

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

**STUDIUM LEDVINNÉ BIOELIMINACE XENOBIOTIK NA
BUNĚČNÉ ÚROVNI II.**

(DIPLOMOVÁ PRÁCE)

Vedoucí diplomové práce

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2009

Lýdia Popadičová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci správne citované.

.....
podpis

Ďakujem Doc. PharmDr. Františkovi Trejtnarovi, Csc., vedúcemu diplomovej práce, za poskytnuté rady, pomoc pri spracovávaní diplomovej práce a riešení problémov a pani Ivane Filipovej pri príprave buniek obličiek. Ďalej ďakujem Doc. Ing. Alici Lázničkovej, Csc. za označenie peptidov rádionuklidmi.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. CIEĽ PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČASŤ	12
3.1. TRANSPORT LIEČIV V OBLIČKÁCH.....	13
3.1.1. Transportné mechanizmy pre nízkomolekulárne liečivá	13
3.1.1.1. Tubulárny transport organických aniónov	14
3.1.1.2. Tubulárny transport organických katiónov	15
3.1.1.3. Transport peptidov v obličkových tubuloch	15
3.1.2. Transportné mechanizmy pre proteínové liečivá.....	16
3.2. VÝVOJ NOVÝCH PEPTIDOVÝCH ANALÓGOV	19
3.2.1. Peptidy cieleňé na SST receptor	19
3.2.2. Peptidy cieleňé na GRP receptor	21
3.2.3. Peptidy cieleňé na NT- receptory	22
3.2.4. Peptidy cieleňé na CCK ₂ - receptor	23
3.2.5. Peptidy cieleňé na GLP-1 receptor	23
3.2.6. Peptidy cieleňé na $\alpha_v \beta_3$ integrin	24
3.3. ZVÝŠENIE TERAPEUTICKÉHO EFEKTU	25
3.3.1. Upregulácia receptorov	25
3.4. KOMBINOVANÁ LIEČBA.....	25
3.4.1. Chemoterapeutiká a rádiosenzitizéry	25
3.4.2. Kombinácia rôznych rádionuklidov.....	26
3.4.3. Hybridné molekuly	26
3.5. CHARAKTERISTIKA ŠTUDOVANEJ LÁTKY	27

4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	28
4.1.	MATERIÁL	29
4.1.1.	Experimentálne zvieratá	29
4.1.2.	Chemikálie	29
4.1.3.	Použité prístroje	29
4.2.	POSTUP	30
4.2.1.	Príprava Krebs-Henseleitových roztokov	30
4.2.2.	Príprava izolovaných obličkových buniek	33
4.2.3.	Usporiadanie akumulčných štúdií	36
4.2.3.1.	Stanovenie závislosti akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC na dobe inkubácie	36
4.2.3.2.	Štúdium vplyvu potencionálnych inhibítorov na akumuláciu ^{111}In -DOTA-NOC	36
4.2.3.3.	Vyjadrovanie výsledkov	37
4.3.	VÝSLEDKY	38
4.3.1.	Životnosť obličkových buniek	38
4.3.2.	Uptake ^{111}In -DOTA-NOC v obličkových bunkách potkana	39
4.3.3.	Akumulácia ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti albuminu	44
4.3.4.	Akumulácia ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti probenecidu	46
5.	DISKUSIA	50
6.	ZÁVER	54
7.	LITERATÚRA	56

ABSTRAKT

STUDIUM LEDVINNÉ BIOELIMINACIE XENOBOTIK NA BUNĚČNÉ ÚROVNI II.

Syntetické analógy somatostatínu značené vhodnými kovovými rádionuklidmi sú v nukleárnej medicíne používané pre scintigrafické zobrazenie a novšie i k cielej rádioterapii niektorých typov maligných nádorov, u ktorých sa vyskytuje zvýšená expresia somatostatínových receptorov. Ich terapeutické použitie je však obmedzené potencionálnymi rádiotoxickými účinkami na obličky v dôsledku akumulácie týchto rádiopeptidov v bunkách tubulov obličiek. Táto kumulácia je spôsobená reabsorpciou rádiopeptidov v obličkových tubuloch zatiaľ nie úplne objasnenými mechanizmami. Cieľom tejto práce bolo študovať akumuláciu vývojového receptorovo špecifického derivátu somatostatínu DOTA-NOC (DOTA-1-NaI³-oktreotid) značeného indiom-111 (¹¹¹In-DOTA-NOC). Experimenty boli zamerané predovšetkým na štúdium mechanizmu obličkového uptake a na možnosti ovplyvnenia nežiadúcej kumulácie študovaného rádiopeptidu v obličkových bunkách potencionálnymi inhibítormi vybraných transportných systémov obličiek. Ako experimentálny model sme použili čerstvo izolované obličkové bunky potkana, ktoré boli získavané z obličiek zvierat a kolagenázovou metódou. Overenie životnosti buniek sa vykonalo pomocou trypanovej modrej. Preparáty izolovaných buniek vykazovali spravidla životnosť okolo 90% a boli teda vhodné pre daný typ experimentu. Albumín, ktorý je substrátom a inhibítorom megalinového transportného endocytárneho systému, namiesto očakávanej inhibície uptake rádiopeptidu paradoxne mierne zvyšoval jeho akumuláciu v obličkových bunkách. Probenecid, ktorý inhibuje transportéry pre organické anióny, prekvapivo výrazne akumuláciu rádiopeptidu znižoval. Inhibitor transportérov pre reabsorpciu oligopeptidov - ampicilín - výrazne znižoval akumuláciu ¹¹¹In-DOTA-NOC v obličkových bunkách. Získané výsledky by mohli ukazovať, že pre obličkový uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC majú význam jak transportéry pre organické anióny, tak transportéry pre peptidy. Avšak je potrebné vylúčiť, že použité koncentrácie týchto inhibítorov nie sú cytotoxické, čo by mohlo tiež znižovať mieru kumulácie rádioaktivity v dôsledku poklesu počtu aktívnych buniek v preparáte. Predpokladanú účasť megalinového receptora na akumuláciu rádiopeptidov sme v uskutočnených pokusoch nepotvrdili.

ABSTRACT

STUDY OF RENAL BIOELIMINATION OF XENOBIOTICS AT THE CELLULAR LEVEL II.

Synthetic somatostatin analogues labeled with suitable metal radionuclides are used in nuclear medicine for scintigraphy. Recently, they are also used for targeting radiotherapy in some types of malignant tumors with higher expression of somatostatin receptors. Their therapeutical use is restricted due to a potential radiotoxic effects on kidneys. This is a consequence of accumulation of those radiopeptides in the renal tubular cells. The reason of this cumulation is the reabsorption of radiopeptides in renal tubules. The mechanism of accumulation has not been explained so far. The aim of this work was to study the accumulation of an experimental receptor specific derivate of somatostatin, DOTA-NOC (DOTA-1-Nal³-oktreotid) labeled with indium-111 (¹¹¹In-DOTA-NOC). The experiments were mainly focused on a study of the mechanism of renal uptake and on possibilities how to modify an unfavourable accumulation of the studied radiopeptide in the renal cells. Freshly isolated renal rat cells, which we obtained by the collagenase method, were used as an experimental model. Verification of the viability of renal cells was made by trypan blue exclusion test. The preparates of renal cells showed viability approximately 90% and therefore they could have been used for the given type of experiment. Albumin is a substrate and an inhibitor of megalin endocytic transport system. It increased moderately the accumulation of radiopeptide instead of the expected inhibition of the uptake. Surprisingly, probenecid, which inhibits transporters for organic anions, decreased the accumulation of radiopeptide markedly. Similarly, an inhibitor of peptide membrane transporter, ampicilin, lowered the accumulation of ¹¹¹In-DOTA-NOC in the renal cells significantly. The discovered results could mean that can be mediated by both transporters for organic anions as well as transporters for oligopeptides. However, it is necessary to eliminate a possibility that the concentration we have used, are not potentially cytotoxic. This can lead to declining the cumulation rate of radioactivity as a consequence of decreasing the number of active cells in preparates. The expected participation of megalin endocytic system was not proved in our experiments.

Zoznam použitých skratiek

CCK	cholecystokinin
CUB	cubilínové (domény)
DBP	protein vázajúci vitamín D (vitamin D-binding protein)
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylenetriaminopentaoctová kyselina
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GRP	gastrin-releasing peptide
HDL	lipoprotein o vysokej hustote (high-density lipoprotein)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
MRP	multidrug-resistant associated proteins
NOC	[1-Nal ³]-oktreotid = D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr
NT	neurotensin
OA, OC	organický aniont, organický kation
OATs	transportéry organických aniontů (organic anion transporters)
OCTs	transportéry anorganických kationtů (organic anion transporters)
PEPT	peptidové transportéry (peptide transporters)
PRRT	peptide-receptor radionuclide therapy
RAP	s receptorom spojený proteín (receptor-associated protein)
RBP	protein vázajúci retinol (retinol-binding protein)
RGD	arginín-glycín- aspartamová kyselina
SRIF	somatotropin release inhibiting factor
SS	somatostatin
SSTR	somatostatínový receptor (somatostatin receptor)
TATE	[D-Phe ¹ -Tyr ³ -Thr ⁸]-oktreotid
TOC	Tyr ³ -oktreotid
VLDL	lipoprotein o veľmi nízkej hustote (very low density lipoprotein)

1. ÚVOD

Hlavnou témou práce je štúdium receptorovo špecifických peptidov zo skupiny somatostatínových analógov zamerané na ich správanie v obličkách. Používajú sa pre zobrazovanie a terapiu najmä neuroendokrinných nádorov, pretože sa u nich vyskytujú receptory špecifické pre tieto peptidy. Rádioaktívne značené analógy somatostatínu sú vylučované obličkami a v závislosti na type analógu sú reabsorbované v proximálnych tubuloch. To je príčinou ich akumulácie v obličkovom tkanive, ktorá je spojená s nefrotoxicitou. Tento nežiadúci účinok obmedzuje ich použitie v terapii a diagnostike.

Dôležité je poznať transportné mechanizmy v obličkách, ktoré sú zodpovedné za reabsorpciu liečiv a tým aj za retenciu a akumuláciu rádioaktívne značených analógov somatostatínu. Na základe týchto poznatkov je možné objaviť látky, ktoré by túto retenciu mohli ovplyvniť a znížiť tak poškodenie obličiek.

Táto práca je zameraná na štúdium obličkovej akumulácie rádioaktívne značeného peptidu zo skupiny analógov somatostatínu [^{111}In -DOTA]-1-Nal³-oktreotidu. Sledovala sa účasť megalin/cubilínového membránového transportného systému, ktorý sa vyskytuje v proximálnych tubuloch obličiek. Zároveň bola študovaná účasť aj iných receptorov. Experimentálne práce skúmali možné ovplyvnenie nežiadúcej obličkovej akumulácie vybranými látkami s využitím izolovaných obličkových buniek potkana.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo experimentálne študovať akumuláciu vybraného rádioaktívne značeného peptidu zo skupiny analógov somatostatínu ^{111}In -DOTA-NOC v izolovaných obličkových bunkách potkana. Ďalej bolo cieľom posúdiť vplyv niekoľkých potencionálnych inhibítorov na túto nežiadúcu obličkovú akumuláciu. Súčasťou práce bolo tiež vypracovanie literárneho prehľadu o súčasnom stave poznania vo vývoji peptidových receptorovo špecifických rádiofarmák a v problematike obličkových transportných systémov.

