....	29
3.5	BEELDVORMING.....	29
3.5.1	Positron Emissie Tomografie.....	29
3.5.2	Magnetic Resonance Imaging.....	32
3.5.3	Computed Tomography.....	33
3.6	PROEFOPZET.....	34
3.6.1	Validatie van HPLC.....	34
3.6.2	Aanmaak escitalopram gelules.....	34
3.6.3	Overzicht scans, escitalopram toedieningen en bloedafnames.....	35
3.6.4	Bepaling SERT occupantie in honden.....	35
3.6.4.1	Sedatie en anesthesie van de honden.....	36
3.6.4.2	PET/CT scan.....	36
3.6.4.3	Kinetische modellering.....	36
3.6.5	Plasmabepaling.....	37
3.6.6	Bepaling van het doseringsschema van escitalopram in honden.....	39
4.	RESULTATEN.....	40
4.1	VALIDATIE HPLC SET-UP VOOR KWALITEITSCONTROLE.....	40
4.1.1	Interferenties.....	40
4.1.2	Detectielimiet.....	40
4.2	SYNTHESE EN KWALITEITSCONTROLE VAN [¹¹ C]DASB.....	41
4.3	OCCUPANTIESTUDIE IN HONDEN.....	42
4.3.1	Injectiegegevens PET-scans.....	42
4.3.2	Plasmaconcentraties van escitalopram en metabolieten.....	43
4.3.3	Beeldverwerking.....	44
4.3.4	Tijd-activiteitscurves.....	46
4.3.5	Kinetische modellering.....	46
4.3.6	Grafische voorstelling.....	47
5.	DISCUSSIE.....	49
6.	CONCLUSIE.....	52
7.	LITERATUURLIJST.....	53
7.1	WETENSCHAPPELIJKE ARTIKELS.....	53
7.2	INTERNETBRONNEN.....	58
8.	BIJLAGEN.....	59

LIJST MET AFKORTINGEN

[¹¹ C]DASB	[¹¹ C]3-amino-4-(2-dimethylaminomethylfenylsulfanyl)-benzonitrile
1-TC model	one tissue compartment model
2-TC model	two tissue compartment model
5-HIA	5-hydroxyindolacetaldehyde
5-HIAA	5-hydroxyindolazijnzuur
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HTF	5-hydroxytryptofaan
5-HTTLPR	serotonin transporter linked polymorphic region
BDNF	brain-derived nerve growth factor
BGO	bismuth germanaat
BHB	bloedhersenbarrière
BP	bindingspotentiaal
cAMP	cyclisch adenosinemonofosfaat
CREB	cAMP response element-binding
CT	computed tomography
DAG	diacylglycerol
DAT	dopaminetransporter
DDMC	didesmethylescitalopram
DMC	desmethylescitalopram
DSM-V	diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition
ER	endoplasmatisch reticulum
FoV	field of view
GC-MS	gaschromatografie-massaspectrometrie
GM	geiger-müller
GPCR	G-proteïne gekoppelde receptor
GSO	gadolinium oxyorthosilicaat
HEPA	high efficiency particulate arrestance

HFBI	heptafluoroboterzuurimidazool
HPLC	high performance liquid chromatography
IP ₃	inositol trifosfaat
LAF	laminaire airflow
LAL	limulus amebocyte lysate
LoD	detectielimiet
LoQ	kwantificatielimiet
LOR	line of response
LSO	lutetium oxyorthosilicaat
LYSO	lutetium yttrium oxyorthosilicaat
MAO	monoamineoxidase
MAOIs	monoamineoxidase inhibitoren
MASB	N-demethyl-DASB
MO	moleculair orbitaal
MRI	magnetic resonance imaging
MRTM	multilinear reference tissue model
NET	noradrenalinetransporter
NSS	neurotransmitter natrium symporters
PET	positron emissie tomografie
P-gp	P-glycoproteïne
PMT	fotomultiplicatorbuis
ROI	region of interest
SA	specifieke activiteit
SERT	serotoninetransporter
S _N 2	nucleofiele substitutie
SNRI	selectieve noradrenaline reuptake inhibitor
SPE	solid phase extraction
SRTM 2	simplified reference tissue model 2
SRTM	simplified reference tissue model

SSRI	selectieve serotonine reuptake inhibitor
SUV	standardized uptake value
TAC	tijd-activiteitscurve
TCAs	tricyclische antidepressiva
TOF	time of flight
UV	ultraviolet
VOI	volume of interest

1. INLEIDING

1.1 DEPRESSIE

Met een levensprevalentie van 16,2% is depressie één van de meest voorkomende psychiatrische stoornissen. De diagnose van depressie is gebaseerd op de Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders (DSM-V) criteria. Zo moeten ten minste vijf van de symptomen weergegeven in tabel 1.1 parallel aanwezig zijn gedurende minimum twee weken en behoren een sombere stemming of een vermindering van interesse of plezier tot de minimumvereisten (Maletic et al., 2007; Uher et al., 2014).

Tabel 1.1: DSM-V criteria voor de diagnose van depressie.

Sombere stemming
Vermindering van interesse of plezier
Wijziging van gewicht of eetlust
Slapeloosheid of overmatig slapen
Psychomotorische agitatie of remming
Moeheid of verlies van energie
Gevoel van waardeloosheid of schuldgevoelens
Concentratiestoornissen of besluiteloosheid
Gedachten aan dood/zelfmoord of zelfmoordpoging

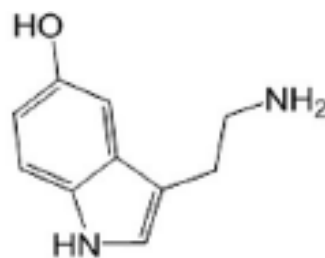
Heel wat hersendelen zijn betrokken in de pathologie van depressie. Een eerste belangrijk netwerk bevat de dorsolaterale prefrontale cortex en de dorsale anterior cingulate cortex. Beiden staan in voor cognitieve processen. Studies tonen aan dat hier een verminderde activiteit waar te nemen is bij depressie. Het tweede belangrijk netwerk, bestaande uit de mediale en inferior prefrontale cortex, de basale ganglia, de amygdala en de thalamus, vertoont daarentegen een verhoogde activiteit. Dit netwerk staat in voor emotionele processen (Fitzgerald et al., 2008).

Voor de behandeling van depressie zijn reeds diverse geneesmiddelen op de markt. Eerst waren tricyclische antidepressiva (TCAs) en monoamineoxidase inhibitoren (MAOIs) de voornaamste producten voor de behandeling van depressie. Ondertussen zijn er echter nieuwere antidepressiva op de markt die een betere tolerantie vertonen, vooral door de verminderde last van bijwerkingen. Tot deze nieuwe groep behoren de selectieve serotonine reuptake inhibitoren (SSRIs) en selectieve noradrenaline reuptake inhibitoren (SNRIs) (Sanchez et al., 2014).

1.2 SEROTONERG SYSTEEM

1.2.1 Serotonine

De ontdekking van serotonine is te danken aan twee verschillende laboratoria. Vittorio Erspamer isoleerde in 1938 voor het eerst serotonine uit de enterochromaffiene cellen van de gastro-intestinale tractus en noemde het 'enteramine'. In 1948 werd door Irvine Page's labo een substantie geïsoleerd uit het bloedserum, die vasoconstrictie gaf. Deze substantie werd serotonine genoemd waarin 'sero' staat voor serum en 'tonin' voor constrictie. Beide substanties bleken uiteindelijk een en dezelfde structuur te hebben: 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Cryan and Leonard, 2000; McCorvy and Roth, 2015). In figuur 1.1 is de structuur hiervan afgebeeld.

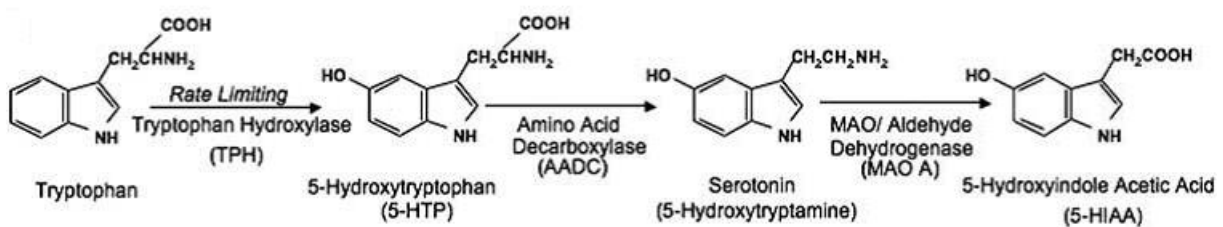


Figuur 1.1: Structuur van 5-hydroxytryptamine (McCorvy and Roth, 2015).

In 1953 werd door Twarog en Page serotonine gevonden in een hersenextract. Vanaf dit moment werd serotonine gezien als een neurotransmitter, die een rol heeft in de regeling van de hersenfuncties. Hoewel men serotonine dus vaak linkt aan het centraal zenuwstelsel, bevindt het grootste aandeel zich in de gastro-intestinale tractus. Daar zorgt serotonine voor een verhoogde peristaltische activiteit (McCorvy and Roth, 2015). In de hersenen lokaliseren de serotonine producerende neuronen zich vooral op de middellijn van de hersenstam, de raphe nuclei genaamd. Van daaruit worden ze geprojecteerd tot in verschillende hersengebieden zoals de cortex, de hippocampus, het reukorgaan, de basale ganglia en het ruggenmerg (Cryan and Leonard, 2000; Hummerich et al., 2004).

Opdat serotonerge neuronen serotonine zouden kunnen aanmaken moet tryptofaan vanuit het bloed in de hersenen geraken. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van gefaciliteerde diffusie. De concentratie van andere aminozuren speelt hierbij een belangrijke rol, ze kunnen namelijk in competitie treden met tryptofaan voor een plaats op het transporteiwit. Eenmaal in de hersenen wordt tryptofaan omgezet in 5-hydroxytryptofaan (5-HTF) via tryptofaan hydroxylase en vervolgens in 5-hydroxytryptamine (5-HT) via aromatisch aminozuur

decarboxylase. De eerste stap is hier de snelheidsbepalende stap (Ni et al., 2008; McCorvy and Roth, 2015). De metabolisatie van 5-HT start met de afbraak tot 5-hydroxyindolacetaldehyde (5-HIA) door monoamineoxidase (MAO). In een tweede stap wordt 5-HIA verder afgebroken tot 5-hydroxyindolazijnzuur (5-HIAA) door aldehyde dehydrogenase (Ni et al., 2008; McCorvy and Roth, 2015). Figuur 1.2 geeft de synthese en metabolisatie van serotonine weer.



Figuur 1.2: Synthese en metabolisatie van 5-hydroxytryptamine (Ni et al., 2008).

1.2.2 Serotoninereceptoren

De 5-HT-receptoren kunnen onderverdeeld worden in zeven types. Het zijn allemaal G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCRs) met uitzondering van de 5-HT₃ receptor, die gekoppeld is aan een ionkanaal.

5-HT₁ receptoren behoren tot de G_i gekoppelde receptoren, die negatief gekoppeld zijn aan adenylaatcyclase. Hun activatie leidt tot de inhibitie van adenylaatcyclase waardoor minder intracellulair cAMP gevormd wordt. Dit type receptoren wordt verder onderverdeeld in vijf subtypes, namelijk A, B, D, E, F. De 5-HT_{1a} receptor fungeert in de raphe nuclei als autoreceptor en inhibeert dus verdere vrijstelling van serotonine.

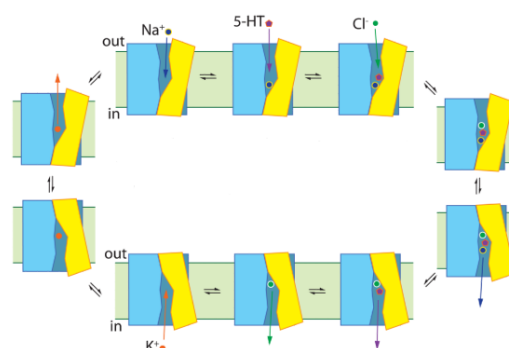
5-HT₂ receptoren zijn gekoppeld aan G_q en zorgen voor de activatie van fosfolipase C. Hierdoor is er vorming van inositol trifosfaat (IP₃) en diacylglycerol (DAG) wat resulteert in een verhoogde vrijstelling van Ca²⁺ vanuit het endoplasmatisch reticulum (ER). Onder invloed hiervan zal uiteindelijk spiercontractie en hersenstimulatie plaatsvinden. Dit type receptoren wordt verder onderverdeeld in drie subtypes, namelijk A, B en C.

5-HT₃ receptoren zijn als enige niet gekoppeld aan een G-proteïne, maar wel aan een ionkanaal. Dit ionkanaal is selectief voor positieve ionen, maar niet voor de positieve ionen onderling. Door opening van het kanaal zullen Na⁺ en Ca²⁺ in de cel stromen terwijl K⁺ uit de cel zal stromen. Het gevolg hiervan is een snelle depolarisatie in centrale en perifere neuronen. Dit type receptoren wordt verder onderverdeeld in twee subtypes, A en B.

5-HT₄, 5-HT₆ en 5-HT₇ receptoren zijn alle drie G_s gekoppelde receptoren, die positief gekoppeld zijn aan adenylaatcyclase. Bij activatie zal dit enzym gestimuleerd worden met een hogere concentratie cAMP tot gevolg. Voor 5-HT₅ receptoren ten slotte is de functie nog niet vastgelegd en is eveneens niet geweten aan welk G-proteïne ze gekoppeld zijn (Hannon and Hoyer, 2008; McCorvy and Roth, 2015).

1.2.3 Serotoninetransporter

De serotoninetransporter (SERT) is een proteïne, gecodeerd door het SLC6A4 gen, die tot de familie van de neurotransmitter natrium symporters (NSS) behoort. Ook de transporters voor noradrenaline, dopamine, glycine en GABA zijn lid van deze familie (Rudnick, 2011; Broer and Gether, 2012). SERTs staan in voor de heropname van serotonine in het presynaptisch neuron. Hierdoor bepaalt deze transporter samen met de afbraakenzymen de concentratie aan 5-HT in de synaptische spleet en dus ook de mate van activatie van de 5-HT receptoren. De SERTs bevinden zich in het centraal zenuwstelsel en in perifere sympathische neuronen, maar ook buiten het neuronaal netwerk zoals op bloedplaatjes, gastro-intestinale cellen en in de longen (Ni et al., 2008). In de hersenen bevindt zich een hoge SERT-densiteit in de hersenstam, de thalamus, de hypothalamus en het striatum. Een intermediaire densiteit wordt waargenomen in het limbisch en paralimbisch systeem. Tenslotte is in het cerebellum een lage densiteit aanwezig waarbij ze voornamelijk in de vermis gelokaliseerd zijn (Huang et al., 2002).



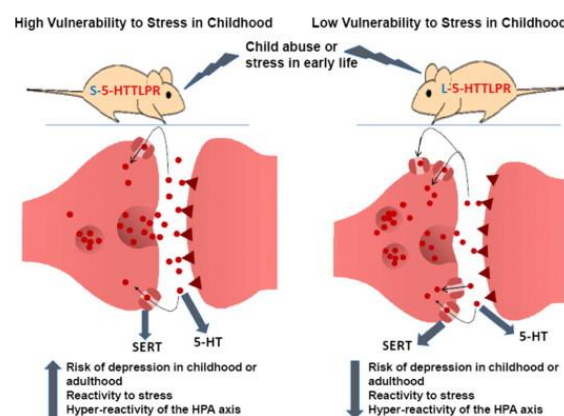
Figuur 1.3: Mechanisme van het 5-HT transport (Rudnick, 2011).

Het transport van serotonine is Na⁺/Cl⁻/K⁺ afhankelijk en komt tot stand via symport (Na⁺ en Cl⁻) en antiport (K⁺). Serotonine kan opgenomen worden in de cel via gelijktijdige binding van één Na⁺ ion en één Cl⁻ ion (figuur 1.3). Door de binding van deze drie componenten ondergaan SERTs een conformationele verandering, die resulteert in een gesloten

bindingsplaats voor extracellulaire moleculen en een open bindingsplaats voor intracellulaire moleculen. Hierbij worden 5-HT, Na⁺ en Cl⁻ intracellulair afgegeven (figuur 1.3). De daaropvolgende binding van één intracellulair K⁺ ion zal ervoor zorgen dat de transporter opnieuw zijn oorspronkelijke conformatie aanneemt. K⁺ wordt hierbij extracellulair afgegeven (figuur 1.3). Hierna kan een nieuwe cyclus van 5-HT transport beginnen (Rudnick, 2011; Broer and Gether, 2012).

1.2.4 Serotonerg systeem en depressie

Genetische epidemiologische studies hebben aangetoond dat depressie hoofdzakelijk beïnvloed wordt door genetische factoren. Een genetisch polymorfisme van de 5-HTTLPR promotor sequentie wordt geassocieerd met veranderingen in functie en expressie van SERT. Er bestaan twee varianten van dit gen, een lang (L-5-HTTLPR) en een kort allel (S-5-HTTLPR). Het korte allel resulteert in een verminderde transcriptie van het gen met een lagere SERT-densiteit tot gevolg. Daarenboven worden meer angsten waargenomen, neemt het antwoord van de amygdala op angstige stimuli toe en is er meer activatie van de amygdala en hippocampus bij mensen met een stressvol leven. Dit alles zorgt ervoor dat patiënten met S-5-HTTLPR kwetsbaarder zijn voor het ontwikkelen van een depressie (Joensuu et al., 2007; Ignacio et al., 2014). In figuur 1.4 is het genetisch polymorfisme afgebeeld.



Figuur 1.4: Genetisch polymorfisme van het 5-HTTLPR gen (Ignacio et al., 2014).

Uit de eerste studie die SERT vergeleek tussen gezonde en depressieve patiënten, is gebleken dat patiënten met een depressie een lagere SERT-densiteit vertonen in de hersenstam. Hier werd echter gebruik gemaakt van ¹²³I-β-CIT, een radiotracer die ook bindt op de dopaminetransporter, waardoor de beeldvorming moeilijk te interpreteren was (Malison et al., 1998). In een meer recente studie werd deze radiotracer vervangen door een

meer specifieke radiotracer, namelijk ^{123}I -ADAM. Deze studie toonde een verminderde SERT-binding aan in de middenhersenen, mogelijks door downregulatie van SERT (Newberg et al., 2005). Deze bevindingen werden later gereproduceerd met ^{123}I -nor- β -CIT, een andere SERT-specifieke radiotracer, in een grotere groep van patiënten met depressie. In deze studie werd voor het eerst een lagere SERT-densiteit aangetoond in de middenhersenen (Joensuu et al., 2007).

1.3 SELECTIEVE SEROTONINE REUPTAKE INHIBITOREN

1.3.1 Algemeen

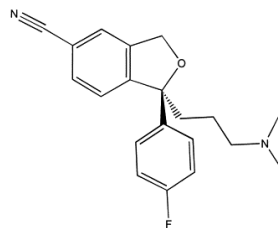
Selectieve serotonine reuptake inhibitoren (SSRIs) behoren tot de nieuwere antidepressiva en worden beter getolereerd dan de oudere generatie waaronder de tricyclische antidepressiva (TCAs) en monoamineoxidase inhibitoren (MAOIs) vallen. Alle SSRIs hebben dezelfde moleculaire target, namelijk de serotoninetransporter (SERT) (Sanchez et al., 2014). Door inhibitie van deze transporter worden verschillende effecten bekomen, afhankelijk van de regio. In de raphe nuclei zal er meer activatie zijn van de 5-HT_{1A} autoreceptoren. Hierdoor zullen de serotonerge neuronen minder vuren waardoor minder extracellulair 5-HT aanwezig zal zijn in de zenuwuiteinden ter hoogte van de projectievelden. In deze regio zal een blokkering van SERT echter resulteren in een verhoogde serotonineconcentratie. Door het minder vuren van de neuronen zal down-regulatie van SERT optreden ter hoogte van de projectievelden, met als gevolg een normalisatie van de 5-HT concentraties. Een lagere SERT densiteit in de raphe nuclei in vergelijking met de densiteit ter hoogte van de projectievelden zou meer kans geven op een goed resultaat van de behandeling (Lanzenberger et al., 2012). Studies die gebruik maakten van beeldvorming, hebben aangetoond dat een bezetting van 80% nodig is om een therapeutisch effect te verkrijgen bij de mens. In vergelijking met andere antidepressiva worden de beste resultaten bekomen met escitalopram (Sanchez et al., 2014).

