

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM LEDVINNÉHO TRANSPORTU LÉČIV
IN VITRO
STUDY OF DRUG RENAL TRANSPORT IN VITRO**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2011

Jana Loužecká

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 2011

Podpis:

Děkuji Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc., vedoucímu diplomové práce, za pomoc a rady poskytnuté při řešení a zpracování práce a společně s paní Ivanou Filipovou za přípravu ledvinných buněk a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále děkuji Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za značení studovaných peptidů radionuklidy.

OBSAH

1	ABSTRAKT	5
2	ABSTRACT.....	7
3	ZADÁNÍ PRÁCE	9
4	ÚVOD.....	11
5	TEORETICKÁ ČÁST	14
5.1	VYLUČOVÁNÍ LÁTEK LEDVINAMI	15
5.1.1	Sekreční a reabsorpční mechanismy v tubulech ledvin.....	16
5.2	RADIOFARMAKA TYPU RECEPTOROVĚ-SPECIFICKÝCH PEPTIDŮ.....	19
5.2.1	Úvod.....	19
5.2.2	Použití peptidů jako radiofarmak.....	20
5.2.3	Značení peptidů radionuklidy	21
5.2.4	Minigastriny.....	24
5.3	^{99m} Tc-DMSA.....	29
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
6.1	MATERIÁL.....	31
6.1.1	Biologický materiál.....	31
6.1.2	Chemikálie	31
6.1.3	Použité přístroje	31
6.2	METODIKA	32
6.2.1	Preparace ledvin a izolace a separace ledvinných buněk.....	32
6.2.2	Stanovení životnosti buněk.....	32
6.2.3	Značení testovaných látek radionuklidy	32
6.2.4	Akumulační buněčné studie.....	32
6.2.5	Vyjadřování výsledků a statistické hodnocení.....	33
6.3	VÝSLEDKY	35
6.3.1	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana	35
6.3.2	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana	38
6.3.3	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-MG46 v ledvinných buňkách potkana	43
6.3.4	Akumulace ^{99m} Tc-DMSA v ledvinných buňkách potkana	45
6.3.5	Porovnání akumulace zkoumaných látek	48
7	DISKUZE	49
8	SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE	53
9	POUŽITÁ LITERATURA	55

1 ABSTRAKT

Zjištění zvýšené exprese určitých typů receptorů pro regulační peptidy v některých nádorech vedlo ke zkoumání analogů regulačních peptidů jako potencionálních receptorově-specifických radiofarmak pro zobrazování a cílenou terapii nádorů. Jednou z perspektivních skupin těchto peptidů jsou analogy gastrinu a cholecystokininu. Avšak kumulace radiopeptidů v ledvinné tkáni může způsobit radiotoxické poškození ledvin a limitovat jejich klinické využití. Studium ledvinných mechanismů je tedy základním předpokladem dalšího vývoje v této skupině.

Cílem této práce bylo sledovat *in vitro* míru akumulace derivátů gastrinu – DOTA-minigastrinů (DOTA-MG) značených indiem-111 a zkoumat mechanismus jejich uptake v ledvinných buňkách. Za využití ledvinného buněčného modelu byla hodnocena akumulace tří sloučenin - ^{111}In -DOTA-MG11, ^{111}In -DOTA-MG45 a ^{111}In -DOTA-MG46.

Experimenty byly prováděny za použití izolovaných ledvinných buněk potkana získaných z nativní ledvinné tkáně. Ledvinné buňky byly využity ke sledování míry akumulace ^{111}In -minigastrinů. Pro posouzení podílu aktivních a pasivních transportních mechanismů na ledvinném uptake byla stanovena akumulace za fyziologické a za snížené teploty. Pro posouzení kvantity akumulace ^{111}In -DOTA-minigastrinů byla jako srovnávací látka použita $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimerkaptojantarová kyselina ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA), která se aktivně kumuluje v ledvinných buňkách. Případná účast megalinového endocytárního systému na ledvinném uptake ^{111}In -minigastrinů byla testována s využitím albuminu, inhibitoru tohoto systému.

Výsledky dokumentují, že ^{111}In -minigastriny vykazují relativně nízkou míru akumulace v ledvinných buňkách potkana. Uptake ^{111}In -minigastrinů je odlišný a klesá v pořadí ^{111}In -DOTA-MG45 > ^{111}In -DOTA-MG11 > ^{111}In -DOTA-MG46. Avšak ve srovnání s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA byl uptake všech ^{111}In -minigastrinů mnohonásobně nižší. Částečné snížení uptake (20-40%) bylo zjištěno v buňkách inkubovaných za nízké teploty, kdy jsou inhibovány energeticky závislé procesy, ale signifikantní snížení bylo pozorováno pouze u ^{111}In -DOTA-MG11 a ^{111}In -DOTA-MG46. V pokusu s albuminem se nepodařilo prokázat snížení uptake. Ze získaných výsledků je patrné, že studované radioaktivně značené minigastriny se vyznačují relativně nízkou akumulací v ledvinných buňkách *in vitro* a na jejich transportu přes buněčné membrány se v rozhodující míře podílí pasivní transportní mechanismy s částečným příspěvkem aktivních transportních mechanismů.

2 ABSTRACT

The finding of increased expression of certain types of regulatory peptide receptors in some tumors led to research on regulatory peptide analogs as potential receptor-specific radiopharmaceuticals for imaging and tumor-targeted therapy. Analogues of gastrin and cholecystokinin belong to one of the perspective groups. However, accumulation of radiopeptides in the renal tissue may cause radiotoxic renal damage and may limit their clinical use. Study of renal mechanisms is therefore an essential premise for further developments in this group.

The aim of this work was to study *in vitro* the rate of renal accumulation of gastrin derivatives, DOTA-minigastrins (DOTA-MG), labeled with indium-111, and to examine general mechanisms responsible for their uptake in kidney cells. Accumulation of three compounds, ^{111}In -DOTA-MG11, ^{111}In -DOTA-MG45 and ^{111}In -DOTA-MG46 was evaluated using a renal cellular model.

Experiments were carried out using isolated rat cells obtained from native rat renal kidney tissue. The renal cells were used to determine the rate of accumulation of ^{111}In -minigastrins. To evaluate the participation of active and passive transport mechanisms in the renal uptake, accumulation under physiological and decreased temperature was determined. To assess the quantity of ^{111}In -DOTA-minigastrin accumulation, a comparative agent, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimercaptosuccinic acid ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA), actively accumulated in the kidney was used. Possible participation of the endocytic megalin system in the renal uptake of ^{111}In -DOTA-minigastrins was tested by using an inhibitor of the system, albumin.

The results indicated that ^{111}In -minigastrins showed relatively low rate of accumulation in the rat kidney cells. The uptake was different and decreasing in the order ^{111}In -DOTA-MG45 > ^{111}In -DOTA-MG11 > ^{111}In -DOTA-MG46. However, the accumulation of all ^{111}In -minigastrins was much lower in comparison with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA. A partial reduction (20-40%) of the uptake in the cells incubated at low temperature when energy-dependent processes were inhibited was found but a significant decrease was observed only in ^{111}In -DOTA-MG11 and ^{111}In -DOTA-MG46. Albumin failed to reduce uptake in ^{111}In -DOTA-MG11. The found data show that the studied radiolabelled minigastrins are characterized by a relatively low accumulation in the rat renal cells *in vitro* and their transport across the cellular membranes is mediated mainly by passive transport with a partial contribution of active transport mechanisms.

3 ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo s pomocí izolovaných ledvinných buněk potkana stanovit *in vitro* ledvinnou akumulaci tří peptidů ze skupiny analogů gastrinu s připojeným chelátátorem DOTA, na který je navázán radionuklid indium-111. Ledvinná akumulace studovaných radiopeptidů byla dále porovnána s akumulací ^{99m}Tc -DMSA, která se vyznačuje značným vychytáváním v ledvinných buňkách. Dalším cílem bylo posouzení obecných mechanismů, kterými jsou peptidy transportovány do ledvinných buněk, tj. do jaké míry se uplatňuje aktivní a pasivní transport a zda v transportu peptidů do buněk hraje roli aktivní endocytóza prostřednictvím systému megalin/kubilin. Cílem práce bylo též vytvořit teoretický přehled o možných mechanismech ledvinné exkrece léčiv a o významu radioaktivně značených receptorově specifických peptidů v nukleární medicíně, se zaměřením na charakterizaci vývoje skupiny analogů gastrinu.

4 ÚVOD

Velká pozornost v oblasti radiofarmak je v současné době věnována radioaktivně značeným analogům regulačních peptidů. Regulační peptidy zastávají v organismu fyziologickou funkci a možnost využití jejich analogů jako radiofarmak se otevřela s objevem, že některé typy lidských nádorů v hojné míře exprimují receptory pro tyto peptidy. Analogy regulačních peptidů jsou potenciálními receptorově-specifickými radiofarmaky, která mohou sloužit jak k zobrazování, tak k cílené terapii některých typů nádorů. Nejvíce prozkoumanými látkami jsou analogy somatostatinu a deriváty dalších peptidů, například gastrinu nebo bombesinu jsou podrobovány preklinickým a klinickým studiím. Jedním z omezení pro používání těchto látek je jejich akumulace, která může vyústit v nefrotoxické působení radiopeptidů. Tato vlastnost je důvodem, proč studium transportu v ledvinných buňkách je jednou z důležitých oblastí při studiu farmakokinetiky těchto látek.

Tato práce se zabývá analogy regulačního peptidu gastrinu – minigastriny. Gastrin je regulační peptid, který působí přes receptory pro cholecystokinin. Toto působení je dáno strukturní podobností gastrinu a cholecystokininu. Minigastriny jsou látky zkoumané jako potenciální radiofarmaka pro diagnostiku a léčbu nádorů exprimujících receptory pro cholecystokinin, jako je např. medulární karcinom štítné žlázy.

Použité zkratky

CCK	cholecystokinin
DMSA	dimerkaptojantarová kyselina (dimerkaptosuccinic acid)
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan- 1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
GLP-1-R	receptor pro glukagonu podobný peptid 1 (glukagon-like peptide 1)
GRP-R	receptor pro gastrin uvolňující peptid (gastrin releasing peptide)
LDL	low density lipoprotein
MG	minigastrin
MRP	multidrug- resistant associated proteins
NOTA	1,4,7- triazacyklonon-N,N',N''- trioctová kyselina
NPY-R	receptor pro neuropeptid Y
NT-R	receptor pro neurotensin
OATs	transportéry organických aniontů (organic anion transporters)
OCTs	transportéry organických kationtů (organic cation transporters)
PEPT	peptidové transportéry (peptide transporters)
PRRI	radioaktivní zobrazování pomocí peptidů vázajících se na specifický receptor (peptide-receptor radionuclide imaging)
PRRT	na peptidové receptory zaměřená radionuklidová terapie (peptide-receptor radionuclide therapy)
SST	somatostatin
TETA	1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
VIP-R	receptor pro vasoaktivní intestinální peptid

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 VYLUČOVÁNÍ LÁTEK LEDVINAMI

Vylučování látek ledvinami je proces, který slouží k udržování homeostázy v těle. Ledvinami jsou vylučovány látky, které v daném momentu homeostázu narušují. Patří sem již nevyužitelné zplodiny a zbytky metabolismu, látky sice pro organismus potřebné a využitelné, ale v daném okamžiku pro svoji koncentraci nadbytečné, nosiče vylučovaných látek a látky organismu cizorodé (léčiva, drogy, toxiny aj.). Existují čtyři možné varianty vylučování těchto látek ledvinami.

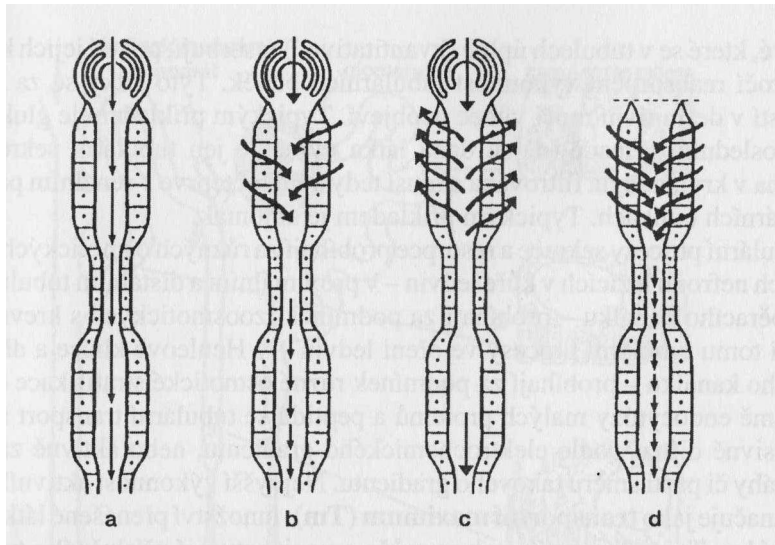
První variantou je vylučování výhradně glomerulární filtrací. Při tvorbě glomerulárního filtrátu dochází k ultrafiltraci krevní plazmy. Glomerulární filtrát má podobné složení jako krevní plazma, avšak chybí zde bílkoviny, takže onkotický tlak filtrátu je výrazně snížen. Pokud je látka vylučována pouze glomerulární filtrací, nejsou již v dalších částech nefronu žádné další mechanismy reabsorpce ani sekrece pro tuto látku. Jestliže se látka objeví v glomerulárním filtrátu a je vylučována touto formou vylučování, pak se musí objevit v definitivní moči. Příkladem takové látky je inulin, který rovněž slouží jako indikátor pro stanovení velikosti glomerulární filtrace.