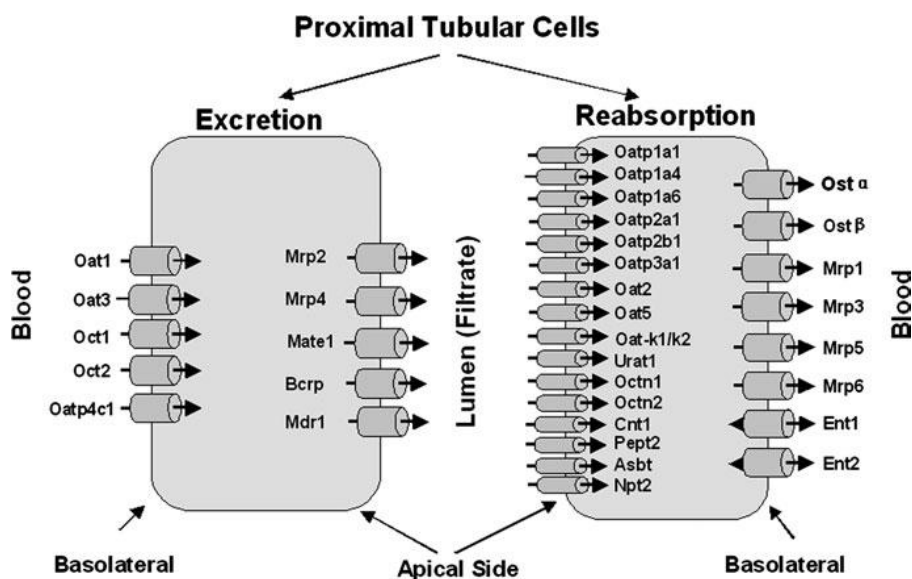
3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Transport liečiv v obličkách

Obličky hrajú dôležitú úlohu v eliminácii hydrofilných xenobiotík vrátane liečiv, toxínov a endogénnych zlúčenín. Boli objavené vysokokapacitné transportné systémy pre elimináciu veľkého počtu cudzích zlúčenín, ktoré sa do obličiek dostávajú. Dôležitým mechanizmom pre vylúčenie liečiv a metabolitov do moču je glomerulárna filtrácia. Ďalším mechanizmom je transcelulárny aktívny transport. Selektívny a špecifický transport organických kationov a aniónov je považovaný za terciárny aktívny transport, ktorý využíva prenášače.

3.1.1. Transportné mechanizmy pre nízkomolekulárne liečivá

Existuje mnoho transportérov liečiv v renálnom tubule, ktoré môžeme rozdeliť do niekoľkých skupín. Medzi tie hlavné patria transportéry pre organické anióny (OAT) a kationy (OCT). Vyskytujú sa na oboch stranách renálnych tubulárnych buniek. Avšak prevažný výskyt OAT je na bazolaterálnej membráne, zatiaľ čo OCT sú vo väčšej miere v kartáčovom leme apikálnej membrány. Ďalšími skupinami transportérov v obličkách sú skupina P-glykoproteínu (Pgp), MRP (multidrug-resistant associated protein) a prenášače pre peptidy (obr. 1).



Obr. 1. Renálne transportéry. Obvyklé názvy transportérov pre xenobiotiká zodpovedných za sekreciu (ľavá strana) a reabsorpciu (pravá strana) v epiteliálnych bunkách proximálneho tubulu sú uvedené so šípkami ukazujúcimi smer transportu (Klaasen a kol. 2008).

3.1.1.1. Tubulárny transport organických aniónov

Prvú skupinu tvoria transportéry organických aniónov, označované ako OAT. U ľudí boli identifikované 4 typy: OAT1, OAT2, OAT3, OAT4. Sú lokalizované prevažne na bazolaterálnej membráne (OAT1 a OAT3) a prenášajú liečiva z krvi do renálnych tubulárnych buniek. OAT1 a OAT2 majú afinitu voči cidofoviru a adenoviru. OAT3 sa vyznačuje vysokou afinitou pre dehydroepiandrosteron a estradiol-17beta-D-glukuronid. Spolu s OAT1 prenášajú okrem iných aj uremické toxíny, kyselinu hipurovú a indolacetát.

Ďalšou skupinou sú prenášače organických anionických polypepidov (OATP). OATP1 sa zúčastňuje exkrécie glukokortikoidov a spironolaktónu. OATP2 a 3 prenášajú tyroxín a trijodtyrosín.

Tretou skupinou sú prenášače MRP, ktoré patria do nadrodiny ABC transportérov. MRP1, 3, 5, 6 sa nachádzajú na bazolaterálnej membráne, zatiaľ čo MRP2 a 4 v kartáčovom leme apikálnej membrány (Launay-Vacher a kol. 2006).

3.1.1.2. Tubulárny transport organických katiónov

Prvou skupinou sú transportéry označované ako OCT. Hrajú dôležitú fyziologickú a farmakologickú úlohu v reabsorpcii a sekrécii endogénnych a exogénnych zlúčenín: cholinu, dopaminu, adrenalinu, histaminu, TEA, cimetidinu a chininu. Nachádzajú sa v renálnom proximálnom tubule a zberných kanálikoch, a to hlavne v kartáčovom leme apikálnej membrány. Sú zodpovedné za prenos liečiv z buniek do tubulárneho lumen.

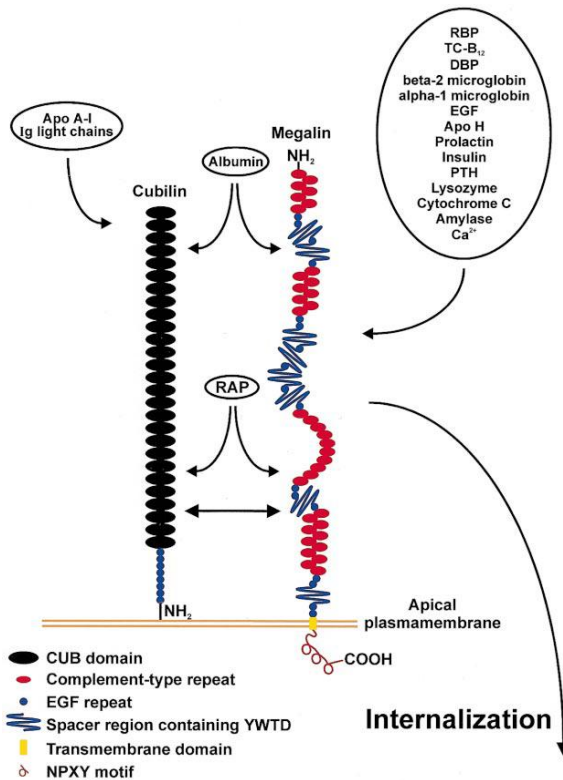
Druhou skupinou je P-glykoproteínový prenášač. Tvorí podskupinu transportérov ABC nadrodiny. Uľahčuje aktívnu exkréciu alkaloidov, antracyklínov, steroidov, cyklosporinu a iných hydrofóbných organických katiónov. Je lokalizovaný v kartáčovom leme apikálnej membrány a funguje ako efluxná pumpa z vnútra renálnych buniek do zberného kanáliku. Doteraz bolo popísaných 20 P-gp polymorfizmov, ale len dva z nich majú klinický efekt (Launay-Vacher a kol. 2006).

3.1.1.3. Transport peptidov v obličkových tubuloch

V renálnych tubuloch sú sekretované a reabsorbované liečivá typu peptidov. Ich reabsorpcia prebieha pomocou prenášačov lokalizovaných na kartáčovom leme apikálnej membrány renálnych tubulárnych buniek. U ľudí boli identifikované dva prenášače: PEPT1 a PEPT2. Substrátmi sú niektoré cytostatiká, inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu a betalaktámové antibiotiká (Launay-Vacher a kol. 2006).

3.1.2. Transportné mechanizmy pre proteínové liečivá

Liečivá s vyššou molekulovou hmotnosťou typu oligopeptidov a proteínov sú v renálnych tubuloch prenášané do buniek systémom megalin/cubilin (obr. 2).



Obr. 2. Štruktúrna organizácia a interakcia medzi megalinom a cubilinom a substráty týmto systémom transportované (Christensen a Birn 2001).

Megalín

Megalín je 600 kDa transmembránový proteín patriaci do skupiny receptorov lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL). Je exprimovaný v polarizovaných epiteliálnych bunkách renálneho proximálneho tubulu, glomerulárnych podocytoch, choroidálnom plexe, endymálnych bunkách, bunkách štítnej žľazy, bunkách labyrintu vnútorného ucha a ciliárnom epitele oka. Nachádza sa tiež v pneumocytoch typu II, v bunkách prištítného telieska produkujúcich paratyroideálny hormón, tenkom čreve, maternici, vajcovode, cytotrofoblaste placenty a vo viscerálnom žltkovom vaku (Christensen a Birn 2001).

Megalin bol prvýkrát identifikovaný ako antigen pri Heymannovej nefritíde u potkanov. Bol izolovaný z kartáčového lemu a pomenovaný ako gp 330 na základe molekulovej hmotnosti. Bolo identifikovaných mnoho ligandov megalinu, ktoré sú dôležité pri tubulárnom vychytávaní filtrovaných proteínov. Medzi jeho ligandy patria napr. proteíny viažuce vitamíny, niektoré hormóny, enzýmy, inhibítory enzýmov, lipoproteíny. Hraje dôležitú úlohu v metabolizme a homeostáze esenciálnych vitamínov.

Megalin pozostáva zo 4600 aminokyselín s NH₂-koncovou extracelulárnou doménou, jednoduchou transmembránovou doménou a krátkym cytoplazmatickým reťazcom. Má spoločné vlastnosti s LDL-receptormi, LDL príbuzným receptorom, VLDL-receptormi a receptorom pre apolipoproteín E (Christensen a Birn 2001).

Hlavnou funkciou je vychytávanie proteínov v tubuloch. Aj keď málo jeho ligandov je možné očakávať vo filtráte, mnoho z nich indikuje poruchu tubulárnej reabsorpcie. Sú to napríklad vitamín D viažúci proteín (DBP), vitamín A viažúci proteín (RBP), α_1 -mikroglobulín a β_2 -mikroglobulín. Medzi jeho ligandy normálne filtrované v glomerule patria DBP, RBP, prolaktin, inzulín, albumín, lyzozým, transkobalamin-B₁₂ a mnoho iných (Christensen a Birn 2001). Vo väčšine prípadov je väzba ligandov závislá na vápentých iónoch (Christensen a kol. 1992). Väzba takmer všetkých ligandov môže byť inhibovaná RAP. Táto veľká afinita je využívaná pre štúdium funkcie receptoru. Megalin má pre RAP dve väzbové miesta, pričom jedna molekula sa viaže s vyššou afinitou a druhá s nižšou (Moestrup a kol. 1996).

Ukázalo sa, že megalin viaže a sprostredkúva uptake niekoľkých polybázických a potenciálne nefrotoxických látok v proximálnom tubule obličiek. Patria medzi ne aminoglykozidy netilimicin, gentamicin, amikacin a polymyxin B. Tieto liečivá sú filtrované v glomerule s následným endocytárnym uptake a akumuláciou v endocytárnom aparáte a lyzozómoch buniek proximálneho tubulu (Christensen a Birn 2001).

Cubilin

Je to 460 kDa periférny membránový proteín, známy ako intestinálny vnútorný faktor-kobalamínový receptor, je exprimovaný spolu s megalinom v renálnom proximálnom tubule. Taktiež sa vyskytuje vo viscerálnom žltkovom vaku, epitele tenkého čreva, placentárnom cytotrofoblaste a lyzozómoch. Jeho primárna štruktúra

bola identifikovaná u potkanov, ľudí a psov. Napriek odlišnej štruktúre majú s megalinom podobné vlastnosti. Je multiligandový, endocytický, majúci niekoľko spoločných ligandov s megalinom. Bol identifikovaný ako cieľ teratogénnych protilátok produkovaných u králikov po aplikácii preparátov na kartáčový lem a pomenovaný gp 280 na základe molekulovej hmotnosti (Christensen a Birn 2001).