Ondanks het feit dat wijzigingen in 5-HT concentraties onmiddellijk optreden, is een behandeling van twee tot zes weken nodig vooraleer een klinisch effect waargenomen kan worden. Veranderingen in signaaltransductie en genexpressie op lange termijn blijken namelijk verantwoordelijk te zijn voor het uiteindelijke therapeutisch effect. Zo zouden antidepressiva leiden tot de activatie van transcriptiefactoren zoals het cAMP response

element-binding (CREB) proteïne en zou de concentratie aan brain-derived nerve growth factor (BDNF) toenemen. Ook zou de afname in hippocampus volume bij depressieve patiënten tegengegaan worden waardoor de neurogenese geïnduceerd wordt (Malberg and Blendy, 2005).

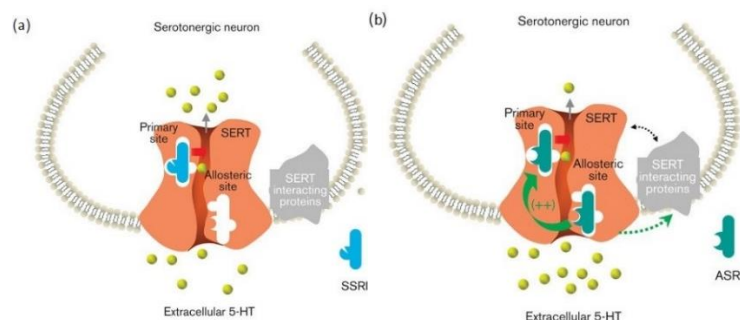
1.3.2 Escitalopram

Escitalopram is het S-enantiomeer van citalopram en is afgebeeld in figuur 1.5. Gezien citalopram ook een hoeveelheid R-enantiomeer bevat, die de werking van het S-enantiomeer tegenwerkt, is escitalopram een betere keuze dan citalopram (Zhong et al., 2012). Binnen de klasse van de SSRIs is escitalopram een potente inhibitor ($K_i = 1,1 \text{ nmol/L}$) met de hoogste SERT-selectiviteit ($\text{NET/SERT} = 7100$, $\text{DAT/SERT} = 25\ 000$) (Owens et al., 2001; Sanchez et al., 2014).



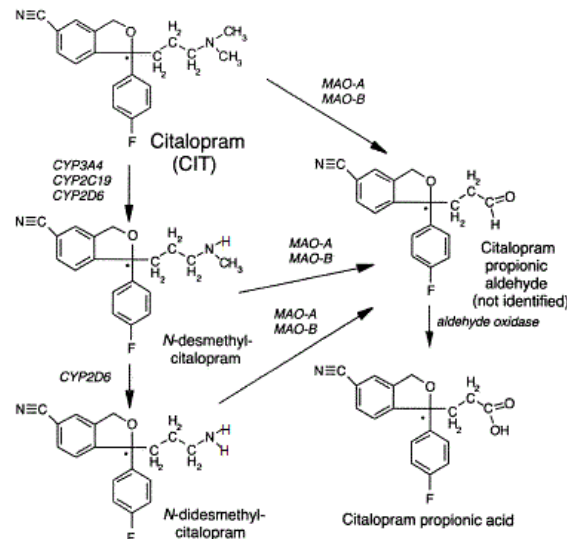
Figuur 1.5: Structuur van escitalopram (Owens et al., 2001).

SSRIs inhiberen SERT via binding aan de orthosterische bindingsplaats, i.e. de plaats waar het substraat 5-HT bindt. Naast deze primaire bindingsplaats kunnen ook één of meerdere allosterische bindingsplaatsen aanwezig zijn op de SERT. Escitalopram is een component die kan binden op beide bindingsplaatsen, waardoor de heropname van 5-HT beter geïnhibeerd wordt (figuur 1.6). Op die manier zorgt escitalopram voor een betere en/of snellere werking (Zhong et al., 2012).



Figuur 1.6: Heropname van 5-HT. (a) Inhibitor die enkel bindt op de primaire bindingsplaats; (b) Inhibitor die op beide bindingsplaatsen bindt (Sanchez et al., 2014).

De metabolisatie van citalopram en zijn enantiomeren wordt weergegeven in figuur 1.7. Humane studies tonen aan dat een eerste N-demethylatie voornamelijk via CYP2C19 en CYP3A4 gebeurt en een tweede via CYP2D6. Op die manier worden achtereenvolgens desmethylcitalopram (DMC) en didesmethylcitalopram (DDMC) gevormd. Ook monoamineoxidasen kunnen citalopram metaboliseren (Baumann et al., 2002).



Figuur 1.7: Metabolisme van citalopram en enantiomeren (gebaseerd op Baumann et al., 2002).

1.4 POSITRON EMISSIE TOMOGRAFIE

1.4.1 Algemeen

Het primaire mechanisme van een geneesmiddel in het centraal zenuwstelsel is de specifieke interactie tussen ligand en receptor. Dit geeft aan waarom het belangrijk is notie te hebben van de relatie tussen de plasmaconcentratie en het percentage receptor- of transporteroccupantie. Positron emissie tomografie (PET) is een niet-invasieve beeldvormingstechniek, die gebruik maakt van radioliganden om onder andere de receptor- of transporteroccupantie te kunnen bestuderen. Het is gebaseerd op β^+ -verval of positron-emissie van een radioactieve kern. Hierbij wordt een proton in een neutron omgezet en wordt een positron deeltje uitgestoten. Dit is een deeltje met dezelfde massa als een elektron maar met een tegenovergestelde lading. De maximale energie van het positron bedraagt 0,96 MeV voor ^{11}C .¹ Het geëmitteerde positron legt een baan af in het lichaam van ongeveer 1 mm

¹ http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/intro_src/section2.html

waarbij het kinetische energie verliest via coulombinteracties met elektronen. Op het moment dat het positron quasi alle energie verloren heeft, treedt annihilatie op, waarbij het positron reageert met een nabijgelegen elektron en omgevormd wordt tot twee fotonen. Deze fotonen worden uitgestraald onder een hoek van 180° en hebben elk een energie van 511 keV (Zhang and Fox, 2012). De PET-camera bestaat uit een ring van detectoren, die geactiveerd worden wanneer twee 511 keV fotonen binnen een bepaald tijdsinterval (3-15 ns) twee tegenoverstaande detectoren van de PET-ring bereiken, i.e. coincidence window (Basu et al., 2011). Op die manier wordt een beeld gevormd van de *in vivo* distributie van het radioligand (Zhang and Fox, 2012).

1.4.2 Radiotracers

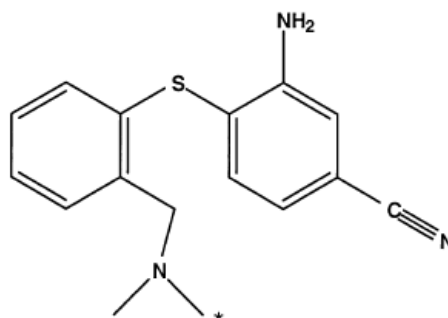
Radiotracers moeten voldoen aan verschillende criteria om bruikbaar te zijn voor kwantitatieve beeldvorming van de target. Zo moet de radiotracer een hoge affiniteit en specificiteit hebben voor de target zodat hoge contrastbeelden bekomen worden zonder dat er interferentie optreedt met het gedetecteerde signaal. De tracer moet ook een lage niet-specifieke binding vertonen en een lage proteïnebinding zodat er meer vrije tracer beschikbaar is. Ook is het belangrijk dat de tracer geschikt is om te labelen. Zo moet nagedacht worden over de plaats van labeling, de te verwachten radioactiviteit en reactietijd, de specifieke activiteit en de keuze van het radio-isotoop. Om de functionaliteit van het biochemisch proces van interesse te kunnen bepalen, moet de distributie van de radiotracer gerelateerd zijn aan de fysiologische respons, die hierdoor uitgelokt wordt. Een te snelle metabolisatie is niet gewenst en heeft een extra nadelig effect op de beeldkwaliteit als de metabolieten ook door de bloedhersenbarrière (BHB) kunnen. Ze binden namelijk met andere moleculen met als gevolg een niet-specifieke accumulatie van radioactiviteit. In bepaalde gevallen echter is metabolisatie wel gewenst. Zo wordt [^{18}F]Fluoro-Deoxy-D-Glucose na opname in de hersencellen gefosforyleerd door hexokinase. Deze metaboliet kan niet verder omgezet worden in de glycolyse en is te hydrofiel om uit de hersencellen te migreren met opstapeling tot gevolg. De radioactiviteit is hier dus een maat voor de enzymatische activiteit. Om optimaal doorheen celmembranen en barrières zoals de BHB te kunnen diffunderen is de lipofiliciteit van groot belang. Zo ligt de optimale log P waarde tussen 1,5 en 2. Een hogere waarde is niet zinvol door het groter aandeel van niet-specifieke binding via hydrofobe interacties met proteïnen en lipiden. Eenmaal opgenomen is het ook belangrijk dat de

radiotracer in de hersenen blijft en dus een lage affiniteit heeft voor effluxpompen zoals bijvoorbeeld P-glycoproteïne (P-gp). Ten slotte mag de radiotracer niet toxisch zijn bij toediening in lage dosissen (Elsinga, 2002; Pike, 2009).

Heel wat radiotracers werden getest om SERT zo goed mogelijk te visualiseren. [^{11}C]McN5652 was de eerste die succesvol bleek te zijn, maar had enkele belangrijke nadelen. Zo was de opname in de hersenen te traag, de niet-specifieke binding relatief hoog en de vrije fractie in het plasma te laag om accuraat te kunnen meten. Later werd een nieuwe klasse componenten ontdekt met hoge selectiviteit voor SERT, namelijk de diarylthioethers of difenylsulfides (Wilson et al., 2002; Hummerich et al., 2004).

Verschillende componenten uit deze klasse werden vergeleken met elkaar en met [^{11}C]McN5652 om zo radiotracers te vinden, die superieur waren aan [^{11}C]McN5652. Hieruit kwamen twee componenten naar voor met betere eigenschappen, namelijk [^{11}C]DASB en [^{11}C]AFM. De meest belovende bleek uiteindelijk [^{11}C]DASB (3-amino-4-(2-dimethylaminomethylfenylsulfanyl)-benzonitrile) te zijn waarvan de structuur afgebeeld wordt in figuur 1.8 (Huang et al., 2002).

[^{11}C]DASB wordt gezien als een ideale radiotracer om SERT te visualiseren. Zo heeft die een hoge affiniteit ($K_i = 1,1\text{nM}$) voor SERT en eveneens een hoge selectiviteit ten opzichte van noradrenaline- en dopaminetransporters (NET/SERT = 1230, DAT/SERT = 1300). [^{11}C]DASB vertoont daarbovenop een hoge signaal/ruis verhouding (7,9), i.e. een hoge specifieke binding, een snelle opname in de hersenen en de log P bij fysiologische pH bedraagt 2,7 (Wilson et al., 2000).



Figuur 1.8: Structuur van [^{11}C]DASB. De plaats waar DASB gelabeld is met ^{11}C wordt aangeduid met * (Wilson et al., 2002).

1.5 KINETISCHE MODELLERING

1.5.1 Algemeen

Via kinetische modellering kan de kinetiek van radiotracers bestudeerd worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van mathematische modellen om de PET-beelden te kwantificeren. Deze modellen illustreren een verband tussen de geregistreeerde activiteit door de PET-camera en de fysiologische parameters, die opname en metabolisatie van de radiotracer beïnvloeden. Zo kan een schatting gemaakt worden van de fysiologische parameters (Schmidt and Turkheimer, 2002; Kuntner, 2014).

PET beelden kunnen onder andere gekwantificeerd worden door middel van de Standardized Uptake Value (SUV). Dit is de meest eenvoudige methode om de concentratie aan radiotracer te meten in een Volume Of Interest (VOI). De SUV normaliseert de gemeten radioactiviteit in een bepaalde VOI voor de geïnjecteerde hoeveelheid activiteit en het gewicht van de patiënt of het proefdier en wordt berekend via formule 1.1. Voor hersenweefsel is een SUV-waarde > 2 gewenst om een goede radiotracer te zijn (Pike, 2009; Kinahan and Fletcher, 2010).

$$SUV = \frac{r}{a' / W} \quad (1.1)$$

waarin: r = radioactiviteit concentratie gemeten door de PET scanner (kBq/mL)
 a' = geïnjecteerde dosis radioactiviteit (kBq)
 W = gewicht van de patiënt (g)

Kinetische modellering kan ook gebruik maken van de bindingspotentiaal (BP) om de hoeveelheid opgenomen radioligand in de hersenen in een bepaalde VOI te kwantificeren. De BP is gebaseerd op radioligand binding en wordt *in vitro* bepaald via formule 1.2.

$$BP = \frac{B_{max}}{K_D} = B_{max} \times \frac{1}{K_D} = B_{max} \times \text{affinity} \quad (1.2)$$

waarin: B_{max} = concentratie radioligand wanneer deze alle receptoren bezet
 K_D = dissociatieconstante van het radioligand bij evenwicht

B_{max} is een maat voor de receptordensiteit. De dissociatieconstante K_D is omgekeerd evenredig met de affiniteit en geeft de concentratie weer waarbij 50% van de receptoren of transporters bezet zijn (Innes et al., 2007; Kinahan and Fletcher, 2010; Nelissen et al., 2012).

De BP kwantificeert de concentratie specifieke binding in evenwicht ten opzichte van een referentieconcentratie. Afhankelijk van de referentieconcentratie kunnen *in vivo* drie bindingspotentialen gedefinieerd worden: BP_F , BP_P en BP_{ND} . BP_F kwantificeert ten opzichte van de concentratie vrij radioligand in het weefsel en kan gelijkgesteld worden aan de vrije plasmaconcentratie indien de radiotracer de BHB enkel passeert via passieve diffusie. BP_P maakt gebruik van de totale concentratie radioligand in het plasma, i.e. de vrije concentratie en de concentratie gebonden aan proteïnen, als referentieconcentratie. Ten slotte kwantificeert BP_{ND} ten opzichte van de concentratie nondisplaceable radioligand in het weefsel, i.e. de concentratie niet-specifiek gebonden en vrije concentratie. Deze laatste wordt typisch gebruikt bij referentieweefselmodellen waarbij de concentratie radioligand in receptorrijke gebieden vergeleken wordt met de concentratie radioligand in receptorarme gebieden (Innes et al., 2007).

Vaak wordt ook gebruik gemaakt van het distributievolume. Dit wordt gedefinieerd als het schijnbaar bloedvolume, dat nodig is om eenzelfde concentratie te bekomen in het volledige lichaam als de plasmaconcentratie. Bij *in vivo* imaging wordt echter gebruik gemaakt van een specifiek orgaan als target in plaats van het volledige lichaam. Daarbovenop wordt de hoeveelheid radioligand niet bepaald in het volledige orgaan, maar in een bepaald volume van het weefsel. Op die manier is het distributievolume bij *in vivo* imaging de ratio van de concentratie radioligand in een bepaald weefselvolume ten opzichte van de concentratie in het plasma en wordt het uitgedrukt in mL/cm³. Formule 1.3 geeft het verband weer tussen de bindingspotentiaal en het distributievolume (Innes et al., 2007).

$$BP_{ND} = \frac{V_T - V_{ND}}{V_{ND}} = \frac{V_T}{V_{ND}} - 1 \quad (1.3)$$

waarin: BP_{ND} = nondisplaceable bindingspotentiaal

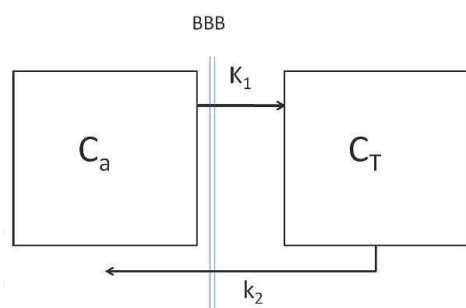
V_T = distributievolume van de totale radiotracer opname in het weefsel

V_{ND} = distributievolume van het nondisplaceable compartiment

1.5.2 Compartimentele modellen

Het fysiologisch systeem in het lichaam wordt onderverdeeld in een aantal compartimenten, die met elkaar interageren. Een compartiment wordt beschreven als het geheel van een chemische stof in een fysische ruimte. Binnen één compartiment is die chemische stof homogeen verdeeld. Compartimentele modellen kunnen beschreven worden aan de hand van lineaire, eerste orde differentiaalvergelijkingen. Via deze vergelijkingen kan de invloed van een concentratieverandering in het ene compartiment op de concentratie in andere compartimenten berekend worden.²

Het aantal compartimenten is afhankelijk van de chemische en biologische eigenschappen van het radioligand (Watabe et al., 2006). Het One Tissue Compartment model (1-TC model) (figuur 1.9) bestaat uit twee compartimenten, namelijk een weefselcompartiment en een plasmacompartiment. De uitwisselingsnelheid van de radiotracer tussen beide compartimenten wordt bepaald door twee snelheidsconstanten, die elk één richting van het transport doorheen de BHB beschrijven. De snelheid waarmee de radiotracer van het plasmacompartiment naar het weefselcompartiment diffundeert, wordt bepaald door K_1 en wordt uitgedrukt in mL per cm^3 weefsel per minuut. k_2 daarentegen bepaalt de snelheid waarmee de radiotracer van het weefselcompartiment naar het plasmacompartiment diffundeert en wordt uitgedrukt in fractie per minuut (Nelissen et al., 2012).

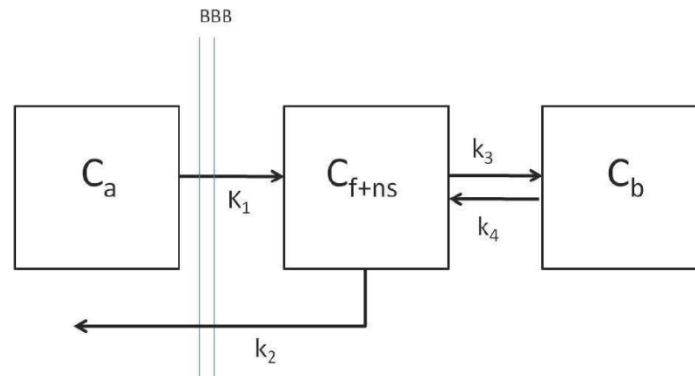


Figuur 1.9: One Tissue Compartment model (Nelissen et al., 2012).

In het Two Tissue Compartment model (2-TC model) (figuur 1.10) worden twee snelheidsconstanten toegevoegd, k_3 en k_4 . Deze bepalen de uitwisselingsnelheid van de radiotracer tussen de twee weefselcompartimenten. In het eerste weefselcompartiment

² http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_compartmental.html

bevindt zich de concentratie vrij en niet-specifiek gebonden radiotracer (C_{f+ns}) terwijl de concentratie specifiek gebonden radiotracer (C_b) zich in het tweede weefselcompartment bevindt (Nelissen et al., 2012).



Figuur 1.10: Two Tissue Compartment model (Nelissen et al., 2012).