Ve druhém případě jsou látky vylučovány kombinací glomerulární filtrace s tubulární sekrecí. Při tubulární sekreci tubulární buňky některé části nefronu odebírají látku z peritubulární krve a transportují jí do tubulární tekutiny. Taková látka je pak vylučována ve větším množství, než je množství, které se dostalo do glomerulárního filtrátu. Příkladem je p-aminohippurová kyselina.

Třetí možností je kombinace glomerulární filtrace s tubulární reabsorpcí. Příkladem takto vylučované látky je glukóza. Pro tubulární reabsorpci disponují určité tubulární buňky mechanismy, které transportují látku z tubulární tekutiny zpět do peritubulární krve. Část vylučované látky se tak vrací zpět do organismu a množství vylučované látky je pak nižší než množství přefiltrované do glomerulárního filtrátu.

Posledním mechanismem je tubulární sekrece. V tomto případě není látka obsažena v krvi, není filtrována a musí tedy vznikat teprve v renálním parenchymu. Příkladem je amoniak (Sedláček 2003).

Jednotlivé mechanismy vylučování jsou schematicky znázorněny na obr. 1.



Obr. 1 Schéma základních typů renální exkrece (Sedláček 2003)

a - glomerulární filtrace, b - glomerulární filtrace a tubulární sekrece, c - glomerulární filtrace a tubulární reabsorpce, d - tubulární sekrece

5.1.1 Sekreční a reabsorpční mechanismy v tubulech ledvin

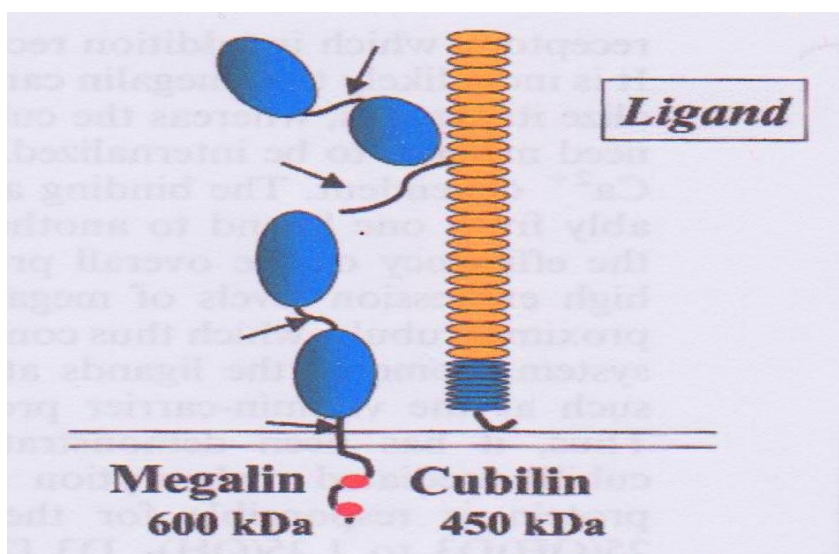
Pro látky, které jsou sekretovány a reabsorbovány v ledvinných tubulech, existuje řada transportérů. Mezi základní transportéry patří transportéry organických aniontů (OATs) a kationtů (OCTs). Tyto transportéry se nacházejí na basolaterální membráně buněk ledvinných tubulů. K dalším přenašečům patří například P-glykoproteinová skupina a MRP přenašeče (MRP= multidrug-resistant associated proteins).

V ledvinných tubulech existují rovněž transportéry pro látky peptidového charakteru. Reabsorpce dipeptidů a tripeptidů probíhá peptidovými transportéry pro oligopeptidy (PEPT= peptide transporters) na kartáčovém lemu apikální membrány renálních tubulárních buněk. U savců byly objeveny dva typy- PEPT1 a PEPT2. Peptidy s vyšší molekulovou hmotností typu oligopeptidů a proteinů jsou v ledvinných tubulech přenášeny do buněk systémem megalin/kubilin (Lysá 2008).

5.1.1.1 Transportní systém megalin/kubilin

Megalín a kubilín představují dva velké endocytární receptory, které jsou ve významné míře exprimovány v endocytárním aparátu ledvinného proximálního tubulu (Christensen a Birn 2001). Oba receptory jsou významné pro normální reabsorpci proteinů, což se ukázalo u proteinurií u myši s deficitem genu pro megalín a u psů postrádajících funkční kubilín (Verroust a Christensen 2002).

Megalin je transmembránový protein skládající se z přibližně 4 600 aminokyselin s velkou NH₂-terminální extracelulární doménou, jednou transmembránovou doménou a krátkým cytoplasmatickým koncem (obr. 2). Protein patří do rodiny LDL-receptorů (LDL= low-density lipoprotein). Kubilin je protein, skládající se z přibližně 3 600 aminokyselin, a na rozdíl od megalinu neobsahuje transmembránovou doménu (obr. 2). Extracelulární část obsahuje 27 domén (Christensen a Birn 2001).



Obr. 2 Schematické zobrazení dvou endocytárních receptorů- megalinu a kubilinu (Verroust a Christensen 2002)

Kubilin a megalin jsou tzv. multiligandové receptory, neboť pro tyto receptory bylo identifikováno množství ligandů (tab. 1). Některé ligandy se vážou na oba receptory a každý receptor má také své specifické ligandy (Verroust a Christensen 2002). Megalin je důležitý pro tubulární uptake a metabolismus mnoha hormonů a proteinů vázajících vitamíny, významný je také pro renální aktivaci vitamínu D hydroxylací. Navíc je megalin zapojen do tubulárního uptake potenciálně nefrotoxických léčiv, mezi které zahrnujeme například aminoglykosidy (Christensen a Birn 2001).

Tab. 1 Ligandy megalinu a kubilinu (Christensen a Birn 2001)

Megalin	Kubilin
<i>Proteiny vázající vitamíny</i>	
Transkobalamin- vitamín B ₁₂	Intrinsic faktor- vitamín B ₁₂
Vitamín D vázající protein	
Retinol vázající protein	
<i>Apolipoproteiny</i>	
Apolipoprotein B	Apolipoprotein A-I
Apolipoprotein E	HDL (high-density lipoprotein)
Apolipoprotein J/ clusterin	
Apolipoprotein H	
<i>Nízkomolekulární peptidy a hormony</i>	
PTH (parathormon)	
Insulin	
β ₂ -mikroglobulin	
Epidermální růstový faktor	
Prolaktin	
Lysozym	
Cytochrom-c	
α ₁ -mikroglobulin	
Transthyretin	
<i>Ostatní</i>	
Albumin	Albumin
RAP (receptor-associated protein)	RAP (receptor-associated protein)
Thyroglobulin	Lehké řetězce imunoglobulinů
Plasminogen	
Laktoferrin	
Ca ²⁺	
<i>Vícesytná léčiva</i>	
Aminoglykosidy	
Polymyxin B	
Aprotinin	
<i>Enzymy a enzymové inhibitory</i>	
PAI-1 (inhibitor aktivátoru plasminogenu)	
α- amyláza	

Ačkoliv jsou oba receptory strukturně velmi odlišné, mohou být funkčně spojeny. Nejpravděpodobnější je, že megalin dokáže navázat i internalizovat své ligandy, zatímco komplex kubilin-ligand potřebuje pro internalizaci megalin (Verroust a Christensen 2002). Interakce megalin/kubilin se zdá být důležitá pro endocytózu a recyklaci periferně připojeného kubilinu. Rovněž bylo prokázáno, že koexistence těchto receptorů je důležitá pro normální reabsorpci peptidů, protože absence či dysfunkce jednoho z těchto receptorů je spojena s výraznou tubulární proteinurií (Christensen a Birn 2001).

5.2 RADIOFARMAKA TYPU RECEPTOROVĚ-SPECIFICKÝCH PEPTIDŮ

5.2.1 Úvod

V posledních letech je v oblasti radiofarmak věnována velká pozornost radioaktivně značeným peptidům. Tyto peptidy lze s výhodou využít jak k zobrazování, tak k cílené terapii některých nádorů (Forrer a kol. 2007, Reubi a Mäcke 2008). Toto využití vyplývá z objevu, že v některých nádorech dochází ke zvýšené expresi receptorů pro tyto peptidy. Receptory jsou pak potenciálními cíly pro peptidy, které po navázání na receptor umožňují zobrazení nádoru nebo mohou sloužit jako nosič cytotoxické látky pro cílenou terapii nádoru.

Peptidy značené emitory gama záření (^{123}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) zobrazí tkáň exprimující dané receptory, jedná se o techniku radioaktivního zobrazování pomocí peptidů vázajících se na specifický receptor (peptide-receptor radionuclide imaging, PRRI). Kromě toho peptidy značené beta emitory (^{131}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{177}Lu) mají potenciál eradikovat tkáň exprimující tyto receptory, jedná se o na peptidové receptory zaměřenou radionuklidovou terapii (peptide-receptor radionuclide therapy, PRRT) (Dijkgraaf a kol. 2007, Zwanziger a Beck-Sickinger 2008).

Tab. 2 Tumory a exprese receptorů pro regulační peptidy (Reubi a kol. 2005)

Receptor	Typ nádoru
SST2	Neuroendokrinní nádory (gastroenteropankreatický nádor, paragangliom), feochromocytom, malobuněčný plicní karcinom, medulární karcinom štítné žlázy, karcinom prsu, nádory ledvin, lymfomy, gliomy, meduloblastomy
CCK2	Medulární karcinom štítné žlázy, gastrointestinální stromální nádor, malobuněčný plicní karcinom, gastroenteropankreatický nádor, ovariální stromální tumor
GRP-R	Nádory prostaty a prsu, gastrointestinální stromální nádor, malobuněčný plicní karcinom
NT1-R	Exokrinní karcinom pankreatu, meningiom, Ewingův sarkom
VIP-R	Gastrointestinální stromální nádor, další stromální nádory
NPY-R	Karcinom prsu, ovariální stromální tumor, nádory nadledvin
GLP-1-R	Insulinomy, gastrinomy

SST - somatostatin, CCK - cholecystokinin, GRP - gastrin-uvolňující peptid, NT - neurotensin, VIP - vasoaktivní intestinální peptid, NPY - neuropeptid Y, GLP-1 - glukagonu podobný peptid 1

Prvním peptidem, který byl objeven jako potencionální látka k zobrazování nádorů, byl somatostatinový analog oktreotid. Právě somatostatin a jeho receptory jsou v současné době nejvíce prozkoumány. Somatostatinové receptory jsou exprimovány neuroendokrinními nádory a somatostatinové analogy jsou využívány ke scintigrafii pacientů s tímto onemocněním (De Jong a kol. 2009, Kwekkeboom a kol. 2010).

Další peptidy jako minigastrin, glukagonu podobný peptid 1 (glukagon-like peptide 1, GLP-1), cholecystokinin (CCK), bombesin, substance P a neurotensin v současné době podléhají mnoha klinickým studiím a dalšímu vývoji (Dijkgraaf a kol. 2007, Nanda a kol. 2010).

5.2.2 Použití peptidů jako radiofarmak

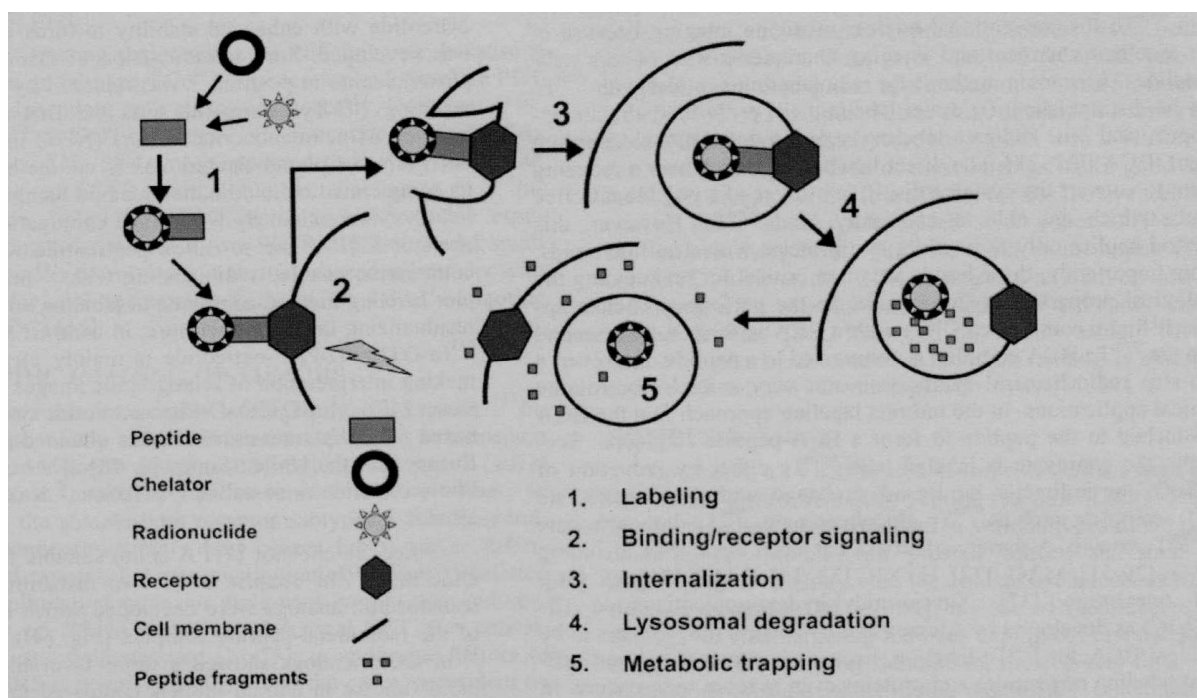
Peptidy studované jako potencionální radiofarmaka jsou většinou analogy regulačních peptidů tvořených v lidském těle. Regulační peptidy jsou vysoce účinné molekuly, které nebývají obvykle větší než 40 aminokyselin. Jsou syntetizovány převážně v mozku a gastrointestinálním traktu. Pro jejich malou molekulu jsou schopné rychle penetrovat téměř všemi tkáněmi. Jejich role jako signálních molekul vyžaduje rychlou degradaci v krvi pro zabránění jejich dlouhodobějšího účinku. Díky všudypřítomným peptidázám jsou tyto peptidy rychle degradovány. Kvůli rychlé degradaci a možnosti, že by tyto peptidy při použití k léčbě či zobrazování nedosáhly cílové tkáně, jsou většinou modifikovány, aby se této příliš rychlé degradaci zabránilo (Dijkgraaf a kol. 2007).