Pozostáva z 3600 aminokyselín bez transmembránovej domény. Extracelulárna doména pozostáva z 27 CUB domén (Complement C1r/C1s, Uefg a Bone morphogenic protein-1). Pred CUB doménami sa nachádza 110 aminokyselín a 8 EGF štruktúr. Iniciálny úsek aminokyselín obsahuje furinové štiepiace miesto, ktoré je pravdepodobne zodpovedné za proteolytickú aktivitu. NH₂-koncová skupina je zodpovedná za ukotvenie proteínu v membráne.

Medzi jeho ligandy, ktoré sa bežne vyskytujú v glomerulárnom ultrafiltráte môžeme zaradiť albumin, imunoglobulin s ľahkými reťazcami a apolipoproteín A-I. Štúdie ukázali, že cubilin je nepostrádateľný pre normálnu reabsorpciu albuminu z filtrátu, inak dochádza k albuminurii. Cubilin taktiež viaže RAP, ale význam tejto väzby nie je známy.

Väčšina ligandov prenášaných megalinom alebo cubilinom v proximálnom tubule je degradovaná v lyzozómoch (Christensen a Birn 2001).

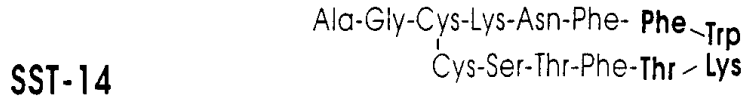
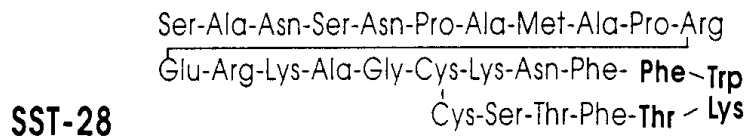
3.2. Vývoj nových peptidových analógov

Prírodná štruktúra peptidov je príčinou ich citlivosti voči peptidázam v krvi a iných tkanivách. To obmedzuje ich potencionálne využitie ako radiofarmák. Pre klinické použitie sú vhodné metabolicky stabilné analógy. Spôsobov ako ich stabilizovať je viacero. Patrí medzi ne začlenenie nebiodegradovateľnej väzby, cyklizácia a stabilizované aminokyselinové deriváty nahrádzajúce prírodné aminokyseliny. Výhodná je in vivo stabilita, dlhá doba zadržiavania rádioaktivity v nádore a tiež jej rýchle odstránenie z ostatných tkanív a krvi. Začlenenie rádioaktívne značených peptidov do nádorových buniek môže viesť k zadržiavaniu rádioaktivity. Agonisti peptidov často podliehajú endocytóze, ktorá uľahčuje ich včlenenie do nádorových buniek, zatiaľ čo antagonisti týchto peptidov sa nevčleňujú. V súčasnosti je výskum zameraný predovšetkým na receptorových agonistov (de Visser a kol. 2008).

3.2.1. Peptidy cielené na SST receptor

V poslednej dobe sa zvyšuje záujem o použitie rádiopeptidov pri targetingu tumorov jednak pre lokalizáciu a zároveň pre internú rádioterapiu neoplazmov. Analógy somatostatínu, rádioaktívne značené mnohými gama-, pozitron- a beta-žiaričmi sú prototypmi takýchto peptidov (Wild a kol. 2003).

Somatostatín je cyklický peptidový hormón. Existuje v dvoch bioaktívnych molekulárnych formách: somatostatín-14 a na N-konci predĺžená forma somatostatín-28 (obr. 3). Vykazuje rozdielne biologické účinky v rôznych častiach tela ako napr. v mozgu, tenkom čreve, hypofýze, pankrease a niektorých zložkách imunitného systému. Medzi jeho účinky patrí inhibícia sekrécie hormónov, modulácia neurotransmisie a proliferácia buniek. Tieto deje sú sprostredkované špecifickými receptormi spojenými s G- proteínom (Wild a kol. 2003).



Obr. 3. Štruktúra somatostatínu 14 a 28 (Patel 1999)

Existuje päť podtypov receptorov označovaných ako sstr₁-sstr₅. Štyri z nich nerozlišujú medzi SS-14 a SS-28. Sú zodpovedné za rôzne biologické odpovede. Niektoré z receptorov sú nadmerne exprimované v niekoľkých nádoroch, hlavne neuroendokrinných a ich metastázach. Tieto nádory môžu byť zobrazované in vivo pomocou chelatovaných kovových rádionuklidov konjugovaných so somatostatínovými analógmi, napr. [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotidom (OctreoScan). Ďalším je ^{99m}Tc-depreotid, ktorý sa používa na hodnotenie solitárnych pľúcnych uzlíkov, tumorov pľúc a melanómu. [¹¹¹In]DOTA-TOC a [⁹⁰Tc]DOTA-TOC sú efektívnymi zobrazovacími a terapeutickými látkami. Naviac náhrada alcoholickej skupiny na C-konci oktapeptidu karboxylovou skupinou viedla k zvýšenej afinite k sstr₂. [¹⁷⁷Lu]DOTA-TATE a [¹¹¹In-DTPA]-oktreotid vykazujú vyššiu afinitu k sstr₂ receptorom v porovnaní s OctreoScanom. Ich afinita k sstr₅ je nízka, k sstr₃ takmer zanedbateľná a k receptorom sstr₁ a sstr₄ nemajú žiadnu afinitu (Wild a kol. 2003).

^{99m}Tc značené somatostatínové analógy, ^{99m}Tc-[HYNIC-Tyr³]oktreotid a ^{99m}Tc-[HYNIC-Tyr³]oktreotát, sú označované ako ďalšie sľubné radiofarmaká.

Rádioaktívne značené analógy oktreatidu a oktreatátu majú vysokú afinitu k sstr₂, čo je najčastejšie sa vyskytujúci podtyp receptora v neuroendokrinných nádoroch. U niektorých typov nádorov sa tento receptor vôbec nevyskytuje alebo je tam vo veľmi malom množstve. Heterogénna skupina sst receptorov vyžaduje markry alebo ich kombinácie, aby mohli útočiť na viac rôznych typov sst- receptorov. Bolo vytvorených mnoho DOTA-somatostatínových analógov, všetky založené na oktreatide, s modifikáciami na aminokyseline v pozícii 3. Dva z nich [DOTA⁰-Nal³]oktreotid a [DOTA⁰-BzThi³]oktreotid majú vysokú afinitu k sstr₂, sstr₃ a sstr₅ (Ginj a kol. 2006).

Agonisti peptidov sa do bunky začlenia po naviazaní na receptor. Tento proces je považovaný za dôležitý a vedúci k zadržiavaniu rádionuklidu v cieľovej bunke. Nedávno bola porovnávaná účinnosť agonistov a antagonistov. Ukázalo sa, že

antagonisti, aj napriek tomu, že sa do bunky nezačleňujú, sa vo vyššej miere akumulujú v nádorových bunkách, zatiaľ čo receptorová afinita bola u oboch rovnaká. A zároveň akumulácia v zdravých tkanivách, okrem obličiek, bola nižšia u antagonistov. Z týchto výsledkov vyplýva, že antagonisti môžu byť lepšími kandidátmi v terapii než agonisti (Ginj a kol. 2006).

3.2.2. Peptidy cieleňé na GRP receptor

Zvýšené množstvo týchto receptorov sa nachádza v mnohých ľudských nádoroch ako sú napríklad rakovina prostaty a prs. Vysokú afinitu k týmto receptorom má bombesin, peptid obsahujúci 14 aminokyselín, preto jeho rádioaktívne značené analógy môžu byť účinné v zobrazovaní a terapii. Prvé pokusy o vytvorenie vhodných zlúčenín boli zamerané na zlúčeniny značené jódom. Boli však nestabilné a jód bol rýchlo odstraňovaný z nádorových buniek. V súčasnosti sa výskum zameriava na značenie ^{111}In a $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Technécium-99m značené bombesinové analógy sa akumulujú v pečeni a črevách vďaka ich vysokej lipofilite. Táto ich vlastnosť znemožňuje detekciu abdominálnych nádorov, preto bola vyvinutá snaha o jej zníženie. Jednou z možností bola konjugácia s bifunkčnou chelatačnou látkou, hydrazin-nikotinátom (HYNIC), a koligandom, N,N'-etylendiamindioctovou kyselinou (EDDA). To viedlo k zníženiu lipofilých vlastností a tým aj k nižšej hepatobiliárnej a renálnej exkrécii (Ferro-Flores a kol. 2006).

Indiom-111 značené analógy bombesínu sa často používajú ako náhradníci pri určovaní biodistribúcie a dozimetrie terapeutických rádiofarmák značených rádioaktívnymi prvkami ako napríklad ^{90}Y . DTPA a DOTA sa v bombesínoch používajú ako chelatačné látky. DTPA analógy sú dobre vychytávané nádorom a rýchlo odstraňované z krvi a tkanív. Na druhej strane DOTA analógy majú lepšiu väzbovú schopnosť k receptoru, preto je možné ich využitie v SPECT, PET a PRRT. Sľubými zlúčeninami sú napríklad DOTA-PESIN a ^{177}Lu -AMBA. Nevýhodou DOTA-PESIN je vysoká retencia v obličkách. ^{177}Lu -AMBA má dobré výsledky in vivo u zvierat, ale je podobne ako DOTA-PESIN zadržovaný v obličkách. Táto retencia nemôže byť znížená

ani súčasným podaním lysinu, ktorého je v týchto sekvenciách málo (de Visser a kol. 2008).

Použitie bombesinových analógov môže byť sľubné v PRRT. Klinická scintigrafia pomocou ^{99m}Tc a ^{68}Ga značených bombesinových analógov jasne ohraničila nádorové lézie vrátane lymfatických uzlín a metastáz. Nevýhodou je ich vychytávanie v pankrease a črevách.

Je záujem o použitie týchto analógov u rakoviny prostaty, ktorá nereaguje na hormonálnu liečbu. Doteraz dostupné liečebné stratégie sú efektívne len okrajovo. Štúdie ukázali, že môžu byť použité len v raných štádiách androgen-dependetného nádoru prostaty (de Visser a kol. 2008).

3.2.3. Peptidy cielené na NT- receptory

Neuroendokrinné pankreatické tumory môžu byť lokalizované a liečené pomocou somatostatínových analógov. Tie však nie sú dostačujúce pre exokrinnú rakovinu pankreasu, pretože 75% karcinómov pankreatických vývodov má NT receptory kým normálne pankreatické tkanivo, pankreatitída a endokrinná rakovina pankreasu tieto receptory nemajú. Neurotenzín (NT) je peptid zložený z 13 aminokyselín, lokalizovaný v centrálnej nervovej ústave, v periférnych tkanivách a hlavne v gastrointestinálnom trakte. Nestabilita prirodzeného NT viedla k snahe syntetizovať analógy, ktoré by boli menej citlivé na degradáciu a udržali si afinitu k receptorom. U ^{111}In značených NT analógov spojených s DOTA a DTPA se ukázalo, že vloženie syntetickej aminokyseliny do C-koncovkej časti neovplyvnilo väzbovú afinitu. Ich neýhodou je vysoká retencia v obličkách (de Visser a kol. 2008). ^{99m}Tc značený, stabilizovaný NT, sa vychytával vo väčšej miere v nádore a v obličkách bolo vychytávanie redukované (Maes a kol. 2006).

3.2.4. Peptidy cielené na CCK₂- receptor

Cholecystokinínové receptory sa vyskytujú v medulárnych karcinómoch štítnej žľazy, v malobunkovom karcinóme pľúc, ovariálnej rakovine, u astrocytómov a niektorých iných typoch nádorov. Na základe týchto informácií bolo zistené, že vhodnými kandidátmi pre diagnostiku a terapiu ľudských nádorov môžu byť analógy gastrínu značené rádioaktívnym jódom (Behr a kol. 1998). Najsľubnejším je však [¹¹¹In-DOTA⁰]CCK₈ s vysokou afinitou k týmto receptorom. Je schopný zobrazit nádory in vivo u potkanov a tiež u pacientov s metastázami.

