

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

**Studium ledvinné bioeliminace xenobiotik na buněčné úrovni
I.**

(DIPLOMOVÁ PRÁCE)

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2009

Tereza Kroupová

Děkuji Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc., vedoucímu diplomové práce, za poskytnuté rady a pomoc při řešení a zpracování práce a spolu s paní Ivou Filipovou za přípravu ledvinných buněk. Dále děkuji Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za označení experimentálních peptidů radionuklidy.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....

Datum

.....

Podpis

Obsah

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
Seznam použitých zkratk	8
1. ÚVOD.....	9
2. CÍL PRÁCE	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. Transport léčiv v ledvinách.....	13
3.1.1. Transportní mechanismy pro nízkomolekulární léčiva	13
3.1.2. Transportní mechanismy pro léčiva typu proteinů	17
3.2. Peptidová radiofarmaka v onkologii.....	20
3.2.1. Somatostatinové peptidy.....	21
3.2.2. Cytotoxické somatostatinové analogy	26
3.2.3. Receptory zprostředkovaná peptidová radioterapie.....	26
3.2.4. Bombesinové peptidové analogy	27
3.2.5. Cytotoxické bombesinové analogy	28
3.3. Studované látky.....	30
3.3.1. ¹¹¹ In-DOTA-TATE ([¹¹¹ In-DOTA]-Tyr ³ -oktreotát)	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1. Materiál	32
4.1.1. Experimentální zvířata	32
4.1.2. Chemikálie	32
4.1.3. Použité přístroje	32
4.2. Metody	33
4.2.1. Příprava roztoků.....	33
4.2.2. Příprava izolovaných ledvinných buněk.....	35
4.2.3. Uspořádání akumulačních studií.....	37
4.2.3.1. Stanovení závislosti akumulace ¹¹¹ In-DOTA-TATE na době inkubace.....	37
4.2.3.2. Studium vlivu potencionálních inhibitorů na akumulaci ¹¹¹ In-DOTA-TATE	38
4.2.3.3. Vyjádření výsledků	38
4.3. Výsledky	39

4.3.1. Životnost ledvinných buněk.....	39
4.3.2. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace	40
4.3.3. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace	42
4.3.4. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace	44
4.3.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v přítomnosti probenecidu	46
4.3.6. Akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v přítomnosti albuminu	48
5. DISKUZE	50
6. ZÁVĚR	54
7. LITERATURA	56

ABSTRAKT

Studium ledvinné bioeliminace xenobiotik na buněčné úrovni I.

Syntetické analogy somatostatinu značené vhodnými kovovými radionuklidy jsou v nukleární medicíně používány pro scintigrafické zobrazení a nověji i k cílené radioterapii některých typů maligních nádorů, u nichž se vyskytuje zvýšená exprese somatostatinových receptorů. Jejich terapeutické použití je však omezeno potencionálními radiotoxickými účinky na ledviny v důsledku akumulace těchto radiopeptidů v buňkách ledvinných tubulů. Tato kumulace je způsobena reabsorpcí radiopeptidů v ledvinných tubulech zatím ne zcela objasněnými mechanismy. Cílem této práce bylo studovat ledvinnou akumulaci vývojového receptorově specifického derivátu somatostatinu DOTA-TATE (DOTA-Tyr³-oktreotát) značeného indiem-111 (¹¹¹In-DOTA-TATE). Experimenty byly zaměřeny především na studium mechanismu ledvinného uptake a na možnosti ovlivnění nežádoucí kumulace studovaného radiopeptidu v ledvinných buňkách potencionálními inhibitory vybraných ledvinných transportních systémů. Jako experimentální model jsme použili čerstvě izolované ledvinné buňky potkana, které byly získávány z ledvin zvířat kolagenázovou metodou. Ověření životnosti buněk bylo prováděno s pomocí trypanové modři. Preparáty izolovaných buněk vykazovaly zpravidla životnost kolem 90% a byly tedy vhodné pro daný typ experimentů. Albumin, který je substrátem a inhibítor megalinového endocytárního systému, namísto očekávané inhibice uptake radiopeptidu paradoxně mírně zvyšoval jeho akumulaci v ledvinných buňkách. Probenecid, který inhibuje transportéry pro organické anionty, překvapivě akumulaci radiopeptidu výrazně snižoval. Získané výsledky by mohly ukazovat, že pro ledvinný uptake ¹¹¹In-DOTA-TATE mají význam jak transportéry pro organické anionty, tak transportéry pro peptidy. Avšak je třeba vyloučit, že použité koncentrace těchto inhibitorů nejsou cytotoxické, což by mohlo též snižovat míru kumulace radioaktivity v důsledku poklesu počtu aktivních buněk ve vzorcích. Předpokládanou účast megalinového receptoru na akumulaci radiopeptidů jsme v provedených pokusech nepotvrdili.

ABSTRACT

Study of renal bioelimination of xenobiotics at cellular level I.

Synthetic somatostatin analogues labeled with convenient metal radionuclides are used in nuclear medicine for scintigraphy and, recently, they are also used for targeting radiotherapy in some types of malignant tumors with high expression of somatostatin receptors. Their therapeutical use is limited due to a potential radiotoxic effect on the kidney. This effect is a consequence of accumulation of the radiopeptides in the renal tubular cells. The reason of the cumulation is an intensive reabsorption of radiopeptides in the renal tubules. The mechanism of accumulation has not been explained fully so far. The aim of this work was to study the accumulation of an experimental receptor specific derivate of somatostatin, DOTA-TATE (DOTA-Tyr³-octreotate) labeled with indium-111 (¹¹¹In-DOTA-TATE). The experiments were mainly aimed at a study of the mechanism of renal uptake and at possibilities how to modify the unfavourable accumulation of the studied radiopeptide in the renal cells. Freshly isolated renal rat cells obtained by the collagenase method were used as an experimental model. Verification of the vitality of renal cells was made by trypan blue exclusion test. The preparates of the cells showed viability approximately 90% and therefore they could have been used for the given type of experiments. Paradoxically, albumin, a substrate and an inhibitor of megalin endocytic system, increased moderately the accumulation of the radiopeptide instead of the expected inhibition of the uptake. Surprisingly, probenecid, an inhibitor of organic anion transporters, decreased the accumulation of the radiopeptide markedly. The found results could mean that the renal uptake of ¹¹¹In-DOTA-TATE can be mediated by the transporters for organic anions. However, it is necessary to exclude a possibility that the concentrations used for the inhibitors are potentially cytotoxic. A lower number of viable cells in the samples due to any toxic action of the tested inhibitor can also result in a lower rate of radiopeptide accumulation. The expected participation of megalin endocytic system on the renal accumulation of the studied radiopeptide was not proved in our experiments.

Seznam použitých zkratek

apo E	apolipoprotein E
BBM	apikální membrána (brush-border membrane)
BLM	bazolaterální membrána (basolateral membrane)
BN	bombesin
CUB	cubilinové (domény)
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminopentaoctová kyselina
GRP	gastrin releasing peptide
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high-density lipoprotein)
LAN	lanreotid (D-2-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
LRP	LDL příbuzné receptory
MRP	multidrug-resistant associated proteins
NETs	neuroendocrine tumors
NOC	[1-Nal ³]-oktreotid = D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr
OA, OC	organický aniont, organický kation
OATs	transportéry organických aniontů (organic anion transporters)
OCTs	transportéry anorganických kationtů (organic anion transporters)
PAH	p-aminohippurát
PEPT	peptidové transportéry (peptide transporters)
PTH	parathyroidální hormon (parathyroid hormon)
RAP	receptor-associated protein
RER	drsne endoplazmatické retikulum (rough endoplasmatic reticulum)
SST	somatostatin
sstr	somatostatinový receptor (somatostatin receptor)
TATE	D-Phe ¹ -Tyr ³ -Thr ⁸ -oktreotid
TOC	Tyr ³ -oktreotid
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)

1. ÚVOD

Hlavním tématem této práce je studium receptorově specifických peptidů ze skupiny somatostatinových analogů zaměřené na jejich chování v ledvinách. Používají se pro zobrazování a terapii zejména neuroendokrinních nádorů, protože se u nich vyskytují receptory specifické pro tyto peptidy. Radioaktivně značené analogy somatostatinu jsou vylučované ledvinami a v závislosti na typu analogu jsou reabsorbované v proximálních tubulech. To je příčinou jejich akumulace v ledvinné tkáni, která je spojena s možnou nefrotoxitou. Tento nežádoucí účinek omezuje jejich použití v terapii a diagnostice.

Důležité je poznání transportních mechanismů v ledvinách, které jsou zodpovědné za reabsorpci léčiv a tím i za retenci a akumulaci radioaktivně značených analogů somatostatinu. Na základě těchto poznatků je možné objevit látky, které by tuto retenci mohly ovlivnit a snížit tak poškození ledvin.

Tato práce je zaměřena na porovnání úlohy dvou transportních systémů, které by se mohly podílet na transportu studovaného radioaktivně značeného somatostatinového analogu ^{111}In -DOTA-TATE. Zkoumána byla možná účast systému pro aktivní endocytózu a systému pro transport organických kyselin.

Experimentální práce se zabývala možným ovlivněním nežádoucí ledvinné akumulace vybranými látkami s využitím izolovaných ledvinných buněk potkana.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo poznání ledvinných transportních mechanismů, které jsou odpovědné za ledvinnou reabsorpci nízkomolekulárních receptorově specifických peptidů a které by mohly tedy být odpovědné i za retenci a akumulaci studovaného radionuklidem značeného analogu somatostatinu- ^{111}In -DOTA-TATE v izolovaných ledvinných buňkách potkana. Současně je cílem hledání látek, které by mohly ledvinnou retenci a akumulaci těchto peptidů snížit a tím omezit poškození ledvinné tkáně. Součástí práce bylo také vypracování literárního přehledu o současném stavu poznatků ve vývoji peptidových receptorově specifických radiofarmak a v problematice ledvinných transportních systémů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Transport léčiv v ledvinách

Ledviny jsou hlavním exkrečním orgánem pro léčiva a jejich metabolity a mají vyvinutý vysoce kapacitní transportní systém k rychlé eliminaci značného množství cizích sloučenin do nich dopravených.

Renální eliminace léčiv zahrnuje tři hlavní procesy: glomerulární filtraci, tubulární sekreci a tubulární reabsorpci (aktivní nebo pasivní). Filtrace léčiv je jednoduchý, jednosměrný, difúzní proces. Renální tubulární sekrece a reabsorpce jsou obousměrné procesy, které často zahrnují pasivní difúzi lipofilních radiofarmak z glomerulárního filtrátu zpět do krve a přenašeči zprostředkované membránové procesy (Bendayan a kol., 1996).

Proximální tubulus ledvin je primární místo aktivního transportu pro různé druhy substrátů, včetně organických aniontů/kationtů, peptidů a nukleosidů.

Ledvinový metabolismus a následný renální uptake katabolitů je velmi důležitý pro možnou terapeutickou aplikaci radioaktivně značených protilátek a peptidů. Tato agens jsou zčásti reabsorbována z ultrafiltrátu buňkami renálních proximálních tubulů pomocí pinocytózy a následně degradována v lysozomech. To limituje jejich terapeutické použití kvůli možné radiační toxicitě.

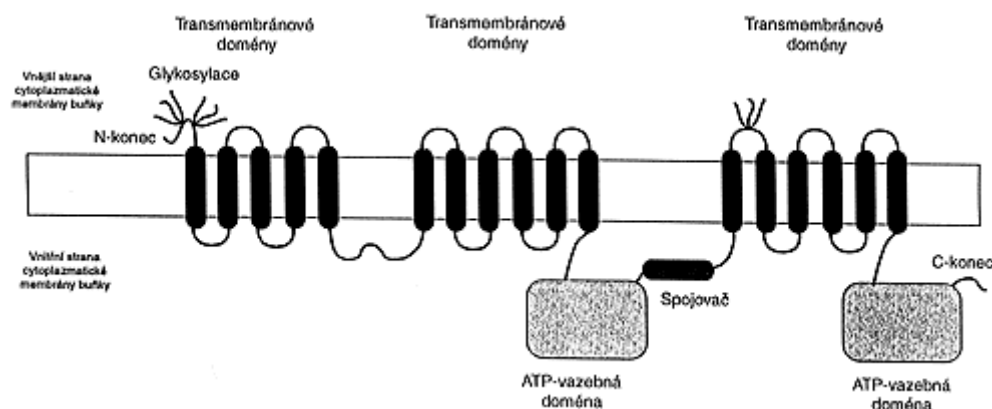
3.1.1. Transportní mechanismy pro nízkomolekulární léčiva

Mnoho organických aniontů a kationtů je aktivně exkretováno z krve do lumen renálních tubulů pomocí mechanismů závislých na transportérech. Sekrece organických aniontů v renálních tubulech zahrnuje dva různé následné transportní kroky. Prvním krokem je na sodíku závislý uptake z krve přes bazolaterální membránu (BLM) proti vnitřnímu negativnímu potenciálu, kdy organické aniony jako p-aminohippurát (PAH) jsou vyměněny s dikarboxylovou kyselinou (α -ketoglutarát). Tento aktivní proces je zprostředkovaný transportérem pro organické anionty-OAT, který je lokalizován na bazolaterální straně proximálního tubulu ledvin. Druhým krokem je eflux přes kartáčový lem lumenální membrány do moče. Důležité fyzikálně-chemické vlastnosti pro interakci s transportéry jsou hydrofobicita, iontový náboj a elektrony přitahující vedlejší skupiny (Trejtnar a Lázníček, 2002). V posledních letech bylo izolováno devět

transportérů pro organické anionty. Tyto transportéry patří do dvou velkých genetických rodin, OAT (1-4) nebo OATP (1-3) a OAT-K (1, 2) (Dresser a kol., 2001).