Analogy regulačních peptidů by pro použití jako radiofarmaka měly mít určité vlastnosti. Takové peptidy by měly mít v organismu dostatečnou stabilitu, vysoké vychytávání nádorovou tkání, nízké vychytávání ostatními tkáněmi a měly by být rychle odstraňovány z krve, preferenčně přes ledviny. Kromě toho by si měl peptid i po radioaktivním značení zachovat schopnost vázat se na specifický receptor a biologickou aktivitu (Dijkgraaf a kol. 2007).

Použití radioaktivně značených peptidových analogů nám nabízí oproti monoklonálním protilátkám a organickým analogům používaným v této oblasti některé výhody. Peptidové analogy jsou snadno syntetizovatelné na pevné fázi a lze je dobře modifikovat tak, abychom získali vhodné biologické vlastnosti a afinitu k receptoru. Poměrně rychle penetrují do cílových tkání a málo se vychytávají v ostatních tkáních.

Jejich výhodou je také odolnost vůči nepříznivým podmínkám při radioaktivním značení.

Hlavním limitujícím faktorem používání peptidů je jejich rychlá enzymatická degradace. Pro zamezení rychlé degradace bylo navrženo několik metod. Mezi nejpoužívanější patří nahrazení L-aminokyselin D-aminokyselinami, nahrazení aminoskupiny iminoskupinou, substituce peptidových vazeb, vložení neobvyklých aminokyselin či neobvyklá délka řetězce, amidace nebo cyklizace. Dalším problémem je, že modifikace peptidu včetně navázání radionuklidu mohou vést ke snížení afinity peptidu k receptoru (Dijkgraaf a kol. 2007). Princip působení radionuklidu značených peptidů je zobrazen na obr. 3.



Obr. 3 Princip internalizace a vychytávání značených peptidů (Dijkgraaf a kol. 2007)

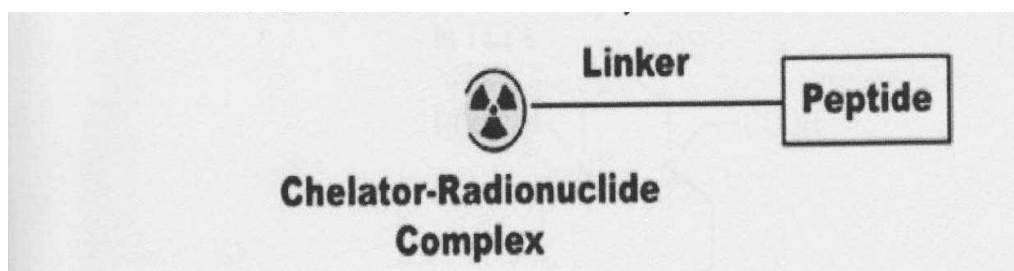
5.2.3 Značení peptidů radionuklidu

Značením peptidů rozumíme navázání radioaktivní částice k peptidu. Základní podmínkou úspěšného značení je, že tento postup nesmí ovlivnit vaznost peptidu na receptor. Mezi hlavní metody patří přímé značení nebo značení pomocí chelatačního činidla.

Přímé značení, které zahrnuje vznik kovalentní vazby mezi radionuklidem a peptidem, se u malých peptidů využívá jen velmi zřídka. Je to z toho důvodu, že přímé značení, ač na první pohled vypadá jako jednoduchý a snadno proveditelný postup, má

také několik nevýhod. Tento postup lze využít pouze u peptidů obsahujících disulfidový můstek, protože vznik kovalentní vazby spočívá v redukci disulfidového můstku na volný thiol, který je pak schopen tvořit kovalentní vazbu s radionuklidem. Využití redukčního agens pak může vést k těžko kontrolovanému procesu, což se může projevit změnami struktury, stability či farmakokinetických vlastností molekuly.

Mnohem častěji je u malých peptidů využíváno značení pomocí chelatačních činidel. Užívají se bifunkční chelatační činidla, která jsou na jedné straně pomocí spojovníku (linkeru) navázána na peptid a na druhé straně se váží s radionuklidem koordinační vazbou. Použití spojovníku mezi peptidem a chelatačním činidlem není vždy nutné, ale jeho využití nám umožňuje mnohem volněji vybrat chelatační činidlo a radionuklid. Každá složka označeného peptidu pak *in vivo* hraje svou roli. Peptid slouží jako nosič radionuklidu k receptoru, bifunkční chelatační činidlo jako koordinátor pro radionuklid a radionuklid jako zdroj radiace (Khan a Beck-Sickinger 2008). Schéma takto formulovaného peptidu je ukázáno na obr. 4.

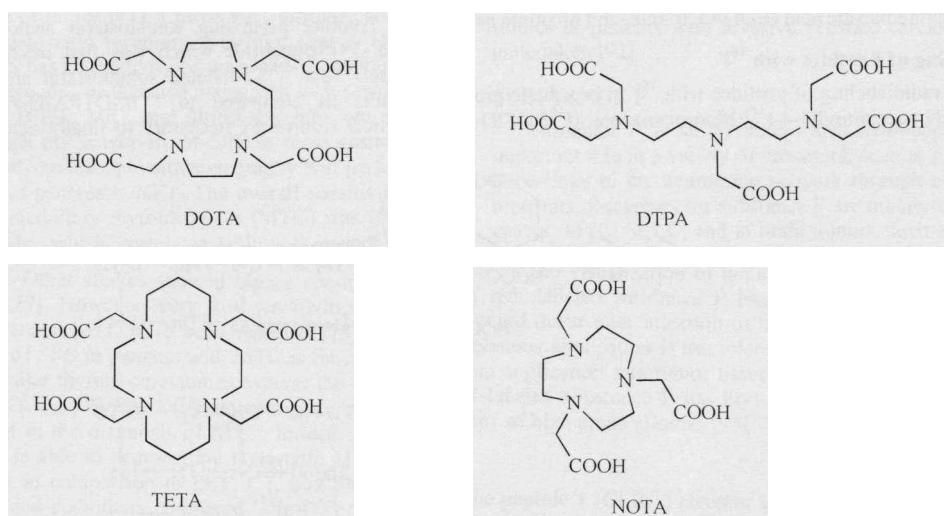


Obr. 4 Schéma cílově-specifických radiofarmak (Khan a Beck-Sickinger 2008)

Abychom splnili základní podmínku úspěšného značení- neovlivnit vaznost peptidu k receptoru, je velmi důležitá volba vhodného chelatačního činidla, radionuklidu a metody značení.

Při výběru chelatačního činidla zohledňujeme zejména povahu a oxidační stav iontu kovu, protože konjugace radionuklidu a specifického chelatačního činidla je charakterizována specifickou koordinací, která zajišťuje udržení radioaktivity. Vhodná stereochemie chelatačního činidla je pak velmi důležitá pro receptorově-specifické působení peptidů (Khan a Beck-Sickinger 2008). K diagnostickému a terapeutickému účelu byla vyvinuta již řada chelatačních činidel. Mezi nejpoužívanější patří 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N⁶,N¹¹,N¹⁴,N¹⁵-tetraoctová kyselina (DOTA). Toto makrocyclické chelatační činidlo zajišťuje stabilitu pro velké množství kovů. Stabilní komplex radionuklid-chelatační činidlo je vyžadován zejména pro terapeutické použití,

proto je DOTA nejpoužívanějším chelatačním činidlem pro PRRT. Největší nevýhodou použití DOTA je, že pro vysokou účinnost značení je potřeba vysokých teplot, což může poškodit peptid. Další často používaná chelatační činidla jsou diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA), 1,4,8,11- tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11- tetraoctová kyselina (TETA) a 1,4,7- triazacyklonan-N,N',N''- trioctová kyselina (NOTA) (Dijkgraaf a kol. 2007). Chemické struktury těchto chelatačních činidel jsou znázorněny na obr. 5.



Obr. 5 Různá chelatační činidla pro radioaktivní značení peptidů (Dijkgraaf a kol. 2007)

Volba vhodného radionuklidu je pak klíčovým faktorem ve vývoji jakéhokoliv radiofarmaka. Důležité faktory, které jsou zvažovány při výběru radionuklidu, jsou jeho poločas, způsob rozpadu, cena a dostupnost. Zejména poločas rozpadu je kritickým faktorem. Pro diagnostické zobrazování musí být poločas radionuklidu dostatečně dlouhý, aby umožnil syntézu značené sloučeniny a usnadnil akumulaci v cílové tkáni a zároveň umožnil očištění ostatních tkání od tohoto nuklidu. V ideálním případě by poločas měl být tak dlouhý, aby bylo možné dosáhnout obou těchto cílů (Khan a Beck-Sickinger 2008). Nejčastěji využívané radionuklidy včetně jejich základních charakteristik a způsobu využití jsou uvedeny v tab. 3.

Tab. 3 Základní charakteristiky radionuklidů užívaných pro radioaktivní značení peptidů (Khan a Beck-Sickinger 2008)

Radionuklid	Poločas	Emise záření	Použití
Měď ⁶⁴ (⁶⁴ Cu)	12,7 h	β^- , β^+ , γ	zobrazování i terapie
Galium-68 (⁶⁸ Ga)	68 min	β^+ , γ	spíše zobrazování
Indium-111 (¹¹¹ In)	67,9 h	γ	zobrazování
Yttrium-90 (⁹⁰ Y)	64,1 h	β^-	terapie
Rhenium-188 (¹⁸⁸ Re)	0,7 d	β^- , γ	terapie
Technecium-99m (^{99m} Tc)	6,0 h	γ	pouze zobrazování
Lutecium-177 (¹⁷⁷ Lu)	6,7 d	β^- , γ	pouze terapie
Samarium-153 (¹⁵³ Sm)	1,9 d	β^- , γ	terapie
Promethium- 149 (¹⁴⁹ Pm)	2,2 d	β^- , γ	spíše terapie

h = hodina, min = minuta, d = den

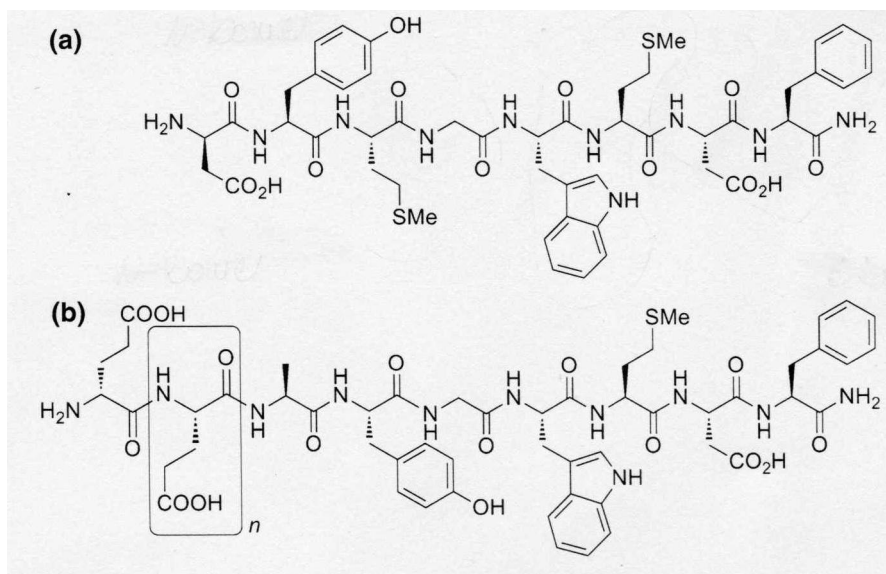
5.2.4 Minigastriny

Jako minigastriny označujeme analogy gastrinu/CCK (cholecystokininu), které jsou určeny k cílené diagnostice či terapii zaměřené zejména na nádory s expresí CCK-2 receptorů (Dijkgraaf a kol. 2007).