Okrem CCK analógov, môžu byť vhodné analógy minigastrínu, napríklad ¹¹¹In-DOTA-minigastrin alebo [^{99m}Tc]Demogastrin 2 ([N₄⁰⁻¹, Gly⁰, (D)Glu¹]minigastrin) (de Visser a kol. 2008).

3.2.5. Peptidy cielené na GLP-1 receptor

Novým sľubným kandidátom v boji proti rakovine je GLP-1 receptor, člen rodiny glukagónových receptorov. Nadmerne sa vyskytuje v ľudských endokrinných nádoroch, u inzulinómov, gastrinómov a feochromocytómov.

Prirodzene sa vyskytujúci agonisti sú pomerne rýchlo degradovaný v krvi. To bol dôvod k hľadaniu stabilnejších foriem akou je napríklad selektívny analóg exendin. Neskôr boli jeho vlastnosti optimalizované. Viedlo to ku dvom novým ¹¹¹In-DTPA-konjugovaným exendin-4 analógom: ¹¹¹In-DTPA-Lys⁴⁰-exendin-4 a [Lys⁴⁰(Ahx-DTPA-¹¹¹In)NH₂]exendin-4.

Neexistuje však zatiaľ žiadna klinická štúdia. Pre terapeutické účely môže byť problémom zadržiavanie v obličkách. Avšak keď bude tento problém prekonaný, je vysoká pravdepodobnosť jeho využitia pre PRRT (de Visser a kol. 2008).

3.2.6. Peptidy cielečné na $\alpha_v \beta_3$ integrin

$\alpha_v \beta_3$ integrin, transmembránový proteín, sa nachádza na povrchu proliferujúcich endoteliálnych buniek, ale chýba na endoteliálnych bunkách v pokojovom štádiu. Tumor väčší než 1-2 mm potrebuje pre svoj rast nové cievy. Na ich povrchu sa nachádza $\alpha_v \beta_3$ integrin, a preto je potencionálnym cieľom pre receptormi sprostredkované zobrazovanie a terapiu.

Pre väzbu extracelulárnych matrixových proteínov na $\alpha_v \beta_3$ receptory je potrebná sekvencia aminokyselín, a to arginin-glycin-aspartátová kyselina (RGD). Bolo uskutočnených niekoľko štúdií na optimalizáciu zlúčenín cielečných na $\alpha_v \beta_3$. Zistilo sa, že cyklická zlúčenina RGD obsahujúca päť aminokyselín (RGD+hydrofóbna aminokyselina v pozícii 4+d'alšia aminokyselina na mieste 5) má najvyššiu väzbovú schopnosť. Medzi zlúčeniny obsahujúce túto sekvenciu aminokyselín patria s DTPA a DOTA konjugované analógy značené ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ktoré umožňujú SPECT a PET zobrazovanie a PRRT (de Visser a kol. 2008).

V snahe zvýšiť väzbovú afinitu k receptorom boli vyvinuté viacmocné RGD peptidy. Porovnávali sa vlastnosti DOTA- viazaných monomérnych, dimérnych a tetramérnych RGD peptidov značených ^{111}In . Bolo zistené, že tetramérne peptidy boli oveľa lepšie vychytávané tumorom in vivo než ostatné. Ako alternatívu syntetizovali multimérne peptidy - dendriméry, makromolekuly pozostávajúce z množstva rozvetvených monomérov. Výsledky ukázali, že tetramérne dendriméry mali vyššiu afinitu a vychytávanie nádorom než monomérne a dimérne analógy. Tieto výhodnejšie vlastnosti boli pripisované zvýšenej koncentrácii multimérov v blízkosti receptorov. Ich nedostatkom je vychytávanie v obličkách. V štúdií zameranej na zistenie potenciálu cyklických RGD analógov bolo zistené, že intraperitoneálne podanie tejto látky u intraperitoneálne rastúceho nádoru viedlo k značne vyššiemu vychytávaniu tumorom, než pri intravenóznom podaní. Avšak vychytávanie inými orgánmi nebolo ovplyvnené cestou podania (Dijkgraaf a kol. 2007).

3.3. Zvýšenie terapeutického efektu

Zvýšením hustoty receptorov na nádorových bunkách je možné rozšíriť terapeutické okno.

3.3.1. Upregulácia receptorov

Použitie vonkajšieho žiarenia v dávke 4 – 16 Gy a tiež nízkych terapeutických dávok viedlo k indukcii upregulácie sst₂ a gastrínových receptorov. U potkanov s nádorom pankreasu boli použité v nízkych neliečebných dávkach [¹⁷⁷Lu - DOTA⁰, Tyr³]oktreotát a [¹¹¹In-DOTA⁰]oktreotid. Výsledkom bolo zvýšenie hustoty sst₂ receptorov (de Visser a kol. 2008).

3.4. Kombinovaná liečba

3.4.1. Chemoterapeutiká a radiosenzitizéry

Výskumy poslednej doby boli zamerané na kombináciu PRRT s chemoterapiou alebo s radiosenzitizujúcimi látkami s cieľom zvýšiť terapeutický efekt u pacientov s neuroendokrinným nádorom. Bola porovnávaná mono- a kombinovaná liečba u myší s nádorom pankreasu. Bol testovaný [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]oktreotid samostatne a v kombinácii s cisplatinou alebo doxorubicinom. Výsledkom bolo zvýšenie účinnosti o 14% v kombinácii s doxorubicinom a o 23% s cisplatinou.

Druhou možnosťou je použitie radiosenzitivujúcich látok. Zistilo sa, že kombinácia 5-flourouracilu s vysokými dávkami ¹¹¹In značeným oktreotidom je bezpečná a jej účinnosť je porovnateľná s použitím samotného značeného peptidu.

Johnson a kol. 2006 testovali kombináciu značených bombesinových analógov s chemoterapeutickými látkami, napr. docetaxelom a estramustinom. Sú skúšané v terapii na androgénoch nezávislého nádoru prostaty. Pracujú synergicky ako

inhibitory mikrotubúl a zároveň majú zvýšený cytotoxický efekt. Výsledkom testov bolo dlhšie prežívanie zvierat a neboli objavené žiadne zmeny v počte krvných buniek.

Ovplyvnenie obličiek však ešte nebolo preskúmané. Nedostatkom je, že nie je známy vplyv chemoterapeutických látok na expresiu receptorov (de Visser a kol. 2008).

3.4.2. Kombinácia rôznych rádionuklidov

Preklinické štúdie ukázali, že protinádorový účinok rádioaktívne značených sst analógov je závislý na veľkosti tumoru. Rádionuklidy s nižšou energiou sú optimálne pre malé nádory, zatiaľ čo rádionuklidy s vyššou sú vhodné pre väčšie nádory. Z toho vyplýva, že u pacientov, ktorí majú na sst₂ receptor pozitívny nádor rôznej veľkosti je najlepším riešením kombinácia rádionuklidov s vyššou a nižšou energiou β častíc (de Visser a kol. 2008).

3.4.3. Hybridné molekuly

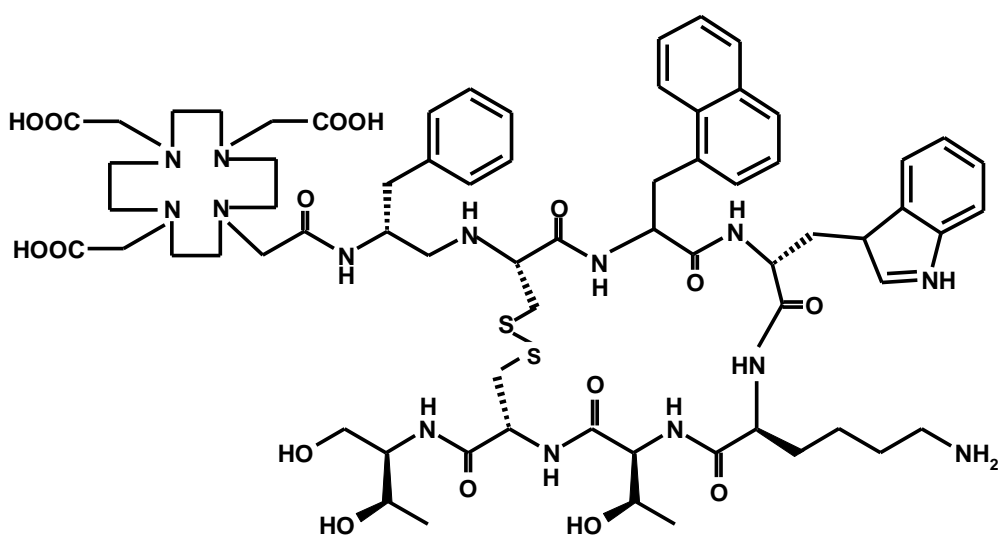
Receptorovo mierená dodávka cytotoxických látok bola navrhovaná k zníženiu toxicity chemoterapeutík u pacientov. V snahe dosiahnuť to, boli chemoterapeutické látky naviazané na peptidové analógy. Výsledkom bolo začlenenie molekuly do nádorovej bunky. Príkladom je ¹¹¹In značený [RGD-DTPA⁰]oktreotát. RGD sa viaže na integrínový receptor a je známy ako apoptózu navodzujúci peptid po priamej aktivácii kaspázou-3. Nevýhodou je však vysoké vychytávanie obličkami (de Visser a kol. 2008).

3.5. Charakteristika študovanej látky

^{111}In -DOTA-NOC

Výskumy s rádioaktívnym somatostatínom sú založené na oktreotide, ktorý je syntetickým a metabolickým stabilným analógom somatostatínu. Prvou komerčne dostupnou látkou bol ^{111}In -DTPA-oktreotid. Nevýhodou je priemerná väzbová afinita k sstr_2 receptorom a taktiež nie je veľmi vhodnou chelatačnou látkou pre β -žiarice ako ^{90}Y či ^{177}Lu . Pre tieto rádiokovy je lepšou chelatačnou látkou DOTA, ktorá tvorí termodynamicky a kineticky stabilné komplexy. Najčastejšie používané sú DOTATOC a DOTATATE (Reubi a kol. 2008).

V snahe rozšíriť profil biologickej aktivity rádioaktívne značených somatostatínových analógov boli syntetizované rádiopeptidy s afinitou ku všetkým podtypom somatostatínových receptorov. Prvou zlúčeninou bola látka so syntetickou aminokyselinou 1-naftyl-alanínom v pozícii 3 oktreotidu spojená s makrocyclickým chelátorom DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina). To viedlo k rádiopeptidu [^{111}In -DOTA]-1-Nal³-oktreotidu (^{111}In -DOTA-NOC) (obr. 4). Má zlepšenú afinitu k sstr_2 a vysokú afinitu sstr_3 a sstr_5 v porovnaní s ^{111}In -DOTA-TOC (Wild a kol. 2003).



Obr. 4. Štruktúra DOTA-NOC

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Materiál

4.1.1. Experimentálne zvieratá

Při pokusoch boli používané laboratórne potkany kmeňa Wistar s hmotnosťou 350-400 g z chovnej stanice BIOTEST s.r.o, Konárovice, Česká republika. Zvieratá boli chované za konvenčných podmienok pri 12 hodinovom svetelnom režime. 12 hodín pred pokusmi im bola odobratá potrava.