Organické endogenní a exogenní kationické sloučeniny jsou sekretovány v proximálním tubulu společnou činností dvou odlišných transportérů. Transportéry pro organické kationty existují v bazolaterální membráně (BLM) a apikální membráně (BBM) buněk ledvin. Tyto transportní procesy byly primárně nalezeny v proximálním tubulu a v menší míře v distálním tubulu. Organické kationty jsou tedy transportovány přes BLM ve směru elektrochemického gradientu. Byly také popsány mechanismy založené na antiportu organický kationt-proton. V tomto případě jsou organické kationty transportovány zevnitř buňky do tubulárního lumen výměnou za lumenální proton. Tyto dva systémy pracují současně a mají za následek sekreci organických kationtů z krve do tubulární tekutiny. V současné době bylo izolováno pět různých izoform transportérů pro organické kationty. Tyto transportéry spadají do dvou genetických rodin: OCT (1-3) a OCTN (1,2).

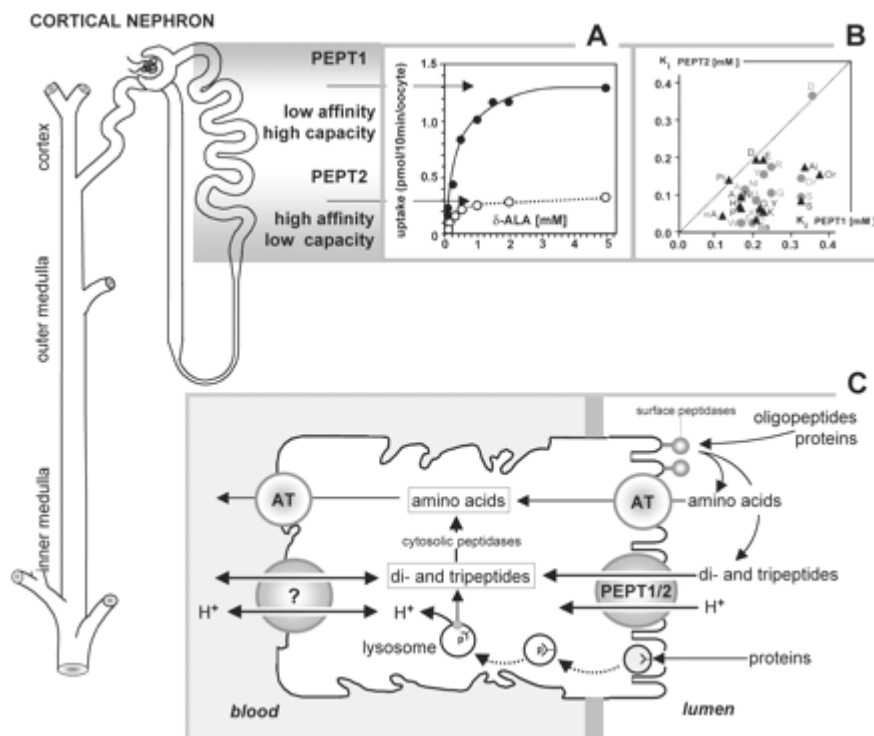
Dalšími transportéry pro léčiva jsou P-glykoproteinové a MRP (multidrug-resistance associated proteins). MRP je na ATP-závislá membránová pumpa patříci stejně jako P-glykoprotein (Pgp) do rodiny ABC-transportních proteinů (obr.1). Bylo identifikováno 9 MRP (MRP 1-9) (Noskova, 2002).



Obr. 1. Schéma prostorového uspořádání transportéru MRP (Noskova, 2002).

Malé lineární peptidy jsou hydrolyzovány na luminální straně proximálního tubulu a poté reabsorbovány, nebo, v případě di- a tripeptidů a některých peptidových sloučenin, mohou být reabsorbovány v nezměněné formě peptidovými transportéry.

Oligopeptidy a peptidové sloučeniny jsou aktivně přijímány prostřednictvím uptake kariéry lokalizovanými na kartáčovém lemu membrány. V ledvinách byly identifikovány dva transportéry pro oligopeptidy – PEPT (peptide transporters). PEPT1 je nízkoafinitní, vysokokapacitní transportér exprimovaný v kartáčovém lemu epiteliálních buněk tenkého střeva a proximálního tubulu ledvin, zatímco PEPT2 je vysoceafinitní, nízkokapacitní transportér a má širší distribuci v organismu. Myší modely ukázaly, že PEPT2 je dominantní transportér pro di-, tripeptidy a jejich farmakologické substráty v organismu. Rozdílné kinetické vlastnosti PEPT1 a PEPT2 jsou ukázány pro kyselinu δ -aminolevulovou na obr. 2. (Daniel a kol., 2003).



Obr. 2. Renální peptidové transportéry PEPT1 a PEPT2. PEPT1 a PEPT2 jsou lokalizované v apikální membráně epiteliálních buněk proximálního tubulu s různou expresí.

A: porovnávání transportu pro substrát δ -aminolevulovou kyselinu PEPT1 nebo PEPT2 při stejných experimentálních podmínkách, které demonstrují, že PEPT1 je vysokokapacitní, nízkoafinitní transportní systém a PEPT2 vysoceafinitní, nízkokapacitní transportér.

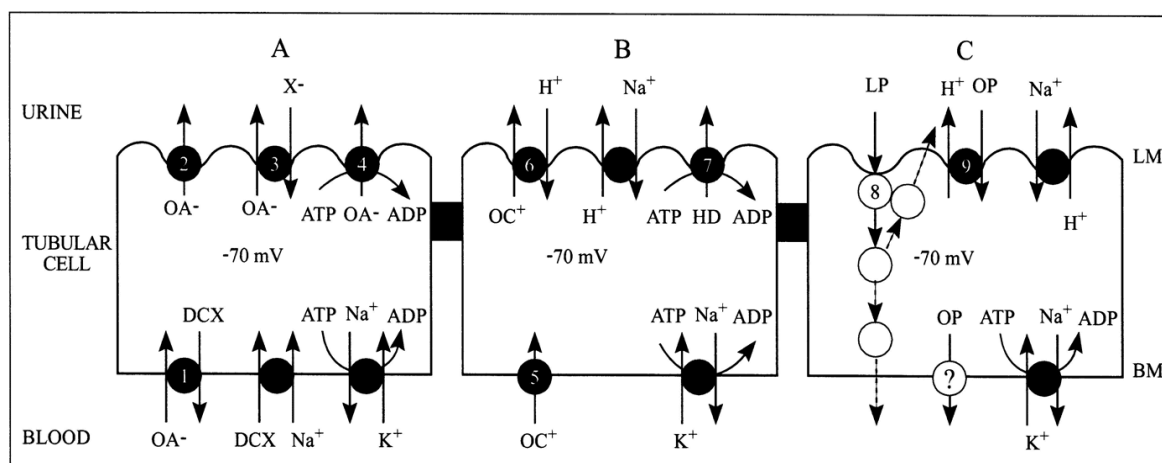
B: rozdílné afinity 2 transportérů pro velký soubor dipeptidů

C: zjednodušený model funkce renálních transportérů peptidů při metabolismu proteinů, di- a tripeptidů a aminokyselin v renálních tubulárních buňkách (Daniel a kol., 2003).

Kromě di- a tripepidů mohou oba transportéry přenášet také další látky jako aminocefalosporiny, betalaktámy, vybrané inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu, inhibitory peptidázy a další různá proléčiva. Transportéry jsou stereoselektivní a mají vyšší afinitu k L-enantiomerům. Využívají k transportu elektrochemického protonového gradientu proti koncentračnímu spádu. Transport tedy závisí na pH a membránovém potenciálu.

Mechanismy aktivní sekrece a reabsorpce mají významný vliv na exkreci léčiv. Změna rovnováhy mezi transportem z krve do buňky a z buňky do lumen tubulu může vyústit v intracelulární akumulaci léčiv a tím způsobit lokální toxicitu léčiva.

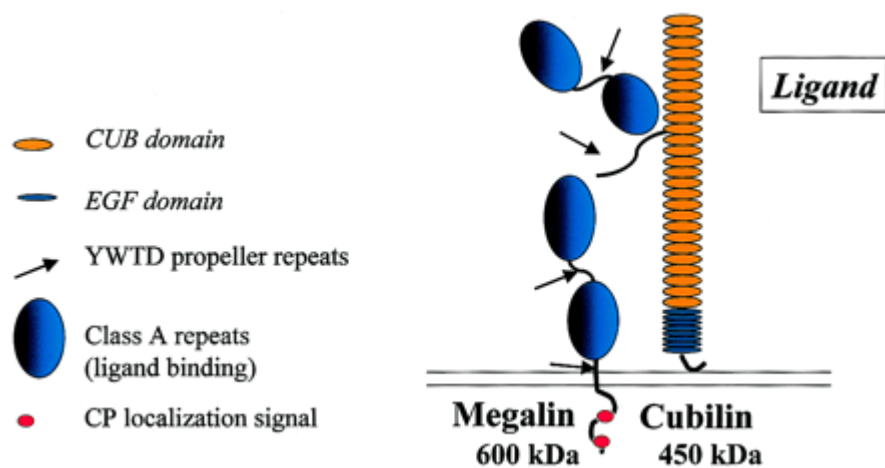
Přehled možných transportérových mechanismů v ledvinných tubulech ukazuje obr. 3.



Obr. 3. Transport různých látek v tubulárních buňkách ledvin: organické anionty (OA⁻) jsou transportovány z krve přes bazolaterální membránu (BM) organickým anion/dikarboxylovým výměníkem. (1), terciárně aktivním transportním systémem, který je identický s OATs. Transport je závislý na aktivitách Na⁺/dekarboxylázového výměníku a Na⁺/K⁺-ATPázy. Eflux buněčných organických aniontů přes lumenální membránu (LM) je považovaný za napěťově zprostředkovaný systém (2) a OA⁻/anion (X⁻) výměník (3). Aniontové konjugáty mohou také vystupovat z buněk pomocí ATP-dependentních transportérů, MRP2 (4). Organické kationty (OC⁺) vstupují do buněk přes bazolaterální membránu facilitovanou difúzí zprostředkovanou OCT (5). Transport přes lumenální membránu je zprostředkovaný výměníkem H⁺/organický kationt (6). H⁺gradient je udržovaný Na⁺/H⁺ antiportem. Mnoho pozitivně nabitých nebo neutrálních hydrofóbních látek (HD) je vypuzováno z buněk do lumen na energii závislými transportéry MRP1 (7). Velké peptidy a proteiny (LP) jsou absorbovány z moče pinocytózou a metabolizovány v buňce (8). Jejich metabolické produkty mohou být přeneseny do krve a zpátky do moče. H⁺-kotrasmportéry PEPT1 a PEPT2 reabsorbují oligopeptidy (OP) přes bazolaterální membránu (9). Nemetabolizované oligopeptidy mohou být transportovány do krve neidentifikovanými transportními mechanismy (Trejtnar a Lázníček, 2002).

3.1.2. Transportní mechanismy pro léčiva typu proteinů

Molekulární mechanismy odpovědné za endocytózu proteinů v renálním proximálním tubulu byly dlouho neznámé. Během posledních několika let se ukázaly pro tyto procesy jako velmi důležité dva endocytární receptory - megalin a cubilin (obr. 4). Tyto dva multiligandové receptory jsou výrazně exprimovány v apikální části epiteliálních buněk proximálního tubulu (Verroust a kol., 2002).



Obr. 4. Schématické znázornění dvou endocytárních receptorů- megalinu a cubilinu (Verroust a kol., 2002).