Zolang er geen irreversibele opname is in een compartiment kan het distributievolumen bepaald worden voor elk compartimenteel model (Innes et al., 2007; Nelissen et al., 2012).³

Bepaling in het 1-TC model via formule 1.4:

$$V_T = \frac{C_T}{C_a} = \frac{K_1}{k_2} \quad (1.4)$$

waarin: C_T = concentratie radiotracer in het weefselcompartment

C_a = concentratie radiotracer in het plasma

V_T = distributievolumen

Bepaling in het 2-TC model via formule 1.5:

$$V_T = \frac{K_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4}\right) \quad (1.5)$$

waarin: V_T = distributievolumen

K_1, k_2, k_3 en k_4 = snelheidsconstanten

1.5.3 Grafische modellen

Een grafische analyse maakt gebruik van lineaire regressie om de binding van radiotracers te kwantificeren. Hierbij wordt verondersteld dat een lineaire relatie ontstaat

³ http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_distribution_volume.html

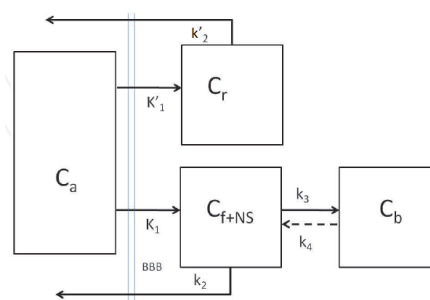
tussen twee variabelen na een bepaalde tijd (t^*). De Patlak plot en de Logan plot zijn de twee methodes, die hierbij meest frequent gebruikt worden (Varga and Szabo, 2002).

De Patlak plot is een grafische analyse van radiotracers, die een irreversibele binding vertonen ($k_4 = 0$). Bij steady state condities ($t = t^*$) wordt via lineaire regressie de netto influx constante bepaald (Nelissen et al., 2012). De Logan plot daarentegen is een grafische analyse van radiotracers, die een reversibele binding vertonen. Op het moment dat steady state condities bereikt worden, kan het distributievolume bepaald worden via lineaire regressie (Nelissen et al., 2012).

1.5.4 Referentieweefselmodellen

De invoerfunctie bij referentieweefselmodellen is gebaseerd op een tijd-activiteitscurve (TAC) van een referentiezone waarin in theorie geen specifieke binding plaatsvindt. Dit in tegenstelling tot de hierboven beschreven kinetische compartimentele modellen waarbij ook de activiteit in plasma bepaald wordt. Aangezien er bij referentieweefselmodellen geen plasma-inputcurve meer vereist is, is deze methode minder invasief en moet er ook geen analyse van metabolieten plaatsvinden (Lammertsma and Hume, 1996; Millet et al., 2002).

In het referentieweefselmodel wordt het tijdsverloop van de opname van de radiotracer in een Region Of Interest (ROI) uitgedrukt in termen van opname in het referentieweefsel. Hierbij wordt verondersteld dat het nondisplaceable distributievolume in beide weefsels gelijk is ($K_1/k_2 = K'_1/k'_2$). Bij het origineel 4-parameter referentieweefselmodel (figuur 1.11) bestaat de referentiezone uit één compartiment en de ROI uit twee compartimenten, namelijk één compartiment voor de concentratie specifiek gebonden radiotracer en één voor de concentratie nondisplaceable radiotracer (Lammertsma and Hume, 1996; Millet et al., 2002).



Figuur 1.11: Reference Tissue Model (gebaseerd op Nelissen et al., 2012).

Via verdere simplificatie van het 4-parameter referentiemodel kan het Simplified Reference Tissue model (SRTM) bekomen worden. In dit model wordt geen onderscheid gemaakt tussen het specifieke en het nondisplaceble compartiment. De ROI wordt dus slechts beschreven door één compartiment waardoor minder parameters bepaald moeten worden. Het SRTM kan beschreven worden door formule 1.6 (Lammertsma and Hume, 1996; Nelissen et al., 2012).

$$C(t) = R_1 C_r(t) + R_1 (k'_2 - k_{2a}) C_r(t) \otimes e^{-k_{2a}t} \quad (1.6)$$

waarin: $C(t)$ = activiteitsconcentratie in targetweefsel in functie van de tijd
 $C_r(t)$ = activiteitsconcentratie in referentieweefsel in functie van de tijd
 R_1 = ratio van traceropname in targetweefsel ten opzichte van traceropname in referentieweefsel (K_1/K'_1)
 k'_2 = snelheidsconstante van referentieweefsel naar plasma
 k_{2a} = apparente k_2 , snelheidsconstante van targetweefsel naar plasma ($k_2/1 + BP$)
 \otimes = convolutiesymbool, i.e. bewerking van twee wiskundige functies

Zoals eerder vermeld kan het distributievolume van radiotracers met reversibele binding bepaald worden via de Logan plot. Wanneer de arteriële inputfunctie hierin vervangen wordt door een referentiezone wordt het Logan Reference model bekomen (formule 1.7) (Nelissen et al., 2012).

$$\frac{\int_0^t C_T(\tau) d\tau}{C_T(t)} = DVR \frac{\int_0^t C_r(\tau) d\tau}{C_r(t)} + B \quad (1.7)$$

waarin: C_T = concentratie radiotracer in het weefselcompartiment
 C_r = concentratie radiotracer in het referentieweefselcompartiment
 $DVR = BP_{ND} + 1$
 B = constante wanneer C_T/C_r constant is na bepaalde tijd (t^*)

Ten slotte wordt het Multilinear Reference Tissue Model (MRTM) gebruikt als alternatief voor het Logan Reference model wanneer de veronderstelling dat C_T/C_r een constante is, niet opgaat (Nelissen et al., 2012).

2. OBJECTIEVEN

Serotonine transporters (SSRIs) staan centraal in de behandeling van psychiatrische aandoeningen zoals angst en depressie. [¹¹C]DASB is een selectieve radiotracer voor deze transporters en wordt in deze masterproef aangewend om veranderingen in BP te kwantificeren veroorzaakt door therapie met escitalopram, een SSRI die de hoogste selectiviteit vertoont voor SERTs. Uit humane studies is reeds gebleken dat 80% van de transporters bezet moet zijn om een therapeutisch effect uit te lokken. Hoewel SSRIs algemeen aangewend worden voor de behandeling van gedragsstoornissen in honden is geen informatie gekend omtrent de geschikte dosis en het geschikte doseringsschema voor therapeutisch effect. De halfwaardetijd bij honden is namelijk korter dan deze bij mensen waardoor optimale dosis en doseringsschema bij mensen vaak resulteren in therapeutisch falen bij honden.

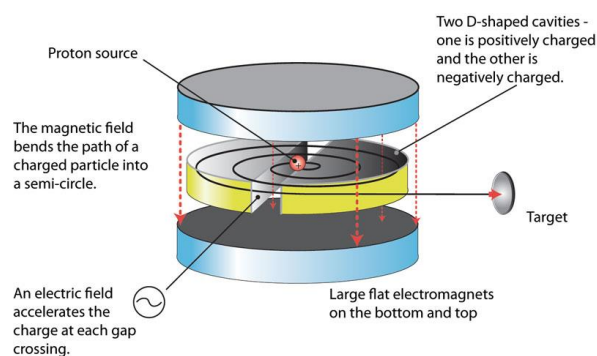
In de cyclotronafdeling van het UZ-Gent vindt de synthese en opzuivering van [¹¹C]DASB plaats waarna verschillende kwaliteitscontroles uitgevoerd worden. Voor elke hond worden twee dynamische PET-scans uitgevoerd, één voor therapie en één na vier dagen therapie met escitalopram waarbij de totale dagdosis per hond verschilt. Tevens worden per hond vijf plasmastalen afgenomen en geanalyseerd via GC-MS welke toelaat de dosis escitalopram en de SERT-occupantie te linken aan de bekomen steady state plasmaconcentraties.

Met behulp van een MRI-beeld en manueel afgelijnde hersenregio's (ROIs) kunnen de PET-beelden verwerkt worden. De bekomen tijd-activiteitcurves per ROI worden ingeladen in de kinetische modelleringstool van het verwerkingsprogramma PMOD waarna de k'_2 waarden van [¹¹C]DASB bepaald worden via SRTM 2 en de BP_{ND} waarden gekwantificeerd worden door gebruik te maken van het Logan Reference model. Met behulp van de wijziging in BP_{ND} voor en na therapie kan de occupantie berekend worden voor elke totale dagdosis. Deze occupanties in functie van de plasmaconcentraties onder steady state condities maken het mogelijk een optimaal behandelingschema op te stellen.

3. MATERIALEN EN METHODEN

3.1 PRODUCTIE VAN ^{11}C

De productie van ^{11}C vindt plaats volgens de kernreactie $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ met behulp van een Cyclone 18/9 cyclotron deeltjesversneller (IBA, Louvain-La-Neuve, België). Deze deeltjesversneller geeft geladen deeltjes een dusdanig hoge energie zodat de coulombbarrière van de targetatomen, i.e. ^{14}N , overwonnen kan worden wat resulteert in de initiatie van kernreacties. Het toestel bestaat uit een vacuüm waarbij twee koperen D-vormige elektroden een centraal gelegen ionenbron omringen. Deze D-vormige elektroden bevinden zich bovendien tussen twee parallel gelegen elektromagnetische elektroden (figuur 3.1) (Saha, MacIntyre & Go, 1992; Strijckmans, 2001; Elsinga, 2002; De Vos, 2012).



Figuur 3.1: Principe van een cyclotron.⁴

Een continue stroom van H_2 -gas wordt door een plasma gestuurd waarbij dit gas zal ioniseren en er een mengsel van protonen, hydride ionen en elektronen zal ontstaan. Het plasma wordt gevormd door bij heel hoge temperaturen een elektrische boog te creëren tussen twee elektroden. De hydride ionen worden uit het mengsel geïsoleerd door, ter hoogte van een fijn gleufje in de elektrische boog, een positief geladen pooler te plaatsen op ongeveer 1 mm afstand. Deze pooler zal zowel de hydride ionen als de elektronen wegtrekken uit het plasma. De protonen worden afgevoerd met de continue stroom van H_2 -gas. De hydride ionen maken nagenoeg 150 steeds groter wordende cirkelvormige bewegingen onder invloed van een verticaal, homogeen magnetisch veld. Een oscillerend potentiaalverschil, aangelegd tussen de twee koperen D-vormige elektroden, zorgt voor een toename van de kinetische energie op het moment dat de hydride ionen zich van de ene naar de andere elektrode begeven. (Saha, MacIntyre & Go, 1992; Strijckmans, 2001; De Vos, 2012).

⁴ <http://atomic.lindahall.org/what-is-an-atom-smasher.html>

Enmaal ze nagenoeg 150 cirkelvormige bewegingen gemaakt hebben, waarbij ze een kinetische energie van 18 MeV verwerven, worden ze doorheen een stripper geleid. Dit is een dunne koolstoffilm, die de elektronen van de hydride ionen capteert, waardoor protonen ontstaan met voldoende kinetische energie om de kernreactie te initiëren. Door de ladingsverandering verandert de draairichting van de versnelde deeltjes waardoor ze afgevuurd worden op een gastarget (De Vos, 2012).

Er wordt gebruik gemaakt van een conisch cilindervormig aluminium gastarget (1-4 L), die gevuld is met een mengsel van stikstofgas en 5% waterstofgas. Het gas bevindt zich onder een verhoogde druk van 10-12 bar. Uiteindelijk ontstaat een mengsel van ^{11}C CH₄, N₂, NH₃ en H₂ (Elsinga, 2002; De Vos). Daarnaast wordt via de kernreactie $^{14}\text{N} (p,pn) ^{13}\text{N}$ ook in minieme mate het nevenproduct $^{13}\text{NH}_3$ gevormd (Hichwa, Moskwa and Hugel, 1989).

3.2 PRODUCTIE VAN ^{11}C DASB

^{11}C DASB wordt gesynthetiseerd vanuit een commercieel beschikbare precursor, N-desmethyl DASB of MASB (ABX, Radeberg, Duitsland), via een nucleofiele substitutiereactie (S_N2-reactie) waarbij de secundaire aminogroep van MASB optreedt als nucleofiel. ^{11}C methyltriflaat wordt aangewend als elektrofiel en wordt gevormd vanuit ^{11}C CH₄.

3.2.1 Isolatie $^{11}\text{CH}_4$

Het gasmengsel wordt met behulp van een N₂-gasflow doorgestuurd van het cyclotron naar de hot cell. Dit is een ruimte, die met lood afgeschermd wordt, en dient ter bescherming van de gebruiker tegen de radioactieve straling waarmee in deze hot cell gewerkt wordt. De synthese vindt er plaats in een Tracerlab FX C-Pro module (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), die afgebeeld is in figuur 3.2. Het aangevoerde gasmengsel wordt allereerst geleid over een kolom, die voor de helft gevuld is met Ascarite II (20-30 mesh, Sigma Aldrich, St Louis, US). Dit zijn NaOH gecoate silicapartikels, die sporen NH₃ uit het gasmengsel capteren. De tweede helft is gevuld met P₂O₅ en een indicator (Sicapent, Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland) waardoor eventueel aanwezige sporen water gecapteerd kunnen worden. Ten slotte passeren de overige componenten een CH₄-trap, i.e. een cryogene trap. Deze bestaat uit een buis gevuld met Carbosieve S-II (Sigma Aldrich, St Louis, US), die omgeven is door vloeibare stikstof bij -196°C waarbij enkel ^{11}C CH₄ zal uitvriezen. De niet-gecapteerde

gassen (N₂ en H₂) worden naar een opvangzak gestuurd. De activiteit ter hoogte van de kolom wordt gecontroleerd via een plaatselijke Geiger-Müller (GM) teller en wanneer deze stabiel is, wordt de kolom opnieuw opgewarmd. Op die manier wordt [¹¹C]CH₄ terug vrijgesteld van de kolom waarna het door de verschillende kolommen van de module geleid wordt door gebruik te maken van heliumgas als dragergas (Elsinga, 2002).

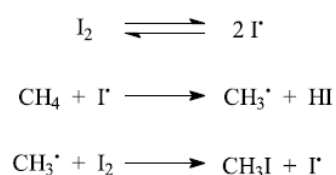


Figuur 3.2: Overzicht Tracerlab FX C-Pro module.

3.2.2 Synthese [¹¹C]CH₃I

De synthese van [¹¹C]methyljodide kan gebeuren via de gasfase methode of via de natte fase methode. De voorkeur gaat uit naar de gasfase methode gezien de lage specifieke activiteit, die gepaard gaat met synthese via de natte fase methode.

De gasfase methode is gebaseerd op de radicalaire jodering (figuur 3.3) van methaan met jodide damp en vindt plaats in een verwarmde (740°C) kwartskolom.



Figuur 3.3: Radicalaire jodering: vorming van CH₃I uit CH₄ en I₂ (Elsinga, 2002).

De damp wordt gecreëerd door de opwarming van een kolom met joodkristallen (Sigma Aldrich, St Louis, US). De oven waarin deze kolom zich bevindt wordt kortstondig

opgewarmd tot 100°C waardoor een kleine hoeveelheid van het jood gesublimeerd wordt. De hierboven beschreven radicalaire reactie resulteert in het ontstaan van $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ en HI. Deze componenten worden vervolgens geleid over een kolom gevuld met Ascarite II waardoor sporen HI verwijderd worden. Sicapent zal in een volgende kolom, zoals eerder beschreven, eventueel aanwezige sporen water capteren. Het gevormde $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ kan hierna gecapteerd worden door een Porapak Q kolom bij kamertemperatuur. Gezien het lage rendement (20-25%) van de radicalaire jodering zal het overblijvende $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ opnieuw door de jodide buis gestuurd worden. Hierdoor kan uiteindelijk een rendement van ongeveer 38% bekomen worden. Door opwarming tot 190°C verliest $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ten slotte zijn affiniteit voor Porapak Q waardoor het opnieuw vrijgesteld wordt (Elsinga, 2002).

3.2.3 Conversie tot $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$

Het gevormde $[^{11}\text{C}]\text{methyljodide}$ wordt verder omgezet tot $[^{11}\text{C}]\text{methyltriflaat}$ gezien de voordelen ervan. Zo is $[^{11}\text{C}]\text{methyltriflaat}$ reactiever door de aanwezigheid van een betere leaving group (LG) waardoor de $\text{S}_{\text{N}}2$ -reactie kan doorgaan bij kamertemperatuur en de reactietijd ingekort kan worden. Daarnaast is ook minder precursor nodig waardoor de opzuivering gemakkelijker verloopt en synthesekosten gedrukt kunnen worden (Nagren et al., 1995; Elsinga, 2002; Van Laeken et al., 2013). Ook is $[^{11}\text{C}]\text{methyltriflaat}$ minder vluchtig waardoor het gecapteerd kan worden in een klein volume (Van Laeken et al., 2013).

Om $[^{11}\text{C}]\text{methyljodide}$ om te zetten in $[^{11}\text{C}]\text{methyltriflaat}$ wordt het door een kolom met zilvertriflaat gestuurd, die opgewarmd is tot 220°C. Zilvertriflaat wordt gemengd met Carbograph in een 50:50 verhouding om een zeer fijne verdeling te bekomen (Elsinga, 2002).

3.2.4 Synthese $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$

Eenmaal $[^{11}\text{C}]\text{methyltriflaat}$ gevormd is, kan de $\text{S}_{\text{N}}2$ -reactie met MASB (ABX, Radeberg, Duitsland) plaatsvinden. Met behulp van heliumgas als dragergas wordt $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ in de reactievial geborreld waarin 50 μg precursor opgelost is in 200 μL aceton (Sigma Aldrich, Bornem, België). Om de $\text{S}_{\text{N}}2$ -reactie te beëindigen en het mengsel meer geschikt te maken voor opzuivering via HPLC, wordt 700 μL 25 mM fosfaatbuffer pH 7 toegevoegd (Van Laeken et al., 2013).

3.3 OPZUIVERING VAN [¹¹C]DASB

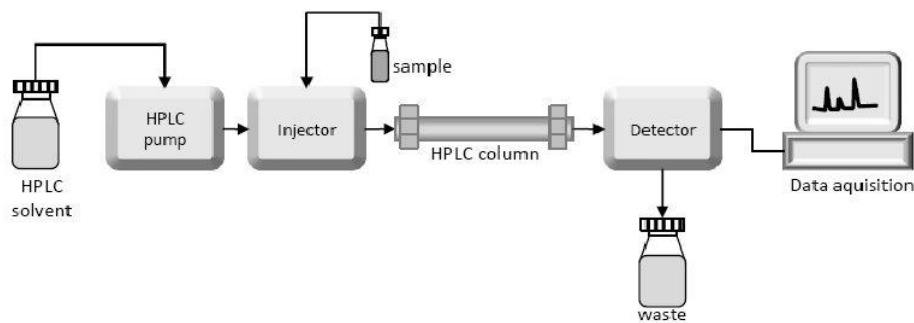
Na het beëindigen van de S_N2-reactie is een mengsel aanwezig voornamelijk bestaande uit aceton, precursor, [¹¹C]DASB, [¹¹C]CH₃OTf, [¹¹C]CH₃I. Indien niet alle sporen H₂O uit het systeem verwijderd zijn kan er eveneens reactie optreden tussen deze sporen H₂O en [¹¹C]CH₃OTf met vorming van [¹¹C]CH₃OH. De opzuivering van [¹¹C]DASB gebeurt via High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Hiervoor wordt het reactiemengsel op een 1 mL HPLC-loop gebracht waarna de componenten gescheiden worden met behulp van een analytische Alltima™ HP CN kolom (150 x 4,6 mm, 5 μm, Grace, Deerfield, USA) en een Sykam S1122 pomp (Sykam GmbH, Eresing, Duitsland). Er wordt een flow gehanteerd van 1 mL/min. De mobiele fase bestaat uit een 25 mM fosfaatbuffer pH 7/ethanol 65/35 (V/V) en wordt aangemaakt in een verticale Laminaire Airflow (LAF) kast. Hierin wordt lucht aangezogen en gefilterd door middel van een gewone filter en een High Efficiency Particulate Arrestance (HEPA) filter en vervolgens van bovenaf op het werkoppervlak geblazen. Op die manier kan steriel gewerkt worden.