4.1.2. Chemikálie

- DOTA-NOC = [DOTA-1-Nal³]-oktreotid = DOTA-D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (piCHEM, Graz, Austria)
- Ampicilin (Biotika, Slovenská Lupča, SR)
- Collagenasa type IV (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Hovězí albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Probenecid (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Trypanová modrá (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

4.1.3. Použité přístroje

- Centrifúga 3K30H, Sigma, Laborentrifugen GmbH, Osterode, Německo
- Laboratorní třepačka KS – 15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15, Johanna Otto GmbH, Hechingen, Německo
- Gama-spektrometr 1480 WizardTM 3'', Wallac, Turku, Finsko
- Svetelný mikroskop Meopta, ČR

4.2. Postup

4.2.1. Príprava Krebs-Henseleitových roztokov

Roztoky boli pripravované spolupracovníkmi. Zásobné roztoky pre prípravu Krebs-Henseleitovho roztoku A a B sa pripravovali vo väčšom množstve. Z nich sa včas potreby pripravovali Krebs-Henseleit A a B roztoky, ktoré sa zmiešali za vzniku pracovného roztoku Krebs-Henseleit.

a) HANKS zásobný

Názov chemikálie	Navážka g/1 liter
NaCl	80
KCl	4
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,21
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2

Roztok bol uložený do chladničky a včas potreby sa z neho pripravovali pracovné roztoky.

b) HANKS pracovný

Názov	Množstvo
HANKS zásobní	40ml
Dest.H ₂ O	360 ml
NaHCO ₃ bezv.	0,880 g
HEPES	1,05 g

c) HANKS I (premytie obličiek)

Názov chemikálie	Množstvo
HANKS pracovný	280 ml
EGTA	53,2 mg

d) HANKS II (rozvoľnenie obláčkového tkaniva)

Názov zložky	Množstvo
HANKS pracovný	120 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (bezv. CaCl ₂)	35,3mg(26,7mg)
Kolagenáza	100 mg

e) Zásobné roztoky pre prípravu Krebs – Henseleitovho roztoku (každý sa pripraví zlášť)

Názov zložky	Množstvo g/l
NaCl	160,9
KCl	11
KH ₂ PO ₄	29,92
MgSO ₄ .7H ₂ O	27,4
CaCl ₂ .2H ₂ O (bezv. CaCl ₂)	15,73(11,88)
NaHCO ₃	9,71

f) KREBS-HENSELEIT B (zásobný)

Názov zložky	Množstvo v ml
NaHCO ₃	100

g) KREBS-HENSELEIT A (zásobný)

Názov zložky	Množstvo v ml
Dest. H ₂ O	78,5
NaCl	20
KCl	15
CaCl ₂	11
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
KH ₂ PO ₄	2

V čas potreby sa zmieša A a B

h) KREBS-HENSELEIT C

Názov	K.H. bunky a inkubácia s HEPES (ml)
Krebs-Henseleit zásobný	150
Dest. H ₂ O	150
HEPES	0,9 g

i) KREBS-HESELEIT D

Názov	Množstvo
K.H. bunky a inkub. s HEPESOM	150 ml
glukóza	150 mg

Krebs-Henseleitov roztok s glukózou, kolagenázou a albuminom bol pripravovaný z Krebs-Henseleitovho roztoku s glukózou (50 ml), kolagenázy (50 mg) a hovädzieho albuminu (1,25 g).

pH roztokov bolo upravované na hodnotu 7,4 pomocou roztokov HCl (3,6g/50ml) a NaOH (2g/50ml).

4.2.2. Príprava izolovaných obličkových buniek

Príprava aparatury (urobené spolupracovníkmi)

Systém obsahuje vodný kúpeľ, v ktorom sú ponorené dve 400 ml kadičky obsahujúce premývaciu a rozvoľňovaciu tekutinu. Peristaltickú pumpu na zaistenie recirkulácie perfúzneho média a druhú na zaistenie vŕhania perfúznej tekutiny do obličiek, perfúznu dvojplášťovú nádobu, vyhrievanú vodou s teplotou 37 °C, obsahujúcu cirkulujúcu tekutinu, ktorá je okysličovaná zmesou 95% O₂ a 5% CO₂, kovovú kanylu zavádzajúcu tekutinu do obličiek, lapač bublín k zabráneniu vniknutia vzduchovej bubliny do obličiek, vodný ultratermostat U1, ktorý udržiava teplotu vodného kúpeľa na 37 °C.

Postup preparácie (urobené spolupracovníkmi)

Do 1. kadičky bolo naliatých 280 ml roztoku Hanks I, naplnila sa ním aparatura a bolo zapnuté prekysličovanie pneumoxidom a sústava sa temperovala za neustálej recirkulácie asi 15 minút na teplotu 37 °C. Do 2. kadičky bolo naliatých 120 ml roztoku Hanks II a pridala sa kolagenáza. Potkan bol uvedený do celkového anestetického i.p. pentobarbitalom 50 mg/1 kg a fixovaný k operačnému stolu. Po laparotómii bola uvoľnená mezenterická artéria, brušná artéria pod odbočkou do ľavej obličky a vložená ligatúra. Do brušnej artérie bola vložená kovová kanyla s prietokom 5 ml/1 min roztokom Hanks I. Bola prestrihnutá dolná časť zadnej dutej žily a brušnej artérie. Prietok bol zvýšený na 9ml/1min. Obličky boli kanylou uvoľnené.

Príprava buniek (urobené spolupracovníkmi)

Obličky boli opláchnuté fyziologickým roztokom a prenesené do 1. kadičky ponorenej do vodného kúpeľa s recirkulujúcim roztokom Hanks I, kde došlo asi za 3 minúty k preplachu tkaniva. Obličky boli prenesené do 2. kadičky, ktorá obsahovala 120 ml roztoku Hanks II. Keď bolo pozorované dostatočné rozvoľnenie pojiva obličkových buniek, boli prenesené do misky s 50 ml roztoku Krebs-Henseleit D s 50 mg kolagenázy. V miske došlo k úplnému rozvoľneniu tkaniva pinzetou a miešadlom

elektromagnetickej miešačky. Získaná suspenzia obličkových buniek bola prefiltrovaná cez gázu a silónové sito s okami 85 μm . Bola rozdelená na dve rovnaké časti do skúmaviek s objemom 25 ml a centrifugovaná v chladenej centrifúge pri 4 °C a 80 g po dobu 5 minút. Supernatant bol odsatý a bunky resuspendované v 5 ml K.H. D. Centrifugácia a odsatie supernatantu sa opakovalo ešte dvakrát. Potom bola bunková suspenzia nariedená na 20 ml pomocou KH s glukózou.

Určenie počtu a životnosti buniek

Zmiešalo sa 100 μl získanej suspenzie obličkových buniek a 100 μl trypanovej modrej v eppendorfke. Počítanie bolo robené v Bürkerovej komorke. Životnosť bola určená na základe vzorca: $\bar{Z} = 100 \cdot \bar{z} / (\bar{z} + m)$, kde \bar{z} je počet živých buniek a m počet mrtvých buniek. Počet buniek bol vypočítaný podľa vzorca $PB = \bar{z} \cdot 10^4$. riedenie.pôčet ml suspenzie. Podľa počtu buniek bolo urobené nariedenie suspenzie tak, aby koncentrácia buniek bola $2 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Inkubácia

Do inkubačnej zmesi bol pipetovaný 1 ml suspenzie buniek o koncentrácii buniek $2 \cdot 10^6/\text{ml}$. Skúmavky boli potom temperované 5 min v inkubátore pri teplote 37 °C pri rýchlosti kmitania 280 kmitov/min. Potom sa k bunkám pridali študované látky, ktoré sa líšili podľa typu pokusu a na záver bolo pridaných 10 μl rádioaktívne značeného peptidu. Takto pripravená suspenzia bola inkubovaná potrebnú dobu pri teplote 37 °C. Po skončení inkubácie sa naraz pridali 4 ml ľadového KH pufu. Po centrifugácii 1 min pri 80g a teplote 4 °C bolo odobrané 0,5 ml supernatantu na meranie aktivity média. Zvyšok média bol opatrne odsatý a bunky boli dispergované v ďalších 4 ml ľadového pufu. Nasledovala opäť centrifugácia za rovnakých podmienok a toto premývanie pufrom sa opakovalo ešte dvakrát. Po poslednej centrifugácii a odsatí supernatantu sa suspenzia buniek kvantitatívne preniesla do meracej fľaštičky 3x opakovaným výplachom inkubačnej skúmavky.

Meranie rádioaktivity

Rádioaktivita v inkubačnom médiu a bunkovej frakcii bola meraná pomocou gama-spektrometru v intervale 1 minúty.

4.2.3. Usporiadanie akumuláčnych štúdií

V akumuláčnych štúdiách bola zisťovaná kumulácia ^{111}In -DOTA-NOC v obličkových bunkách potkana za rôznych podmienok. V týchto experimentoch bol ďalej študovaný vplyv potenciálnych inhibítorov uptake – ampicilínu, probenecidu a albumínu v rôznych koncentráciách a boli porovnávané získané hodnoty.

4.2.3.1. Stanovenie závislosti akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC na dobe inkubácie

K 1 ml suspenzie buniek bolo pridaných 10 μl značených peptidov. Takto pripravené suspenzie sa nechali inkubovať pri teplote 37 °C v časových intervaloch 2, 10, 30 minút alebo 2, 5, 10, 20, 30 minút za trepania rýchlosťou 280 kmitov/minútu. Po uplynutí príslušného časového intervalu bola inkubácia zastavená a bunková frakcia bola izolovaná podľa postupu v kapitole Inkubácia.

4.2.3.2. Štúdium vplyvu potencionálnych inhibítorov na akumuláciu ^{111}In -DOTA-NOC

Do inkubačnej zmesi bol vložený 1 ml suspenzie buniek a do časti inkubačných skúmaviek bola pridaná študovaná látka (vzorky bez danej látky slúžili jako kontrola). Potom bol do suspenzie pridaný peptid ^{111}In -DOTA-NOC v množstve 10 μl a vzorky boli inkubované 30 minút pri 37 °C za trepania s rýchlosťou 280 kmitov/minútu.

Použité látky

Prvým študovaným inhibítorom bol ampicilín v inkubačných koncentráciách 0,5 mM, 5 mM, 50mM. Druhou látkou bol albumín v inkubačných koncentráciách 0,1mM, 0,25 mM, 0,5mM. Skúšaný bol aj probenecid v koncentráciách 0,25mM, 1,25 mM.

4.2.3.3. Vyjadrovanie výsledkov

Rádioaktivita kumulovaná v bunkovej frakcii v jednotlivých experimentoch bola porovnávaná s rádioaktivitou štandardov, ktoré obsahovali rovnaké množstvo rádiopeptidu ako bola dávka vložená do inkubačnej zmesi (tzn. 10 μ l). Pri každom experimente sa pripravili 3 štandardy s obsahom 10 μ l preparátu $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ a 9 ml destilovanej vody. Tieto štandardy boli merané zároveň s experimentálnymi vzorkami. Zo zistených hodnôt aktivít štandardov bol urobený priemer a táto hodnota bola považovaná za vloženú aktivitu, s ktorou sa rátalo při výpočte. Zo zistených hodnôt rádioaktivity boli u každej experimentálnej vzorky vypočítané rádioaktivita na 10^6 buniek a počet percent rádioaktivity, ktorý bol kumulovaný v bunkách z vloženej dávky.

4.3. Výsledky

4.3.1. Životnosť obličkových buniek

Životnosť získaného preparátu izolovaných obličkových buniek potkana bola zistená pomocou hodnotenia exklúzie trypanovej modrej postupom uvedeným v článku 4.2.2. Experimenty zhŕňa tabuľka 1.