Megalin je multiligandový, endocytární receptor patřící do skupiny receptorů lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). Je intenzivně exprimován v renálním proximálním tubulu a to v kartáčovém lemu. Bylo identifikováno mnoho ligandů pro megalin, který tedy hraje důležitou roli při tubulárním uptake filtrovaných proteinů. Mezi ligandy jsou proteiny vázající vitamíny a některé hormony, což naznačuje význam megalinu v metabolismu a homeostáze esenciálních vitamínů, včetně vitamínu D a kalcia. Mezi další ligandy megalinu patří apolipoproteiny, enzymy, nízkomolekulární peptidy i některá léčiva.

Megalin je ze 4600 aminokyselin složený velký transmembránový protein s koncovou NH₂ - extracelulární doménou, jednoduchou transmembránovou doménou a krátkým cytoplazmatickým řetězcem. Jelikož patří do skupiny LDL-receptorů, sdílí podobné rysy jako další savčí receptory zahrnující LDL receptor, LDL příbuzné receptory (LRP), receptory pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) a receptor pro apolipoprotein E (apo E).

Megalin je exprimován v mnoha epiteliálních buňkách, v absorpčním epitelu obklopující transcelulární tekutiny, který je v proximálním tubulu ledvin, podocytech glomerulu, v choroideálním plexu, v buňkách thyroidei, v buňkách labyrintu vnitřního ucha a v ciliárním epitelu oka. Dále byl nalezen ve viscerálním žloutkovém váčku, v pneumocytech typu 2, v buňkách příštítného tělíska produkujících parathyreoidální hormon (PTH), v tenkém střevě, endometriu, vejcovodech a v cytotrofoblastu v placentě. Také byl objeven v embryonální tkáni. Během vývoje tkání se může megalin vyskytnout v mesonefronu, ledvinném váčku i močovém měchýři. Vyskytuje se v esovitých buňkách, ze kterých později vznikne jak glomerulus, tak proximální a distální tubulus. V dalším vývoji je ovšem přítomen pouze v proximálním tubulu a v menší míře v glomerulu.

Po translaci v drsném endoplazmatickém retikulu (RER), se megalin rychle a s velkou afinitou váže na 40 kDa velký protein RAP. Deficit RAP je spojen s významným poklesem exprese megalinu a s jeho subcelulární redistribucí v proximálním tubulu. RAP se vyskytuje převážně v RER, je tedy intracelulární ligand. Vzhledem k jeho vysoké afinitě k megalinu inhibuje vazbu mnoha dalších ligandů a může sloužit jako důležitý prostředek pro studium vazby ligandů k megalinu (Christensen a Birn 2001).

Cubilin, známý jako intestinální vnitřní faktor-kobalaminový receptor (intrinsic factor-cobalamin receptor), je exprimován v ledvinném proximálním tubulu společně s megalinem. Ačkoliv se strukturně velice liší, mají mnoho společných znaků. Jedná se o multiligandové přenašeče, některé ligandy mají společné a jsou důležité pro tubulární reabsorpci proteinů. Navíc se ukázalo, že megalin váže cubilin a je zapojen do jím zprostředkované endocytózy. Oba receptory se vyskytují společně v buňkách proximálních tubulů ledvin.

Cubilin má velikost přibližně 3600 aminokyselin, neobsahuje transmembránovou doménu. Kompletní sekvence jeho DNA byla identifikována jak u lidí, tak u potkanů a psů. S ostatními známými endocytárními receptory nemá mnoho

společných rysů. Obsahuje 27 CUB (cubilinových) domén. Tyto domény pravděpodobně tvoří části vážící ligandy. CUB doménám předchází úsek ze 110 aminokyselin. Poslední NH₂-skupina je nutná k uchycení proteinu na membránu.

Cubilin je výrazně exprimován v ledvinném proximálním tubulu, ve viscerálním žloutkovém váčku, v epitelu tenkého střeva, placentárním cytotrofoblastu, a možná také v dalších tkáních jako je thymus. Jeho exprese je v porovnání s megalinem omezenější. V proximálním tubulu se cubilin nachází, podobně jako megalin, na kartáčovém lemu. Cubilin byl také identifikován v lysozomech. Podobně jako megalin se nachází během vývoje ledvin v esovitých buňkách, avšak pozdnější exprese je omezena na proximální tubulus. Dosud nebyl nalezen v glomerulu (Christensen a Birn, 2001).

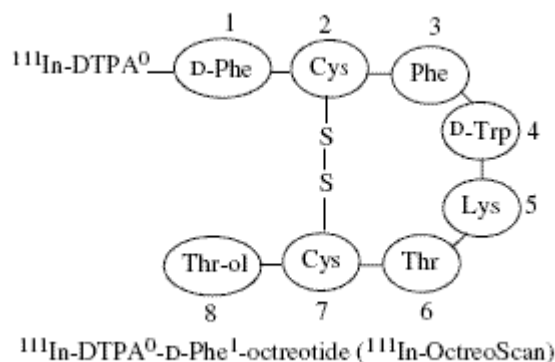
Oba zmíněné receptory jsou důležité pro normální reabsorpci proteinů v proximálním tubulu ledvin. Některé proteiny se vážou na oba receptory, které navíc rozpoznají specifické ligandy. Megalin může vázat oba a internalizovat tyto ligandy, zatímco cubilinový komplex potřebuje k internalizaci megalin. Vazba ligandů je závislá na Ca²⁺. Vazebná afinita ligandů se podstatně liší. Některé ligandy přitahují speciální pozornost jako např. proteiny přenášející vitamíny. Bylo objasněno, že megalin/cubilinová reabsorpce proteinu vázajícího vitamin D je odpovědná za konverzi 25(OH)D₃ na 1,25(OH)₂D₃ v proximálním tubulu ledvin.

Cubilin a megalin vážou lipoproteiny (HDL, LDL), ale jejich role v metabolismu cholesterolu není jasně stanovena, přesto u psů s deficitem exprese cubilinu byla prokázána hypercholesterolémie (Verroust a kol., 2002).

Megalin a cubilin představují dva velké, endocytární receptory exprimované v endocytárním aparátu proximálního tubulu ledvin. Chybění nebo dysfunkce jednoho nebo druhého receptoru je spojena s významnou tubulární proteinurií, což ukazuje, že oba jsou důležité pro normální absorpci filtrovaných proteinů včetně např. albuminu. Ačkoli jsou strukturálně velmi rozdílné, oba receptory mohou být funkčně propojené. Navíc je megalin zapojený do tubulárního uptake potenciálně nefrotoxických léčiv včetně aminoglykosidů. Tudíž modifikace receptoru může být cenná pro budoucí výzkum (Christensen a Birn, 2001).

3.2. Peptidová radiofarmaka v onkologii

Nadějí pro diagnózu a léčbu nádorů je výzkum nových nádorově specifických peptidových radiofarmak. Nadměrná exprese některých receptorů v lidských nádorech činí tyto receptory potenciálním cílem pro diagnostické zobrazení a radioterapii specificky konstruovanými radioaktivně značenými peptidy. Jedním z příkladů je vysoká exprese somatostatinových receptorů v neuroendokrinních nádorech (NETs), které jsou účinně zaměřeny SST analogem ^{111}In -DTPA-oktreotidem (^{111}In -OctreoScan) (Obr. 5). Vysoká exprese SST receptorů u různých nádorů vytvořila molekulární podklad pro úspěšné užití ^{111}In - OctreoScanu jako cíleného nádorového peptidu, což otevřelo nové možnosti pro další nádorově specifické peptidy s potenciálním použitím v nukleární medicíně. Mnoho přirozeně se vyskytujících peptidů projevuje extrémně vysokou afinitu k receptorům na povrchu buněk. Úspěšný výzkum nových radioaktivně značených na receptor se vázajících peptidových analogů je tedy závislý na molekulární modifikaci přirozených peptidů při zachování afinity na cílové receptory.



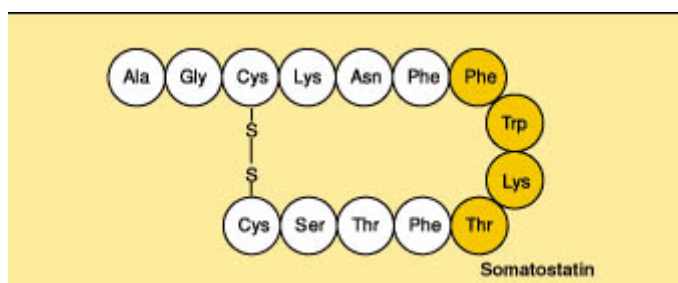
Obr. 5. Struktura ^{111}In -DTPA-oktreotidu (^{111}In -OctreoScan) (Okarvi, 2008).

Kromě SST receptorové scintigrafie se ukázaly v poslední době jako slibné pro zásah nádorů bombesin/gastrin peptidové (BN/GRP) receptory. Tato možnost odpovídá hlavně nadměrné expresi BN/GRP receptorů v lidských nádorech zahrnujících hlavně nádory prostaty, prsu a malobuněčný plicní karcinom. Jednotlivé značené BN/GRP analogy mají potenciál při in vivo vizualizaci BN/GRP receptorů exprimovaných v nádorech. Množství ostatních, pro tumory specifických peptidů, jako jsou vasoaktivní intestinální peptid, neurotensin a cholecystokinin/gastrin je v současné době

v preklinických a klinických studiích zjišťujících jejich skutečný potenciál pro diagnostiku nebo léčbu lidských nádorových onemocnění (Okarvi, 2008).

3.2.1. Somatostatinové peptidy

Somatostatin je cyklický tetradekapeptidový hormon zpočátku izolovaný z ovčích hypotalamu (obr. 6). Vyskytuje se ve dvou bioaktivních formách. Inhibuje endokrinní a exokrinní sekreci, stejně jako růst nádorových buněk pomocí vazby na specifický povrch receptorů (Weckbecker a kol., 1993).

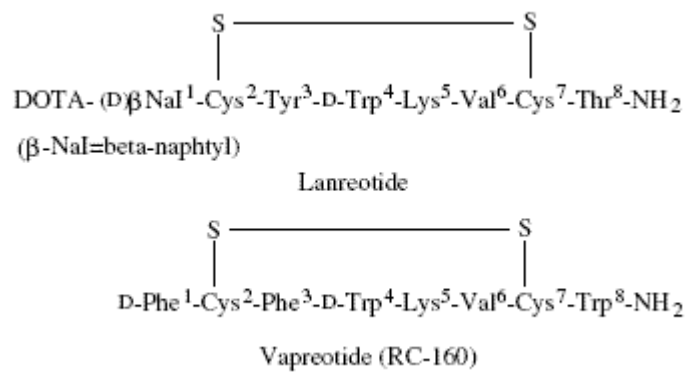


Obr. 6. Struktura somatostatinu

Přirozeně se vyskytující somatostatiny (také známé jako faktory inhibující uvolňování somatotropinu) mají různé biologické účinky na mnoho buněk. Somatostatiny vznikají jako velká prekurzorová molekula, která je degradována enzymy buď na somatostatin-14 (SST-14) nebo jeho na N-konci rozšířená forma-peptid somatostatin-28. Další enzymatická degradace rychle snižuje jejich aktivitu, a proto přirozeně se vyskytující somatostatiny mají velmi krátký biologický poločas (méně jak 3 min). Účinky SST peptidů jsou zprostředkované interakcemi se specifickými SST receptory na povrchu buňky, mezi nimiž rozeznáváme 5 různých receptorových subtypů (sstr₁-sstr₅). Somatostatin-14 a somatostatin-28 mají téměř stejnou afinitu ke všem receptorovým subtypům (pouze SST-28 má o něco málo větší afinitu k subtypu sstr₅). Syntetické analogy SST vykazují různou vazebnou afinitu k jednotlivým subtypům receptorů. Ačkoli jsou v lidských nádorech exprimovány různé typy SST receptorů, sstr₂ je dominantní jedině v NETs. Je to tedy především přítomnost sstr₂ a jeho hustota, která poskytuje molekulární základ pro různé klinické aplikace SST analogů, jako jsou

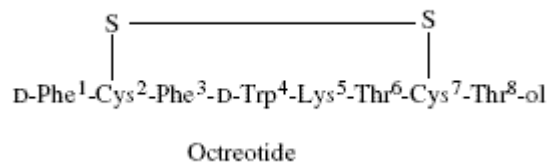
symptomatická léčba hormon-sekretujících NETs (oktreotidem), diagnostiku a terapeutické užití radioaktivně značených SST analogů.

Molekulární modifikací byly připraveny různé syntetické analogy SST, které si uchovávají většinu biologické aktivity originálního SST. Zavedení D-aminokyseliny a zkrácení sekvence vedlo k SST analogům obsahujícím 8 aminokyselin jako oktreotid, lanreotid a vapreotid (obr. 7). Tyto SST analogy jsou mnohem stabilnější než přirozený SST.