HPLC is een scheidingstechniek, die gebaseerd is op de verdeling van de componenten van een matrix tussen twee fasen: een vaste stationaire fase en een vloeibare mobiele fase. De stationaire fase wordt gedefinieerd als de pakking van de HPLC-kolom waarbij de mobiele fase de matrix langs deze stationaire fase leidt. HPLC-systemen maken gebruik van een pomp, die de mobiele fase met een constante flow doorheen de kolom pompt, en een injector, die de matrix injecteert in de kolom via een loop. Na passage van de chromatografische kolom wordt de detector bereikt waarbij een Ultraviolet (UV) detector de meest gebruikte is.⁵ De werking van deze detector is gebaseerd op de wet van Lambert-Beer (formule 3.1), die een evenredig verband beschrijft tussen de absorptie en de concentratie licht absorberende stof in de oplossing. De absorptie van licht met voldoende energie resulteert in de transitie van een elektron naar een moleculair orbitaal (MO) met hogere energie, i.e. promotie van het elektron van de grondtoestand naar de geëxciteerde toestand. UV-licht heeft slechts voldoende energie voor twee transities, die beide een elektron overbrengen in een π* antibinding MO. Hierdoor kunnen enkel componenten met π-elektronen UV-licht absorberen. Door de aanwezigheid van aromatische ringen met π-elektronen kunnen MASB en DASB gedetecteerd worden met een UV-detector (Bruce, n.d.). De detectie gebeurt bij 220 nm gezien bij deze golflengte zowel MASB als DASB een hoog signaal geven en aceton een laag.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3.1)$$

waarin: A = absorptie
 ε = molaire extinctiecoëfficiënt (L/mol.cm)
 c = concentratie absorberende stof (mol/L)
 l = weglengte (cm)

Ten slotte worden de signalen van de detector omgezet in chromatografische data. Een overzicht van het HPLC-systeem wordt weergegeven in figuur 3.4.⁵

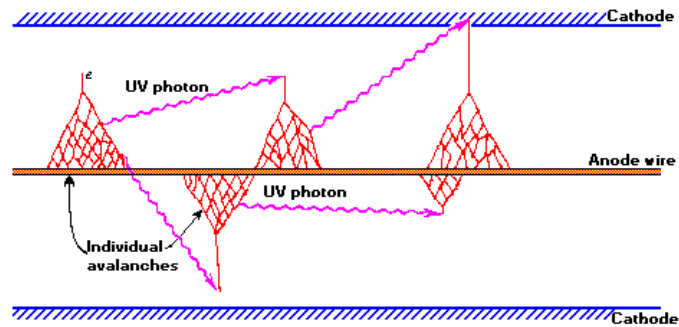


Figuur 3.4: Overzicht van het HPLC-systeem.⁶

Om de radioactiviteit te detecteren in de hot cell bevindt zich een GM-teller, die in serie staat met de UV-detector. De resulterende stroompuls is hierbij niet evenredig met de energie van de oorspronkelijke radioactieve straling waardoor geen onderscheid gemaakt kan worden tussen de verschillende types radioactieve straling. De GM-teller bestaat uit een meetbuis gevuld met argongas en een centrale anode (figuur 3.5). Onder invloed van radioactieve straling worden gasmoleculen geïoniseerd waardoor positieve ionen en elektronen ontstaan. Door het grote potentiaalverschil (750-1000 V) tussen beide elektrodes worden de elektronen zodanig versneld dat ze een wolk van ionisaties veroorzaken. Op die manier ontstaat een lawine aan elektronen, die naar de centrale anode bewegen, en daar een grote puls veroorzaken. De positieve ionen zijn veel zwaarder en bewegen trager naar de kathode. Dit bepaalt de dode tijd van de GM-teller, i.e. tijd waarin de GM-teller ongevoelig is voor nieuwe invallende radioactieve straling (De Vos, 2012; Prekeges, 2013).

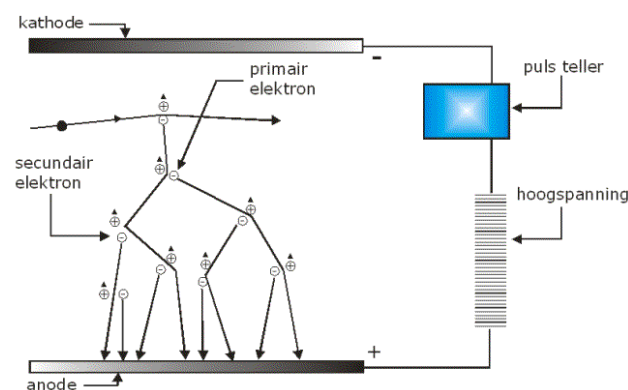
⁵ <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>

⁶ <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44034.pdf>



Figuur 3.5: Schema van een Geiger-Müller teller (De Vos, 2012).

De HPLC-fractie die [^{11}C]DASB bevat, wordt gedurende 2,4 minuten opgevangen en vervolgens over twee in serie geplaatste steriele filters (poriëngrootte $0.22\ \mu\text{m}$, Merck Millipore, Darmstadt, Duitsland) in een opvangvial geleid, welke reeds 6 mL fysiologische oplossing bevat. Het resultaat is een 8,4 mL oplossing met een ethanolpercentage van 10%, die zonder post-formulatiestappen intraveneus geïnjecteerd kan worden in mens of dier. De opvangvial bevindt zich in een dosiscalibrator, die de totale activiteit van het eindproduct meet. Een dosiscalibrator (figuur 3.6) is een gasdetector, die opgebouwd is uit een meetkamer gevuld met argongas. In deze meetkamer wordt een potentiaalverschil van 150-200 V aangelegd tussen twee elektroden. Door ionisatie van het gas onder invloed van radioactieve straling ontstaan elektronen en positief geladen ionen. Deze zullen migreren naar de elektrode met tegenovergestelde lading en op die manier een elektrisch signaal genereren. De hoeveelheid stroom is hierbij afhankelijk van de energie van de straling, de activiteit en het type straling (De Vos, 2012).⁷



Figuur 3.6: Principe van een dosiscalibrator (De Vos, 2012).

⁷ <http://www.nucmedtutorials.com/dwdcopsqc/dc1.html>

Na verwijdering van de aanwezige toevoer- en ventilatienaald wordt de opvangvial via een schacht uit de hot cell verwijderd en vervolgens aan verschillende kwaliteitscontroles onderworpen.

3.4 KWALITEITSCONTROLE

De Europese Farmacopee 8.5 legt een aantal eisen op voor ^{11}C -gelabelde radioliganden vooraleer ze vrijgegeven mogen worden voor injecties in mensen. Volgende kwaliteitscontroles worden hiervoor uitgevoerd:

- Kwaliteitscontrole van de opzuivering via HPLC
- pH meting met behulp van pH-strips
- Meting van het gamma-spectrum met behulp van een NaI(Tl) scintillatiedetector
- Bepaling van de halfwaardetijd

Na vrijgave dienen echter nog verschillende kwaliteitscontroles uitgevoerd te worden:

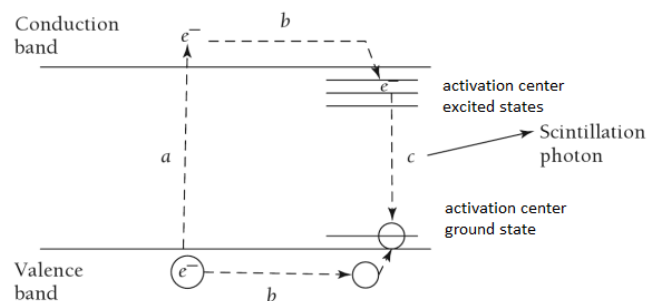
- Controle van de aanwezigheid van residuele solventen via gaschromatografie
- Controle van de steriliteit via twee voedingsbodems
- Controle van de integriteit van de gebruikte filters via de bubble point test
- Bepaling van endotoxines via de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test

Doordat in deze studie enkel met proefdieren gewerkt wordt en omwille van de hoge kostprijs van sommige kwaliteitscontroles worden niet alle bovenstaande kwaliteitscontroles uitgevoerd.

3.4.1 Meting van het gamma-spectrum

Het gamma-spectrum wordt gemeten met behulp van een NaI(Tl) scintillatiedetector en wordt gebruikt om radionucliden die gamma emissie vertonen, te identificeren. De fotopiek, aanwezig op het gamma-spectrum, is afkomstig van de cascade van excitaties en deëxcitaties van foto-elektronen, die veroorzaakt wordt door het foto-elektrisch effect. De intensiteit van deze piek is hierbij evenredig met de energie van de invallende gammastraal (511 keV). Een waarde tussen 486 en 536 keV wordt vooropgesteld.

Een NaI(Tl) scintillatiedetector bestaat uit een NaI kristal waaraan een kleine hoeveelheid thalium toegevoegd wordt om onzuiverheid te creëren in het kristal. Deze onzuiverheid dient als activator en heeft een conductie- en valentieband, die gelegen zijn tussen deze van het kristal, waardoor de energieniveaus in het kristal gewijzigd worden. Wanneer een gammastraal invalt, ontstaat een fotonelektron dat ionisaties en excitaties veroorzaakt in de valentieband van het kristal. Hierdoor wordt een elektron geëxciteerd naar de conductieband waardoor een gat ontstaat in de valentieband (figuur 3.7, stap a). Dit gat verplaatst zich vervolgens door beweging van de aanwezige elektronen en kan opgevuld worden met een elektron van de grondtoestand van thalium. Het elektron in de conductieband van het kristal kan nu terugvallen naar de geëxciteerde toestand van thalium (figuur 3.7, stap b). Ten slotte wordt een lichtfoton uitgestraald door terugkeer van het elektron in de geëxciteerde toestand naar de grondtoestand (figuur 3.7, stap c). Dit lichtfoton bezit onvoldoende energie om een elektron van de valentieband van het kristal te exciteren (Prekeges, 2013).



Figuur 3.7: Scintillatieproces (gebaseerd op Prekeges, 2013).

Het scintillatiefoton wordt gedetecteerd met behulp van een fotomultiplicatorbuis (PMT) en wordt in verschillende stappen omgezet in een elektrisch signaal. De fotokathode zal het scintillatiefoton in een eerste stap omzetten in een elektron, dat vervolgens naar een reeks dynoden beweegt onder invloed van een elektrisch veld. Deze dynoden versterken het oorspronkelijk signaal van het elektron tot een meetbaar elektrisch signaal. Dit is mogelijk door de opeenvolgende botsingen met de dynoden waarbij de absorptie van één elektron telkens resulteert in de emissie van drie tot zes elektronen. De anode verzamelt ten slotte alle geëmitteerde elektronen van de laatste dynode en geeft het elektrisch signaal (Prekeges, 2013).

3.4.2 Bepaling van de halfwaardetijd

De halfwaardetijd (formule 3.2) is de tijd waarin het oorspronkelijk aantal radionucliden gereduceerd wordt tot de helft. Een waarde tussen 19,9 en 20,9 minuten wordt vooropgesteld.

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (3.2)$$

waarin: $T_{1/2}$ = halfwaardetijd

λ = vervalconstante

De vervalconstante in formule 3.2 wordt berekend via de formule van radioactief verval (formule 3.3). Hiervoor wordt een bepaalde hoeveelheid activiteit in een dosiscalibrator geplaatst waarbij de activiteit gemeten wordt bij de start en na een welbepaalde tijd.

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad (3.3)$$

waarin: A_t = activiteit op tijdstip t

A_0 = activiteit op tijdstip 0

λ = vervalconstante

t = tijd (meestal 5 min)

3.4.3 Kwaliteitscontrole van de opzuivering via HPLC

Om de chemische identiteit, de chemische en radio-chemische zuiverheid en de specifieke activiteit te bepalen, wordt een Reversed Phase HPLC-analyse uitgevoerd. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een Agilent 1100 G1311A HPLC-pomp (Agilent, Santa Clara, California), een Alltima C18 HPLC kolom (Grace, Deerfield, USA) (250 mm x 4,6 mm) en een mobiele fase bestaande uit 0,05M ammoniumacetaatbuffer pH 5,5/acetonitrile: 50/50 (V/V). Door de extra [^{11}C]CH₃ groep op de stikstof is DASB meer lipofiel dan MASB waardoor DASB een hogere affiniteit heeft voor de stationaire fase en dus later zal elueren dan MASB. De detectie gebeurt met behulp van een Ultimate 3000 UV-detector (Dionex, Sunnyvale, California) bij 254 nm en de radioactiviteit wordt gemeten met een Bioscan FC3500 (Eckert & Ziegler, Hopkinton, USA).

3.4.3.1 Chemische identiteit

Voor de identificatie van DASB wordt gebruik gemaakt van een referentieoplossing DASB. De retentietijd van de piek van DASB van het staal dient hiervoor gelijkaardig te zijn aan deze van de referentieoplossing.

3.4.3.2 Concentratie [¹¹C]DASB

Aan de hand van de referentieconcentratie DASB (1,36 µg/mL) kan de concentratie DASB in het staal berekend worden via formule 3.4.

$$c = \frac{\text{piekoppervlakte DASB in staal}}{\text{piekoppervlakte DASB in referentieoplossing}} \times 1,36 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (3.4)$$

3.4.3.3 Chemische zuiverheid

Met behulp van een referentieoplossing MASB (0,135 µg/mL) wordt een controle uitgevoerd op de resterende concentratie aan precursor in het eindstaal (formule 3.5). Ook wordt de eventuele aanwezigheid van bijproducten nagegaan.

$$c = \frac{\text{piekoppervlakte MASB in staal}}{\text{piekoppervlakte MASB in referentieoplossing}} \times 0,135 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (3.5)$$

3.4.3.4 Radiochemische zuiverheid

De radiochemische zuiverheid wordt uitgedrukt als de ratio van de hoeveelheid radionuclide aanwezig in de gewenste chemische vorm, namelijk [¹¹C]DASB, ten opzichte van de totale hoeveelheid activiteit van dat radionuclide. Een radiochemische zuiverheid van ≥ 95% wordt vooropgesteld. Als radiochemische onzuiverheden kunnen onder andere [¹¹C]methyljodide en [¹¹C]methanol voorkomen.

3.4.3.5 Specifieke activiteit

De specifieke activiteit (SA) wordt gedefinieerd als de hoeveelheid activiteit van een radionuclide ten opzichte van de totale hoeveelheid van de betreffende chemische component uitgedrukt in massa-eenheden (mol of gram). Het kan berekend worden via formule 3.6 waarin de massa van de referentie in het eindvolume bepaald wordt aan de hand van de concentratie van de referentie (1,36 µg/mL).

$$SA = \frac{A \times \text{oppervlakte ref} \times \text{MG DASB}}{\text{oppervlakte staal} \times m \text{ ref in eindvolume}} \quad (3.6)$$

waarin: A = activiteit gemeten in een dosiscalibrator (GBq)
 $MG\ DASB$ = moleculair gewicht DASB (283 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)
 m = massa (μg)

3.4.3.6 Percentage SERT-bezetting

Het percentage SERT-bezetting kan berekend worden via formule 3.7 waarbij de ED_{50} -waarde van DASB 56 nmol/kg bedraagt (Passchier et al., 2002; Wilson et al., 2002). Bij proefdierstudies wordt een bezetting van < 5% vooropgesteld om onder tracercondities te kunnen werken. Deze tracercondities zijn gebaseerd op 3 principes. Allereerst mag het fysiologisch systeem niet gewijzigd of verstoord worden. Zo kan een te hoge concentratie mogelijks een farmacologisch effect uitlokken. Ook moet de interactie met het fysiologisch systeem voorspelbaar, informatief en reproduceerbaar zijn. Ten slotte moet de tracer ook een concentratie hebben die kwantitatief te bepalen is.

$$O = \frac{\text{geïnjecteerde activiteit (MBq)}}{(G \times ED_{50} \times SA) + \text{geïnjecteerde activiteit (MBq)}} \times 100 \quad (3.7)$$

waarin: O = target occupantie (%)
 G = gewicht van de hond (g)
 ED_{50} = dosis waarbij 50% van de populatie een therapeutisch effect ondervindt ($\mu\text{mol}/\text{g}$)
 SA = specifieke activiteit (MBq/ μmol)

3.4.4 pH meting

De pH van het radioactief eindproduct wordt gemeten met behulp van pH-strips. Een pH tussen 4,5 en 8,5 wordt vooropgesteld.

3.5 BEELDVORMING

3.5.1 Positron Emissie Tomografie

Positron emissie tomografie (PET) is een niet-invasieve beeldvormingstechniek, die gebaseerd is op β^+ -verval of positron emissie van radionucliden. Componenten gelabeld met deze radionucliden worden in het lichaam gebracht en via het emissiesignaal kan de *in vivo* distributie in beeld gebracht worden. Op die manier kunnen biochemische processen *in vivo*

gemeten worden (Basu et al., 2011; Zhang and Fox, 2012). De meeste gebruikte radionucliden worden weergegeven in tabel 3.1 (Paans et al., 2002).

Tabel 3.1: Meest gebruikte radionucliden met hun halfwaardetijd.

Radionuclide	Halfwaardetijd (min)
^{11}C	20
^{13}N	10
^{15}O	2
^{18}F	110

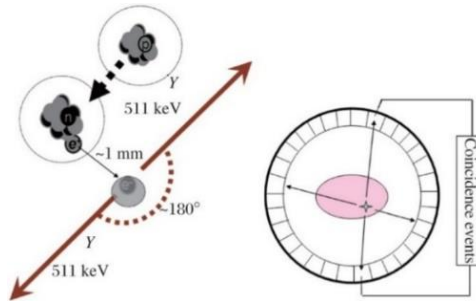
Bovenstaande positron-emitterende radionucliden hebben een protonenexcedent in hun kern en trachten zich bijgevolg te stabiliseren. Hierbij worden de overtollige protonen omgezet in neutronen via het uitzenden van een positron, i.e. een elektron met een positieve lading (β^+). Aan dit positron wordt een energie meegegeven, die varieert van 0 tot E_{\max} . Naast een positron wordt ook een neutrino (ν) geëmitteerd. Dit deeltje heeft geen massa en geen lading, maar wel een bepaalde hoeveelheid energie. Deze energie is afhankelijk van de hoeveelheid energie, die meegegeven wordt aan het positron. Op die manier kan voldaan worden aan de wet van behoud van energie. Het proces van β^+ -verval (formule 3.8) resulteert in een dochtermolecule met hetzelfde massagetal maar met een proton minder en kan enkel optreden bij radionucliden met een energieoverschot van minstens 1,022 MeV. Deze energie is nodig voor de vrijstelling van het positron en een bijkomend orbitaalelektron (Paans et al., 2002; Basu et al., 2007; De Vos, 2012).



waarin: n = massagetal A, m = atoomgetal Z
 X = moederisotoop, Y = dochterisotoop
 β^+ = positron, ν = neutrino

Het geëmitteerde positron beweegt doorheen het weefsel en verliest hierbij continu aan energie door ermee te botsen. Als het positron quasi tot rust gekomen is, vindt het proces van annihilatie plaats waarbij het positron reageert met een orbitaalelektron. De massa van beide deeltjes wordt hierbij omgezet in energie. Deze wordt uitgezonden onder de vorm van twee γ -straal fotonen onder een hoek van 180° met elk een energie van 511 keV (figuur 3.8) (Paans et al., 2002; Basu et al., 2007; De Vos, 2012).

De detectie van de gevormde fotonen is gebaseerd op coïncidentie. Hierbij worden de fotonen geregistreerd indien ze beiden gedetecteerd worden door tegenoverstaande detectoren binnen een tijdsvenster van 3-15 nanoseconden. Annihilatie vindt hierbij plaats op de lijn tussen de twee detectoren, i.e. line of response (LOR) (Basu et al., 2007).



Figuur 3.8: Principe van annihilatie en positron emissie tomografie (Zhang and Fox, 2012).