Tabuľka 1.

označenie experimentu	počet živých buniek	počet mŕtych buniek	životnosť (%)
4.3.2.			
experiment 1	699	56	92,58
experiment 2	524	36	93,57
experiment 3	359	26	93,25
4.3.3.	252	29	89,68
4.3.4.	509	55	90,25
4.3.5.	509	55	90,25

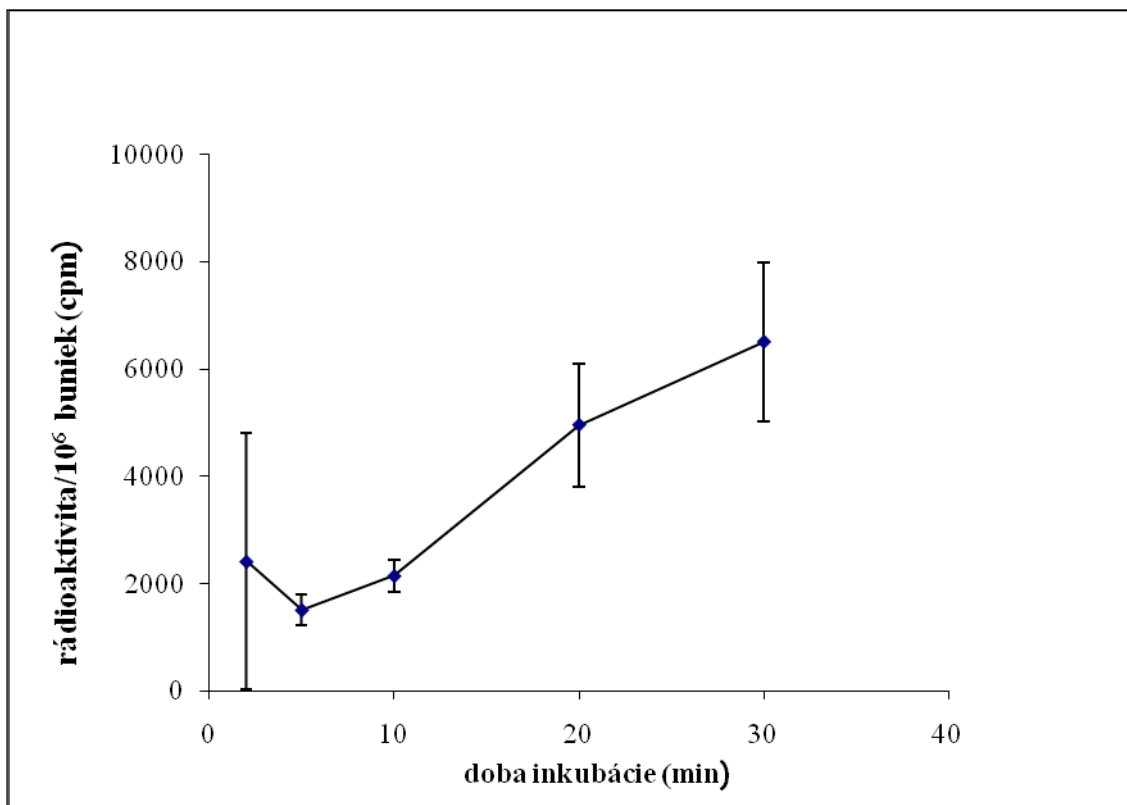
4.3.2. Uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC v obličkových bunkách potkana

Tabuľky 2-4 a grafy 1-3 zobrazujú výsledky troch štúdií akumulácie ¹¹¹In-DOTA-NOC v izolovaných obličkových bunkách v závislosti na čase inkubácie. Výsledky sú prepočítané na percentá aktivity v 10⁶ buniek voči celkovej vlozenej aktivite.

Tabuľka 2. Uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v závislosti na dobe inkubácie (experiment 1)

Doba inkubácie (min)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/10 ⁶ buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/10 ⁶ buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/10 ⁶ buniek)
2	1085,9	590	2407 ± 2393	0,04	0,15 ± 0,15
	10645,6	5789		0,36	
	1549,3	842		0,05	
5	3466,1	1885	1506 ± 291	0,12	0,09 ± 0,02
	2674,1	1454		0,09	
	2167,4	1179		0,07	
10	2985,9	1624	2141 ± 299	0,1	0,13 ± 0,02
	4292,1	2334		0,14	
	4236,4	2304		0,14	
	4238,1	2305		0,14	
20	7263,8	3950	4955 ± 1147	0,24	0,31 ± 0,07
	8007,4	4354		0,27	
	12065,2	6561		0,41	
30	9653,1	5249	6499 ± 1483	0,32	0,40 ± 0,09
	15783,9	8583		0,53	
	10419,7	5666		0,35	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 1616161 cpm/10 µl

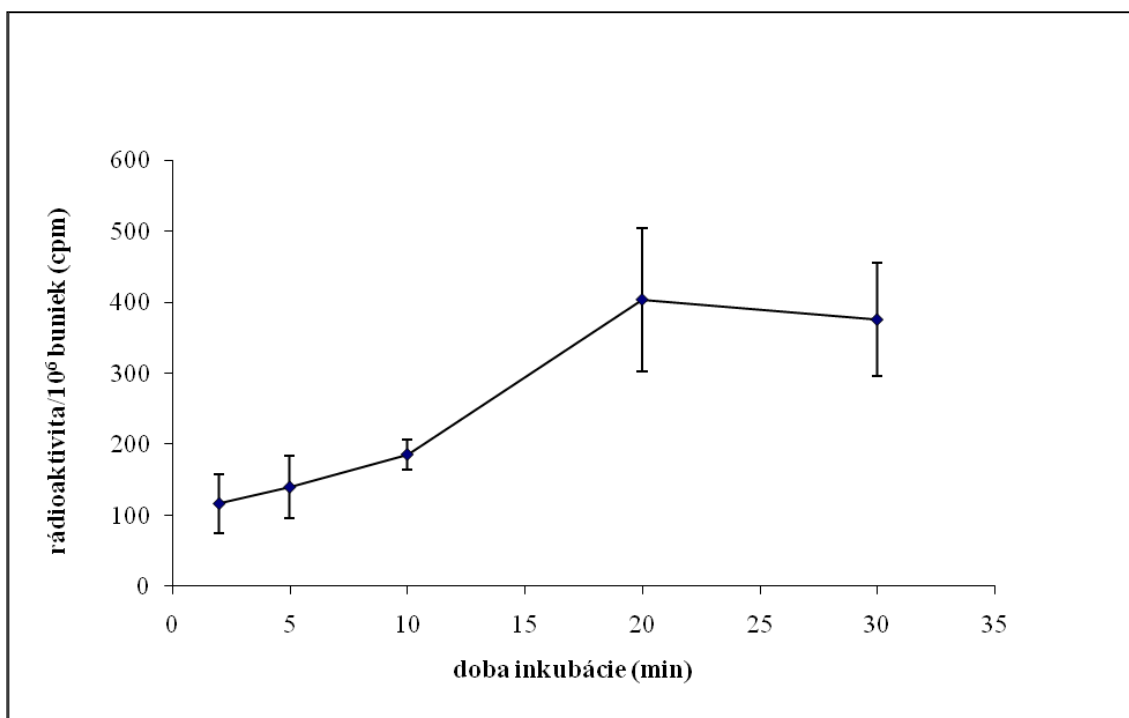


Graf 1. Závislosť akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC v obličkových bunkách potkana na dobe inkubácie (experiment 1) ($\bar{x} \pm \text{s.d.}$)

Tabuľka 3. Uptake ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v závislosti na dobe inkubácie (experiment 2)

Doba inkubácie (min)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/ 10^6 buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/ 10^6 buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buniek)
2	107,1	86	116 ± 41	0,03	0,05 ± 0,02
	122,3	98		0,04	
	234,1	188		0,07	
	116,6	93		0,04	
5	175,9	141	139 ± 44	0,05	0,05 ± 0,02
	262,2	210		0,08	
	138,4	111		0,04	
	119,7	96		0,04	
10	203,3	163	186 ± 21	0,06	0,07 ± 0,01
	266,7	214		0,08	
	224,8	180		0,07	
20	326,6	262	404 ± 101	0,10	0,15 ± 0,04
	600,9	481		0,18	
	584,9	469		0,18	
30	374,3	300	376 ± 79	0,11	0,14 ± 0,03
	405,6	325		0,12	
	466,2	374		0,14	
	629,2	504		0,19	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 262226 cpm/10 μ l

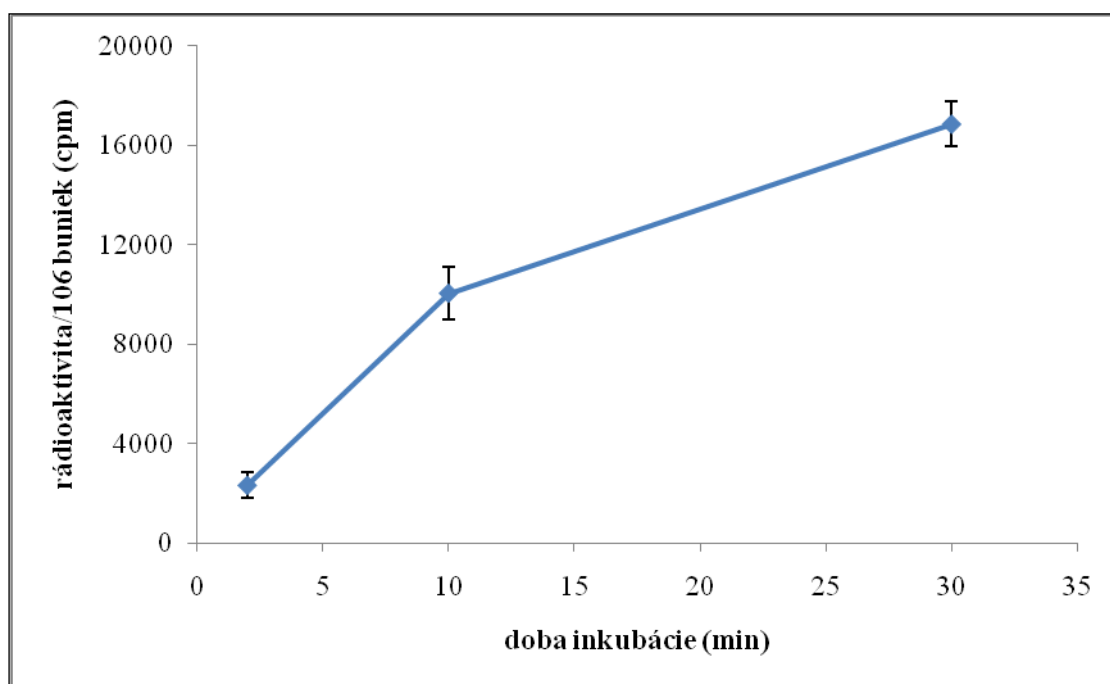


Graf 2. Závislosť akumulácie ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana na dobe inkubácie (experiment 2) ($\bar{x} \pm s.d.$)

Tabuľka 4. Uptake ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v závislosti na dobe inkubácie (experiment 3)

Doba inkubácie (min)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/ 10^6 buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/ 10^6 buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buniek)
2	4154,9	2258	2337 ± 509	0,16	0,16 ± 0,04
	3233,3	1757		0,12	
	5512,3	2996		0,21	
10	17163,2	9328	10051 ± 1056	0,64	0,69 ± 0,07
	17077,9	9281		0,64	
	21241,6	11544		0,79	
30	28253,6	15355	16839 ± 897	1,05	1,16 ± 0,06
	31813,6	17290		1,19	
	32621,7	17729		1,22	
	31244	16980		1,17	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 1456583,5 cpm/10 μl



Graf 3. Závislosť aktivity ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana na dobe inkubácie (experiment 3) ($\bar{x} \pm \text{s.d.}$)