5.2.4.1 Cholecystokinin a CCK receptory

Cholecystokinin (obr. 6) je peptidový hormon, který byl nejprve nalezen v gastrointestinálním traktu a později bylo zjištěno, že je to také jeden z nejvíce rozšířených neuropeptidů v centrálním nervovém systému. Zpočátku byl charakterizován jako sekvence 33 aminokyselin, ale ukázalo se, že tento peptid se vyskytuje v různých biologicky aktivních formách, jako je například CCK39, CCK33, CCK8 a CCK4, a že všechny tyto formy pochází ze 115-aminokyselinového prekurzoru. Nejhojnějším peptidem v mozku je CCK8, jehož sekvence aminokyselin je Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (Noble a Roques 1999).

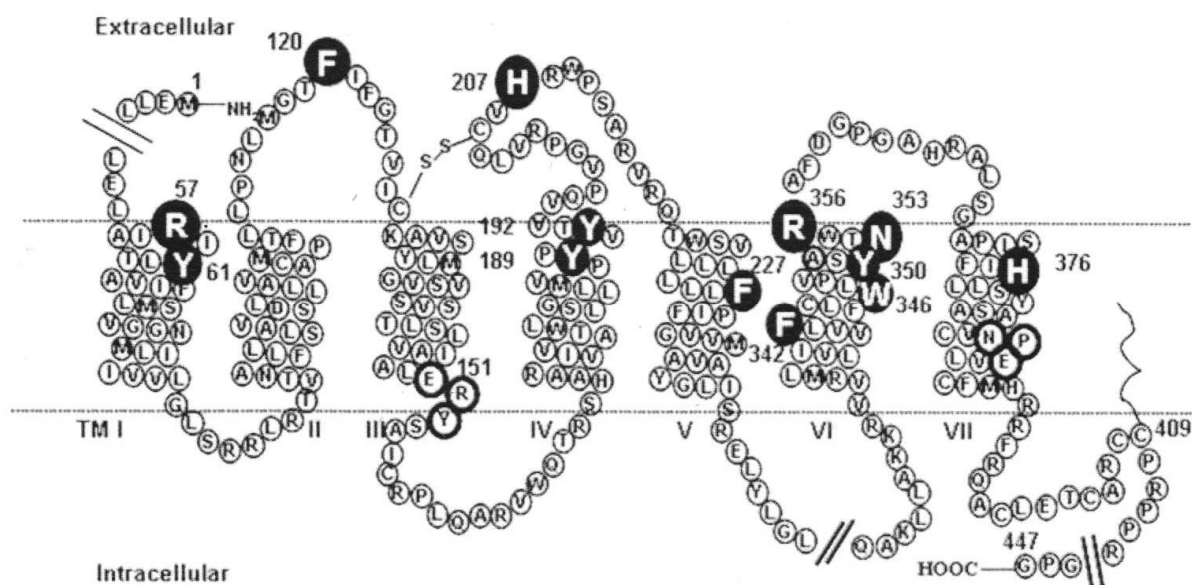
Prostřednictvím receptorů pro cholecystokinin působí také další endogenní peptid – gastrin (obr. 6). Tyto peptidy sdílejí stejný amidovaný C-terminální pentapeptid, ale liší se umístěním tyrosinového zbytku, který je v pozici 6 (gastrin) nebo 7 (CCK) (Wank 1998, Behr a kol. 1999).



Obr. 6 Molekulární struktura (a) CCK8 a (b) minigastrinu (n=0 MG11, n=5 MG0)
(Roosenburg a kol. 2010)

Dodnes byly identifikovány 3 typy CCK receptorů. CCK-1 receptor (dříve známý jako CCK-A receptor) byl poprvé objeven v pankreatických acinárních buňkách a nachází se především na periférii, ale také v některých regionech mozku. U člověka je jeho exprese v různých orgánech gastrointestinálního traktu na rozdíl od hlodavců omezená. CCK-2 receptor (dříve známý jako CCK-B receptor) byl objeven v mozku a je lokalizován v mozku, žaludku, slinivce a močovém měchýři. Aktivace tohoto receptoru v gastrointestinálním traktu gastrinem vede ke stimulaci sekrece žaludeční kyseliny (Noble a Roques 1999). Rozdíl mezi CCK-1 a CCK-2 je v afinitě ke gastrinu, různé distribuci a jejich molekulární struktuře. CCK-1 váže sulfatovaný cholecystokinin s 500-1000krát větší afinitou než nesulfatované analogy. Naopak CCK-2 receptor váže gastrin a cholecystokinin téměř se stejnou afinitou a nerozlišuje mezi sulfatovaným a nesulfatovaným CCK analogem (Noble a Roques 1999). Třetí typ CCK receptorů je CCK2i4sv, jedná se o spojenou variantu CCK-2 receptoru.

Všechny CCK receptory patří do skupiny receptorů spojených s G-proteinem, což znamená, že obsahují 7 transmembránových domén a po navázání ligandu je aktivována cesta druhého posla (Behé a Behr 2002) (obr. 7).



Obr. 7 Podoba lidského CCK-2 receptoru (Foucaud a kol. 2008)

CCK-1 a CCK-2/gastrin receptory byly identifikovány v mnoha normálních tkáních, ale také v různých nádorech. Skupina Reubiho identifikovala nečekaně vysokou incidenci (>90%) CCK-2 receptorů v medulárním karcinomu štítné žlázy (MTC), což bylo překvapující proto, že diferencované nádory štítné žlázy CCK-2 receptory neexprimují (Reubi a Waser 1996). CCK-2 receptory jsou také velmi často exprimovány u astrocytomů (65%) a stromálních ovariálních nádorů (100%). Několik ostatních typů nádorů jako meningiomy, endometriální a ovariální adenokarcinomy, plicní karcinomy a gastroenteropankreatické nádory občas exprimují CCK-2 receptory. Naopak CCK-1 receptory jsou u nádorů exprimovány jen zřídka (Reubi a kol. 1997).

5.2.4.2 CCK a gastrinové peptidy

Po zjištění, že CCK receptory jsou exprimovány i některými nádory, bylo provedeno mnoho studií pro získání vhodných radioligandů pro cílenou terapii nádorů exprimujících tyto receptory. Různé výzkumné skupiny syntetizovaly a charakterizovaly různé obměny radioaktivně značených CCK/gastrin peptidů (tab. 4). Všechny tyto analogy mají společnou C-terminální tetrapeptidovou sekvenci Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Ukázalo se, že přítomnost celé této terminální skupiny je nezbytná pro navázání na receptor, i když methionin může být nahrazen leucinem nebo norleucinem (Behr a kol. 1998, Behr a kol. 1999).

Jednou ze studií zabývajících se analogy gastrinu byla studie provedená Behrem s kolektivem, kteří se zabývali diagnostickým a terapeutickým využitím ¹³¹I-

radiojodovaného lidského gastrinu-I (tab. 4). Tento syntetický heptadekapeptid má afinitu k CCK-2 receptoru v nízkém nanomolárním rozmezí, zatímco afinita k CCK-1 je nejméně o čtyři řády nižší. Gastrin-I má na N-konci pyroglutamátovou skupinu, která je známá tím, že zajišťuje ochranu peptidu před rychlou enzymatickou degradací. Této výzkumné skupině se podařilo demonstrovat schopnost ^{131}I -značeného gastrinu-I se specificky vázat na nádory exprimující CCK-2 receptory stejně jako na CCK-2 receptory normálních tkání. Zjistili také, že nahrazení pentaglutamátové sekvence podobně polárním, ale nenabitým pentaglutaminem způsobilo snížení afinity a snížilo se vychytávání ve tkáních exprimujících receptory CCK-2 (Behr a kol. 1999).

Behr a kol. rok také studovali dva konjugované minigastriny s DTPA. U druhého minigastrinu byla první aminokyselina leucin nahrazena D-glutamovou kyselinou (tab. 4). Oba peptidy (minigastrin a D-Glu¹-minigastrin) byly derivovány benzyliothiokyanátem, derivátem DTPA, pro značení s ^{131}I nebo ^{90}Y . DTPA-D-Glu¹-minigastrin vykázal zlepšenou radiochemickou stabilitu oproti DTPA-Leu-minigastrinu a byl proto zkoumán v další studii (Behé a Behr 2002). Výhodou konjugace s DTPA cestou isothiokyanátu je, že vede ke konjugátu s pěti karboxylovými skupinami vhodnými ke konjugaci, zatímco DTPA-konjugáty normálně mají čtyři. Dodatečná karboxylová skupina může poskytovat lepší stabilitu pro chelataci s radionuklidy jako je ^{90}Y , o kterém je známo, že tvoří spíše nestabilní komplexy s konvenčními DTPA-konjugovanými peptidy (Fichna a Janecka 2003).

Další skupinou minigastrinů, která byla zkoumána, jsou peptidy značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Byla provedena derivace minigastrinu pomocí otevřeného řetězce buď přímo (Demogastrin-1) nebo pomocí různých spojovníků (Demogastrin-2 a 3) pro dosažení stabilního značení pomocí $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Po injekční aplikaci této látky myším byl příznivý poměr nádor-necílová tkáň zejména u $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrinu-2 (s glycinem vloženým mezi chelatačním činidlem a peptidem) (Nock a kol. 2005).

Prováděné studie se nezabývaly pouze minigastriny, ale také analogy cholecystokininu. Byla vyvinuta série nesulfatovaných CCK8 analogů. Peptidy byly přes N-konec navázány na DTPA nebo DOTA pro zajištění vazby radionuklidu. Tyto látky prokázaly poměrně vysokou specifitu vůči CCK-2 receptorům, která je dána přítomností nesulfatovaného tyrosinu (Reubi a kol. 1998).

Tab. 4 Struktury analogů gastrinu a cholecystokininu (dle Behr a kol. 1999 a Roosenburg a kol. 2010)

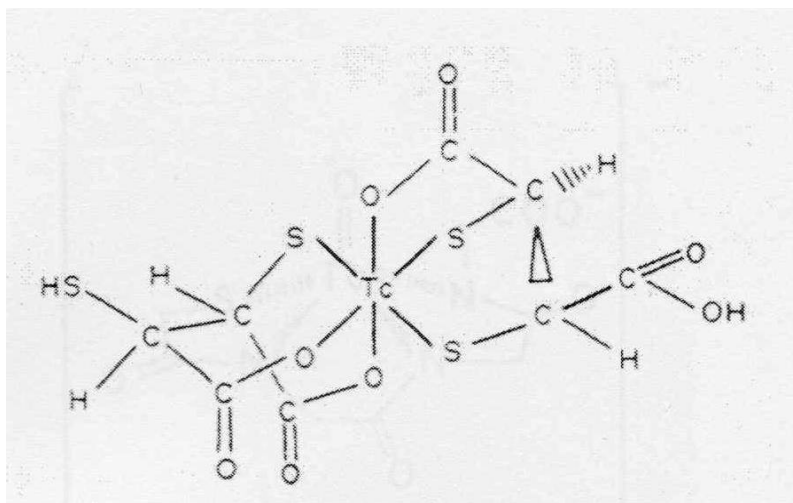
Peptid	Délka řetězce	Sekvence aminokyselin
Deriváty gastrinu		
Velký gastrin	34	pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
Gastrin-I	17	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
[Leu ¹⁵]-gastrin-I	17	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp-Leu-Asp-PheNH₂
[Gln ⁶⁻¹⁰]-gastrin-I	17	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
Minigastrin	13	Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
[D-Leu ¹]-minigastrin	13	D-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
[Gln ²⁻⁶]-minigastrin	13	Leu-Gln-Gln-Gln-Gln-Gln-Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
Gastrin-I fragment 11-17	7	Ala-Tyr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
Gastrin-I Fragment 1-14	14	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly- Trp
Deriváty cholecystokininu (CCK)		
Caerulein	10	pGlu-Gln-Asp-Tyr-Thr-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
[Thr ²⁸ ,Nle ³¹]-sCCK-25-33	9	Arg-Asp-Tyr(OSO ₃ H)-Thr-Gly- Trp-Nle-Asp-PheNH₂
sCCK-8	8	Asp-Tyr(OSO ₃ H)-Met-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
nsCCK-8	8	Asp-Tyr-Met-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
[Tyr(SO ₃ H) ²⁷]CCK-26-29	4	Asp-Tyr(OSO ₃ H)-Met-GlyNH ₂
Peptidy charakteru gastrinu i CCK		
Cionin	8	Asn-Tyr(OSO ₃ H)-Tyr(OSO ₃ H)-Gly- Trp-Met-Asp-PheNH₂
des-BOC-pentagastrin	5	β-Ala- Trp-Met-Asp-PheNH₂
CCK fragment 30-33	4	Trp-Met-Asp-PheNH₂

Sekvence vázající se na receptor je znázorněna tučně.

5.3 ^{99m}Tc -DMSA

^{99m}Tc -dimerkaptojantarová kyselina (obr. 9) je sloučenina, která byla zavedena jako radiofarmakum v roce 1974 (Enlander a kol. 1974) a stále je sloučeninou volby pro statickou renální scintigrafii. Ještě před zavedením této sloučeniny jako radiofarmaka se samotná 2,3-dimerkaptojantarová kyselina užívala v dávkách 1-2 g na léčbu otrav antimonem, olovem a rtutí. Toto využití bylo efektivní a žádné klinické nebo laboratorní nežádoucí účinky nebyly zaznamenány (Wang a kol. 1965).