Obr. 7. Struktura lanreotidu a vapreotidu (Okarvi, 2008)

Oktreotid je kratší, syntetický analog somatostatinu (obr. 8). Jeho farmakodynamické vlastnosti jsou podobné somatostatinu, s rozšířením spektra inhibičních efektů na funkci předního laloku hypofýzy, pankreatickou endokrinní sekreci a gastrointestinální funkci. Ve srovnání se somatostatinem je oktreotid rezistentnější k enzymatické degradaci a má tedy delší plazmatický poločas u lidí pohybující se kolem 100 minut, což dovoluje jeho použití při dlouhodobé léčbě různých patologických stavů (Chanson a kol 1993).

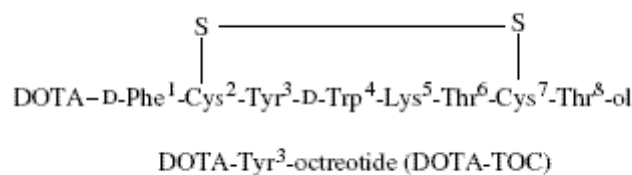


Obr. 8. Struktura oktreotidu (Okarvi, 2008)

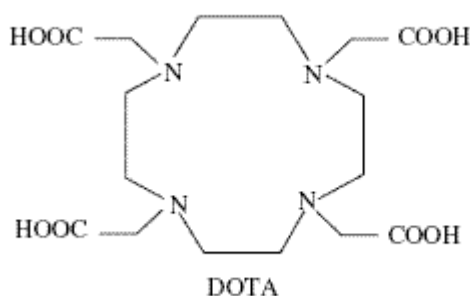
Oktreotid a ostatní analogy SST byly modifikovány vložení chelatujícího činidla pro tvorbu komplexů s radioaktivními kovy a manipulací s peptidovou sekvencí k maximalizaci jejich receptorové aktivity a optimalizaci jejich farmakokinetiky. Cyklický oktapeptid oktreotid značený ^{123}I byl první SST analog použitý pro in vivo zobrazení nádorů pozitivních na SST receptory. ^{123}I -Tyr-oktreotid dobře zobrazil určité nádory, ale výrazná hepatobiliární exkrece a komplikovaná radiojodační procedura omezily použití této látky. Trvalé hledání lepších SST analogů vyústilo v objevení DTPA-oktreotidu. ^{111}In značený DTPA-oktreotid (^{111}In -OctreoScan), který se ukázal slibným jako zobrazovací agens pro vizualizaci na SST receptory pozitivních NETs a byl později schválen FDA pro toto použití.

Somatostatinové receptory zobrazované pomocí ^{111}In - DTPA-oktreotidu se staly významným nástrojem pro vizualizaci NETs a to zvláště těch, které se vyznačují vysokou hustotou SST receptorů, jako jsou gastroenteropankreatické nádory. Tento postup je nyní používán rutinně pro lokalizaci primárních nádorů, hodnocení rozsahu onemocnění, monitorování efektivity léčby a k výběru pacientů pro peptidovou receptorovou radioterapii.

Současná hybridní technologie umožňuje získat zobrazení obou informací-jak anatomické (CT), tak funkční (SPECT) nebo (PET) s vlivem na správnou diagnostiku. Značné úsilí bylo vyvinuto v minulých několika letech při výzkumu na SPECT a PET založených SST analogích schopných targetingu různých receptorových subtypů. Z četných syntetizovaných SST analogů jich jen několik vykazuje klinický potenciál. Nejlepším příkladem je [Tyr³] oktreotid (obr. 9). Tento peptid byl konjugován s makrocylem DOTA (obr. 10), chelátorem, který umožňuje stabilní značení pomocí mnoha kovových radionuklidů (^{90}Y , ^{111}In , ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{64}Cu atd.), čímž vznikají radioligandy, které jsou užitečné pro SPECT, PET nebo radionuklidovou terapii. Kromě toho bylo sledováno, že konverze oktreotidu na oktreotát (záměna threoninolu na C-konci s přírodní aminokyselinou threoninem) má za následek zvýšení vazby na receptory, lepší internalizaci a vyšší vychytávání nádorem s vhodným využitím v scintigrafii (Okarvi, 2008).



Obr. 9. Struktura DOTA-Tyr³-oktreotidu (DOTA-TOC) (Okarvi, 2008)



Obr. 10. Struktura DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina) (Okarvi, 2008)

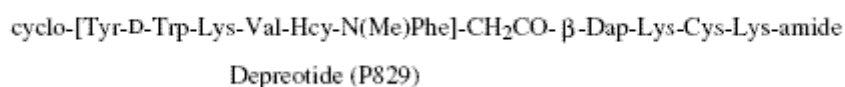
V dalších studiích byla zjištěna diagnostická využitelnost ¹¹¹In-DOTA-TOC a ¹¹¹In-DOTA-lanreotidu (LAN) pozorována u pacientů s NETs. Výsledky ukázaly, že ¹¹¹In-DOTA-TOC i ¹¹¹In-DOTA-LAN jsou vhodné pro zobrazení NETs a mohou detekovat poškození, které není viditelné konvenčními zobrazeními a ¹⁸F-FDG-PET (Okarvi, 2008).

SST analog DOTA-[1-Nal⁸] oktreotid (DOTA-NOC) byl vyvinut nedávno pro zasažení různých SST receptorů. ¹¹¹In/⁹⁰Y -DOTA-NOC vykazuje vysokou afinitu k sstr₂, sstr₃ a sstr₅ in vitro. Tato slibná data opravňují hodnotit tento radiopeptid jako vhodný pro zobrazování a pro potenciační studie radioterapie u pacientů. Pokud jej označíme pozitronovým zářičem, jako je ⁶⁸Ga, DOTA-NOC vykazuje vysokou afinitu k sstr₂ a sstr₅ a je příslibem pro in vivo vizualizaci na SST receptory pozitivních nádorů (Okarvi, 2008).

Zkoumání syntetických analogů SST, které mají selektivní afinitu k 5 známým receptorovým subtypům, vedlo k četným potenciačním agonistickým analogům SST receptorů. Mnoho z těchto agonistů vykazuje dobrou selektivitu a afinitu pro subtypy 2, 3 a 5 s malou selektivitou pro sstr₁ nebo sstr₄. Obecně jsou pro cílení nádorů

agonisté vhodnější než antagonisté, zvláště ty, kteří se rychle začlení do nádorové buňky po navázání na příslušný receptor, což usnadňuje aktivní kumulaci radioaktivity v nádorových buňkách. Výzkum SST specifických antagonistů na receptorových subtypech může vést k pochopení fyziologické úlohy každého receptorového subtypu. Recentní studie naznačují, že radioaktivně značení SST receptoroví antagonisté jsou pro *in vivo* zásah receptorů v nádorech vhodnější než agonisté. Antagonistické radioligandy, kterým chybí schopnost internalizace, ale vážou se na různé receptory, jsou preferované cílové agens ve srovnání s agonistou, který má velkou schopnost internalizace, avšak váže se na omezený počet receptorů. Nedávná studie s radioaktivně značenými peptidovými antagonisty ukazuje význam dalšího výzkumu. Pokud budou současné výsledky potvrzeny i pro jiné peptidové receptory, použití potencionálních antagonistických radioligandů pro *in vivo* zásah nádorů může významně zvýšit citlivost současných diagnostických technik a efektivitu receptory zprostředkované radionuklidové terapie.

V posledních několika letech byly různé SST analogy značeny pomocí ^{99m}Tc s užitím různých chelatujících činidel. Zvláštní význam má ^{99m}Tc -depreotid. Depreotid je cyklický syntetický peptid bez disulfidické vazby (obr. 11). Klinický výzkum s ^{99m}Tc -depreotidem ukázal jeho efektivitu při targetingu SST receptorově (sstr₂,sstr₃ a sstr₅) pozitivních nádorů. ^{99m}Tc – depreotid byl FDA schválený pro targeting nádorů exprimujících SST receptory.



Obr. 11. Struktura depreotidu (Okarvi, 2008)

Další preklinické studie byly zaměřené na protinádorové účinky oktreotidu a příbuzných somatostatinových analogů BIM 23014 a RC-160. *In vitro* v nanomolekulárních koncentracích inhibují tyto analogy růst nádorových buněk a vykazují vysokou afinitu k SST receptorům. Podle toho SST analogy jako oktreotid účinně inhibují růst SST receptor-pozitivních nádorů v různých modelech hlodavců a

částečně u xenotransplantovaných lidských nádorů u myši. Skupina nádorů citlivých k oktreotidu a příbuzným SST analogům zahrnuje prsní, pankreatické, kolorektální a plicní malignity (Okarvi, 2008)

3.2.2. Cytotoxické somatostatinové analogy

Nadměrná exprese mnoha SST receptorů v různých lidských novotvarech může být cílem pro použití cytotoxických SST peptidových konjugátů. V současné době byl vyvinut pro inhibici růstu SST receptor exprimujících tumorů cytotoxický analog (AN-238), který je účinným derivátem doxorubicinu (DOX) - 2-pyrrolino-DOX (AN-201), spojený kovalentně k cyklickému oktapeptidu D-Phe¹,Cys²,Tyr³,D-Trp⁴,Lys⁵,Val⁶,Cys⁷,Thr⁸-NH₂ (RC-121) (Okarvi, 2008)

3.2.3. Receptory zprostředkovaná peptidová radioterapie

Po úspěchu radioaktivně značených SST analogů jako je např. ¹¹¹In-OctreoScan, bylo dalším cílem označit tyto peptidy radionuklidy emitujícími α nebo β částice, Augerovy nebo konverzní elektrony a využít radioaktivně značené peptidy k radionuklidové terapii.

¹¹¹In neemituje pouze γ -paprsky, které mohou být vizualizovány pomocí scintigrafie, ale také terapeutické Augerovy a konverzní elektrony se střední až krátkou tkáňovou penetrací a ¹¹¹In-DTPA-OC (¹¹¹In-OctreoScan) je používán na SST receptory cílenou radioterapii. Počáteční studie byly provedené s vysokou dávkou diagnostického agens ¹¹¹In-DTPA-OC s odůvodněním, že Augerovy a konverzní elektrony vyzařované ¹¹¹In by se mohly nacházet dostatečně blízko jádra a způsobit destrukci buňky. Navzdory povzbudivým výsledkům tohoto přístupu u pacientů s metastázami NETs, ¹¹¹In obsahující peptidy nejsou ideální pro receptorovou radionuklidovou terapii pro malý dosah částic a z toho vyplývající krátkou tkáňovou penetraci Augerových elektronů. Jak bylo řečeno, ¹¹¹In je hlavně γ -zářič a nemusí být vždy vhodný pro vnitřní radioterapii, protože lokální radiace je tvořena Augerovými a konverzními elektrony. DOTA obsahující SST analogy značené vysokoenergetickými β -částicemi zářičů jako ⁹⁰Y a nízkoenergetickými β -zářiči jako ¹⁷⁷Lu jsou pro radioterapeutické účely mnohem vhodnější. Bylo zjištěno, že nízkoenergetické β -částice emitované analogy obsahujícími

^{177}Lu jsou vhodnější pro menší nádory nebo metastázy, zatímco vysokoenergetické β -částice emitované ^{90}Y analogy pro větší nádory. Jak již bylo řečeno dříve, chelátor DOTA je výhodný pro značení indiem-111, yttriem-90 a luteciem-177, což jej činí vhodným pro diagnostiku i terapeutické použití. V recentní studii bylo ukázáno, že přežití u pacientů s gastropankreatickými metastázami NETs po peptidové receptorové radioterapii s ^{111}In -DOTA-TOC je delší než u ^{111}In -DTPA-OC, což bylo dáno vyšší efektivností ^{111}In -DOTA-TOC při radioterapii.

Receptorová terapie využívající radionuklidy s vhodným dosahem částic je novou potenciální metodou léčby rakoviny. Úspěch této strategie závisí na vysoké koncentraci radioligandu uvnitř nádorové buňky po dostatečně dlouhou dobu (dlouhá doba retence v nádoru) a rychlé clearance z necílových tkání renální exkrecí (Okarvi, 2008).