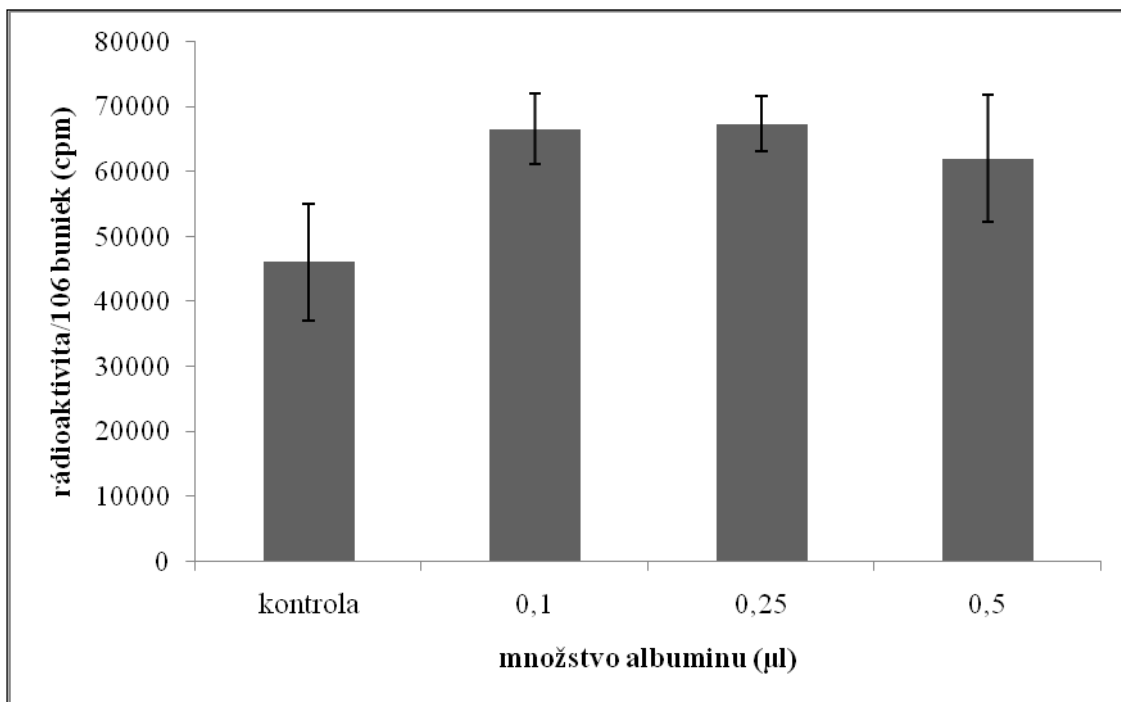
4.3.3. Akumulácia ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti albuminu

Tabuľka 5 uvádza výsledky získané pri štúdiu akumulácie ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek počas 30 minút inkubácie v prítomnosti troch rôznych koncentrácií albuminu. Výsledky sú prepočítané na percentá aktivity v 10⁶ buniek voči celkovej aktivite. Konečné výsledky sú priemerné hodnoty aktivity bez albuminu a pri jeho prítomnosti v rôznej koncentrácii.

Tabuľka 5. Uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti vybraných koncentrácií albumin

Koncentrácia albuminu (mmol/l)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/10 ⁶ buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/10 ⁶ buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/10 ⁶ buniek)
0	45783,7	35436	46085 ± 8962	1,56	2,03 ± 0,39
	74111,4	57362		2,52	
	58731,9	45458		2,00	
0,1	76918,1	59534	66613 ± 5445	2,62	2,93 ± 0,24
	94029,8	72778		3,20	
	87242,2	67525		2,97	
0,25	94562,4	73191	67341 ± 4195	3,22	2,96 ± 0,18
	82125,1	63564		2,8	
	84325,6	65267		2,87	
0,5	70731,4	54746	62057 ± 9799	2,41	2,73 ± 0,43
	71728,7	55518		2,44	
	98071,6	75907		3,34	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 2273038 cpm/10 µl



Graf 4. Akumulácia ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti vybraných koncentrácií albuminu (inkubácia 30 minút) ($\bar{x} \pm s.d.$).

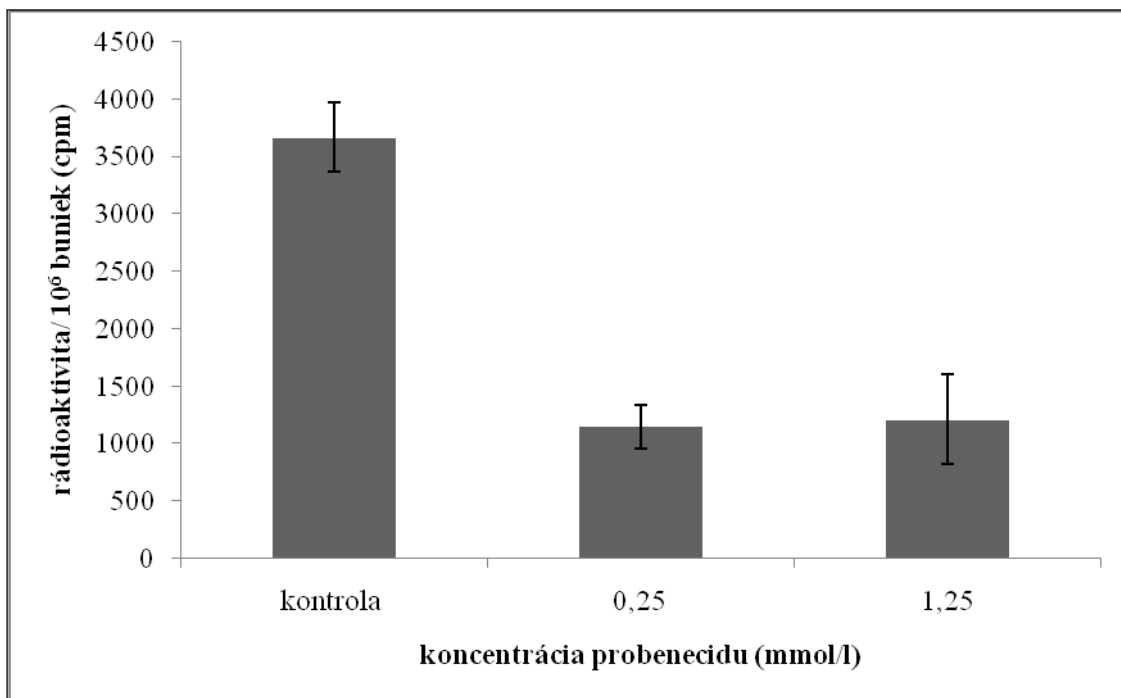
4.3.4. Akumulácia ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti probenecidu

Tabuľka 6 uvádza výsledky získané pri štúdiu akumulácie ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek počas 30 minút inkubácie v prítomnosti vybraných koncentrácií probenecidu. Výsledky sú prepočítané na percentá aktivity v 10⁶ buniek voči celkovej aktivite. Konečné výsledky sú priemerné hodnoty aktivity bez probenecidu a jeho prítomnosti v rôznej koncentrácii.

Tabuľka 6. Uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti vybraných koncentrácií probenecidu

Koncentrácia probenecidu (mmol/l)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/10 ⁶ buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/10 ⁶ buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/10 ⁶ buniek)
0	7295,6	3648	3665 ± 301	1,21	1,22 ± 0,1
	7868,1	3934		1,31	
	7795,4	3898		1,29	
	6361,6	3181		1,06	
0,25	2376,1	1188	1146 ± 188	0,39	0,38 ± 0,06
	2388,4	1194		0,40	
	1685,3	843		0,28	
	2718,3	1359		0,45	
1,25	2652,2	1326	1211 ± 392	0,44	0,40 ± 0,13
	1348,5	674		0,22	
	3510,6	1755		0,58	
	2172,8	1086		0,36	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 301261 cpm/10 µl



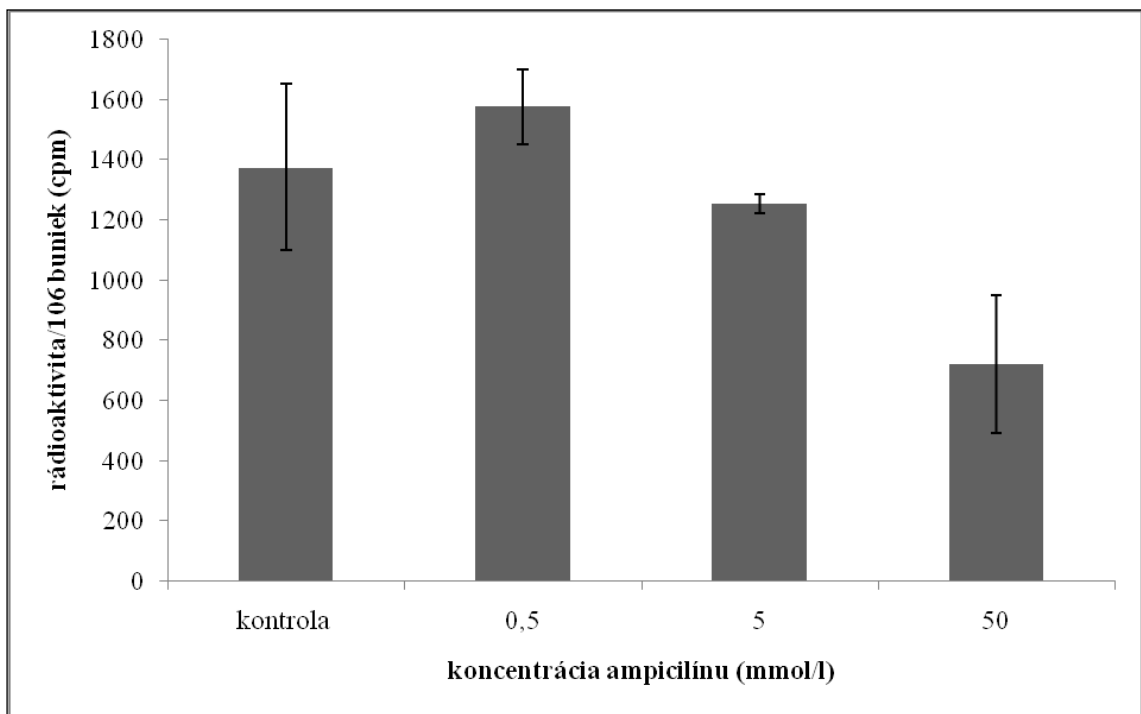
Graf 5. Akumulácia ¹¹¹In-DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana na prítomnosti probenecidu (inkubácia 30 minút) ($\bar{x} \pm s.d.$).

Tabuľka 7 uvádza výsledky získané pri štúdiu akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek počas 30 minút inkubácie v prítomnosti vybraných koncentrácií ampicilínu. Výsledky sú prepočítané na percentá aktivity v 10^6 buniek voči celkovej aktivite. Konečné výsledky sú priemerné hodnoty rádioaktivity bez ampicilínu a jeho prítomnosti v rôznej koncentrácii a množstve.

Tabuľka 7. Uptake ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti vybraných koncentrácií ampicilínu

Koncentrácia ampicilínu (mmol/l)	Rádioaktivita v bunkách (cpm)	Rádioaktivita/ 10^6 buniek (cpm)	Priemerné hodnoty rádioaktivity (cpm)	Uptake (% D/ 10^6 buniek)	Priemerné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buniek)
0	2206,7	1103	1375 ± 276	0,37	0,46 ± 0,09
	2533,3	1267		0,42	
	3507,7	1754		0,58	
0,5	2813,6	1407	1577 ± 124	0,47	0,52 ± 0,04
	3403,1	1702		0,56	
	3243,7	1622		0,54	
5	2430,6	1215	1255 ± 31	0,40	0,42 ± 0,01
	2514,4	1257		0,42	
	2582,5	1291		0,43	
50	1250,1	625	722 ± 230	0,21	0,24 ± 0,07
	2077,1	1039		0,34	
	1002,8	501		0,17	

priemerná rádioaktivita štandardu: D= 301261 cpm/10 μl



Graf 6. Akumulácia ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách obličiek potkana v prítomnosti vybraných koncentrácií ampicilínu (inkubácia 30 minút) ($\bar{x} \pm \text{s.d.}$).

5. DISKUSIA

Experimenty urobené v rámci tejto diplomovej práce boli uskutočnené na obličkových bunkách, ktoré boli získané izoláciou z obličiek potkana kolagenázovou metódou. Tá spočíva v rozvoľnení tkaniva vo vypreparovaných obličkách roztokom obsahujúcim kolagenázu, ktorá štiepi medzibunkové kolagénové spoje. Tieto čerstvo izolované obličkové bunky boli po ďalších úpravách použité k akumuláčnym štúdiám so študovaným rádioaktívne značeným analógom somatostatínu.