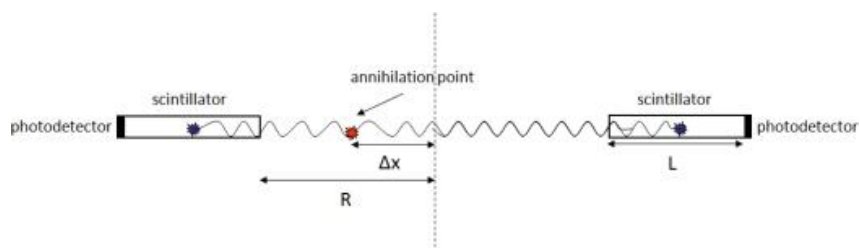
Time of flight (TOF) PET kan bovendien ook de positie op de LOR inschatten (figuur 3.9). Via formule 3.9 kan het tijdsverschil (Δt) in detectie van beide fotonen namelijk gecorreleerd worden aan de afstand (Δx) ten opzichte van het middelpunt van de LOR (Spanoudaki & Levin, 2010).

$$\Delta x = \frac{c\Delta t}{2} \quad (3.9)$$

waarin: Δx = afstand van het foton t.o.v. het centrum van de Field of View (FoV)

Δt = tijdsverschil in detectie van beide fotonen

c = lichtsnelheid



Figuur 3.9: Positie van annihilatie op de LOR (Spanoudaki & Levin, 2010).

Deze betere lokalisatie van annihilatie resulteert in een betere signaal-ruisverhouding bij de beeldvorming ten opzichte van de klassieke PET (Spanoudaki & Levin, 2010).

Voor de detectie wordt gebruik gemaakt van scintillatiedetectoren, die bestaan uit kristallen en een PMT. Zoals beschreven in 3.4.1 interageren γ -straal fotonen met de atomen

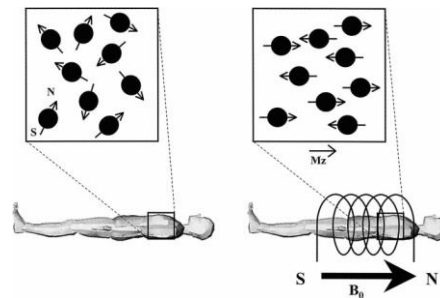
van de kristallen waardoor hun energie omgezet wordt in zichtbaar licht. Dit wordt verder omgezet in een elektrisch signaal dat versterkt wordt door de PMT en vervolgens gemeten kan worden. De hoeveelheid licht die gedetecteerd wordt, is hierbij proportioneel met de energie van het geabsorbeerde foton (Zanzonico, 2012).

Nal(Tl) en Bismuth Germanaat (BGO) kristallen vertegenwoordigen de eerste generatie kristallen, die gebruikt werden in PET-detectoren. Ondanks de zeer hoge lichtopbrengst van Nal(Tl) kristallen, ging de voorkeur naar BGO kristallen. Deze zorgden immers voor een zeer hoge sensitiviteit door de hogere dichtheid en het hoger atoomgetal (Z). Toch was er nood aan andere kristallen gezien de trage snelheid van verval. Later werden Gadolinium oxyorthosilicaat (GSO) kristallen gebruikt wegens de betere combinatie van sensitiviteit, lichtopbrengst en vervalsnelheid. De meest recente detectoren maken echter gebruik van lutetium oxyorthosilicaat (LSO) en lutetium yttrium oxyorthosilicaat (LYSO) kristallen. Deze zorgen voor zeer hoge lichtopbrengst en sensitiviteit en zeer snel verval en zijn bovendien minder hygroscopisch. Op die manier worden de belangrijke eigenschappen van Nal(Tl) en BGO kristallen gecombineerd met een snel verval (Paans et al., 2002; Basu et al., 2007).

3.5.2 Magnetic Resonance Imaging

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is gebaseerd op de magnetische eigenschappen van het lichaam. Meestal wordt gebruik gemaakt van waterstofatomen gezien deze voorkomen in water en vet, aanwezig in ons lichaam. Koolstof-13, natrium-23 en fosfor-31 behoren echter ook tot de mogelijkheden. Het proton in het waterstofatoom gedraagt zich in het lichaam als een kleine magneet door rond zijn eigen as te draaien. In normale omstandigheden is er echter geen netto magnetische kracht. Alle protonen bewegen namelijk in alle richtingen waardoor ze elkaar neutraliseren. Wanneer de patiënt blootgesteld wordt aan een extern magnetisch veld (B_0) zullen de protonen zich parallel of antiparallel oriënteren ten opzicht van B_0 . De parallelle oriëntatie is energetisch meest gunstig en geniet dus de voorkeur. Het energetisch verschil tussen beide oriëntaties resulteert in een netto magnetische vector (M_z). De oriëntaties voor en na aanleggen van het extern magnetisch veld worden weergegeven in figuur 3.10. Om een meetbaar signaal te kunnen krijgen moet deze vector echter van richting veranderen. Dit gebeurt door toevoegen van energie via specifieke radiofrequentie, namelijk de Larmor frequentie. Door absorptie van deze energie veranderen de protonen van parallelle tot antiparallelle oriëntatie waardoor M_z 90° gedraaid wordt. Deze

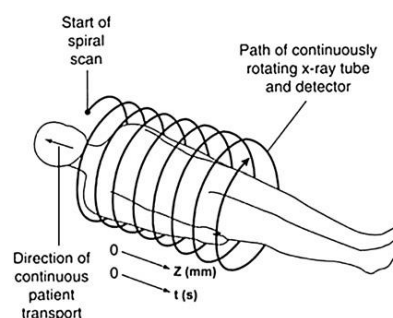
rotatie zorgt vervolgens voor een wisselstroom in een ontvangerspoel, die gemeten kan worden. Wanneer de radiofrequenties terug uitgeschakeld worden, keren de protonen terug naar hun oorspronkelijke oriëntatie. Het signaal in de spoel zal dus afnemen in functie van de tijd. Op basis hiervan wordt ten slotte een MRI-beeld gevormd (van Geuns et al., 1999).⁸



Figuur 3.10: Oriëntatie van de protonen in normale omstandigheden (links) en na blootstelling aan een extern magnetisch veld B_0 (rechts) (van Geuns et al., 1999).

3.5.3 Computed Tomography

Computed Tomography (CT) is een beeldvormingstechniek gebaseerd op X-stralen. Dit is elektromagnetische straling, met golflengte tussen 0,01 en 10 nm, die invalt op het lichaam van de patiënt in een rechte lijn aan de snelheid van het licht. Het toestel bevat een bron die een bundel van X-stralen uitzendt door elektronen met hoge snelheid op een target te richten. Deze bron draait rond de patiënt en door simultane rotatie van detectoren kan de fractie X-stralen, die door de patiënt gaat, gemeten worden (figuur 3.11). Deze fractie is afhankelijk van het type weefsel. De ontvangen signalen van de detectoren worden via een reconstructiealgoritme omgezet in een 3D-beeld, dat anatomische informatie verleent van het lichaam of van een bepaald lichaamsdeel (Cogbill and Ziegelbein, 2011).



Figuur 3.11: Opname van een CT-scan (Cogbill and Ziegelbein, 2011).

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1121941/>

3.6 PROEFOPZET

3.6.1 Validatie van HPLC

Om de HPLC-methode te valideren worden enkele parameters nagegaan. Zo moet DASB voldoende onderscheiden kunnen worden van eventueel aanwezige (radio)chemische onzuiverheden zoals MASB of $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Dit wordt uitgevoerd via berekening van de resolutie tussen de verschillende componenten (formule 3.10). Wanneer de resolutie minimaal 1,5 bedraagt, wordt gesteld dat geen interferentie waargenomen wordt.

$$R = \frac{1,18 \times (T_{R(\text{DASB})} - T_{R(X)})}{(\text{FWHM}_{\text{DASB}} + \text{FWHM}_X)} \quad (3.10)$$

waarin: R = resolutie
 T_R = retentietijd (min)
 FWHM = piekbreedte op halve hoogte (min)
 X = MASB of methyljodide

Ook worden de detectielimiet (LoD) en kwantificatielimiet (LoQ) van DASB en MASB bepaald. De LoD wordt gedefinieerd als de laagste concentratie die gedetecteerd kan worden in een matrix, terwijl de LoQ de laagste concentratie weergeeft die met voldoende precisie en accuraatheid bepaald kan worden. De signaal-ruisverhouding bij LoD en LoQ, die doorgaans aangehaald worden, zijn respectievelijk 3:1 en 10:1. Deze verhouding kan berekend worden via formule 3.11.

$$s = \frac{H}{h} \quad (3.11)$$

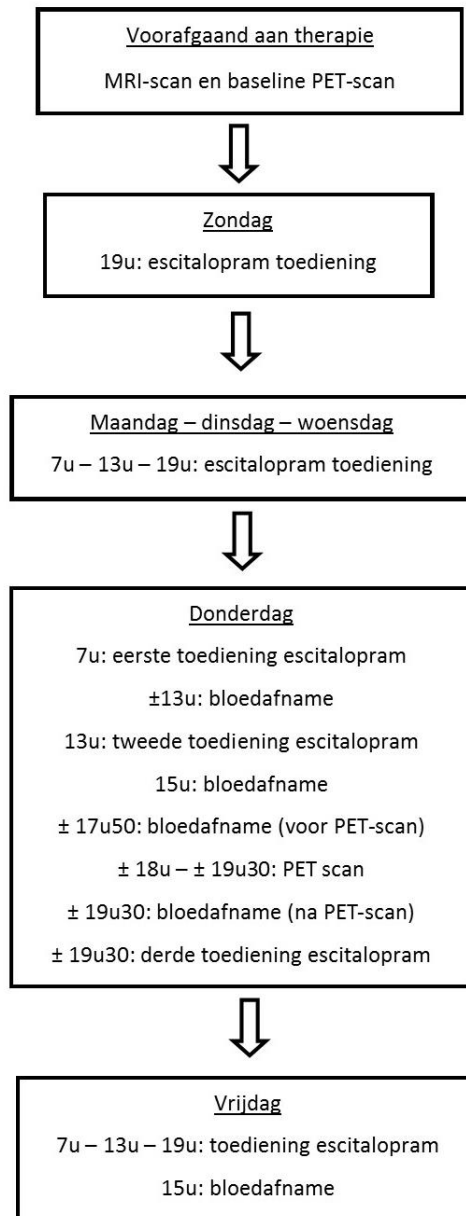
waarin: s = signaal-ruisverhouding
 H = hoogte van de piek van de component
 h = hoogste fluctuatie van de baseline

3.6.2 Aanmaak escitalopram gelules

Om escitalopram gelules aan te maken worden een aantal 10 mg escitalopram filmomhulde tabletten geplet met behulp van een stamper en mortier. Dit poeder wordt vervolgens aangevuld met lactose als vulmiddel. Via een maatcilinder kan de benodigde hoeveelheid poedermengsel afgemeten worden. Ten slotte worden de gelulen (n° 2) afgevuld met het poedermengsel met behulp van een capsuleerapparaat.

3.6.3 Overzicht scans, escitalopram toedieningen en bloedafnames

In figuur 3.12 wordt een overzicht weergegeven van de uitgevoerde scans, de escitalopram toedieningen en de bloedafnames.



Figuur 3.12: Overzicht uitgevoerde scans, escitalopram toedieningen en bloedafnames.

3.6.4 Bepaling SERT occupantie in honden

Voorafgaand aan de occupantiestudie wordt bij elke hond een MRI-scan afgenomen om anatomische informatie te verkrijgen. Voor de studie zelf dienen per hond twee PET/CT-scans afgenomen te worden: een baseline scan binnen de twee weken voorafgaand aan de therapie met escitalopram en een post-therapie scan.

3.6.4.1 Sedatie en anesthesie van de honden

Vooraleer de honden getransporteerd worden naar het PET-center, worden ze geseedeerd via een intramusculaire injectie met 375 μg dexmedetomidine (Dexdomitor[®]) per m^2 lichaamsoppervlak. Eenmaal de hond op de PET/CT-scanner (Siemens, Knoxville, Tennessee, USA) ligt, wordt de anesthesie geïnduceerd via een intraveneuze injectie met 2-3 mg/kg propofol (Propofol[®]). Vervolgens wordt de anesthesie in stand gehouden met 1,2-1,4% isofluraan (Isoflo[®]) in 100% zuurstof, die via een circulair systeem toegediend wordt.

3.6.4.2 PET/CT scan

De honden worden gescand met een Biograph mCT 40 beeldvormingssysteem (Siemens, Knoxville, Tennessee, USA). Eerst wordt een CT-scan uitgevoerd waarvan de beelden gereconstrueerd worden via een iteratieve reconstructiemethode. Deze CT-beelden worden gebruikt om de PET-beelden te corrigeren voor attenuatie. Vervolgens wordt een PET-scan uitgevoerd in list mode gedurende 90 minuten. Het beeld wordt gereconstrueerd in 34 frames (6x10s, 8x30s, 5x120s, 15x300s) in een matrix van 400x400 met een voxelgrootte van 2x2x2 mm. De detectie gebeurt met behulp van een ring van detectoren, bestaande uit LSO kristallen gekoppeld aan PMTs, met een diameter van 78 cm waarvan de Field of View (FoV) 21,6 cm bedraagt. Door gebruik te maken van TOF en een Truex reconstructiealgoritme kan het contrast van de PET-beelden geoptimaliseerd worden wat uiteindelijk resulteert in een spatiale resolutie van 2 mm (FWHM) over de volledige FoV.

3.6.4.3 Kinetische modellering

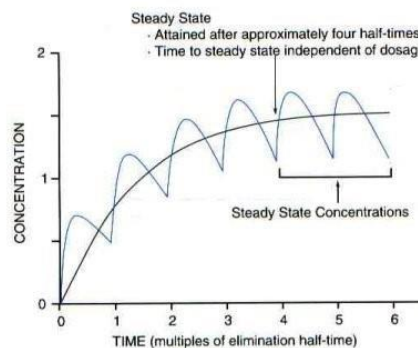
Het verkregen MRI-beeld bevat anatomische informatie waardoor verschillende hersenregio's (ROIs) manueel afgelijnd kunnen worden. Nadien gebeurt de coregistratie van PET/MRI via de Fusion tool van PMOD 3.4 om op die manier ook de ROIs op het PET-beeld te krijgen. Bij de beeldverwerking worden meerdere targetregio's vergeleken met eenzelfde referentieregio. Het cerebellum wordt gebruikt als referentieregio met exclusie van de vermis gezien dit centrale deel wel een substantiële hoeveelheid SERTs bevat.

Wanneer de snelheidsconstante k'_2 bepaald wordt via het SRTM, beschreven in 1.5.4, kan slechts één waarde bekomen worden gezien deze de snelheid beschrijft van het referentieweefsel naar het plasma. Daarom werd een aangepast model ontwikkeld, namelijk het Simplified Reference Tissue Model 2 (SRTM 2). Dit model verloopt in twee stappen en laat toe de waarde voor k'_2 te fixeren. Via het SRTM wordt in een eerste stap de k'_2 waarde

berekend van enkele ROIs waarvan gekend is dat ze een hoge dichtheid aan SERTs bevatten, namelijk de raphe nuclei, de thalamus en het striatum. De k'_2 waarde wordt in de tweede stap gefixeerd door het gemiddelde te berekenen (Wu and Carson, 2002).⁹ Vervolgens wordt deze k'_2 waarde in rekening gebracht bij het berekenen van de bindingspotentiala (BP_{ND}) via het Logan Reference model, beschreven in 1.5.4.

3.6.5 Plasmabepaling

Bij de eerste toedieningen heeft een geneesmiddel tijd nodig om te accumuleren in het lichaam waardoor piek- en dalconcentraties bij elke toediening variëren. Na X aantal toedieningen stelt zich een evenwicht in waarbij de toegediende dosis exact de uitgescheiden dosis vervangt, met gelijke piek- en dalconcentraties na elke toediening tot gevolg. Steady state condities worden bereikt wanneer dit voor minstens twee toedieningen het geval is en treden meestal op na 4 à 5 halfwaardetijden (figuur 3.13).¹⁰



Figuur 3.13: Steady state condities.¹⁰

Op basis van het artikel van Overø wordt verwacht dat de halfwaardetijd na meerdere toedieningen ongeveer 8 uur zal zijn. Hierdoor wordt verondersteld dat tegen donderdag reeds steady state condities bekomen worden (Overø, 1982).

Per hond wordt op vijf verschillende tijdstippen bloed afgenomen uit de vena jugularis. Op donderdag wordt een bloedafname gedaan net voor toediening van de tweede dagdosis van escitalopram ($\pm 13u$) waarbij de dalconcentratie bepaald kan worden. Om 15u, twee uur na de tweede dagdosis, wordt eveneens een bloedstaal afgenomen waarbij verwacht wordt dat op dit tijdstip de piekconcentraties ongeveer bereikt zullen worden. Om een idee te

⁹ <http://doc33.pmod.com/pkin/2310.htm>

¹⁰ http://www.rxkinetics.com/pktutorial/1_6.html

hebben hoeveel de plasmaconcentratie daalt tijdens de scan wordt bloed afgenomen net voor en net na de PET-scan. Ter controle of de steady state condities reeds bereikt werden op donderdag wordt nog één dag verder gedoseerd en wordt op vrijdag om 15u een vijfde bloedstaal afgenomen. Indien op donderdag reeds steady state condities bereikt werden, mag de concentratie van dit laatste plasmastaal niet significant afwijken van deze afgenomen op donderdag om 15u.

De bloedafname gebeurt met behulp van spuitjes waarin een kleine hoeveelheid heparine wordt toegevoegd om stolling van het bloed te vermijden. Nadien wordt het bloed overgebracht in buisjes (Vacuette 3 mL buis, K3-EDTA; GBO, Kremsmünster, Oostenrijk) waarvan de randen eveneens gecoat zijn om stolling van het bloed tegen te gaan. Vervolgens worden de bloedstalen gedurende vijf minuten gecentrifugeerd bij 5200 toeren per minuut waarna het plasma geïsoleerd kan worden. Het plasma wordt ten slotte bewaard bij -20°C.

De kwantitatieve bepaling van escitalopram in plasma gebeurt met behulp van gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS). Dit is een scheidingstechniek voor vluchtige componenten waarbij de detectie gebeurt met behulp van een massaspectrometer. Het staal wordt op de kolom geïntroduceerd via een injector. Hier wordt gebruik gemaakt van een 'pulsed splitless injection'. Bij 'splitless' injectie wordt het verdampte staal volledig op de kolom gebracht, dit in tegenstelling tot 'split' injectie waarbij het grootste deel van het verdampte staal verloren gaat en slechts een kleine fractie op de kolom gebracht wordt. Wanneer ook de druk van het dragergas tijdens de injectie verhoogd wordt en nadien terug afneemt tot een ideale gasflow, wordt gesproken van 'pulsed splitless injection'. Deze initiële hoge druk zorgt voor een snelle passage over de kolom en resulteert zo in minder degradatie en een betere respons. Verlaging van de druk nadien is noodzakelijk voor een goede resolutie (Godula, Hajšlová & Alterová, 1999).¹¹ Hoewel het injectievolume bepalend is voor de piekoppervlakte, is het moeilijk te reproduceren. Bijgevolg wordt een interne standaard toegevoegd aan het staal om te compenseren voor alle oncontroleerbare variabelen tijdens de chromatografie. Hiervoor worden citalopram-D6 en paroxetine-D6 aangewend ter controle van respectievelijk citalopram en de actieve metaboliëten DMC en DDMC. Vervolgens gebeurt de scheiding op basis van de verdeling van de componenten tussen de stationaire fase op de

¹¹ <http://www.chem.agilent.com/library/applications/5988-9944en.pdf>

binnenwand van de kolom en de mobiele fase, een inert gas (Goodman, 1980). De detectie gebeurt ten slotte met een massaspectrometer. De componenten worden eerst verdampt en geïoniseerd waarna de ontstane fragmenten in een ionenversneller terechtkomen. Daar worden ze via een magnetisch veld geselecteerd op massa/lading. Na het verlaten van de ionenversneller vallen ze in op een recorder die een massaspectrum genereert, die uniek is voor elke component. Op die manier kunnen de componenten geïdentificeerd worden (Bruce, n.d.). Voorafgaand aan GC-MS zijn staalvoorbereiding en derivatisatie echter noodzakelijk.