^{99m}Tc -DMSA je i v současné době hojně využívanou sloučeninou, která se používá k zobrazování mnoha nádorů. Obvyklá dávka ^{99m}Tc -DMSA u lidí obsahuje méně než 0,5mg DMSA, takže bezpečnostní rezervy se zdají být velké (Enlander a kol. 1974). Navzdory rozšířenému užívání ^{99m}Tc -DMSA není mechanismus jejího vychytávání v ledvinných buňkách stále plně objasněn. Bylo prokázáno, že tato sloučenina je soustředěna v proximálních tubulárních buňkách ledvin (Willis a kol. 1977). ^{99m}Tc -DMSA může vstupovat do proximálních tubulárních buněk buď glomerulární filtrací a následnou reabsorpcí nebo přímým vychytáváním z peritubulárních kapilár. Protože se tato sloučenina vysoce váže na plazmatické bílkoviny, je glomerulární filtrace nevýznamná a k vychytávání dochází spíše na peritubulární straně buněk (Chervu a Blaufox 1982).



Obr. 9 Chemická struktura Tc-DMSA (Moretti a kol. 1984)

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pracovní postup byl převzat z diplomové práce Kubačková T. (2010).

6.1 MATERIÁL

6.1.1 Biologický materiál

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

6.1.2 Chemikálie

- $^{99m}\text{Tc-DMSA} = ^{99m}\text{Tc-dimerkaptojantarová kyselina}$ (Lacomel, Praha)
- $^{111}\text{In-DOTA-MG11} = ^{111}\text{In-DOTA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH}_2$ (PiChem, Rakousko)
- $^{111}\text{In-DOTA-MG45} = ^{111}\text{In-DOTA-(dGln)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-PheNH}_2$ (PiChem, Rakousko)
- $^{111}\text{In-DOTA-MG46} = ^{111}\text{In-DOTA-dGln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH}_2$ (PiChem, Rakousko)
- Albumin bovinní (Sigma-Aldrich, SRN)

6.1.3 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 WizardTM3'' (Wallac, Turku, Finsko)
- Světelný mikroskop (Meopta, ČR)

6.2 METODIKA

6.2.1 Preparace ledvin a izolace a separace ledvinných buněk

Preparace, izolace a separace buněk z ledvin byly prováděny spolupracovníky. Primární ledvinné buňky potkana byly připravovány dvoufázovou kolagenázovou perfúzní metodou (Jones a kol. 1979).

6.2.2 Stanovení životnosti buněk

Stanovení počtu živých buněk a životnosti preparátu bylo prováděno spolupracovníky v Bürkerově komůrce po obarvení trypanovou modří.

6.2.3 Značení testovaných látek radionuklidy

Značení testovaných látek radionuklidy bylo prováděno spolupracovníky.

6.2.4 Akumulační buněčné studie

Suspenze získaných buněk byla doplněna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na objem, při kterém byla koncentrace $2 \cdot 10^6$ buněk na 1 ml. Buňky byly dispergovány a pipetovány po 1ml do inkubačních zkumavek a ponechány 5 minut v inkubátoru temperovaném na 37°C při rychlosti kmitání 250 kmitů/min. Při inkubacích za nízké teploty byly zkumavky se stojánkem umístěny v krabici s ledovou tříští o teplotě 2-4°C. Poté bylo ke vzorku přidáno určené množství zkoumané látky značené radioaktivním izotopem a vzorky byly inkubovány určenou dobu při teplotě 37°C nebo 2-4°C.

Jako základní objem zkoumané látky bylo určeno 10 μ l, při experimentech studujících závislost akumulace látky na podané dávce byly ke vzorku přidávány vybrané objemy zkoumané látky. Základní inkubační interval byl 30 min. V experimentech studujících dynamiku akumulace v závislosti na čase byly vzorky inkubovány ve vybraných časových intervalech.

Po skončení inkubace byly vždy ke vzorkům přidány 4 ml Krebs- Henseleitova roztoku bez albuminu a glukózy o teplotě 4 °C. Po následné centrifugaci (1 min, 80g, 4 °C) bylo odebráno 0,5 ml media na měření do připravené scintilační lahvičky a přidalo se k němu 10 ml destilované vody. Zbytek media v inkubační zkumavce byl odsán a

buňky byly dispergovány v dalších 4ml Krebs- Henseleitova roztoku, následovala centrifugace a promytí se pak ještě dvakrát zopakovalo.

Po poslední, tedy čtvrté centrifugaci (3 min, 80g, 4 °C), a odsátí media bylo k buňkám přidáno postupně 2, 3 a 4 ml fyziologického roztoku, čímž byly buňky kvantitativně přeneseny do měřicí lahvičky. Lahvičky byly poté uzavřeny a na gama-spektrometru byla změřena jejich radioaktivita.

Vložené dávky radioaktivity (standarty) byly připravovány v triplikátech a jejich radioaktivita byla měřena stejným způsobem jako u vzorků na gama-spektrometru.

V akumulačních studiích byl zkoumán uptake ^{111}In -DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě, přidáváno bylo 10 μl peptidu v koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$. Dále byl sledován uptake ^{111}In -DOTA-MG11 v ledvinných buňkách v přítomnosti albuminu, ligandu transportního systému megalin/kubilin. Vzorky byly rozděleny do tří skupin, k první skupině bylo přidáno místo albuminu 100 μl pufru s glukózou, ke druhé skupině 10 μl albuminu (o koncentraci 280 mg/ml) a 90 μl pufru s glukózou, ke třetí skupině buněk bylo přidáno 100 μl albuminu (konc. 280 mg/ml). Nakonec bylo ke všem vzorkům přidáno 10 μl ^{111}In -DOTA-MG11 o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ a vzorky byly inkubovány 30 min. při 37 °C. Z dalších analogů minigastrinu byl zkoumán uptake ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana a to v závislosti na teplotě, podané dávce i v závislosti na čase. Uptake v závislosti na teplotě byl sledován také u ^{111}In -DOTA-MG46.

Pro kvantitativní srovnání míry akumulace těchto analogů minigastrinu byl stanoven také uptake $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, látky, která se výrazně kumuluje v ledvinných buňkách. Do inkubační směsi bylo přidáváno 10 μl látky o koncentraci 0,24 mg/ml.

6.2.5 Vyjadřování výsledků a statistické hodnocení

Radioaktivita buněčné frakce (cpm) byla vztažena na 1.10^6 buněk a vyjádřena jako procenta vložené dávky radioaktivity. Vložená dávka radioaktivity byla zjišťována měřením radioaktivity tripletu standardů, vzorků obsahujících stejné množství radiopeptidu jako bylo vloženo do experimentálních vzorků. Z těchto hodnot pak bylo vypočítáno 1% vložené dávky.

Z jednotlivých experimentálních údajů byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka průměru. Získané výsledky byly hodnoceny s použitím programu

GraphPad Prism 5.02 s pomocí nepárového t-testu. Signifikance byla sledována na hladině významnosti $P < 0,05$.

6.3 VÝSLEDKY

6.3.1 Akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana

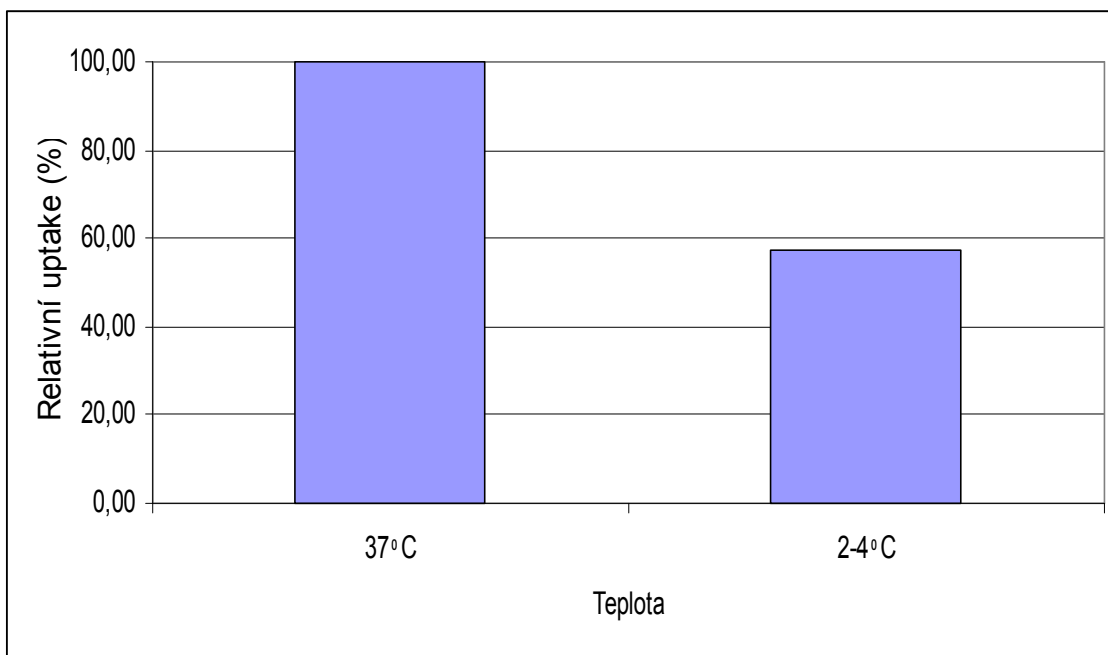
Relativní uptake ¹¹¹In-DOTA-MG11 v závislosti na teplotě zobrazuje tab. 5 a obr. 10. Snížení uptake při nižší inkubační teplotě bylo při srovnání s uptake při 37 °C statisticky významné ($P < 0,05$). Výsledky druhého pokusu, kdy do vzorků byl kromě peptidu přidáván albumin (ALB) nebo pufr s glukózou (inkubace 30 min při 37 °C), zobrazuje tab. 6 a obr. 11. Vliv albuminu na akumulaci nebyl signifikantní. Závěrečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG11 při dané teplotě a za daného množství přidaného albuminu.

Tab. 5 Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě

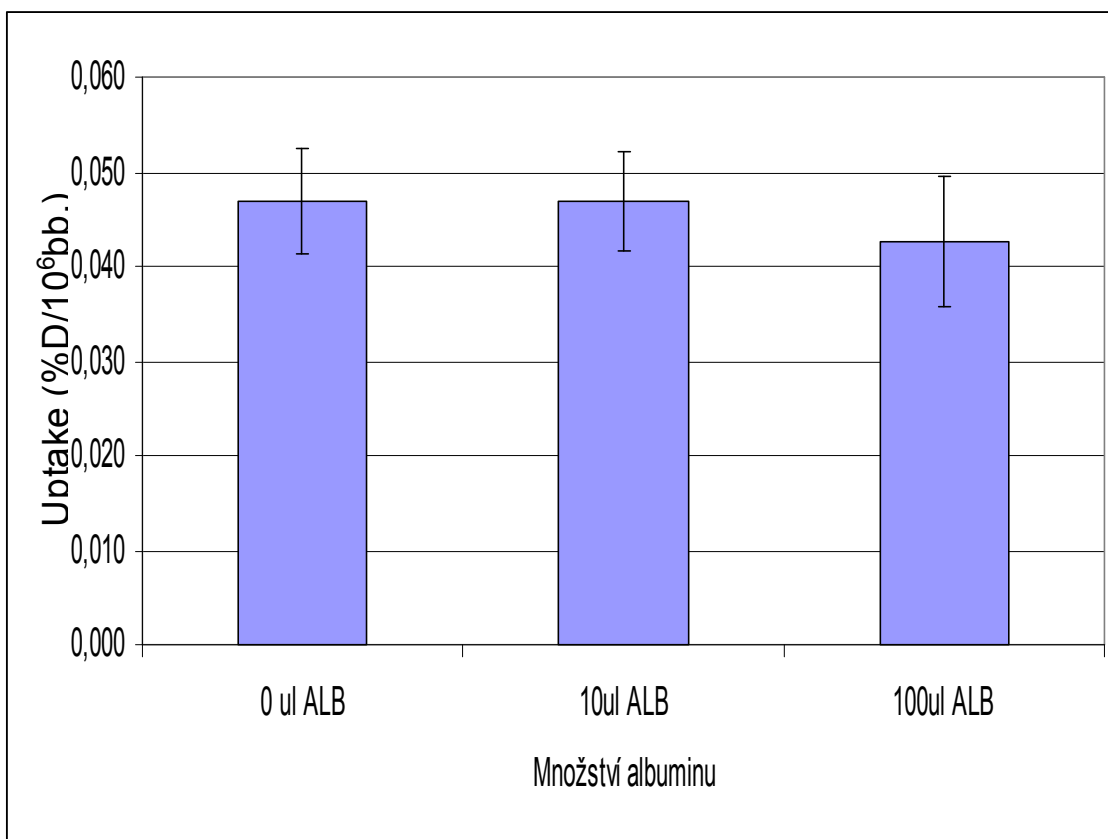
Teplota (°C)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/10 ⁶ bb)	Uptake (%D/10 ⁶ bb)	Průměrný uptake (%D/10 ⁶ bb)	Relativní uptake (%)
37	882,0	7435,6	441	0,059	0,087±0,021	100,00
	1166,0		583	0,078		
	1386,0		693	0,093		
	1542,0		771	0,104		
	1076,0		538	0,072		
	1746,0		873	0,117		
2-4	1046,0	7435,6	523	0,070	0,050±0,014	57,47
	843,0		422	0,057		
	505,0		253	0,034		
	515,0		258	0,035		
	794,0		397	0,053		
	802,0		401	0,054		