Prvým krokom bolo overenie životnosti získaných buniek ich spočítaním v Bürkerovej komôrke. Suspenzia buniek bola ofarbená trypanovou modrou a došlo k prieniku farbiva do buniek. Živé bunky s neporušenou membránou majú zachovaný aktívny eflux farbiva z bunky. Na druhej strane mŕtve bunky majú tento mechanizmus poškodený, a preto zostávajú ofarbené. Životnosť obličkových buniek sa pohybovala v rozmedzí od 89% do 94%. Takáto životnosť je dobre akceptovateľná pre uskutočnenie daného typu experimentálnych štúdií.

Urobené experimenty boli zamerané na štúdium akumulácie rádioaktívne značeného somatostatínového analógu - $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ - v obličkových bunkách a na ovplyvnenie jeho akumulácie potencionálnymi inhibítormi bunkového uptake. Uptake rádioaktivity bunkovej frakcie v každej vzorke bol prepočítaný na 10^6 buniek a táto hodnota bola vzťahnutá k aktivite štandardov, tj. dávke rádiopeptidu vloženého do inkubačnej zmesi.

V prvej sérii pokusov boli vzorky buniek so študovanou látkou inkubované za štandardných podmienok rôznu dobu - od 2 do 30 minút. Vo všetkých troch vykonaných experimentoch dochádzalo k postupnému zvyšovaniu akumulovanej rádioaktivity v závislosti na dobe inkubácie. V prvom experimente sme pozorovali veľký rozptyl hodnôt pri inkubácii po dobu 2 minút. Pri tak krátkom intervale i malá odchýlka v zrealizovaní experimentu môže vyústiť v relatívne veľké rozdiely hodnôt. Ovšem v ďalších experimentoch (experimenty 2 a 3) nebol takýto veľký rozptyl zaznamenaný. Šlo teda skôr o náhodný jav spojený možno s nedostatočnou rutinou na začiatku práce. Pri druhom experimente došlo k najväčšiemu nárastu akumulácie v 20. minúte. V 30. minúte však došlo k určitému poklesu akumulovanej aktivity. To mohlo byť spôsobené zníženou aktivitou obličkových buniek na konci inkubačnej periódy.

Zistená miera akumulácie v bunkách sa medzi vyššie uvedenými experimentami pomerne výrazne líšila a pohybovala sa po 30 minútach inkubácie v rozmedzí

0,3-1,2%/10⁶ buniek. Z tohto dôvodu by stanovenie priemernej hodnoty pre uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC z týchto troch experimentov nebolo úplne validné a skôr je možné uvádzať rozsah tejto kumulácie. Pretože sa jedná o natívne bunky, vysvetlenie môže spočívať v relatívne vysokej interindividuálnej variabilite medzi zvieratami a preparátmi buniek získaných z ich obličiek. Ďalším faktorom môže byť i nedostatočná miera rutiny pri prvých experimentoch. Najviac sa publikovaným údajom blížia hodnoty uptake nájdené v experimente 3, pri ktorom sa priemerná hodnota akumulovanej rádioaktivity blížila po 30 minútach inkubácie k 1,2% AD/10⁶. Táto hodnota uptake sa dobre zhoduje s údajom 1,4% AD/10⁶ buniek uvádzanej v literatúre (Trejtnar a kol. 2008).

V ďalších pokusoch sme študovali možnosti zníženia nežiadúcej akumulácie študovaného rádiopeptidu v obličkových bunkách. Použili sme tri potencionálne inhibítory uptake študovaného rádiopeptidu. Zároveň sme sa pomocou týchto troch substrátov rôznych transportných systémov pokúšali zistiť, ktorý z transportných mechanizmov by mohol byť zodpovedný za transport rádiopeptidov do obličkových buniek.

Prvou testovanou látkou bol albumín, ktorý je substrátom megalin/cubilínového transportného systému. Jeho účinok na uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC sme skúmali pri troch rôznych koncentráciách. Namiesto očakávanej inhibície uptake došlo pri všetkých koncentráciách albumínu k paradoxnému nárastu akumulácie rádiopeptidu. Pretože prídavok albumínu do živného média je doporučovaný niektorými autormi ako prostriedok pre zvýšenie stability buniek v preparátoch (Jones 1978), bolo by možné zvýšený uptake rádiopeptidu v prítomnosti albumínu pričítať lepšiemu stavu obličkových buniek. Účasť megalinového receptora na akumuláciu ¹¹¹In-DOTA-NOC sme teda nepotvrdili.

Druhou skúšanou látkou bol probenecid, ktorý inhibuje transport organických aniónov blokádu príslušných transportérov. V pokuse došlo prekvapivo k značnému zníženiu akumulácie rádiopeptidu u vzorky s koncentráciou 0,25 mmol/l až na 31% v porovnaní s aktivitou kontrolnej vzorky. Pri päťnásobnej koncentrácii probenecidu bol výsledok podobný. Tieto výsledky by mohli ukazovať na účasť transportérov pre organické anióny na uptake ¹¹¹In-DOTA-NOC. Avšak v pilotných štúdiách vykonaných na pracovisku sa ukázalo, že použité koncentrácie probenecidu môžu byť už potenciálne cytotoxické. Aj napriek tomu, že šlo o štúdiu s iným typom obličkových buniek (línia

OK buniek z vačice), je možné predpokladať i podobný účinok u používaných buniek z obličiek potkana. Znížený uptake by tak mohol byť i následok nižšieho počtu funkčných buniek v prítomnosti probenecidu. Táto skutočnosť musí byť ovšem potvrdená ďalšími následnými experimentami.

Ampicilín parí medzi aminopenicilíny, ktoré sú efektívnymi inhibítormi transportérov PEPT 1 a PEPT 2 na apikálnej membráne tubulov obličiek. Tieto transportéry zaisťujú reabsorpciu malých peptidov a im podobných látok z ultrafiltrátu v proximálnych tubuloch. V našom pokuse došlo k výraznému poklesu akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC v bunkách pri koncentrácii ampicilínu 50 mmol/l až na 52% z aktivity akumulovanej v porovnávacjej vzorke. Pri koncentrácii 0,5 mmol/l a 5 mmol/l nebol pokles uptake v bunkách zreteľný. Inhibičné koncentrácie ampicilínu, ktorá by mala inhibovať ako PEPT 1, tak i PEPT 2, je uvádzaná okolo 13 mM (Inui a kol. 2000). To vcelku odpovedá našemu nálezu, lebo inhibícia uptake peptidu bola pozorovaná pri koncentrácii 50 mM, avšak nie pri koncentrácii 5 mM. Tento nález by mohol ukazovať na účasť transportérov pre peptidy na akumuláciu študovaného rádiopeptidu. To je ovšem nutné potvrdiť u ďalších študovaných rádiopeptidov. Taktiež je potrebné vylúčiť cytotoxický účinok použitých koncentrácií ampicilínu.

Miera akumulácie ^{111}In -DOTA-NOC v izolovaných obličkových bunkách potkana je v porovnaní s ďalším podobným peptidom - ^{111}In -DOTA-TATE - vyšší (Kroupová 2009). DOTA-NOC obsahuje vo svojej molekule lipofilný naftylový zvyšok, ktorý môže významne zvyšovať lipofilitu tejto zlúčeniny v porovnaní s DOTA-TATE, ktorý takúto lipofilnú štruktúru neobsahuje. Okrem možnej vyššej afinity k systémom pre aktívny transport, môže byť vyšší uptake ^{111}In -DOTA-NOC spôsobený tiež jeho vyšším prienikom cez lipofilnú membránu buniek pasívnym transportom.

6. ZÁVER

1. Test životnosti pomocou trypanovej modrej ukázal vysokú životnosť obličkových potkaních buniek a ich využiteľnosť pre daný typ experimentálnych štúdií.
2. Bola vykonaná akumulčná štúdia s vývojovým receptorovo špecifickým peptidom - ^{111}In -DOTA-NOC. V týchto experimentoch bol pozorovaný nárast uptake peptidu s dobou inkubácie. Bola pozorovaná variabilita výsledkov akumulčných štúdií medzi jednotlivými preparátmi obličkových buniek. Obecne však miera akumulácie odpovedala publikovaným údajom.
3. Experimenty s potencionálnymi inhibítormi obličkového uptake rádiopeptidov ukázali možnú účasť transportérov pre peptidy na kumuláciu ^{111}In -DOTA-NOC v obličkových bunkách. Uskutočnené pokusy však nepotvrdili účasť megalínového endocytárneho systému na uptake študovaného rádiopeptidu.
4. Akumulácia ^{111}In -DOTA-NOC in vitro bola vo vykonaných experimentoch vyššia než akumulácia uvádzaná pre príbuzný peptid ^{111}In -DOTA-TATE.

7. LITERATÚRA

Behr TM, Jenner N, Radetzky S, et al.: Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: Preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur. J. Nucl. Med.*; 25: 424-430 (1998)

de Visser M, Verwijnen SM, de Jong M: Improvement strategies for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.*; 23: 137-157 (2008)

Dijkgraaf I, Kruijtzter JA, Frielink C, et al.: Alpha v beta-3 integrin-targeting of intraperitoneally growing tumors with a radiolabeled RGD peptide. *Int. J. Cancer*; 120: 605-610 (2007)

Ferro-Flores G, Arteaga de Murphy C, Rodriguez-Cortes J, et al.: Preparation and evaluation of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-[Lys 3]-bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl. Med. Commun.*; 27: 371-376 (2006)

Ginj M, Schmitt JS, Chen J et al.: Design, synthesis, and biological evaluation of somatostatin-based radiopeptides. *Chem. Biol.*; 13: 1081-1090 (2006)

Christensen EI, Birn H: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*; 280: F562-573 (2001)

Christensen EI, Gliemann J, Moestrup SK.: Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J. Histochem. Cytochem.*; 40: 1481-1490 (1992)

Inui K, Terada T, Masuda S, Saito H.: Physiological and pharmacological implications of peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Nephrol. Dial. Transplant.*; 15 Suppl 6:11-3 (2000)

Jones DP, Sundby GB, Ormstad K, Orrenius S.: Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.*; 28: 929-35 (1979)

Johnson CV, Shelton T, Smith CJ, Ma L, Perry MC, Volkert WA, Hoffman TJ: Evaluation of combined $(^{177}\text{Lu})\text{-DOTA-8-AOC-BBN (7-14)NH}_2$ GRP receptor-targeted radiotherapy and chemotherapy in PC-3 human prostate tumor cell xenografted SCID mice. *Cancer Biother. Radiopharm.*;21: 155-66 (2006)

Klaasen CD, Lu H: Xenobiotic transporters: Ascribing function from gene knockout and station studies. *Toxicol. Sci.*; 101: 186-96 (2008)

Kroupová T: Studium ledvinné bioeliminace xenobiotik na buněčné úrovni I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze (2009)

Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G: Renal tubular drug transporters. *Nephron. Physiol.*; 103: 97-106 (2006)

Maes V, Garcia-Garayoa E, Blauenstein P, et al.: Novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled neurotensin analogues with optimized biodistribution properties. *J. Med. Chem.*; 49: 1833-1836 (2006)

Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB, Christensen EI, Nexø E.: Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B₁₂ complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B₁₂ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93:8612-8617 (1996)

Patel YC: Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 20, 157–198 (1999)

Reubi JC, Maecke HR: Peptide-based probes for cancer imaging. *J. Nucl. Med.*; 49: 1735-1738 (2008)

Trejtner F, Novy Z, Petrik M, Laznickova A, Melicharova L, Vankova M, Laznicek M.: In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111. *Ann. Nucl. Med.*; 22: 859-67 (2008)

Wild D, Schmitt JS, Ginj M, Mäcke HR, Bernard BF, Krenning E, de Jong M, Wenger S, Reubi JC: DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2,3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur. J. Nucl. Med.*; 30: 1338-1347 (2003)