De staalvoorbereiding gebeurt via Solid Phase Extraction (SPE) waarbij componenten uit een vloeibare matrix opgezuiverd en aangeconcentreerd worden doordat ze zich gaan verdelen tussen een vloeibare en een vaste fase. SPE wordt onderverdeeld in vier stappen: conditioneren, beladen, wassen en elueren. Om de kolom te conditioneren wordt 3 mL eluens (5% NH₃ in MeOH), 2 mL methanol en 3 mL 25 mM fosfaatbuffer pH 2,5 achtereenvolgens op de kolom gebracht. Daarna wordt de kolom beladen met het staal bestaande uit 200 µL plasma en 4 mL 25 mM fosfaatbuffer pH 2,5. Vervolgens wordt de kolom gewassen door vier keer 1 mL methanol op de kolom te brengen waarna de kolom gedurende twee minuten gedroogd wordt. In de volgende stap worden de componenten geëluëerd door twee keer 1 mL 5% NH₃ in methanol op de kolom te brengen. Ten slotte wordt de kolom gedurende één minuut gedroogd.

Na verdamping van de vaste fase extracten onder stikstof vindt de derivatisatie plaats. Hiervoor wordt 50 µL heptafluoroboterzuurimidazool (HFBI) toegevoegd aan het staal en vervolgens 30 minuten verwarmd bij 85°C. Nadien wordt 0,5 mL HPLC-grade water en 2 mL toluen toegevoegd. Na vortexen en centrifugeren wordt het staal in de diepvries geplaatst om daarna gemakkelijk de toluenefase te kunnen overbrengen in een glazen puntbuis. Dit wordt ten slotte drooggedampt bij 40°C en opgelost in 50 µL toluen.

3.6.6 Bepaling van het doseringsschema van escitalopram in honden

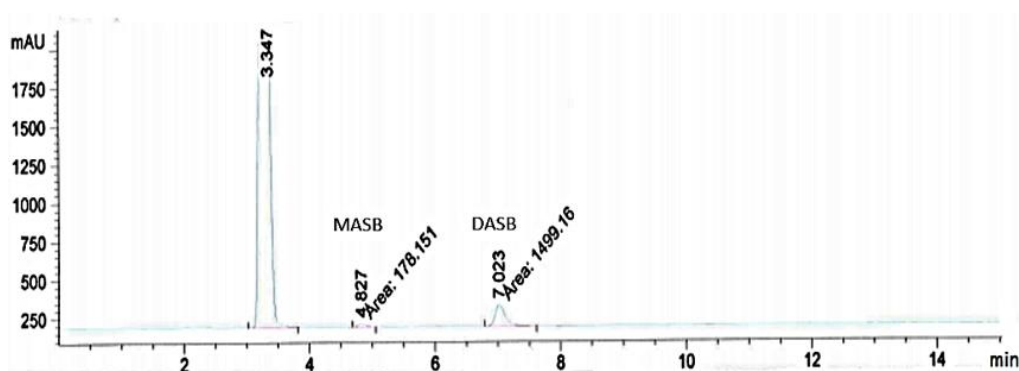
Om een geschikte dosis en doseringsschema op te stellen die voor een therapeutisch effect zorgt bij honden, wordt de occupantie uitgezet in functie van de toegediende dagdosis en de escitalopram plasmaconcentraties tijdens de PET-scan. Hieruit kan de plasmaconcentratie bepaald worden, die nodig is om een occupantie van 80% te bekomen (Meyer et al., 2004).

4. RESULTATEN

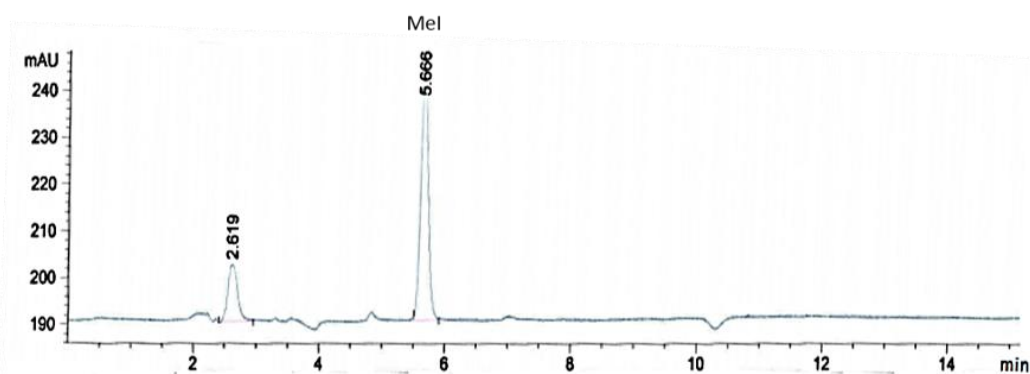
4.1 VALIDATIE HPLC SET-UP VOOR KWALITEITSCONTROLE

4.1.1 Interferenties

In het eindstaal kunnen mogelijks restanten precursor aanwezig zijn en bestaat de mogelijkheid dat [^{14}C]Mel voorkomt. Om interferentie met deze (radio)chemische onzuiverheden te kunnen uitsluiten, wordt de resolutie berekend. Met behulp van formule 3.10 en de chromatogrammen in figuur 4.1 en 4.2 wordt een resolutie van 8,84 bekomen tussen DASB en MASB, terwijl de resolutie tussen DASB en methyljodide 5,27 bedraagt.



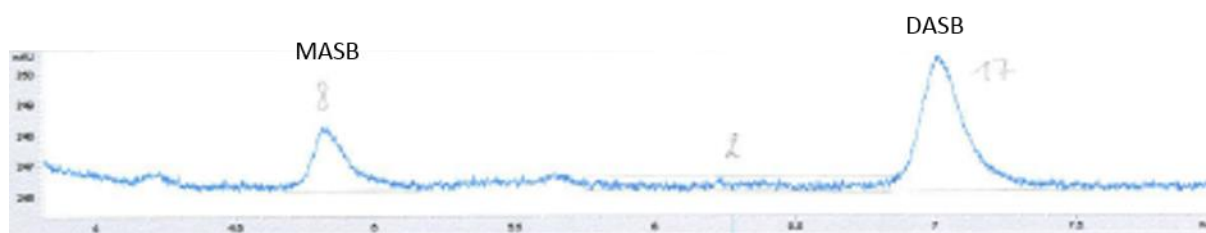
Figuur 4.1: Chromatogram van MASB en DASB.
(1,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DASB en 0,135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MASB in 63 μL aceton en 600 μL ethanol in 5337 μL water)



Figuur 4.2: Chromatogram van Mel.
(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methyljodide in acetonitrile)

4.1.2 Detectielimiet

Om LoD en LoQ te bepalen werden een aantal verdunningen gemaakt uitgaande van een 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oplossing MASB en een 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oplossing DASB. Met behulp van het chromatogram in figuur 4.3, de aangenomen signaal-ruisverhoudingen van LoD en LoQ, respectievelijk 3:1 en 10:1, en de concentraties MASB en DASB werden LoD en LoQ berekend (tabel 4.1).



Figuur 4.3: Chromatogram van 0,0031 µg/mL MASB en 0,031 µg/mL DASB.

Tabel 4.1: LoD en LoQ van DASB en MASB.

	DASB	MASB
LoD (µg/mL)	0,0109	0,00233
LoQ (µg/mL)	0,0365	0,00775

4.2 SYNTHESE EN KWALITEITSCONTROLE VAN [¹¹C]DASB

In tabel 4.2 worden de opbrengst van elke synthese en het totaal volume in de opvangvial weergegeven.

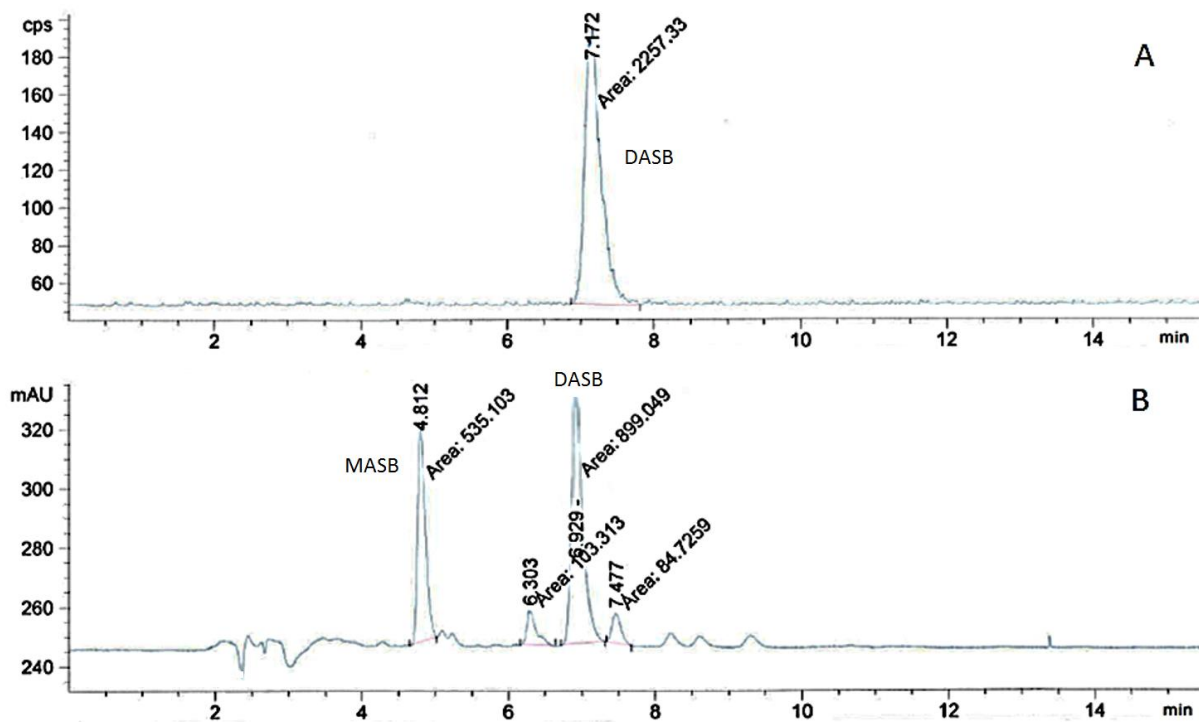
Tabel 4.2: Opbrengst van de synthese en eindvolume.

Hond	Scan	Activiteit (MBq) @EOS	Volume (mL)
Jeanine	Baseline	2405	7,5
	Post-therapie	2590	7,5
Jos	Baseline	3071	7,5
	Post-therapie	2701	7,5
Jenny	Baseline	1998	8,4
	Post-therapie	1702	8,4

De radionuclidische zuiverheid werd bepaald aan de hand van de opname van het gamma spectrum en de bepaling van de halfwaardetijd. Zowel de maximale energie (E_{max}) in het spectrum als de halfwaardetijd voldeden telkens aan de vooropgestelde range, respectievelijk 486 – 536 keV en 19,9 – 20,9 min. Ook de pH bevond zich steeds in de vooropgestelde range (4,5 – 8,5) en de oplossing was telkens helder.

De kwaliteitscontrole van de opzuivering werd uitgevoerd met behulp van HPLC. Voor elke synthese was de radiochemische zuiverheid > 95% en correleerden de retentietijden van DASB in het staal met deze in de referentieoplossing. In zeer beperkte mate werden bij Jenny naast MASB ook andere chemische onzuiverheden gedetecteerd (figuur 4.4). De specifieke

activiteit (SA) berekend via formule 3.6 en de concentratie aan [^{11}C]DASB en MASB berekend via formule 3.4 en 3.5 worden weergegeven in tabel 4.3.



Figuur 4.4: Chromatogram Jenny na therapie: (A) Radioactiviteit; (B) UV.

Tabel 4.3: Specifieke activiteit en concentratie aan [^{11}C]DASB en MASB.

Hond	Scan	Concentratie [^{11}C]DASB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentratie MASB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SA (GBq/ μmol) @EOS
Jeanine	Baseline	1,221	0,240	79,4
	Post-therapie	0,952	0,189	109,8
Jos	Baseline	1,071	0,293	115,7
	Post-therapie	1,355	0,198	80,0
Jenny	Baseline	0,867	1,000	77,5
	Post-therapie	0,963	0,515	59,4

4.3 OCCUPANTIESTUDIE IN HONDEN

4.3.1 Injectiegegevens PET-scans

In tabel 4.4 wordt een overzicht weergegeven van de injectiegegevens van elke hond. Hiervoor werd de hoeveelheid activiteit op het tijdstip van injectie (MBq), de massa geïnjecteerd [^{11}C]DASB ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en het percentage transporterbezetting berekend.

Tabel 4.4: Overzicht van de injectiegegevens.

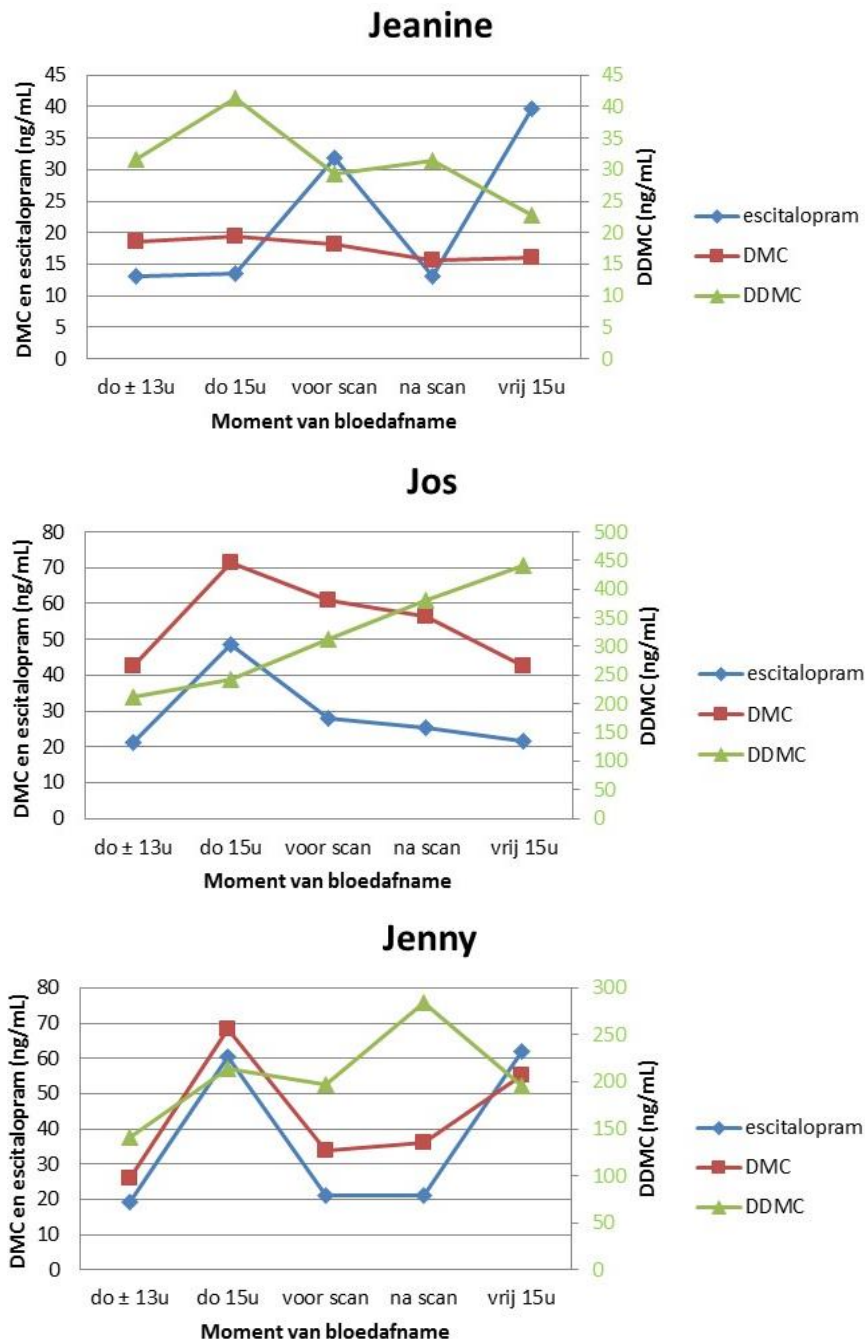
Hond	Scan	Gewicht (kg)	Activiteit (MBq)	Massa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	% SERT occupantie
Jeanine	Baseline	10,7	346	0,251	1,56
	Post-therapie	10,7	394	0,230	1,43
Jos	Baseline	12	392	0,193	1,20
	Post-therapie	12	356	0,244	1,52
Jenny	Baseline	7,7	351	0,306	1,90
	Post-therapie	7,7	331	0,318	1,97

4.3.2 Plasmaconcentraties van escitalopram en metabolieten

In tabel 4.5 worden de plasmaconcentraties weergegeven van escitalopram en de gevormde metabolieten (DMC en DDMC). De dosis van Jeanine bedroeg 0,25 mg/kg/dag, van Jos 0,75 mg/kg/dag en van Jenny 1,30 mg/kg/dag. Indien op donderdag reeds steady state condities bereikt werden, mag de concentratie van het plasmastaal op vrijdag (15u) niet significant afwijken van dat afgenomen op donderdag om 15u. Daarbovenop wordt een gelijkaardige concentratie verwacht van het plasmastaal op donderdag rond 13u (net voor tweede toediening) en dat na de scan (net voor derde toediening). Via de grafieken in figuur 4.5 kunnen deze voorwaarden voor elke hond nagegaan worden.

Tabel 4.5: Plasmaconcentraties van escitalopram en metabolieten.