Tab. 6 Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na množství přidaného albuminu

Množství ALB a pufr s Glu (μl)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake ($\%D/10^6\text{bb}$)	Průměrný uptake ($\%D/10^6\text{bb}$)	Relativní uptake (%)
0 μl ALB, 100 μl pufr	744,0	7348,6	372	0,051	0,047 \pm 0,006	100,00
	740,0		370	0,050		
	570,0		285	0,039		
	598,0		349	0,047		
10 μl ALB, 90 μl pufr	720,0	7348,6	360	0,049	0,047 \pm 0,005	100,00
	780,0		390	0,053		
	625,0		313	0,043		
	622,0		311	0,042		
100 μl ALB, 0 μl pufr	739,0	7348,6	370	0,050	0,043 \pm 0,007	91,48
	600,0		300	0,041		
	542,0		271	0,037		



Obr. 10 Relativní uptake ^{111}In -DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě



Obr. 11 Závislost akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 v ledvinných buňkách potkana na množství přidaného albuminu

6.3.2 Akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana

V následujících tabulkách a grafech jsou znázorněny výsledky měření akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana. Dvakrát byla měřena závislost akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 na teplotě (tab. 7 a obr. 12, tab. 8 a obr. 13). Snížení uptake při nižší inkubační teplotě nebylo při srovnání s uptake při 37 °C statisticky významné ($P < 0,05$) ani v jednom z obou experimentů. Výsledky experimentu sledujícího dynamiku akumulace peptidu v závislosti na čase ukazuje tab. 9 a obr. 14., tab. 10 a obr. 15 ukazují závislost akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na množství přidaného peptidu. U posledního z experimentů byly hodnoty vložené dávky radioaktivity měřeny v tripletu pro 20μl a 100μl, pro ostatní vložené dávky byly hodnoty vypočteny.

Tab. 7 Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě (experiment 1)

Teplota (°C)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/10 ⁶ bb)	Uptake (%D/10 ⁶ bb)	Průměrný uptake (%D/10 ⁶ bb)	Relativní uptake (%)
37	4446,0	8095,1	2223	0,27	0,19±0,07	100,00
	3763,0		1882	0,23		
	2040,3		1020	0,13		
	1634,9		817	0,10		
	3333,0		1667	0,21		
2-4	2262,0	8095,1	1131	0,14	0,15±0,04	79,08
	2319,0		1160	0,14		
	1647,0		824	0,10		
	2536,0		1268	0,16		
	3270,0		1635	0,20		

Tab. 8 Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě (experiment 2)

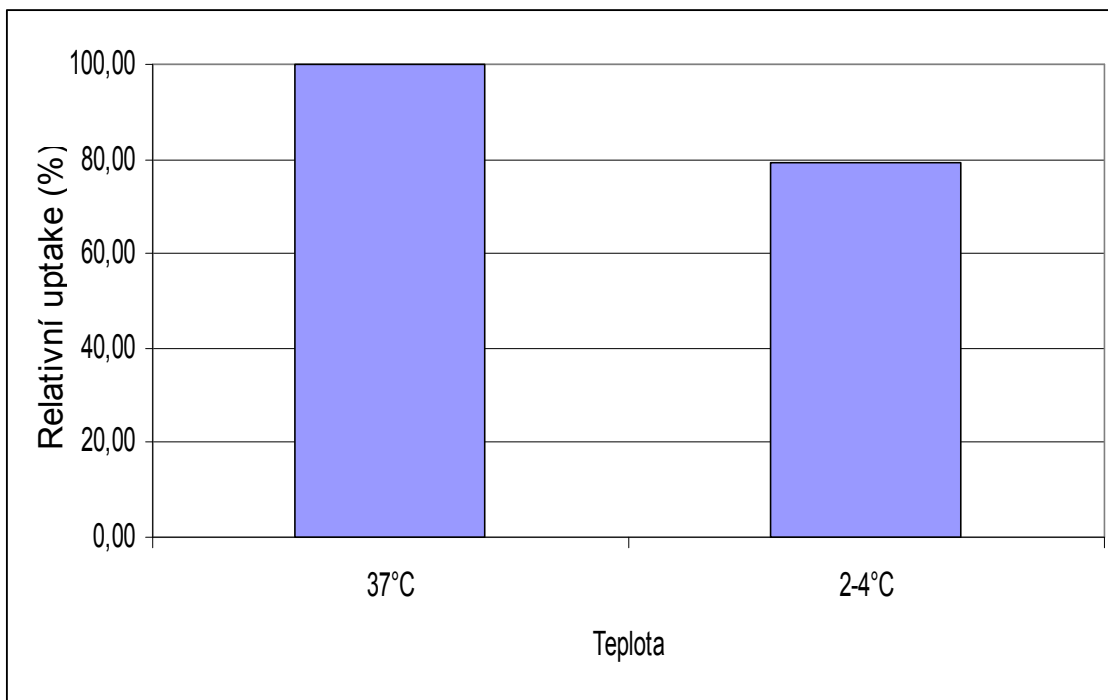
Teplota (°C)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake (%D/ 10^6bb)	Průměrný uptake (%D/ 10^6bb)	Relativní uptake (%)
37	2425,5	7902,2	1213	0,15	0,14±0,02	100,00
	2505,4		1253	0,16		
	1504,3		752	0,10		
	2178,3		108	0,14		
	2120,2		1060	0,13		
2-4	1280,1	7902,2	640	0,08	0,09±0,05	66,63
	2842,6		1221	0,18		
	706,9		353	0,04		
	895,2		448	0,06		
	1427,0		714	0,09		

Tab. 9 Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na délce inkubace

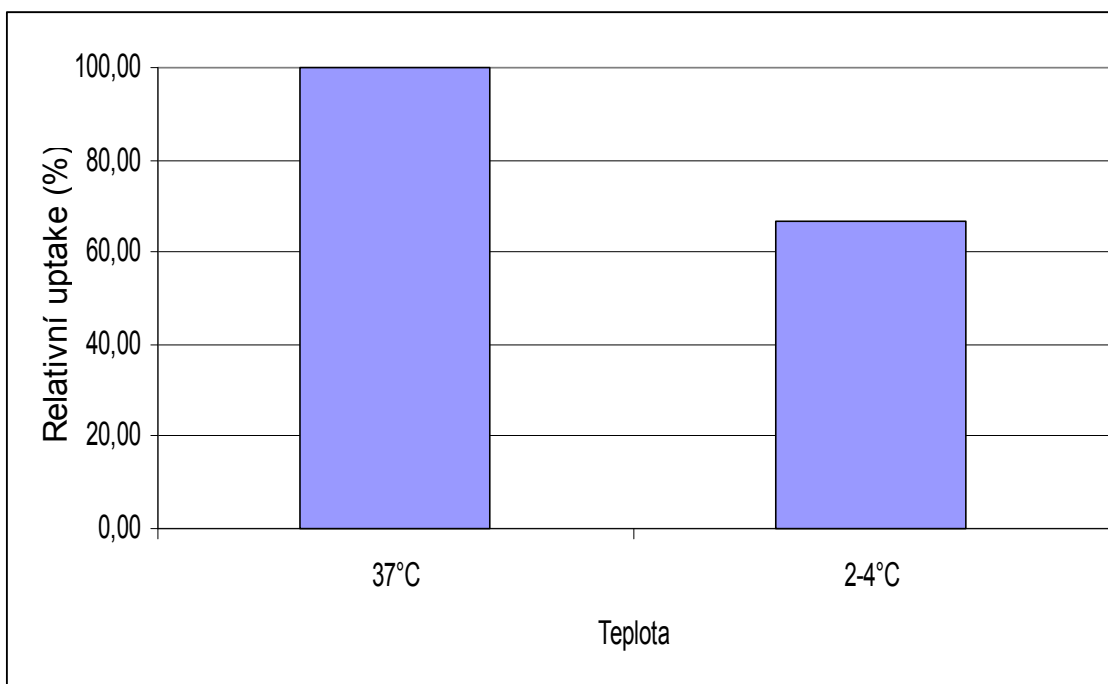
Doba inkubace (min)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Průměrný uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake (%D/ 10^6bb)	Průměrný uptake (%D/ 10^6bb)
0	1895,1	8351,0	948	916±168	0,11	0,11±0,02
	2131,9		1066		0,13	
	1468,6		734		0,09	
2	3543,3	8351,0	1772	1233±762	0,21	0,15±0,09
	1386,8		693		0,08	
10	7186,3	8351,0	3593	2169±1234	0,43	0,26±0,15
	2910,5		1455		0,17	
	2916,0		1458		0,17	
30	4977,0	8351,0	2488	3686±2510	0,30	0,44±0,30
	3996,8		1998		0,24	
	13140,0		6570		0,79	

Tab. 10 Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na přidaném množství peptidu

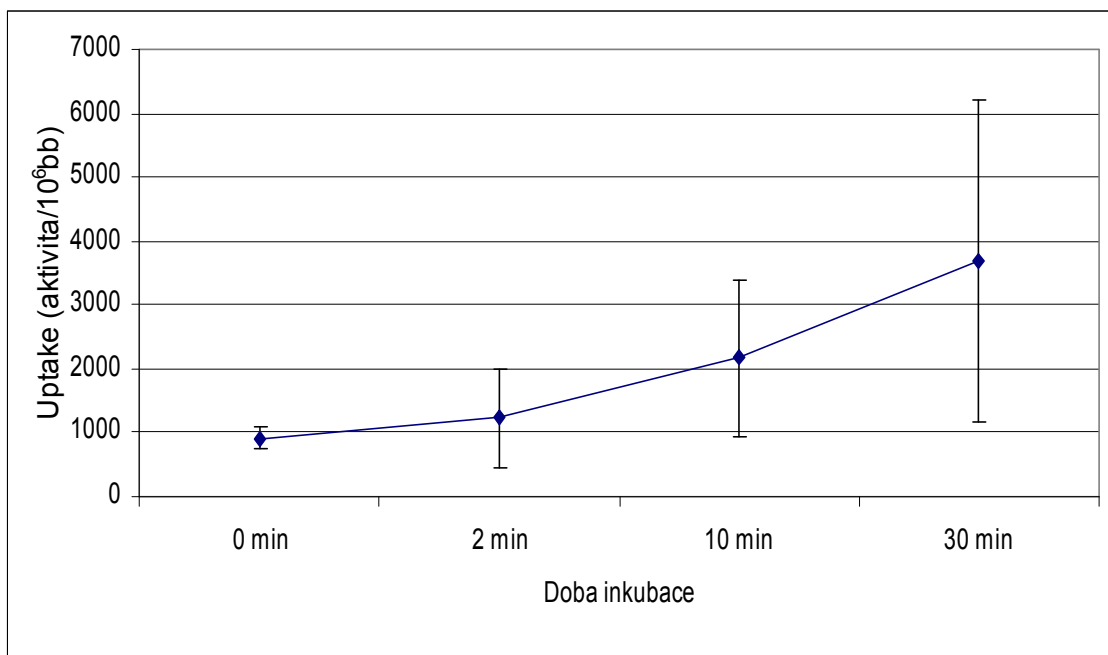
Množství peptidu (μl)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/10 ⁶ bb)	Průměrný uptake (aktivita/10 ⁶ bb)
4	127,4	2145,1	64	47±16
	93,3		47	
	62,2		31	
20	559,8	10725,7	280	284±62
	696,0		348	
	450,2		225	
100	2721,6	40273,0	1361	1242±119
	2247,4		1124	
	2485,5		1243	
500	33056,1	201364,9	16528	15517±1008
	31020,4		15510	
	29022,5		14511	