3.2.4. Bombesinové peptidové analogy

Bombesin, 14-aminokyselinový (pGlu¹-Gln²-Arg³-Leu⁴-Gly⁵-Asn⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Gly¹¹-His¹²-Leu¹³-Met¹⁴-NH₂) neuropeptid izolovaný z kůže evropské žáby *Bombina bombina* vykazuje vysokou afinitu k lidskému GRP receptoru, který je nadměrně exprimovaný u různých typů nádorů jako jsou nádory prostaty, prsu, pankreatu, gastrointestinální a malobuněčný plicní karcinom. Doposud byly charakterizovány tři savčí BN/GRP receptorové subtypy: GRP receptor, BN receptor subtypu 3 a neuromedin-B receptor. Vysoká exprese BN/GRP receptorů u různých nádorů nabízí zajímavý cíl pro BN/GRP receptorovou scintigrafií a radionuklidovou terapii. Po objevu, že BN může působit jako účinný růstový faktor v mnoha typech nádorových buněk, by měl být významný zájem na vývoji kompetitivních antagonistů BN/GRP receptorů jako možných antimitotických agens. Blokováním vazby bombesinových peptidů na jejich receptorech antagonisté blokují fyziologické účinky těchto peptidů a inhibují růst nádorových buněk. Tudíž mají tyto antagonisté použití jako potenciální protirakovinové sloučeniny. C-koncová část aminokyselinové sekvence zahrnující 7.-14. aminokyselinu (Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Gly¹¹-His¹²-Leu¹³-Met¹⁴-NH₂) bombesinových peptidů je známa jako rozhodující pro receptorovou afinitu a biologickou aktivitu. Proto je většina radioaktivně značených BN peptidů založena na aminokyselinové sekvenci 7-14, ve spojení s chelátorem přes vloženou skupinu

na N-konci peptidu. DTPA a DOTA byly použity pro značení ^{90}Y , ^{111}In , ^{68}Ga , ^{177}Lu a ^{64}Cu . Vhodně formulovaná BN/GRP peptidová radiofarmaka, která se s vysokou afinitou a specifitou vážou na BN/GRP receptory jsou příslibem pro časnou, neinvazivní diagnózu a pro radioterapii nádorů pozitivních na BN/GRP receptory v nukleární onkologii. V poslední době byla vyvinuta syntetická analoga BN/GRP-(D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴-NH₂) BN(6-14), které mají vysokou afinitu ke všem ze tří tříd savčích BN/GRP receptorů a fungují jako univerzální ligand. Radioaktivně značené analogy se vážou s vysokou afinitou ke všem receptorovým třídám a jsou rychle internalizovány všemi třídami BN/GRP receptorů. Objev univerzálního ligandu je velmi významným krokem ve vývoji peptidových radiofarmak, která jsou cílená na nádory nesoucí různé třídy BN/GRP receptorů (Okarvi, 2008).

3.2.5. Cytotoxické bombesinové analogy

Přítomnost BN/GRP receptorů v různých lidských nádorech vybízí ke zkoumání cytotoxických BN/GRP analogových nosičů. Byl vyvinut nový cytotoxický analog BN/GRP (AN-215), který obsahuje 2- pyrrolinodoxorubicin (AN-201), účinný cytotoxický derivát doxorubicinu, který je kovalentně připojený k BN oktapetidu Gln¹, Trp², Ala³, Val⁴, Gly⁵, His⁶, Leu⁷-ψ(CH₂-NH), Leu⁸-NH₂ (RC-3094) (Okarvi, 2008).

Tab. 1. Peptidové receptory exprimované v lidských nádorech (Okarvi, 2008)

Peptid	Nádorová exprese
Somatostatin	NETs (gastroenteropankreatické, hypofyzární nádory) Lymfomy, karcinoidy, paragangliomy, nádory prsu, mozku a malobuněčné plicní karcinomy
Bombesin/GRP	Nádory prostaty, prsu, pankreatu, žaludku, malobuněčné plicní karcinomy, kolorektální nádory
VIP	Adenokarcinomy tlustého střeva, nádory prsu a endokrinní nádory
α -M2	Nádory prsu
α - MSH	Melanomy
CCK/gastrin	Nádory štítné žlázy, malobuněčné plicní karcinomy, gastrointestinální, vazivové tkáně, ovariální a astrocytomy
Neurotensin	Malobuněčné plicní karcinomy, nádory tlustého střeva, exokrinní pankreatické, prsu, prostaty a Ewingův sarkom
LHRH	Nádory prostaty a prsu

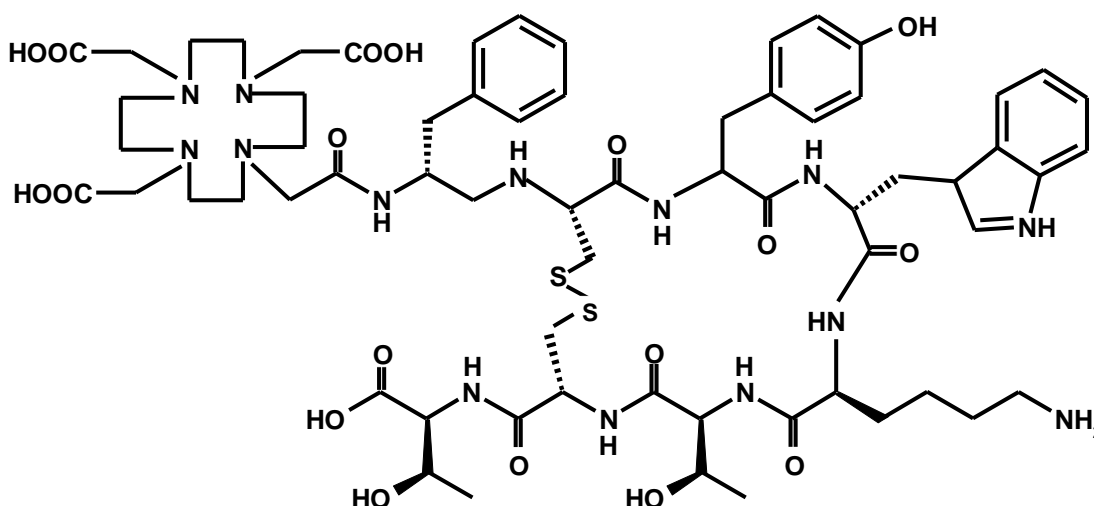
GRP- gastrin-releasing peptide, VIP-vasoactive intestinal peptide, CCK-cholecystokinin,
 α - MSH- α -melanocyte-stimulating hormone, LHRH- luteinizing hormone-releasing hormone

3.3. Studované látky

3.3.1. ^{111}In -DOTA-TATE (^{111}In -DOTA]-Tyr³-oktreotát)

Oproti [Tyr³] oktreotidu byl v molekule [Tyr³]oktreotátu na C-konci threoninol (Thr-ol) nahrazen přírodní aminokyselinou threoninem pro posouzení efektů dalšího záporného náboje na buněčný uptake (Richtrová M., 2008). Inkorporací chelátoru DOTA vzniká konjugovaný peptid [DOTA⁰, Tyr³] oktreotát (DOTA-TATE) (obr. 12), který může být značen radionuklidy jako ^{90}Y , ^{111}In a ^{177}Lu . V in vitro studiích byla pozorována jeho vysoká a specifická vazba k somatostatinovým receptorům a afinita k sstr 2 (Breeman a kol., 2003).

V porovnání s ^{111}In -DOTA-NOC má ^{111}In -DOTA-TATE nižší koncentraci radioaktivity v orgánech potkanů. Renální clearance ^{111}In -DOTA-NOC byla nižší než clearance ^{111}In -DOTA-TATE (Cihlo a kol., 2008). In vitro metody ukázaly vysokou renální akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC ve srovnání s ^{111}In -DOTA-TATE. Renální uptake byl částečně snížen inhibitory receptorové endocytózy a blokováním na energii závislých procesů (Trejtnar a kol., 2008)



Obr. 12. Struktura DOTA-Tyr³-oktreotátu (DOTA-TATE)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Experimentální zvířata

Při pokusech bylo použito laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 350–400 g z chovné stanice BIOTEST s.r.o., Konárovice, ČR. Zvířata byla chována za konvenčních podmínek při 12-ti hodinovém světelném režimu. 12 hodin před pokusy byla zvířatům odejmuta potrava.

4.1.2. Chemikálie

- DOTA-TATE=DOTA-Tyr³-oktreotátu=DOTA-D-Phe-Cys-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (piCHEM, Graz, Austria)
- Collagenase type IV (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Hovězí albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)
- Probenecid (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

4.1.3. Použité přístroje

- Centrifuga 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
- Světelný mikroskop Meopta, ČR

4.2. Metody

4.2.1. Příprava roztoků

Příprava roztoků byla prováděna spolupracovníky. Zásobní roztoky pro přípravu Krebs-Henseleitových roztoků A a B se připravovaly ve větším množství. Z nich se včas potřeby připravovaly Krebs-Henseleit A a B roztoky, které se smísily za vzniku pracovního roztoku Krebs-Henseleit.

1) HANKS zásobní

název chemikálie	navážka g/l
NaCl	80
KCl	4
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,6
nebo Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,21
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2

2) HANKS pracovní

název chemikálie, roztoku	množství
HANKS zásobní	40 ml
destilovaná H ₂ O	360 ml
NaHCO ₃ bezvod.	0,880 g
HEPES	1,05 g

3) HANKS I – k promytí ledvin

název složky	množství
HANKS pracovní	280 ml
EGTA	53,2 mg
Roztok do 1. kádinky vyhřívané vodní lázni	

4) HANKS II – k rozvolnění ledvinné tkáně

název složky	množství
HANKS pracovní	120 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	35,3 mg
nebo CaCl ₂ .2H ₂ O bezvod.	26,7 mg
kolagenáza	120 mg
Roztok do 2. kádinky vyhřívané vodní lázni	

5) Zásobní roztoky KREBS – HENSELEIT – připravují se v čas potřeby v dostatečném množství a to smísením Krebs-Henseleitova roztoku A a B.

KREBS – HENSELEIT A

název roztoku	množství v ml
destil. H ₂ O	235,5
NaCl	60
KCl	45
CaCl ₂	33
MgSO ₄ .7H ₂ O	15
KH ₂ PO ₄	6

KREBS – HENSELEIT B

název roztoku	množství v ml
NaHCO ₃	300

Dále se připravovaly roztoky:

KREBS-HENSELEIT buňky a inkubační, vychlazený v ledové drti

500 ml KREBS-HENSELEIT zásobní

500 ml destil. H₂O

3 g HEPES

KREBS-HENSELEIT buňky a glukóza, vychlazený v ledové drti

150 ml KREBS-HENSELEIT buňky a inkubační

150 mg glukóza

KREBS-HENSELEIT buňky, glukóza, albumin, kolagenáza

50 ml KREBS-HENSELEIT buňky a glukóza

50 mg kolagenóza

1,25 g Albumin bovine

pH u všech roztoků bylo upravováno na 7,4 pomocí roztoků HCl (3,6g/50ml) a NaOH (2g/50ml)

4.2.2. Příprava izolovaných ledvinných buněk

Příprava aparatury (připravené spolupracovníky)

Systém obsahuje vodní lázeň, v které jsou ponořené dvě 400 ml kádinky obsahující promývací a rozvolňovací tekutinu. Peristaltickou pumpu na zajištění recirkulace perfuzního média a druhou na zajištění vhánění perfuzní tekutiny do ledvin, perfuzní dvouplášťovou nádobu, vyhřívanou vodou s teplotou 37°C, obsahující cirkulující tekutinu, která je okysličovaná směsí 95% O₂ a 5% CO₂, kovovou kanylu zavádějící tekutinu do ledvin, lapač bublin k zabránění vniknutí vzduchové bubliny do ledvin, vodný ultratermostat U1, který udržuje teplotu vodní lázně na 37 °C.

Preparace ledvin a izolace ledvinných buněk (připravené spolupracovníky)

Do 1. kádinky bylo nalito 280 ml roztoku HANKS I, jím naplněna aparatura, zapnuto prokysličování pneumoxidem a soustava nechána temperovat za neustálé recirkulace asi 15 minut na teplotu 37°C. Do 2. kádinky bylo nalito 120 ml roztoku HANKS II a přidána kolagenáza. Po vytemperování obou roztoků bylo upraveno pH na 7,4.

Vyjmuté ledviny byly opláchnuty teplým fyziologickým roztokem a ponořeny do 1. kádinky, kde došlo k propláchnutí tkáně během cca 3 minut. Poté byly ledviny přeneseny do 2. kádinky a sledovány cca 20 minut.

Když bylo rozvolnění kolagenního pojiva ledvinných buněk dostatečné, bylo přeneseno do skleněné misky s 50 ml roztoku Krebs-Henseleit buňky obsahujícím albumin, kolagenázu, kde bylo provedeno úplné rozvodnění ledvinné tkáně mechanicky pinzetou a po té míchadélkem na elektromagnetické míchačce s mírným zahřátím na 30°C v roztoku po dobu cca 10-15 minut.