Hond	Moment van bloedafname	Escitalopram (ng/mL)	DMC (ng/mL)	DDMC (ng/mL)
Jeanine	Donderdag \pm 13u	13,08	18,57	31,70
	Donderdag 15u	13,43	19,43	41,26
	Donderdag voor scan (18u11)	31,81	18,19	29,31
	Donderdag na scan	13,21	15,66	31,42
	Vrijdag 15u	39,72	16,02	22,89
Jos	Donderdag \pm 13u	21,21	42,67	212,25
	Donderdag 15u	48,52	71,51	242,05
	Donderdag voor scan (18u05)	27,93	61,04	311,94
	Donderdag na scan	25,28	56,32	381,08
	Vrijdag 15u	21,64	42,62	442,44
Jenny	Donderdag \pm 13u	19,09	25,93	140,47
	Donderdag 15u	60,30	68,33	213,95
	Donderdag voor scan (18u51)	21,26	33,89	197,36
	Donderdag na scan	21,16	36,19	284,84
	Vrijdag 15u	61,87	55,07	196,21

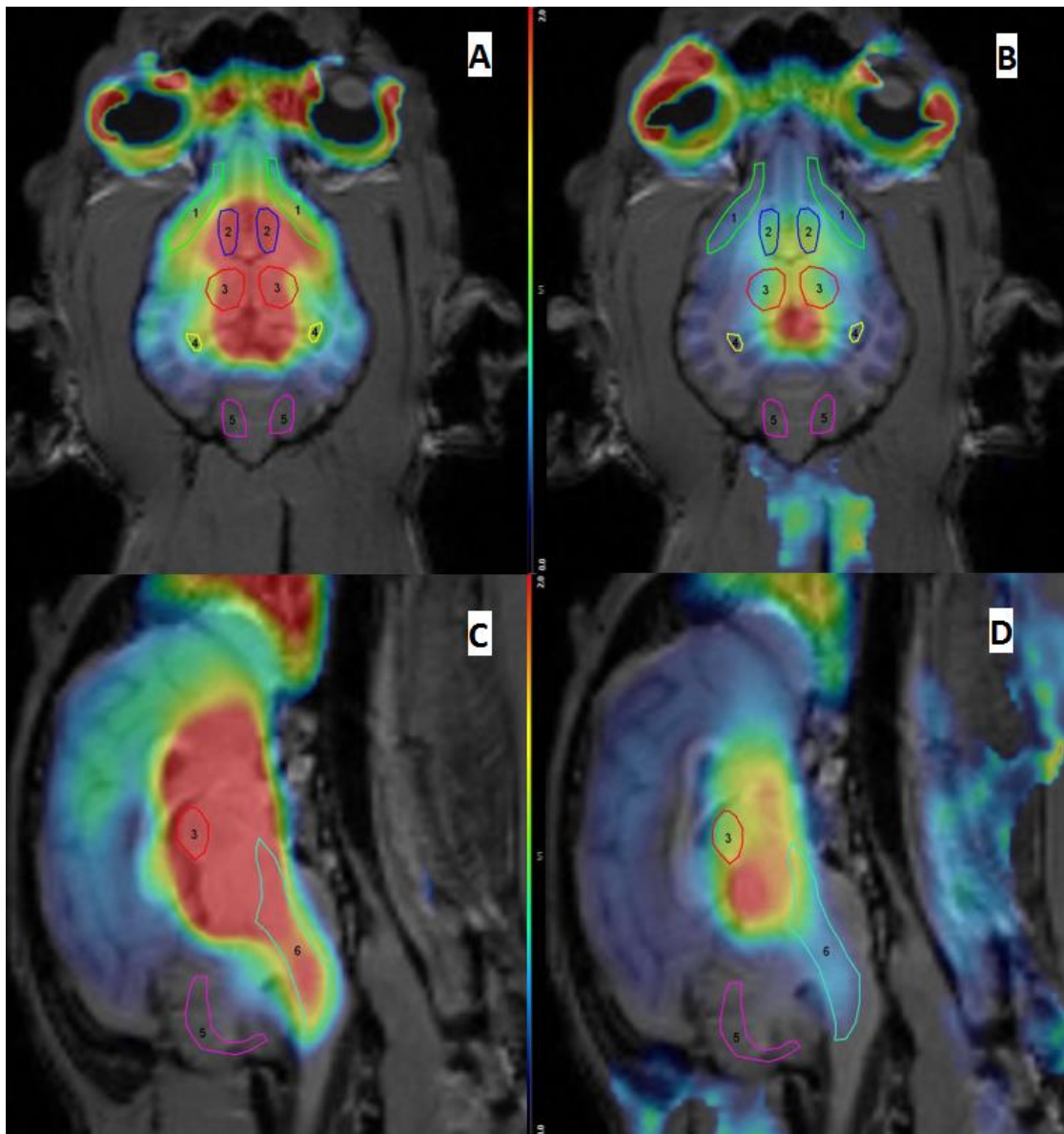


Figuur 4.5: De plasmaconcentratie van escitalopram en metabolieten in functie van het moment van bloedafname.

4.3.3 Beeldverwerking

Bij elke hond werden twee PET-scans uitgevoerd, een baseline scan en een post-therapie scan. De beelden werden verwerkt in PMOD door fusie van het PET-beeld met het bijhorende MRI-beeld, die voorafgaand aan de PET-scans opgenomen werd. Op deze beelden werden verschillende ROIs manueel afgelijnd waaronder het cerebellum (met exclusie van de vermis), een regio in de hersenstam die de raphe nuclei omvat, de basale ganglia (links +

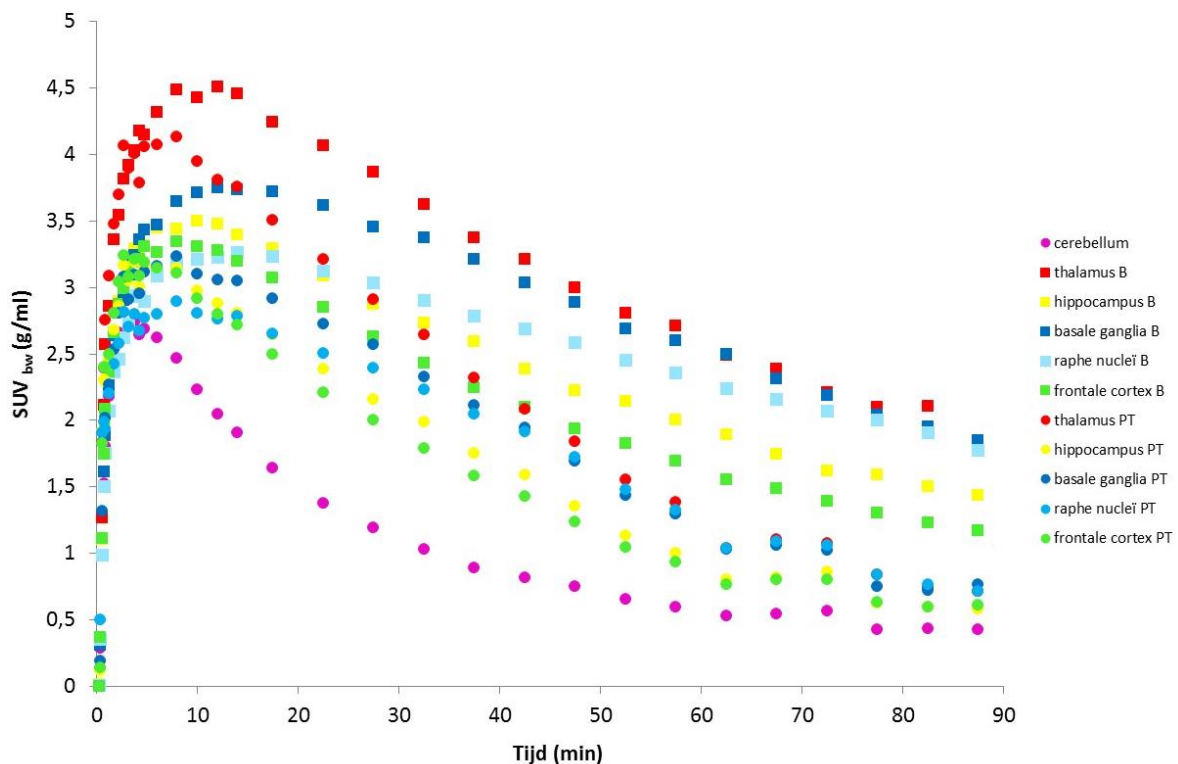
rechts), de hippocampus (links + rechts), de thalamus (links + rechts) en de frontale cortex (links + rechts). In figuur 4.6 wordt de BP_{ND} per voxel vergeleken tussen de gefuseerde PET/MRI-beelden in dorsale en sagittale doorsnede afkomstig van de baseline scan en de post-therapie scan.



Figuur 4.6: Fusie PET/MRI met enkele manueel afgelijnde hersenregio's: (1) Frontale cortex Li + Re; (2) Basale ganglia Li + Re; (3) Thalamus Li + Re; (4) Hippocampus Li + Re; (5) Cerebellum; (6) Raphe nuclei. Vergelijking van de BP_{ND} per voxel in dorsale en sagittale doorsnede voor en na therapie: (A) Dorsale doorsnede voor therapie; (B) Dorsale doorsnede na therapie; (C) Sagittale doorsnede voor therapie; (D) Sagittale doorsnede na therapie.

4.3.4 Tijd-activiteitscurves

De tijd-activiteitscurves van de hersenregio's voor en na therapie worden weergegeven in figuur 4.7. Bij de bekomen baseline scan van Jos worden de hoogste concentraties [^{11}C]DASB waargenomen in de thalamus, middelhoge concentraties in de basale ganglia, de raphe nuclei, de hippocampus en de frontale cortex en zoals verwacht de laagste concentraties in het cerebellum. Na therapie is een duidelijke daling waar te nemen in alle regio's.



Figuur 4.7: Tijd-activiteitscurves van de belangrijkste hersenregio's voor en na therapie:

□ voor therapie; ○ na therapie (beagle Jos).

4.3.5 Kinetische modellering

In een voorafgaande studie werd het 2-TC model geprefereerd voor de beschrijving van de kinetiek van [^{11}C]DASB in de hersenen gezien de lagere standaard error waarden en betere fitting. Ook werd aangetoond dat het Logan Reference model de beste correlatie vertoonde met dit 2-TC model. Mits gebruik van een gefixeerde k'_2 waarde berekend via het SRTM 2 (tabel 4.6) worden de bindingspotentiaal en de SERT-occupantie bekomen via het Logan Reference model (tabel 4.7).

Tabel 4.6: k'_2 waarden via SRTM 2.

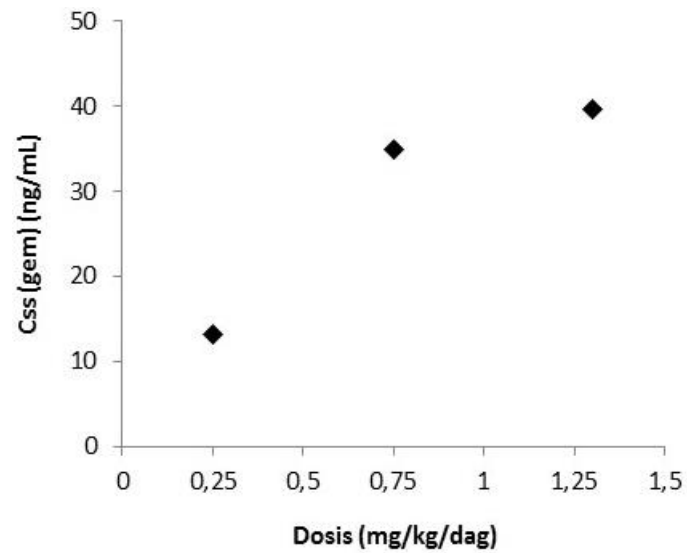
Hond	Scan	k'_2 via SRTM 2
Jeanine	Baseline	0,092921
	Post-therapie	0,111088
Jos	Baseline	0,097350
	Post-therapie	0,113390
Jenny	Baseline	0,085664
	Post-therapie	0,079200

Tabel 4.7: BP_{ND} via Logan Reference en % occupantie.

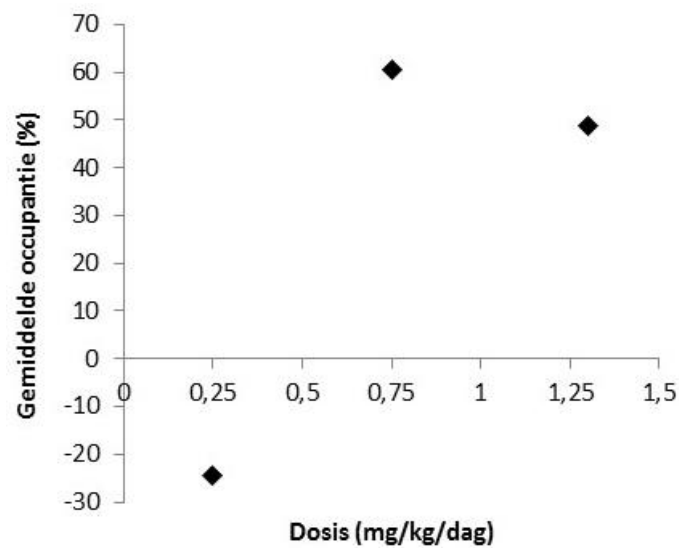
ROI	Hond	BP_{ND} via Logan Reference (baseline)	BP_{ND} via Logan Reference (post-therapie)	Occupantie (%)
Raphe nuclei	Jeanine	1,835	2,004	-9,2
	Jos	2,030	0,703	65,4
	Jenny	1,013	0,671	33,8
Basale ganglia	Jeanine	1,827	2,298	-25,8
	Jos	2,265	0,764	66,3
	Jenny	0,839	0,254	69,7
Hippocampus	Jeanine	1,884	2,253	-19,6
	Jos	1,563	0,530	66,1
	Jenny	0,712	0,534	25,0
Thalamus	Jeanine	2,217	3,057	-37,9
	Jos	2,408	1,013	57,9
	Jenny	1,437	0,700	51,3
Frontale cortex	Jeanine	0,689	0,897	-30,2
	Jos	1,222	0,468	61,7
	Jenny	0,397	0,143	64,0
Gemiddelde	Jeanine			-24,5
	Jos			63,5
	Jenny			48,8

4.3.6 Grafische voorstelling

In figuur 4.8 en 4.9 worden de gemiddelde steady state plasmaconcentratie van escitalopram en de gemiddelde occupantie weergegeven in functie van de toegediende dosis escitalopram (0,25 – 0,75 en 1,30 mg/kg/dag). Voor de berekening van de plasmaconcentratie wordt gebruik gemaakt van de minimum- en maximumconcentratie bij steady state condities (cf. tabel 4.5). De gemiddelde occupantie wordt berekend uitgaande van deze bekomen voor de raphe nuclei, de thalamus, de basale ganglia, de hippocampus en de frontale cortex (cf. tabel 4.7).



Figuur 4.8: Gemiddelde steady state plasmaconcentraties in functie van de toegediende dosis (mg/kg/dag).



Figuur 4.9: Gemiddelde occupantie in functie van de toegediende dosis (mg/kg/dag).

5. DISCUSSIE

Voor de validatie van HPLC voor de kwaliteitscontrole is een resolutie van minimaal 1,5 aangewezen. Gezien de resolutie van 8,84 tussen DASB en MASB en van 5,27 tussen DASB en methyljodide kan besloten worden dat er geen interferentie optreedt tussen DASB en de mogelijks te verwachten (radio)chemische onzuiverheden. Tevens kan uit tabel 4.1 besloten worden dat DASB en MASB voldoende gevoelig bepaald kunnen worden om kwantitatieve bepaling ervan toe te laten in de bekomen eindstalen tijdens het experiment (cf. tabel 4.3).

In alle eindstalen kon de radioactieve hoofdcomponent geïdentificeerd worden als [¹¹C]DASB, maar er werden telkens nog in meer of mindere mate restanten precursor teruggevonden. Ondanks het feit dat deze precursor eveneens affiniteit vertoont voor de SERT (Huang et al., 2005), is deze component meer polair waardoor kan aangenomen worden dat passage doorheen de BHB heel gering is (Ginovart, Wilson, Meyer, Hussey, & Houle, 2001). Dit kan eveneens gestaafd worden indien gebruik gemaakt wordt van de pKa-waarde van MASB (9.3, Scifinder) om het percentage niet-geladen precursor in het bloed te berekenen, in dit geval slechts 1,22 %. Zoals weergegeven in figuur 4.4 werden bij de [¹¹C]DASB producties voor beagle Jenny in minieme mate ook enkele andere chemische onzuiverheden waargenomen. Dit is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan ofwel degradatie van de aangemaakte precursoroplossing in functie van de tijd, ofwel rechtstreeks aan enkele onzuiverheden in de aangekochte precursorbatch. Omwille van de lage concentraties en het niet beïnvloeden van het experiment werd op dit moment nog geen extra aandacht besteed aan de identificatie van deze onzuiverheden. Wel is het aangewezen om in de nabije toekomst de HPLC-condities voor de opzuivering van [¹¹C]DASB uit het reactiemengsel na de synthese te heroptimaliseren, met het oog op een betere scheiding tussen MASB en DASB, en eventueel een nieuwe analytische HPLC kolom te hanteren.

Zoals weergegeven in tabel 4.4 werd bij iedere scan een gelijkaardige hoeveelheid activiteit (MBq/kg) toegediend en was de SERT-occupantie, veroorzaakt door de radiotracer, telkens laag genoeg (< 5 %) waardoor onder tracercondities gewerkt kon worden.

De resultaten van de plasmabepaling tonen aan dat er veel hogere concentraties DMC en vooral DDMC aanwezig zijn in vergelijking met deze geobserveerd bij de mens, wat in

overeenstemming is met een in 1982 gepubliceerde studie omtrent de kinetiek van citalopram in verschillende species (Overø, 1982). Ondanks het feit dat beide metaboliëten eveneens affiniteit vertonen voor de SERT, wordt de bijdrage ervan tot het totaal effect relatief gering geschat gezien het SERT-inhiberend vermogen van DMC en DDMC respectievelijk 7 en 27 keer lager is in vergelijking met dat van escitalopram.

Tijdens de scan worden bij Jenny lagere escitalopram plasmaconcentraties waargenomen in vergelijking met deze geobserveerd bij Jos. Gezien deze concentraties echter op de grens liggen van de minimale plasmaconcentratie die kwantitatief bepaald kan worden in beagle plasma (20-25 ng/mL), kan een geringe meetnauwkeurigheid een mogelijke verklaring zijn voor dit gegeven. Bovendien werd, omwille van problemen met de beschikbaarheid van de PET-camera, de post-therapie scan van Jenny pas 46 minuten later gestart in vergelijking met die van Jos, wat eveneens mede aan de oorzaak ligt van de lagere geobserveerde plasmaconcentratie tijdens de scan. Bij het plasmastaal van Jenny dat afgenomen werd donderdag om 15u, werd weliswaar een hogere escitalopram concentratie gedetecteerd in vergelijking met het overeenkomstige staal van Jos, maar gezien de substantieel hogere dosis toegediend aan Jenny (1,30 mg/kg/dag versus 0,75 mg/kg/dag) voldoet deze waarde niet aan de verwachtingen. Desondanks geven de resultaten aan dat bij Jenny toch steady state condities bereikt werden gezien de gemeten plasmaconcentratie in het staal dat afgenomen werd op vrijdag (15u), de plasmaconcentratie van het staal dat afgenomen werd op donderdag (15u) evenaart. Bij beagle Jos is dit echter niet het geval. Een heranalyse in de nabije toekomst van het plasmastaal afgenomen op vrijdag dient uitsluitend te geven of de lage gemeten waarde het gevolg is van een fout tijdens de analyse. Zoniet behoort een onvolledige inname van de toegediende dosis op vrijdag tot één van de mogelijke verklaringen. Omwille van de geringe meetnauwkeurigheid is het niet mogelijk een uitspraak te doen omtrent de plasmawaarden bekomen bij Jeanine.

De preliminaire resultaten van deze studie laten op dit moment nog niet toe een optimale dosis en doseringsschema voorop te stellen. Dit komt voornamelijk door problemen bij twee van de beagles, Jeanine en Jenny. Bij Jeanine was er een probleem met de anesthesie tijdens de eerste helft van de post-therapie scan waardoor de hond half wakker geworden is en bewogen heeft. Ondanks de poging om bewegingscorrectie uit te voeren in PMOD kon het

probleem niet volledig verholpen worden aangezien de attenuatie-correctie van het PET-beeld met behulp van het vooraf opgenomen CT-beeld ook foutief verlopen is door de bewegingen van de hond ook. Ondanks het feit dat een grondige heranalyse van deze beelden in de nabije toekomst in het bijzijn van experts zeker aangewezen is, ligt de beweging van deze hond tijdens de scan hoogstwaarschijnlijk aan de basis van de bekomen negatieve occupantiewaarden. Ook bij Jenny werd een kanteling van het hoofd waargenomen tijdens één van de scans, wat een nauwkeurige bepaling van de occupantie bemoeilijkt. Bovendien werden er na onderzoek bij deze beagle verschillende ziekteverschijnselen waargenomen (dunnere stoelgang, een episode van melena, een verdikking van de dunne darmwand en hypoproteïnemie), die eveneens de afwijkende occupantie en plasmawaarden kunnen verklaren. Ten gevolge hiervan werd dan ook besloten deze beagle te excluderen uit het onderzoek.