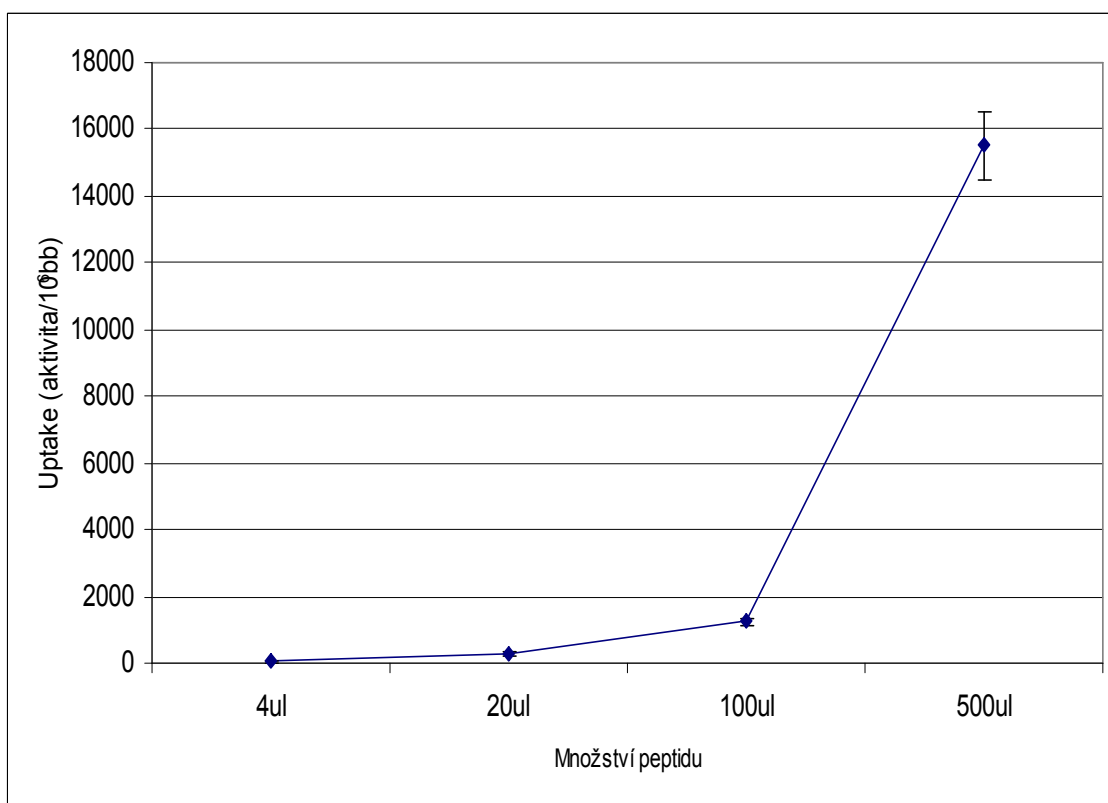
Obr. 12 Relativní uptake $^{111}\text{In-DOTA-MG45}$ v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě (experiment 1)



Obr. 13 Relativní uptake $^{111}\text{In-DOTA-MG45}$ v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě (experiment 2)



Obr. 14 Závislost uptake ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na délce inkubace



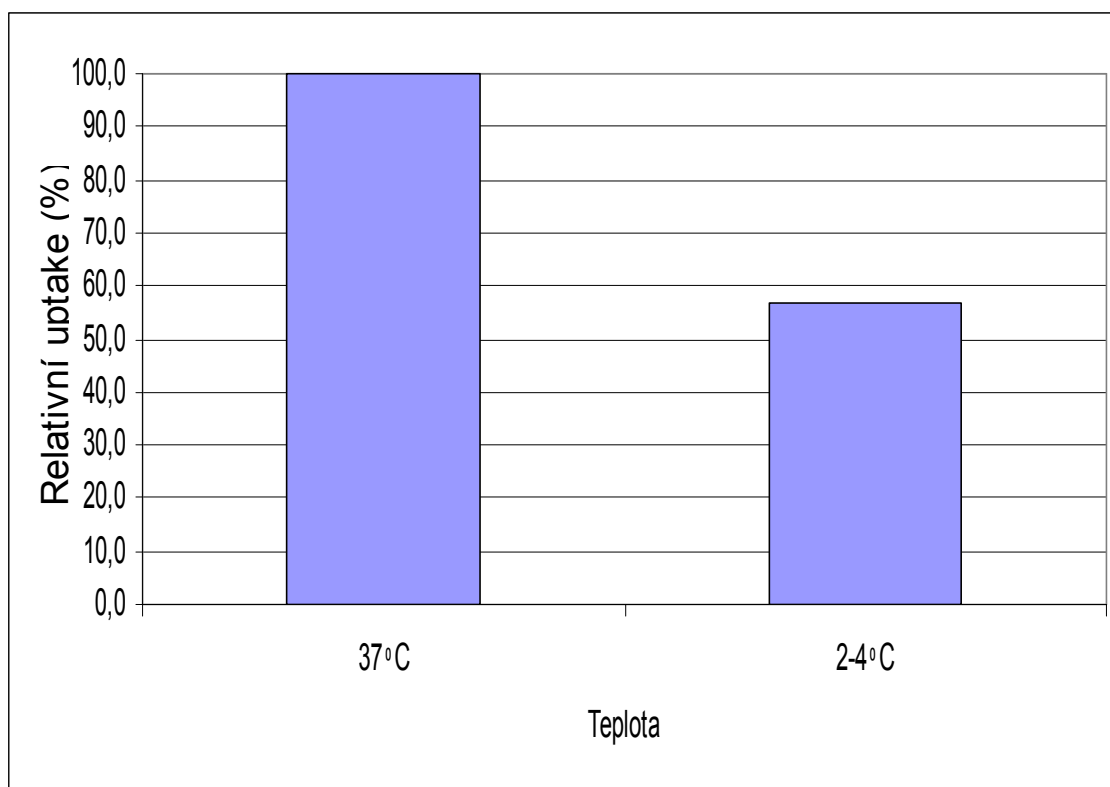
Obr. 15 Závislost uptake ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana na množství přidaného peptidu

6.3.3 Akumulace $^{111}\text{In-DOTA-MG46}$ v ledvinných buňkách potkana

Relativní uptake $^{111}\text{In-DOTA-MG46}$ v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě znázorňuje tab. 11 a obr. 16. Při nízké inkubační teplotě došlo ke statisticky významnému snížení uptake v ledvinných buňkách ve srovnání s inkubací při 37 °C ($P < 0,05$).

Tab. 11 Hodnoty akumulace $^{111}\text{In-DOTA-MG46}$ v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě

Teplota (°C)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake (%D/ 10^6bb)	Průměrný uptake (%D/ 10^6bb)	Relativní uptake (%)
37	660,3	8436,7	330	0,039	0,044±0,003	100,00
	705,9		353	0,042		
	817,8		409	0,048		
	765,8		383	0,045		
	751,4		376	0,045		
	777,0		389	0,046		
2-4	338,4	8436,7	169	0,020	0,025±0,004	56,81
	349,8		175	0,021		
	502,0		251	0,030		
	442,2		221	0,026		
	395,7		198	0,023		
	460,8		230	0,027		



Obr. 16 Relativní uptake ^{111}In -DOTA-MG46 v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě

6.3.4 Akumulace ^{99m}Tc -DMSA v ledvinných buňkách potkana

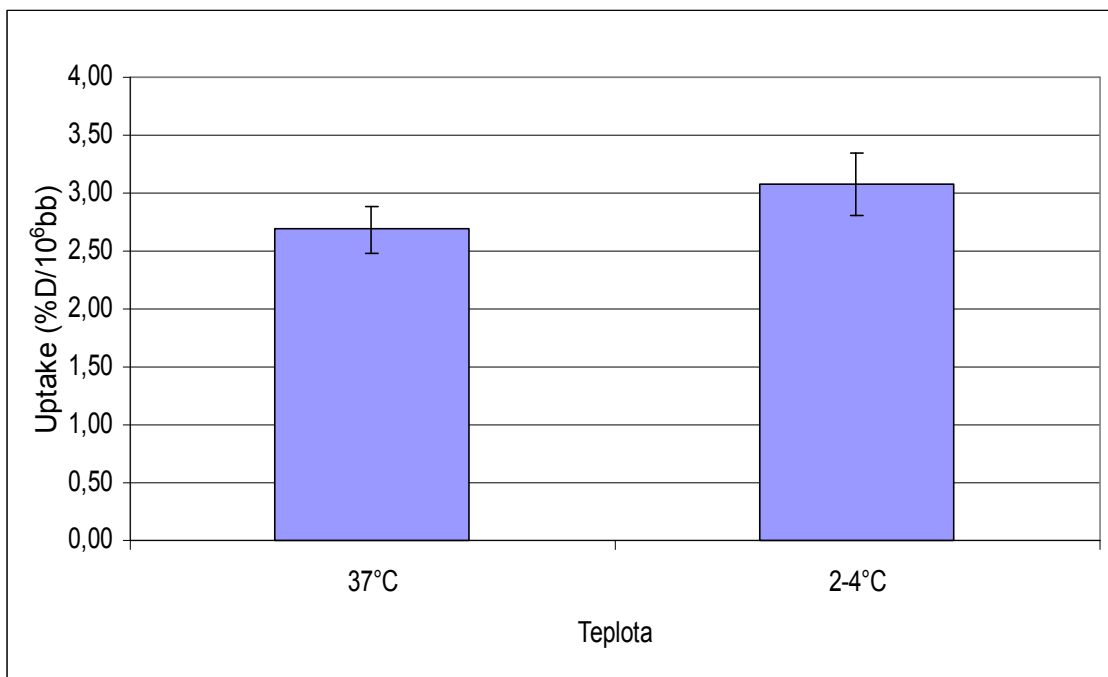
Následující tabulky a grafy zobrazují výsledky měření akumulace ^{99m}Tc -DMSA v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě (tab. 12, obr. 17) a na čase (tab. 13, obr. 18). Změny akumulace při nízké inkubační teplotě nebyly signifikantní.

Tab. 12 Hodnoty akumulace ^{99m}Tc -DMSA v ledvinných buňkách potkana v závislosti na teplotě

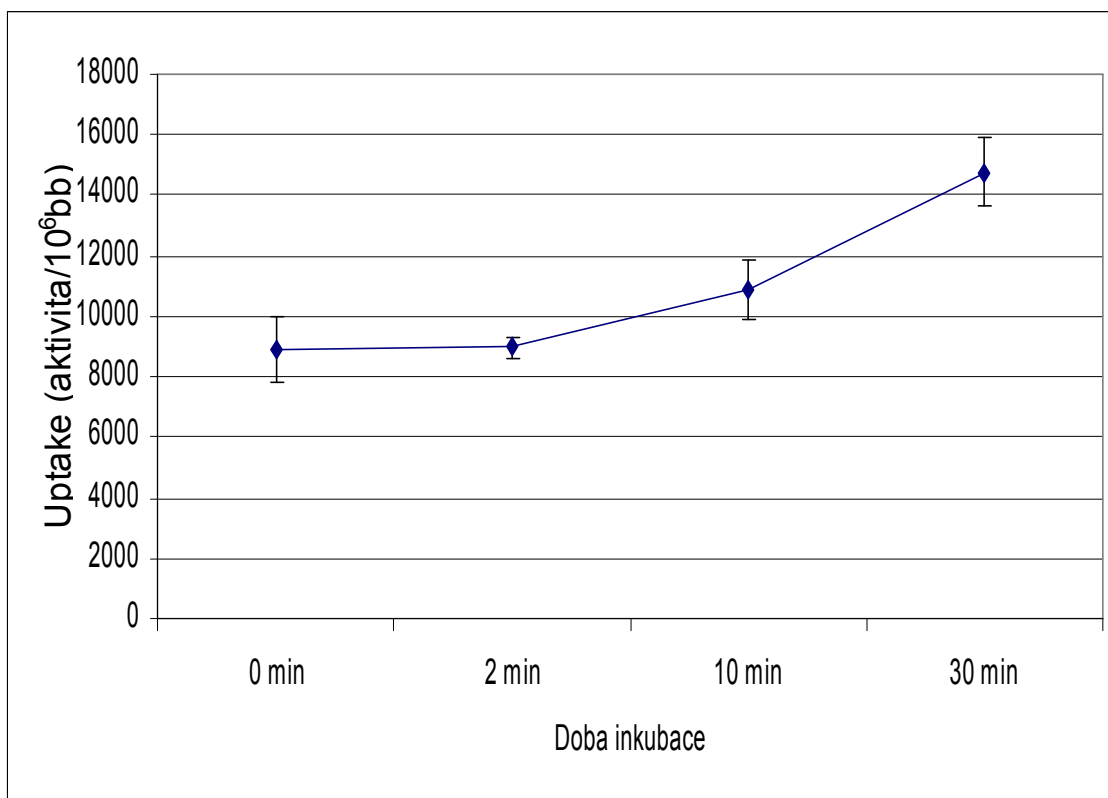
Teplota (°C)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake (%D/ 10^6bb)	Průměrný uptake (%D/ 10^6bb)	Relativní uptake (%)
37	48628,0	8388,5	24314	2,90	2,68±0,20	100,00
	39693,4		19847	2,37		
	43635,5		21818	2,60		
	46072,0		23036	2,75		
	43680,9		21840	2,60		
	48342,3		24171	2,88		
2-4	53812,7	8388,5	26906	3,21	3,08±0,27	114,90
	47613,7		23807	2,84		
	53350,9		26675	3,18		
	45452,8		22726	2,71		
	58229,1		29115	3,47		
	51348,5		25674	3,06		

Tab. 13 Hodnoty akumulace ^{99m}Tc -DMSA v ledvinných buňkách potkana v závislosti na čase

Doba inkubace (min)	Radioaktivita buněčné frakce (cpm)	1% vložené dávky	Uptake (aktivita/ 10^6bb)	Průměrný uptake (aktivita/ 10^6bb)	Uptake ($\%D/10^6\text{bb}$)	Průměrný uptake ($\%D/10^6\text{bb}$)
0	19472,8	7145,3	9736	8930 \pm 1103	1,36	1,25 \pm 0,15
	15345,2		7673		1,07	
	18759,3		9380		1,31	
2	18371,0	7145,3	9186	8955 \pm 326	1,29	1,25 \pm 0,05
	17449,9		8725		1,22	
10	19474,9	7145,3	9737	10863 \pm 1002	1,36	1,52 \pm 0,14
	22385,1		11193		1,57	
	23317,9		11659		1,63	
30	31641,9	7145,3	15821	14745 \pm 1131	2,21	2,06 \pm 0,16
	29695,4		14848		2,08	
	27132,5		13566		1,90	