Získaná suspenze ledvinných buněk byla přefiltrována přes gázu a silikonové sítko s oky 85µm a centrifugována v silnostěnných zkumavkách při 4°C (928 ot./min, 5 min.)

Supernatant byl odsán a ledvinné buňky nesuspendovány v 5 ml Krebs-Henseleit buňky a glukóza vychlazeného na 2°C a provedena centrifugace (4°C, 728 ot./min., 1 min.) celkem třikrát.

Stanovení počtu a životnosti ledvinných buněk

Stanovení se provádí pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem (zvětšení 10x10) ze 100µl vzorku, který byl připraven smísením 100 µl suspenze ledvinných buněk a 100 µl trypanové modři.

Byl zaznamenán počet jasně svítících živých buněk a počet modře zbarvených mrtvých a zjištěn průměr živých buněk.

Životnost buněk byla určena jako poměr živých buněk a součtu živých a mrtvých (v %). Počet buněk byl vypočítaný podle vzorce $PB = \text{životnost} \cdot 10^4 \cdot \text{ředení} \cdot \text{počet ml suspenze}$. Podle počtu buněk byla naředěna suspenze tak, aby koncentrace buněk byla $2 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Inkubace

Do inkubační směsi byl pipetovaný 1 ml suspenze buněk o koncentraci buněk $2 \cdot 10^6/\text{ml}$. Zkumavky byly potom temperované 5 min v inkubátoru při teplotě 37°C při rychlosti kmitání 280 kmitů/min. Potom se k buňkám přidaly studované látky, které se lišily podle typu pokusu a na závěr bylo přidáno 10 µl radioaktivně značeného peptidu. Takto

připravená suspenze byla inkubovaná potřebnou dobu při teplotě 37°C. Po skončení inkubace se naráz přidaly 4 ml ledového Krebs-Henseleit buňky a inkubačního pufru. Po centrifugaci 1 min. při 80g a teplotě 4°C bylo odebráno 0,5 ml supernatantu na měření aktivity média. Zbytek média byl opatrně odsátý a buňky byly dispergované v dalších 4 ml ledového pufru. Následovala opět centrifugace za stejných podmínek a toto promývání puftrem se opakovalo ještě dvakrát. Po poslední centrifugaci a odsátí supernatantu se suspenze buněk kvantitativně přenesla do měřicí nádoby 3x opakovaným výplachem inkubační zkumavky.

Měření radioaktivity

Radioaktivita v inkubačním médiu a buněčné frakci byla měřena pomocí gama-spektrometru v intervale 1 minuty.

4.2.3. Uspořádání akumulčních studií

V akumulčních studiích byla zjišťována kumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana za různých podmínek. V těchto experimentech byl dále studován vliv potenciálních inhibitorů uptake - probenecidu a albuminu v různých koncentracích a byly porovnávány získané hodnoty.

4.2.3.1. Stanovení závislosti akumulace ^{111}In -DOTA-TATE na době inkubace

Buněčná suspenze byla napipetována po 1 ml do inkubačních zkumavek a bylo přidáno 10 μl značených peptidů. Takto připravené suspenze se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C v časových intervalech 2, 10, 30 minut nebo 2, 5, 10, 20, 30 minut za třepání rychlostí 280 kmitů/minutu. Po uplynutí příslušného časového intervalu byla inkubace zastavena a buněčná frakce byla izolována podle postupu v kapitole Inkubace.

4.2.3.2. Studium vlivu potencionálních inhibitorů na akumulaci

¹¹¹In-DOTA-TATE

Do inkubační směsi byl vložen 1 ml suspenze buněk a do části inkubačních zkumavek byla přidána studovaná látka (vzorky bez dané látky sloužily jako kontrola). Potom byl do suspenze přidán peptid ¹¹¹In-DOTA-TATE v množství 10 µl a vzorky byly inkubované 30 minut při 37 °C za třepání s rychlostí 280 kmitů/minutu. Po uplynutí příslušného časového intervalu byla inkubace zastavena a buněčná frakce byla izolována podle pokynů v kapitole Inkubace.

Použité látky

Prvním studovaným inhibitorem byl probenecid v koncentracích 0,25 mM, 1,25 mM. Zkoušen byl také albumin v inkubačních koncentracích 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM.

4.2.3.3. Vyjádření výsledků

Radioaktivita kumulovaná v buněčné frakci v jednotlivých experimentech byla porovnávána s radioaktivitou standardů, které obsahovaly stejné množství radiopeptidu jako byla dávka vložená do inkubační směsi (tzn. 10 µl). Při každém experimentu se připravily 3 standardy s obsahem 10 µl preparátu ¹¹¹In-DOTA-TATE a 9 ml destilované vody. Tyto standardy byly měřené zároveň s experimentálními vzorky. Ze zjištěných hodnot aktivit standardů byl vypočten průměr a tato hodnota byla považována za vloženou aktivitu, s kterou se počítalo při výpočtu. Ze zjištěných hodnot radioaktivity byly u každého experimentálního vzorku vypočítané radioaktivita na 10⁶ buněk a počet procent radioaktivity, který byl kumulovaný v buňkách z vložené dávky.

4.3. Výsledky

4.3.1. Životnost ledvinných buněk

Životnost získaného preparátu izolovaných ledvinných buněk potkana byla zjištěna pomocí hodnocení exkluze trypanové modři postupem uvedeným v článku 4.2.2. Experimenty shrnuje tabulka 2.

označení experimentu	počet živých buněk	počet mrtvých buněk	životnost (%)
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

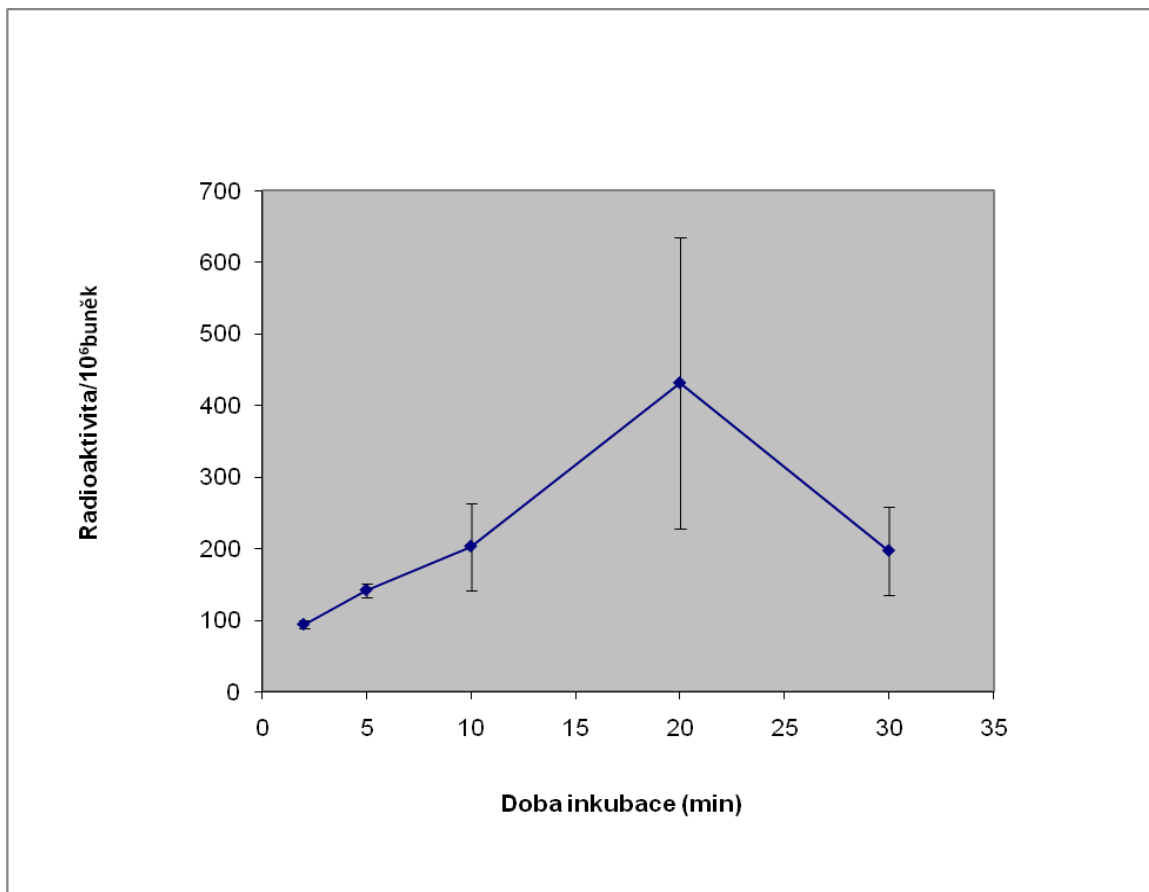
4.3.2. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace

Tabulky 3-5 a grafy 1-3 zobrazují výsledky tří studií akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v izolovaných ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace při konstantním množství peptidu (10 μl). Výsledky jsou přepočítané na procenta aktivity v 10^6 buněk vůči celkové vložené aktivitě. Inkubace probíhaly při teplotě 37°C.

Tabulka 3. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana v závislosti na době inkubace (Experiment 1)

Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buňkách (cpm)	Radioaktivita/ 10^6 buněk (cpm)	Průměrné hodnoty radioaktivity (cpm)	Uptake % D/ 10^6 buněk	Průměrné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buněk)
2	106,5	85	94 ± 6	0,16	$0,18 \pm 0,01$
	119,5	95		0,18	
	126,0	101		0,19	
5	160,4	128	142 ± 10	0,25	$0,27 \pm 0,02$
	194,4	156		0,30	
	169,0	135		0,26	
	183,1	147		0,28	
10	362,8	291	203 ± 61	0,55	$0,39 \pm 0,11$
	283,8	227		0,43	
	177,8	142		0,27	
	188,3	151		0,29	
20	290,0	232	431 ± 203	0,44	$0,82 \pm 0,39$
	311,4	250		0,48	
	901,7	722		1,38	
	647,8	519		0,99	
30	166,3	133	197 ± 62	0,25	$0,37 \pm 0,12$
	281,3	225		0,43	
	178,3	143		0,27	
	355,8	285		0,54	

Průměrná radioaktivita standardu: D = 52391 cpm/10 μl



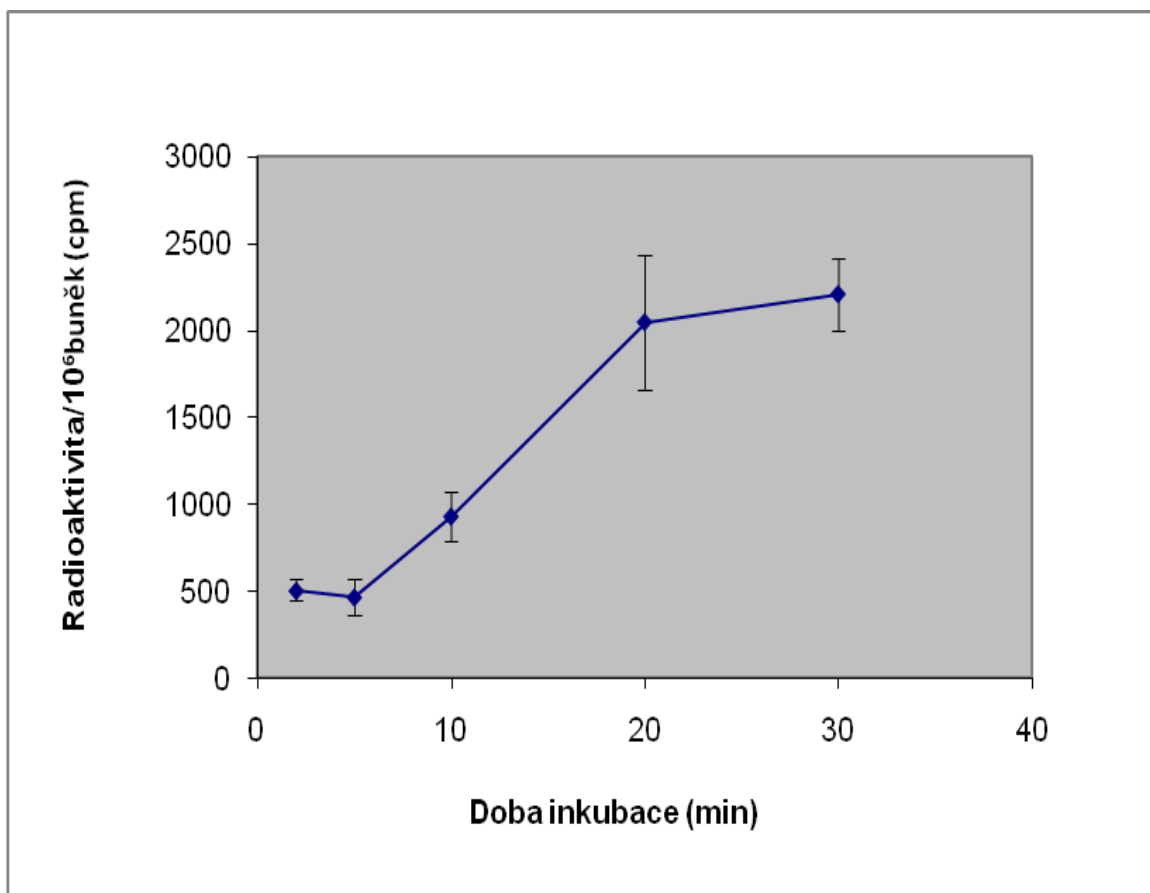
Graf 1. Závislost uptake ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace ($\bar{x} \pm s.d.$)