De enige beagle die tot op heden het experiment zonder problemen doorlopen heeft, is Jos. De hierbij bekomen tijd-activiteitscurves vertonen lagere waarden van de raphe nuclei in vergelijking met deze van de thalamus. Deze resultaten staan in tegenstelling tot de resultaten van een voorafgaande studie in honden. De verklaring hiervoor zou kunnen gevonden worden in de individuele verschillen, maar in een humane studie werden eveneens lagere waarden van de raphe nuclei waargenomen (Hinz et al., 2008). Verder toonde deze studie regionale verschillen aan in opnamesnelheid waardoor de piekactiviteit verschilt van regio tot regio. Een gelijkaardig fenomeen kan waargenomen worden in figuur 4.7. Ook werd de piekactiviteit vroeger bereikt na therapie met escitalopram in vergelijking tot de baseline. Escitalopram inhibeert immers SERTs in de longen, waar [¹¹C]DASB normaal het snelst opgenomen wordt, met als gevolg een snellere opname in de hersenen. Ook in figuur 4.7 kan deze snellere opname waargenomen worden.

In de toekomst zullen extra honden getest worden om bijkomende occupantiewaarden te verkrijgen. Zo zal een hogere dosis toegediend worden om zeker de vereiste 80% occupantie te bekomen. Verder zal de dosis die aan Jenny toegediend werd, hernomen worden bij een andere hond gezien de slechte fysieke toestand van Jenny. Ook zal gezocht worden naar een fixatiesysteem voor het hoofd van de hond zodat bewegingen niet verder voor problemen zorgen bij de beeldverwerking.

6. CONCLUSIE

In deze masterproef werd gezocht naar een geschikte dosis en doseringschema voor escitalopram, die bij honden resulteert in een therapeutisch effect. Dit gebeurde met behulp van een [¹¹C]DASB PET experiment en een GC-MS plasmabepaling. Op die manier kan namelijk meer informatie verkregen worden omtrent de behandeling van gedragsstoornissen in honden.

De bekomen resultaten werden door heel wat factoren beïnvloed. Zo zorgden bewegingen van bepaalde honden tijdens de PET-scan voor een bemoeilijkte beeldverwerking. Ondanks de mogelijkheid tot uitvoeren van een bewegingscorrectie, konden de problemen niet volledig verholpen worden. Daarnaast werd ook een slechte fysieke toestand vastgesteld bij één van de honden waardoor de opname van escitalopram niet optimaal kon verlopen. Ten slotte zorgde een limitatie van de methode voor plasmabepaling dat plasmaconcentraties vaak niet voldoende nauwkeurig gemeten konden worden.

Ondanks de vele problemen die optraden, kan vastgesteld worden dat de bloedafname op de vooropgestelde tijdstippen een goede weerspiegeling gaf van de verwachte piek- en dalconcentratie. Ook kan aangenomen worden dat steady state condities op donderdag reeds bereikt werden.

Om een optimale dosis en doseringschema voorop te stellen, zullen in de toekomst extra honden getest moeten worden zodat bijkomende occupantiewaarden verkregen worden. Ook zal een oplossing gezocht moeten worden om de problemen bij beeldverwerking aan te pakken. Zo zou een fixatiesysteem voor het hoofd van de hond ervoor kunnen zorgen dat bewegingen tijdens de PET-scan gelimiteerd worden.

7. LITERATUURLIJST

7.1 WETENSCHAPPELIJKE ARTIKELS

- Basu, S., Kwee, T. C., Surti, S., Akin, E. a., Yoo, D., & Alavi, A. (2011). Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1228(1), 1–18.
- Baumann, P., Zullino, D. F., & Eap, C. B. (2002). Enantiomers' potential in psychopharmacology—a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 12(5), 433–444.
- Bröer, S., & Gether, U. (2012). The solute carrier 6 family of transporters. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 256–278.
- Bruice, P. Y. (n.d.). *Organic Chemistry (6th Edition)*, 502-503; 535-537.
- Cogbill, T. H., & Ziegelbein, K. J. (2011). Computed Tomography, Magnetic Resonance, and Ultrasound Imaging: Basic Principles, Glossary of Terms, and Patient Safety. *Surgical Clinics of North America*, 91(1), 1–14.
- Cryan, J. F., & Leonard, B. E. (2000). 5-HT(1A) and beyond: The role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Human Psychopharmacology*, 15(2), 113–135.
- De Vos, F. (2012). *Cursus medische stralingsfysica en kernchemie*.
- Elsinga, P. H. (2002). Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Methods (San Diego, Calif.)*, 27(3), 208–217.
- Fitzgerald, P., & Laird, A. (2008). A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Human Brain ...*, 29(6), 683–695.
- Fredricson Overø, K. (1982). Kinetics of citalopram in test animals; drug exposure in safety studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 6(3), 297–309.
- Ginovart, N., Wilson, a a, Meyer, J. H., Hussey, D., & Houle, S. (2001). Positron emission tomography quantification of [(11)C]-DASB binding to the human serotonin transporter: modeling strategies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(11), 1342–1353.
- Godula, M., Hajšlová, J., & Alterová, K. (1999). Pulsed splitless injection and the extent of matrix effects in the analysis of pesticides. *HRC Journal of High Resolution Chromatography*, 22(7), 395–402.
- Goodman, S. I. (1980). An introduction to gas chromatography-mass spectrometry and the inherited organic acidemias. *American Journal of Human Genetics*, 32(6), 781–792.

- Hannon, J., & Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 198–213.
- Hichwa, R. D., Moskwa, J. J., & Hugel, E. A. (1989). Design of target systems for production of PET nuclides. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 40-41, 1110–1113.
- Hinz, R., Selvaraj, S., Murthy, N. V., Bhagwagar, Z., Taylor, M., Cowen, P. J., & Grasby, P. M. (2008). Effects of citalopram infusion on the serotonin transporter binding of [11C]DASB in healthy controls. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(8), 1478–1490.
- Huang, T. Y., Hwang, D. R., Narendran, R., Sudo, Y., Chatterjee, R., Bae, S. a, ... Laruelle, M. (2002). Comparative evaluation in nonhuman primates of five PET radiotracers for imaging the serotonin transporters: [C-11]McN 5652, [C-11]ADAM, [C-11]DASB, [C-11]DAPA, and [C-11]AFM. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(11), 1377–1398.
- Huang, Y., Bae, S.-A., Zhu, Z., Guo, N., Roth, B. L., & Laruelle, M. (2005). Fluorinated diaryl sulfides as serotonin transporter ligands: synthesis, structure-activity relationship study, and in vivo evaluation of fluorine-18-labeled compounds as PET imaging agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2559–2570.
- Hummerich, R., Reischl, G., Ehrlichmann, W., Machulla, H. J., Heinz, A., & Schloss, P. (2004). DASB - In vitro binding characteristics on human recombinant monoamine transporters with regard to its potential as positron emission tomography (PET) tracer. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1218–1226.
- Ignácio, Z. M., Réus, G. Z., Abelaira, H. M., & Quevedo, J. (2014). Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: Insights in depression. *Neuroscience*, 275, 455–468.
- Innis, R. B., Cunningham, V. J., Delforge, J., Fujita, M., Gjedde, A., Gunn, R. N., ... Carson, R. E. (2007). Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(9), 1533–1539.
- Joensuu, M., Tolmunen, T., Saarinen, P. I., Tiihonen, J., Kuikka, J., Ahola, P., ... Lehtonen, J. (2007). Reduced midbrain serotonin transporter availability in drug-naïve patients with depression measured by SERT-specific [123I] nor-beta-CIT SPECT imaging. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 154(2), 125–131.
- Fletcher, J. W., & Kinahan, P. E. (2010). PET/CT Standardized Uptake Values (SUVs) in Clinical Practice and Assessing Response to Therapy. *NIH Public Access*, 31(6), 496–505.
- Kuntner, C. (2014). Kinetic modeling in preclinical positron emission tomography. *Zeitschrift Fur Medizinische Physik*, 24(4), 274–285.

- Lammertsma, a a, & Hume, S. P. (1996). Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *NeuroImage*, 4(3 Pt 1), 153–158.
- Lanzenberger, R., Kranz, G. S., Haeusler, D., Akimova, E., Savli, M., Hahn, A., ... Kasper, S. (2012). Prediction of SSRI treatment response in major depression based on serotonin transporter interplay between median raphe nucleus and projection areas. *NeuroImage*, 63(2), 874–881.
- Malberg, J. E., & Blendy, J. a. (2005). Antidepressant action: To the nucleus and beyond. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(12), 631–638.
- Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S. G., & Russell, J. (2007). Neurobiology of depression: An integrated view of key findings. *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), 2030–2040.
- Malison, R. T., Price, L. H., Berman, R., van Dyck, C. H., Pelton, G. H., Carpenter, L., ... Charney, D. S. (1998). Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by I-123 -2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biological Psychiatry*, 44(11), 1090–1098.
- McCorvy John D., Roth Bryan L. (2015). Structure and function of G protein coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 129–142.
- Meyer, J. H., Meyer, J. H., Wilson, A. a, Wilson, A. a, Sagrati, S., Sagrati, S., ... Houle, S. (2004). Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: an [11C]DASB positron emission tomography study. *The American Journal of Psychiatry*, 161(5), 826–35.
- Millet, P., Graf, C., Buck, A., Walder, B., & Ibáñez, V. (2002). Evaluation of the reference tissue models for PET and SPECT benzodiazepine binding parameters. *NeuroImage*, 17(2), 928–942.
- Någren, K., Müller, L., Halldin, C., Swahn, C. G., & Lehtikoinen, P. (1995). Improved synthesis of some commonly used PET radioligands by the use of [11C]methyl triflate. *Nuclear Medicine and Biology*, 22(2), 235–239.
- Nelissen, N., Warwick, J., Dupont, P., & Leuven, K. U. (2008). Kinetic Modelling in Human Brain Imaging.
- Newberg, A. B., Amsterdam, J. D., Wintering, N., Ploessl, K., Swanson, R. L., Shults, J., & Alavi, A. (2005). 123I-ADAM binding to serotonin transporters in patients with major depression and healthy controls: a preliminary study. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(6), 973–977.
- Ni, W., Geddes, T. J., Priestley, J. R. C., Szasz, T., Kuhn, D. M., & Watts, S. W. (2008). The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *British Journal of Pharmacology*, 154(3), 663–674.

- Overø, K. F. (1982). Kinetics of citalopram in test animals; drug exposure in safety studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 6(3), 297–309.
- Owens, M. J., Knight, D. L., & Nemeroff, C. B. (2001). Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biological Psychiatry*, 50(5), 345–350.
- Paans, a. M. J., Van Waarde, A., Elsinga, P. H., Willemsen, a. T. M., & Vaalburg, W. (2002). Positron emission tomography: The conceptual idea using a multidisciplinary approach. *Methods*, 27(3), 195–207.
- Passchier, J., Gee, A., Willemsen, A., Vaalburg, W., & Van Waarde, A. (2002). Measuring drug-related receptor occupancy with positron emission tomography. *Methods*, 27(3), 278–286.
- Pike, V. W. (2009). PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8), 431–440.
- Prekeges, J. (2013). *Nuclear Medicine Instrumentation (2nd edition)*, 6-9; 18-20.
- Rudnick, G. (2011). Cytoplasmic permeation pathway of neurotransmitter transporters. *Biochemistry*, 50(35), 7462–7475.
- Saha, G. B., MacIntyre, W. J., & Go, R. T. (1992). Cyclotrons and positron emission tomography radiopharmaceuticals for clinical imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 22(3), 150–161.
- Sanchez, C., Reines, E. H., & Montgomery, S. a. (2014). A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: are they all alike? *International Clinical Psychopharmacology*, 29(4), 185–196.
- Schmidt, K. C., & Turkheimer, F. E. (2002). Kinetic modeling in positron emission tomography. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine : Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 46(1), 70–85.
- Spanoudaki, V. C., & Levin, C. S. (2010). Photo-detectors for time of flight positron emission tomography (ToF-PET). *Sensors (Switzerland)*, 10(11), 10484–10505.
- Strijckmans, K. (2001). The isochronous cyclotron: Principles and recent developments. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 25(2), 69–78.
- Uher, R., Payne, J. L., Pavlova, B., & Perlis, R. H. (2014). Major depressive disorder in DSM-5: Implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV. *Depression and Anxiety*, 31(6), 459–471.

- Van Geuns, R.-J. M., Wielopolski, P. a., de Bruin, H. G., Rensing, B. J., van Ooijen, P. M. a., Hulshoff, M., ... de Feyter, P. J. (1999). Basic principles of magnetic resonance imaging. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 42(2), 149–156.
- Van Laeken, N., Kersemans, K., De Meestere, D., Goethals, I., & De Vos, F. (2013). Improved HPLC purification strategy for [11C]raclopride and [11C]DASB leading to high radiochemical yields and more practical high quality radiopharmaceutical formulations. *Applied Radiation and Isotopes*, 78, 62–67.
- Varga, J., & Szabo, Z. (2002). Modified regression model for the Logan plot. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(2), 240–244.
- Watabe, H., Ikoma, Y., Kimura, Y., Naganawa, M., & Shidahara, M. (2006). PET kinetic analysis--compartmental model. *Annals of Nuclear Medicine*, 20(9), 583–588.
- Wilson, a. a., Ginovart, N., Schmidt, M., Meyer, J. H., Threlkeld, P. G., & Houle, S. (2000). Novel radiotracers for imaging the serotonin transporter by positron emission tomography: Synthesis, radiosynthesis, and in vitro and ex vivo evaluation of 11C-labeled 2-(phenylthio)araalkylamines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(16), 3103–3110.
- Wilson, A. a., Ginovart, N., Hussey, D., Meyer, J., & Houle, S. (2002). In vitro and in vivo characterisation of [11C]-DASB: A probe for in vivo measurements of the serotonin transporter by positron emission tomography. *Nuclear Medicine and Biology*, 29(5), 509–515.
- Wu, Y., & Carson, R. E. (2002). Noise reduction in the simplified reference tissue model for neuroreceptor functional imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(12), 1440–1452.
- Zanzonico, P. (2012). Principles of Nuclear Medicine Imaging: Planar, SPECT, PET, Multi-modality, and Autoradiography Systems. *Radiation Research*, 177(4), 349–364.
- Zhang, Y., & Fox, G. B. (2012). PET imaging for receptor occupancy: Meditations on calculation and simplification. *Journal of Biomedical Research*, 26(2), 69–76.
- Zhong, H., Haddjeri, N., & Sánchez, C. (2012). Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter-a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology*, 219(1), 1–13.

7.2 INTERNETBRONNEN

1. http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/intro_src/section2.html (23-03-2015)
2. http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_compartmental.html (25-02-2015)
3. http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/model_distribution_volume.html (25-02-2015)
4. <http://atomic.lindahall.org/what-is-an-atom-smasher.html> (09-04-2015)
5. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (03-04-2015)
6. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44034.pdf> (06-04-2015)
7. <http://www.nucmedtutorials.com/dwdcopsqc/dc1.html> (23-04-2015)
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1121941/> (06-03-2015)
9. <http://doc33.pmod.com/pkin/2310.htm> (08-04-2015)
10. http://www.rxkinetics.com/pktutorial/1_6.html (31-03-2015)
11. <http://www.chem.agilent.com/library/applications/5988-9944en.pdf> (24-04-2015)

8. BIJLAGEN

BIJLAGE 1: Evening lectures

Lezing 1: Research on the causes of human cancer and scientific strategies for cancer prevention and control.

Kanker vormt een wereldwijd probleem met sterk stijgende prevalentie- en mortaliteitscijfers in de afgelopen jaren. Borstkanker en longkanker zijn bij respectievelijk vrouwen en mannen de meest voorkomende pathologieën en staan ook in voor het grootste aandeel mortaliteit. Prevalentie, type en mortaliteit van kanker varieert over de hele wereld. Er wordt echter wel een duidelijke trend gezien in ontwikkelde versus minder ontwikkelde landen. Zo zou de mortaliteit in de toekomst dalen in ontwikkelde landen terwijl deze zou stijgen in de minder ontwikkelde met als gevolg dat bijna alle kankers een groeiend probleem vormen in deze laatste landen. Het International Agency for Research on Cancer (IARC) is een agentschap die onderzoek doet naar kanker. Aan de oorsprong van kanker kunnen namelijk verschillende risicofactoren zoals milieufactoren en levensstijlfactoren liggen. Hierbij speelt het rookgedrag de belangrijkste rol speelt. Al deze blootstellingen worden door het IARC geclassificeerd in vier groepen waaruit kan afgeleid worden in hoeverre ze een 'cancer hazard' vormen. Naast het onderzoek naar kanker is ook de preventie van groot belang. Levensstijlaanpassingen zoals het op punt houden van een gezond gewicht, voldoende beweging en een gezond dieet zouden het risico om kanker te ontwikkelen reduceren. Ook zouden ze zorgen voor een positieve beïnvloeding van de gezondheid en overleving na diagnose.

Lezing 2: The evolution of microbiology in cystic fibrosis.

Cystische fibrose (CF) is de meest voorkomende dodelijke genetische aandoening bij blanken en wordt veroorzaakt door een mutatie van het CFTR gen. Slechts bij een klein deel van deze populatie resulteert die mutatie in de symptomen van CF. De aantasting van het pulmonair epitheel is de belangrijkste doodsoorzaak. Door de abnormale werking van CFTR, een ionkanaal die chloride ionen doorheen de epitheliale celmembraan transporteert, functioneren de cilia niet meer voldoende om mucus te verwijderen. Hierdoor treden achtereenvolgens bronchiëctasieën, respiratoir falen en sterfte op. Hoewel CF reeds lang voordien bestond, werd het pas in 1938 beschreven. Dit resulteerde in tal van tests met antibiotica in een poging om de overlevingskans van de patiënten te verhogen. Waar in het

begin voornamelijk *Staphylococcus aureus* werd teruggevonden als pathogeen, werd deze later vervangen door *Pseudomonas* als primair pathogeen. Hierbij heeft het mucoïde fenotype een veel slechtere overleving dan het niet mucoïde fenotype en is de virulentie van deze *Pseudomonas* te wijten aan biofilmvorming en Quorum sensing. In latere onderzoeken werden nog tal van andere bacteriën ontdekt. Moleculen die het gendefect zouden herstellen hebben nog niet lang zoveel succes. Wat gentherapie echter zal doen bij CF is tot nu toe nog niet geweten.

Lezing 3: Zijn managementvaardigheden in de farmaceutische zorg belangrijk voor de toekomst? Een kijk vanuit NederBelgisch perspectief.

De laatste jaren hebben heel wat evoluties plaatsgevonden zowel in het zorglandschap als in de rol van de apotheker, maar ook bij de patiënt zelf. Zo is het zwaartepunt in de zorg verschoven van acuut naar chronisch en is het belangrijker geworden om ziekten te voorkomen in plaats van te genezen. Daar waar vroeger het geneesmiddel centraal stond, staat nu de patiënt meer en meer centraal. Apothekers hebben de dag van vandaag meer interacties met allerlei andere zorgverleners, wat primordiaal blijkt te zijn voor een goede gezondheid van de patiënt. Ook is de focus nu vooral gericht op evidence based geneesmiddelengebruik en zorgdiensten. De patiënt zelf wordt meer en meer beïnvloedt door de reclame en verandert van klant naar zorgconsument gezien er heel wat meer bij komt kijken dan enkel geneesmiddelen afleveren. Apothekers worden niet meer zuiver aanzien als leverancier van medicatie, maar zijn geëvolueerd naar het leveren van farmaceutische patiëntenzorg. Hierbij staan de zorgen, verwachtingen en overtuigingen van de individuele patiënt centraal om de kwaliteit van leven te optimaliseren. In Nederland zijn hiervoor al heel wat initiatieven naar voor gekomen zoals geïntegreerde farmaceutische zorg, medicatiereview en farmacotherapeutisch overleg. In België daarentegen is de verschuiving van medicatieaflevering naar medicatieopvolging en –review als belangrijkste kerntaak tot op heden nog een uitdaging. Om de waardering als apotheker te behouden moet dus vooral rekening gehouden worden met het belang van samenwerking en communicatie en het centraal stellen van de patiënt. De apotheker moet zich hierbij bewust zijn van de specifieke vaardigheden die geen enkele andere zorgverlener heeft.