4.3.3. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace

Tabulka 4. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana v závislosti na době inkubace (Experiment 2)

Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buňkách (cpm)	Radioaktivita/ 10^6 buněk (cpm)	Průměrné hodnoty radioaktivity (cpm)	Uptake % D/ 10^6 buněk	Průměrné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buněk)
2	771,3	419	506 ± 62	0,02	$0,02 \pm 0$
	1029,5	560		0,02	
	989,1	538		0,02	
5	825,6	449	469 ± 105	0,02	$0,02 \pm 0$
	1114,8	606		0,02	
	646,6	352		0,01	
10	1592,1	866	932 ± 142	0,04	$0,04 \pm 0$
	1352	735		0,03	
	2022	1099		0,04	
	1891	1028		0,04	
20	3230	1756	2045 ± 385	0,07	$0,08 \pm 0,02$
	4761,3	2589		0,11	
	3293,3	1791		0,07	
30	4366,7	2374	2205 ± 208	0,10	$0,09 \pm 0,01$
	3645,6	1982		0,08	
	3707,5	2016		0,08	
	4501,4	2448		0,10	

Průměrná radioaktivita standardu: D = 2465724 cpm/10 μ l



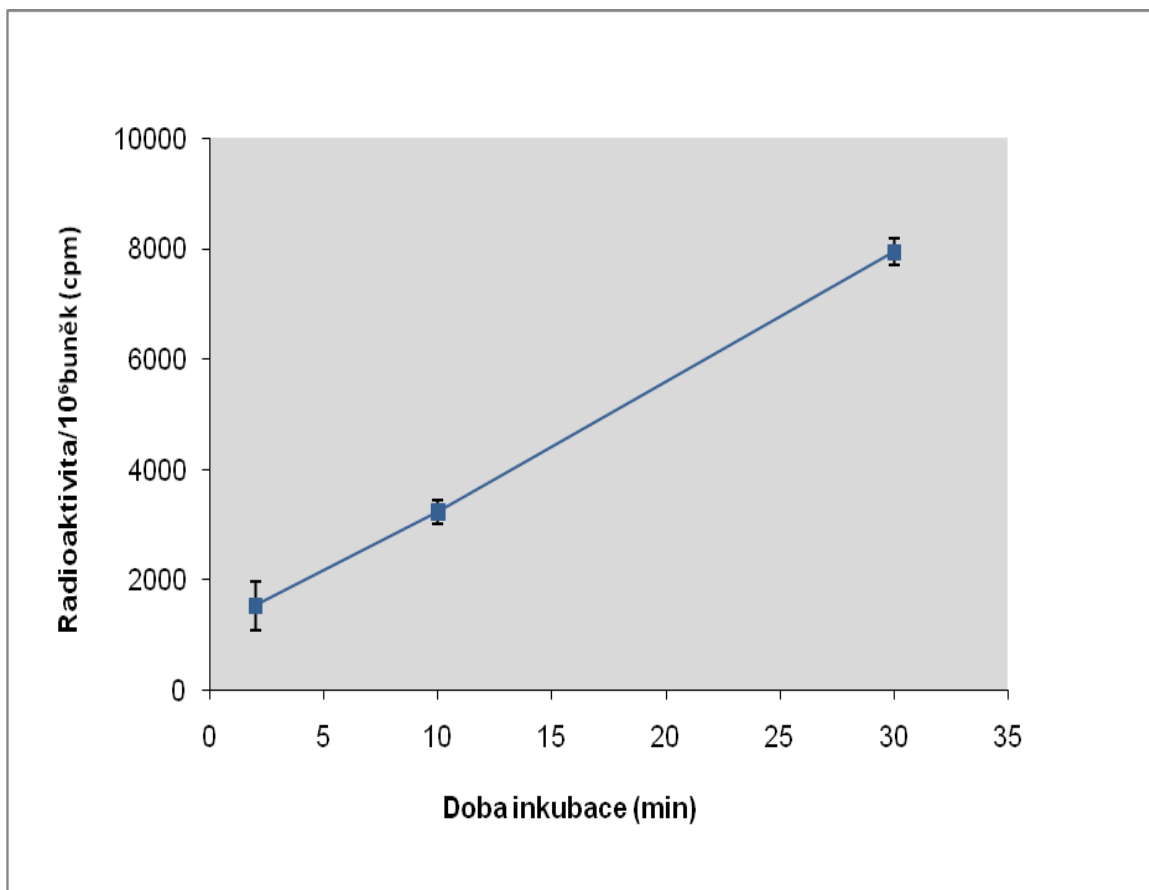
Graf 2. Závislost akumulace ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace ($\bar{x} \pm s.d.$)

4.3.4. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace

Tabulka 5. Uptake ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana v závislosti na době inkubace (Experiment 3)

Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buňkách (cpm)	Radioaktivita/ 10^6 buněk (cpm)	Průměrné hodnoty radioaktivity (cpm)	Uptake % D/ 10^6 buněk	Průměrné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buněk)
2	2492,5 1983,1 3951,7	1355 1078 2147	1527 ± 453	0,05 0,04 0,08	$0,06 \pm 0,02$
10	5302,5 6030,7 6205,2 6200,3	2882 3277 3372 3370	3225 ± 202	0,11 0,13 0,13 0,13	$0,13 \pm 0,01$
30	15173,1 13961,0 14817,7 14447,8	8246 7588 8053 7852	7935 ± 244	0,33 0,30 0,32 0,31	$0,32 \pm 0,01$

Průměrná radioaktivita standardu: D = 2528446 cpm/10 μ l



Graf 3. Závislost uptake ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace ($\bar{x} \pm s.d.$)

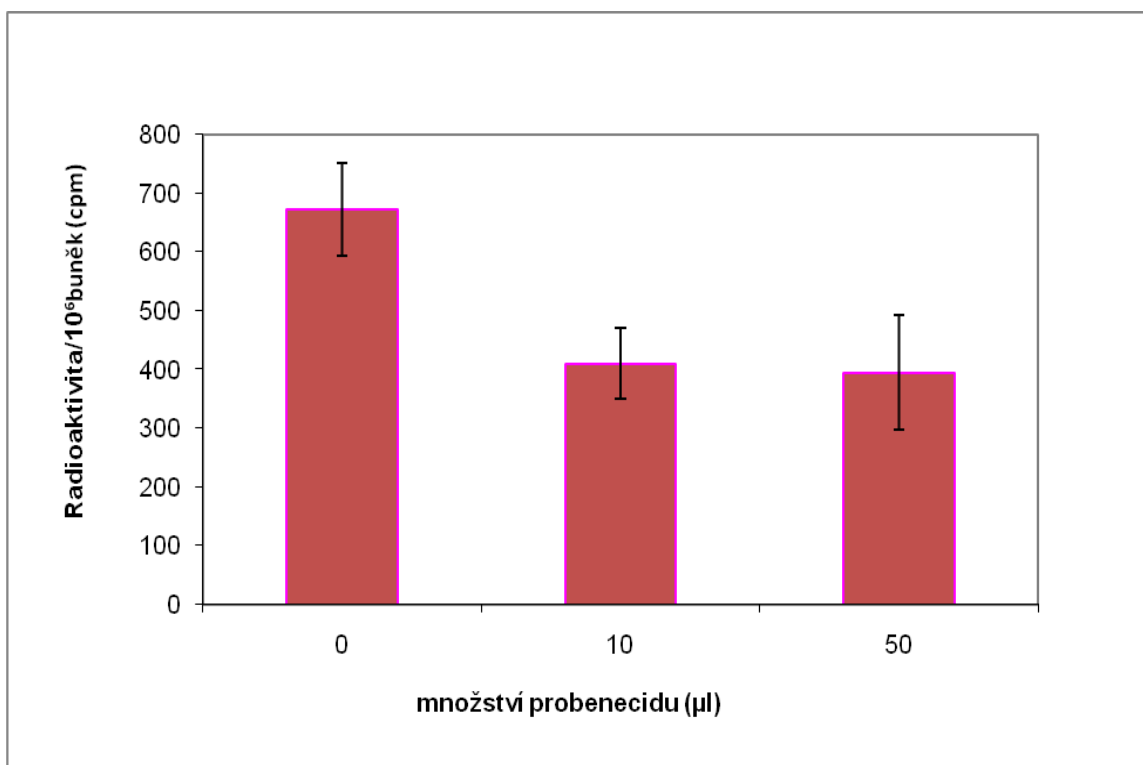
4.3.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v přítomnosti probenecidu

Tabulka 6. a graf 4. uvádějí výsledky získané při studiu akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana po dobu 30 minut inkubace v přítomnosti vybraných koncentrací probenecidu. Výsledky jsou vztaženy na procenta aktivity v 10^6 buněk vůči celkové vložené aktivitě. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty měření bez a v přítomnosti probenecidu.

Tabulka 6. Akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v ledvinných buňkách v přítomnosti vybraných koncentrací probenecidu (inkubace 30 min.)

Koncentrace probenecidu (mM)	Radioaktivita v buňkách (cpm)	Radioaktivita / 10^6 buněk (cpm)	Průměrné hodnoty radioaktivity (cpm)	Uptake % D/ 10^6 buněk	Průměrné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buněk)
0	1254,5 1130,6 1472,7 1515,5	627 565 736 758	672 ± 79	0,12 0,10 0,14 0,14	$0,13 \pm 0,02$
0,25	1148,2 651,4 763,6 717,4	574 326 382 358	410 ± 97	0,11 0,06 0,07 0,07	$0,08 \pm 0,02$
1,25	946,1 857,1 712,8 641,2	473 428 356 321	395 ± 60	0,09 0,08 0,07 0,06	$0,08 \pm 0,01$

Průměrná radioaktivita standardu: D = 540534 cpm/10 μ l



Graf 4. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana v přítomnosti vybraných koncentrací probenecidu po inkubaci 30 min. ($\bar{x} \pm s.d.$)

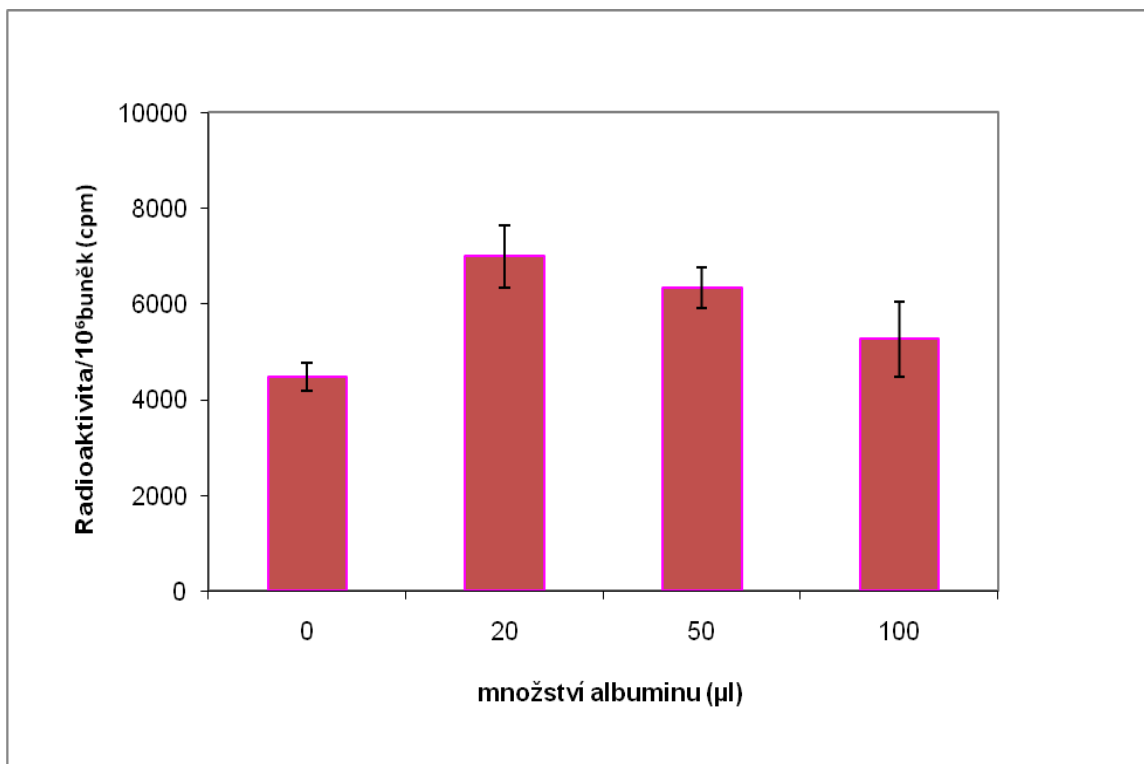
4.3.6. Akumulace $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$ v ledvinných buňkách v přítomnosti albuminu

Tabulka 7. a graf 5. uvádějí výsledky získané při studiu akumulace $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$ v ledvinných buňkách potkana po dobu 30 minut inkubace v přítomnosti tří různých koncentrací albuminu. Výsledky jsou vztaženy na procenta aktivity v 10^6 buněk vůči celkové vložené aktivitě. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty měření bez albuminu a při jeho přítomnosti v různých koncentracích.

Tabulka 7. Akumulace $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$ v ledvinných buňkách v přítomnosti vybraných koncentrací albuminu

Koncentrace albuminu (mM)	Radioaktivita v buňkách (cpm)	Radioaktivita / 10^6 buněk (cpm)	Průměrné hodnoty radioaktivity (cpm)	Uptake % D/ 10^6 buněk	Průměrné hodnoty uptake (% D/ 10^6 buněk)
0	6292,5 5577,8 5474,2	4870 4317 4237	4475 ± 282	0,32 0,28 0,27	0,29 ± 0,02
0,1	8749,4 10152,7 8187,1	6772 7858 6337	6989 ± 640	0,44 0,51 0,41	0,45 ± 0,04
0,25	7480,6 8256,4 8800	5790 6390 6811	6330 ± 419	0,38 0,41 0,44	0,41 ± 0,02
0,5	6396,8 5786,1 8202,8	4951 4478 6349	5259 ± 749	0,32 0,29 0,41	0,34 ± 0,05

Průměrná radioaktivita standardu: D = 1541761 cpm/10 μ l



Graf 5. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách potkana v přítomnosti vybraných koncentrací albuminu po inkubaci 30 min. ($\bar{x} \pm s.d.$)

5. DISKUZE

Experimenty provedené v rámci této diplomové práce byly uskutečněné na ledvinných buňkách, které byly získané izolací z ledvin potkana kolagenázovou metodou. Ta spočívá v rozvolnění tkaniva ve vypreparovaných ledvinách roztokem obsahujícím kolagenózu, která štěpí mezibuněčné kolagenové spoje. Tyto čerstvě izolované ledvinné buňky byly po dalších úpravách použité k akumulačním studiím se studovaným radioaktivně značeným analogem somatostatinu.

Prvním krokem bylo ověření životnosti získaných buněk jejich spočtením v Bürkerově komůrce. Suspenze buněk byla obarvena trypanovou modří a došlo k průniku barbiva do buněk. Živé buňky s neporušenou membránou mají zachovaný aktivní eflux barbiva z buňky. Na druhé straně mrtvé buňky mají tento mechanismus poškozen, a proto zůstávají obarveny. Životnost ledvinných buněk se pohybovala v rozmezí od 89% do 94%. Taková životnost je dobře akceptovatelná pro provedení daného typu experimentálních studií.

Provedené experimenty byly zaměřené na studium akumulace radioaktivně značeného somatostatinového analogu - ^{111}In -DOTA-TATE - v ledvinných buňkách a na ovlivnění jeho akumulace potencionálními inhibitory buněčného uptake. Uptake radioaktivity buněčné frakce v každém vzorku byl přepočítán na 10^6 buněk a tato hodnota byla vztažena k aktivitě standardů, tj. dávce radiopeptidu vloženého do inkubační směsi.

V první sérii pokusů byly vzorky buněk se studovanou látkou inkubovány za standardních podmínek různou dobu - od 2 do 30 minut. Ve všech třech provedených experimentech docházelo k postupnému zvyšování akumulované radioaktivity v závislosti na době inkubace. V prvním experimentu jsme pozorovali velký rozptyl hodnot při inkubaci po dobu 20 minut. Při relativně nízkém záchytu může i malá odchylka v provedení experimentu vyústit v relativně velké rozdíly hodnot. Ovšem v dalších experimentech (experimenty 2 a 3) nebyl takto velký rozptyl hodnot zaznamenán. Šlo tedy spíše o náhodný jev spojený možná s nedostatečnou rutinou v začátku práce. Při druhém i třetím experimentu došlo k největšímu nárůstu akumulace ve 30. minutě.

Zjištěná míra akumulace v buňkách se mezi výše uvedenými experimenty poměrně výrazně lišila a pohybovala se po 30 min. inkubace v rozpětí 0,09-0,37 %/ 10^6 buněk. Z tohoto důvodu by stanovení průměrné hodnoty pro uptake ^{111}In -DOTA-TATE z těchto tří experimentů nebylo zcela validní a spíše lze uvádět rozsah této kumulace. Protože se jedná o nativní buňky, vysvětlení může spočívat v relativně vysoké

interindividuální variabilitě mezi zvířaty a preparáty buněk získaných z jejich ledvin. Dalším faktorem může být i nedostatečná míra rutiny při prvních experimentech. Nejvíce se publikovaným údajům blíží hodnoty uptake nalezené v experimentu 1 a 3, při kterých se průměrná hodnota akumulované radioaktivity pohybovala po 30 minutách inkubace kolem 0,3% AD/10⁶. Tato hodnota uptake se dobře shoduje s údajem 0,3% AD/10⁶ buněk uváděné v literatuře (Trejtnar a kol. 2008).

V dalších pokusech jsme studovali možnosti snížení nežádoucí akumulace studovaného radiopeptidu v ledvinných buňkách. Použili jsme dva potencionální inhibitory uptake studovaného radiopeptidu. Zároveň jsme se pomocí těchto dvou substrátů různých transportních systému pokusili zjistit, který z transportních mechanismů by mohl být odpovědný za transport radiopeptidů do ledvinných buněk.

První testovanou látkou byl probenecid, který inhibuje transport organických anionů blokadou příslušných transportérů. V pokuse došlo překvapivě ke značnému snížení akumulace radiopeptidu u vzorku s koncentrací 0,25 mmol/l až na 61 % v porovnání s aktivitou kontrolního vzorku. Při pětinasobné koncentraci probenecidu byl výsledek podobný. Tyto výsledky by mohly ukazovat na účast transportérů pro organické anionty na uptake ¹¹¹In-DOTA-TATE. Avšak v pilotních studiích prováděných na pracovišti se ukázalo, že použité koncentrace probenecidu mohou být již potencionálně cytotoxické. Přestože šlo o studii s jiným typem ledvinných buněk (linie OK buněk z vačice), je možné předpokládat i podobný účinek u používaných buněk z ledvin potkana. Snížený uptake by tak mohl být i následek nižšího počtu funkčních buněk v přítomnosti probenecidu. Tato skutečnost musí být ovšem potvrzena dalšími následnými experimenty.

Druhou zkoušenou látkou byl albumin, který je substrátem megalin/cubilinového transportního systému. Jeho účinek na uptake ¹¹¹In-DOTA-TATE jsme zkoumali při třech různých koncentracích. Namísto očekávané inhibice uptake, došlo při všech koncentracích albuminu k paradoxnímu nárůstu akumulace radiopetidu. Koncentrace 0,1 mM albuminu způsobila zvýšení akumulace ¹¹¹In-DOTA-TATE na 156 % oproti kontrolním vzorkům bez albuminu. I u dalších dvou vyšších koncentrací albuminu v inkubační směsi byl pozorován vyšší uptake než v kontrolních vzorcích. Protože přidavek albuminu do živného média je doporučován některými autory jako prostředek pro zvýšení stability buněk v preparátech (Jones 1979), bylo by možné zvýšený uptake radiopetidu v přítomnosti albuminu přičítat lepšímu stavu ledvinných buněk. Účast megalinového receptoru na akumulaci ¹¹¹In-DOTA-TATE jsme tedy nepotvrdili.

Míra akumulace ^{111}In -DOTA-TATE v izolovaných ledvinných buňkách potkana je v porovnání s dalším podobným peptidem - ^{111}In -DOTA-NOC – nižší (Popadičová, 2009). DOTA-NOC obsahuje ve své molekule lipofilní naftylový zbytek, který může významně zvyšovat lipofilitu této sloučeniny ve srovnání s DOTA-TATE, který takovou lipofilní strukturu neobsahuje. Kromě možné vyšší afinity k systémům pro aktivní transport, může být vyšší uptake ^{111}In -DOTA-NOC způsoben také i jeho vyšším průnikem přes lipofilní buněčnou membránu buněk pasivním transportem.

6. ZÁVĚR

1. Test životnosti pomocí trypanové modře ukázal vysokou životnost ledvinných buněk potkanů a jejich využitelnost pro daný typ experimentálních studií.
2. Byla provedena akumulační studie s vývojovým receptorově specifickým peptidem-¹¹¹In-DOTA-TATE. V těchto experimentech byl pozorován nárůst uptake peptidu s dobou inkubace. Byla pozorována variabilita výsledků akumulačních studií mezi jednotlivými preparáty ledvinných buněk. Obecně však míra akumulace odpovídala publikovaným údajům.
3. Experimenty s potencionálními inhibitory ledvinného uptake radiopeptidů ukázaly možnou účast transportérů pro peptidy na kumulaci ¹¹¹In-DOTA-TATE v ledvinných buňkách. Uskutečněné pokusy však nepotvrdily účast megalinového endocytárního systému na uptake studovaného radiopeptidu.
4. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-TATE in vitro byla v provedených experimentech nižší než akumulace uváděná pro příbuzný peptid ¹¹¹In-DOTA-NOC.

7. LITERATURA

Bendayan R: Renal drug transport Pharmacotherapy. Nov-Dec;16(6):971-85 (1996)

Breeman WA, De Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP: Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. Jun;30(6):917-20 (2003)

Daniel H and Rubio-Aliaga I: An update on renal peptide transporters. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 284: F885-F892 (2003)

Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM: Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. J. Pharm. Sci. Apr;90(4):397-421 (2001)

Cihlo J, Melicharová L, Petrik M, Laznickova A, Laznicek M: Comparison of ^{111}In -DOTA-NOC and ^{111}In -DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: conflicting results in vitro and in vivo. Anticancer Res. Jul-Aug;28(4B):2189-95 (2008)

Chanson P, Timsit J, Harris AG: Clinical pharmacokinetics of octreotide. Therapeutic applications in patients with pituitary tumours. Clin. Pharmacokinet. Nov;25(5):375-91 (1993)

Christensen EI and Birn H: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 280: F562-F573 (2001)

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)

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, and Benya RV: International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. Pharmacol. Rev. March; 60(1): 1-42 (2008)

Jones DP, Sundby GB, Ormstad K, Orrenius S.: Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* ;28(6):929-35 (1979)

Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G: Renal Tubular Drug Transporters. *Nephron. Physiol*;103:p97–p106 (2006)

Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Cwiertka K: Mechanisms of multidrug resistance and their clinical implications II. Atypical MDR. *Klin. Onkologie* 2, 10-17 (2002)

Okarvi SM: Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat. Rev.* Feb;34(1):13-26 (2008)

Popadičová L: Štúdium obličkovej bioeliminácie xenobiotík na bunkovej úrovni II. Diplomová práca, Univerzita Karlova v Praze (2009)

Richtrová M: Studium transportních mechanismů pro xenobiotika. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze (2008)

Rubio-Aliaga I, Daniel H: Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica.* Jul;38(7-8):1022-42 (2008)

Somogyi A: Renal transport of drugs: specificity and molecular mechanisms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* Oct-Nov;23(10-11):986-9 (1996)

Trejtmar F, Laznicek M: Analysis of renal handling of radiopharmaceuticals. *Q. J. Nucl. Med.* Sep;46(3):181-94 (2002)

Trejtmar 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.* Dec;22(10):859-67 (2008)

Verroust PJ and Christensen EI: Megalin and cubilin—the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 1867-1871 (2002)

Weckbecker G, Raulf F, Stolz B, Bruns C: Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacol Ther.* Nov;60(2):245-64 (1993)