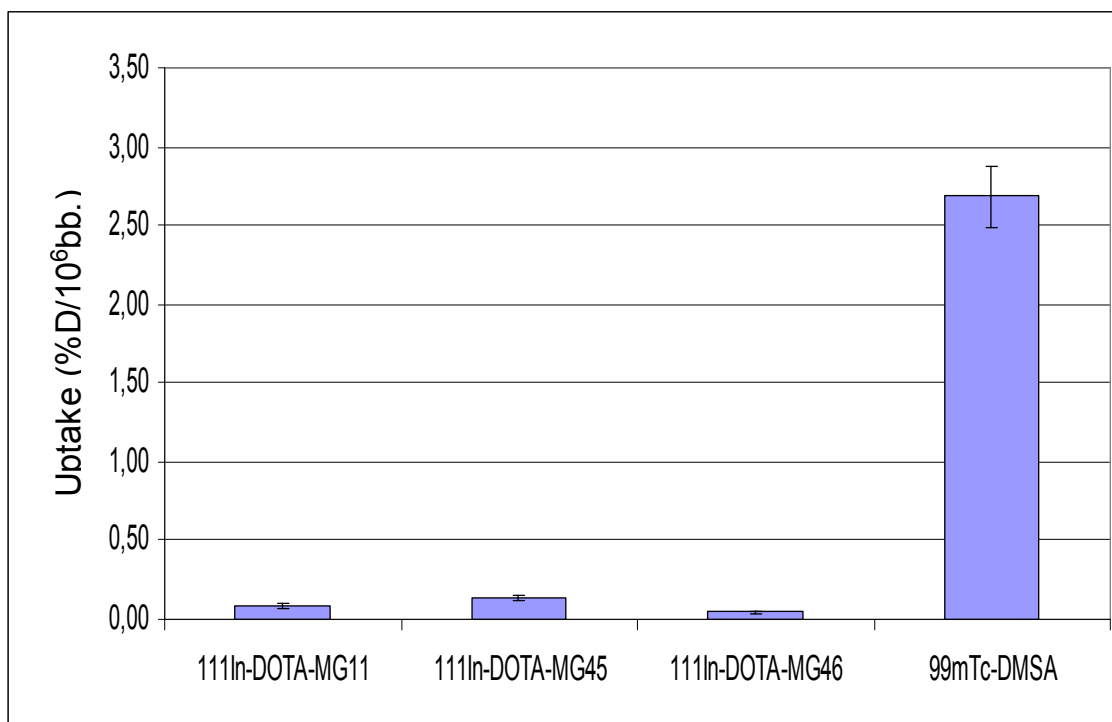
Obr. 17 Závislost akumulace ^{99m}Tc-DMSA v ledvinných buňkách potkana na teplotě



Obr. 18 Závislost uptake ^{99m}Tc-DMSA v ledvinných buňkách potkana na době inkubace

6.3.5 Porovnání akumulace zkoumaných látek

Následující obrázek (obr. 19) ukazuje vzájemné porovnání akumulace ^{111}In -DOTA-MG11, ^{111}In -DOTA-MG45 a ^{111}In -DOTA-MG46 a také s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, což je látka, u které je známá její vysoká akumulace v ledvinných buňkách. Statistické hodnocení ukázalo, že akumulace ^{111}In -DOTA-MG45 v ledvinných buňkách potkana byla signifikantně vyšší než u obou dalších ^{111}In -minigastrinů a akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 byla signifikantně vyšší než v případě ^{111}In -DOTA-MG46. Míra akumulace $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA byla ve srovnání s akumulací všech tří minigastrinů signifikantně vyšší.



Obr. 19 Porovnání akumulace zkoumaných minigastrinů s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA (inkubační teplota 37 °C)

7 DISKUZE

Studium ledvinného transportu léčiv bylo prováděno s izolovanými ledvinnými buňkami potkana, které byly získávány dvoustupňovou perfúzní kolagenázovou metodou. Jedná se o metodu, při které dochází k postupnému rozvolňování spojů mezi buňkami ve vypreparovaných ledvinách pomocí perfúze roztokem, který obsahuje enzym kolagenázu (Jones a kol. 1979). Dalšími úpravami pak byla získána suspenze primárních ledvinných buněk potkana. Takto získané buňky si zachovávají funkční membránové transportéry, avšak mají jen omezenou životnost, což znemožňuje delší mnohahodinové pokusy. Životnost získaných buněk byla zjišťována počítáním buněk v Bürkerově komůrce po přidání trypanové modři. Tato metoda vychází z předpokladu, že živé a nepoškozené buňky mají funkční membránu, která zabraňuje průniku trypanové modři do intracelulárního prostoru. Poškozené buňky tuto schopnost nemají a barvivo proniká do jejich intracelulárního prostoru, kde se váže na buněčné proteiny. Životnost buněk (viabilita) se určí mikroskopickým porovnáním počtu zbarvených a nezbarvených buněk. V našem případě se životnost buněk pohybovala okolo 90%.

Na modelu izolované ledvinné buňky byla vzájemně porovnávána akumulace ^{111}In -DOTA-MG11, ^{111}In -DOTA-MG45 a ^{111}In -DOTA-MG46. Kromě toho jsme porovnávali ještě akumulaci minigastrinů vůči $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, což je látka, o které je známo, že se hojně akumuluje v ledvinných buňkách (Willis a kol. 1977, Chervu a Blaufox 1982). Výsledky studia akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 ukázaly, že tento peptid se v izolovaných primárních ledvinných buňkách potkana akumuluje, ale hodnoty uptake jsou v porovnání s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA velmi nízké. Akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 se při inkubaci 30 min při 37°C pohybovala okolo 0,09% D/10⁶ buněk, což je oproti uptake $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, který činí 2,68% D/10⁶ buněk, mnohonásobně nižší. K podobným výsledkům dospěla ve své práci Kubačková (2010) u níž se uptake ^{111}In -DOTA-MG11 pohyboval v rozmezí od 0,08% do 0,39% D/10⁶ buněk. Rozptýl těchto hodnot autorka přisuzuje interindividuálním rozdílům mezi preparáty z různých zvířat a poměrně nízkým hodnotám radioaktivity použitých peptidů, což mohlo vyústit ve větší experimentální chybu (Kubačková 2010). Při srovnání akumulace ^{111}In -DOTA-MG11 s ostatními minigastriny je patrné, že i ostatní minigastriny vykazují poměrně nízkou akumulaci v ledvinných buňkách. Nejvyšším uptake v této skupině se vyznačuje ^{111}In -DOTA-MG45 s 0,14% D/10⁶ buněk, následuje ^{111}In -DOTA-MG11 a nejnižší uptake vykazuje ^{111}In -DOTA-MG46 s 0,04% D/10⁶ buněk.

Díky zachování funkčnosti membránových transportérů nám model izolovaných ledvinných buněk umožňuje studovat, do jaké míry se při akumulaci peptidů uplatňuje

aktivní a pasivní transport. Toho docílíme porovnáním akumulace v buňkách při inkubační teplotě 37°C, kdy se může uplatňovat aktivní transport, a při 2-4°C, kdy je aktivní transport závislý na energii inhibován.

Výsledky u minigastrinů ukazují na to, že aktivní transport se na akumulaci minigastrinů v ledvinných buňkách může částečně podílet, přestože největší měrou se uplatňuje pasivní transport. U ^{111}In -DOTA-MG45 došlo při inkubaci za nízké teploty k snížení uptake o 21-43%. K podobnému snížení uptake při inkubaci za nízké teploty došlo u ^{111}In -DOTA-MG46 a ^{111}In -DOTA-MG11. U těchto dvou radiopeptidů byl uptake při 2-4 °C o 43% a 42,5% nižší než při teplotě 37 °C.

U ^{111}In -DOTA-MG11 bylo sledováno, zda se při transportu peptidu do buněk uplatňuje transportní systém megalin/kubilin a to přidáním albuminu, což je ligand tohoto transportního systému. Mělo by docházet ke kompetici albuminu a minigastrinu o tento přenašeč, což by se mělo projevit snížením uptake radiopeptidu. Přidání 10 μl albuminu nemělo na uptake ^{111}In -DOTA-MG11 žádný vliv, uptake byl naprosto stejný jako u vzorku, kam byl místo albuminu přidán pufr s glukózou. Jen velmi malé snížení nastalo při přidání 100 μl albuminu. Tyto téměř shodné hodnoty uptake ukazují na to, že transportní systém megalin/kubilin se pravděpodobně významně neúčastní transmembránového přenosu minigastrinu do ledvinných buněk.

Výsledky publikací zabývajících se příbuznou skupinou radiopeptidů - radioaktivně značenými analogy somatostatinu jako jsou např. ^{111}In -DOTA-TATE a ^{111}In -DOTA-NOC ukazují na podobnou či nižší kumulaci ^{111}In -minigastrinů v potkaních ledvinných buňkách ve srovnání s indiem-111 značenými analogy somatostatinu. Poměrně vysoký uptake vykazuje derivát ^{111}In -DOTA-NOC, u kterého je tento vyšší průnik do ledvinných buněk vysvětlován skutečností, že tento peptid obsahuje ve své struktuře naftyl, má tudíž větší lipofilitu a snadněji prochází přes buněčné membrány pasivním transportem (Kubačková 2010, Trejtnar a kol. 2008). Námi studované minigastriny tento ani jiný vysoce lipofilní substituent neobsahují, což přispívá k jejich nízkému influxu do buněk.

Pokus provedený s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA ukazuje, že u této sloučeniny se s největší pravděpodobností na vstupu látky do buněk podílejí v největší míře pasivní mechanismy. Uptake $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA při 2-4°C činil 3,08%, což je více než při 37°C, kdy byl uptake 2,68%. Tato vyšší hodnota při 2-4°C než při 37°C mohla být pravděpodobně způsobena určitou experimentální chybou. Význam pasivního transportu na vstupu

^{99m}Tc -DMSA do ledvinných buněk potvrzují i publikované výsledky zabývající se akumulací této látky v ledvinných buňkách (Nový a kol. 2011).

S využitím modelu izolovaných ledvinných buněk jsme dále pozorovali závislost akumulace ^{111}In -DOTA-MG45 na délce inkubace. Z křivky je patrná rostoucí tendence. Stejný pokus s ^{99m}Tc -DMSA rovněž vykazuje rostoucí charakter křivky. Další pokus, ve kterém byla studována závislost akumulace ^{111}In -DOTA-MG45 na podané dávce, vykazuje rostoucí tendenci křivky až s exponenciálním nárůstem při nejvyšší koncentraci peptidu. Tento nálezn však může být určitým artefaktem, protože při velmi vysoké koncentraci radiopeptidu v inkubační směsi může být promytí buněk nedokonalé a i ve velmi malém množství média, který zbývá mezi buňkami po centrifugaci, může být relativně vysoký zbytek radioaktivity média.

Porovnání akumulace minigastrinů s ^{99m}Tc -DMSA, látkou, která je ve vysokém procentu vychytávána v ledvinných buňkách, ukazuje, že přestože se minigastriny vyznačují určitou mírou akumulace v ledvinných buňkách, je tento uptake jen velmi nízký, ve srovnání s ^{99m}Tc -DMSA je mnohonásobně nižší. Výsledky rovněž ukazují, že na transportu minigastrinů do buněk se sice v největší míře podílí pasivní transport, avšak určitý příspěvek aktivních transportních mechanismů může být u některých derivátů též významný.

8 SHRNU TÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE

Za využití izolovaných ledvinných buněk potkana byla studována akumulace ^{111}In -DOTA-MG11, ^{111}In -DOTA-MG45 a ^{111}In -DOTA-MG46 a výsledky byly porovnávány s hodnotami akumulace $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA. Ze získaných výsledků jsme došli k těmto závěrům:

- 1) Studované minigastriny se kumulují v ledvinných buňkách potkana v různé míře. Nejvyšší uptake vykazuje ^{111}In -DOTA-MG45, následuje ^{111}In -DOTA-MG11 a nejnižší uptake byl pozorován u ^{111}In -DOTA-MG46.
- 2) V porovnání s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA je kumulace všech studovaných ^{111}In -minigastrinů v ledvinných buňkách mnohonásobně nižší.
- 3) Na vstupu minigastrinů do ledvinných buněk se v největší míře podílí pasivní transportní mechanismy, avšak alespoň u některých látek z této skupiny pravděpodobně významně přispívají i aktivní transportní mechanismy.
- 4) Nebyla dokázána účast endocytárního systému megalinu na vstupu ^{111}In -minigastrinů do ledvinných buněk potkana.
- 5) Porovnatelná publikovaná data o ledvinné kumulaci příbuzné skupiny radiopeptidů ze skupiny indiem-111 značených derivátů somatostatinu ukazují, že kumulace minigastrinů v ledvinných buňkách potkana je srovnatelná nebo nižší.

9 POUŽITÁ LITERATURA

BÉHÉ, M. P., BEHR, T. M. Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies. *Biopolymers*, 2002, vol. 66, pp. 399-418.

BEHR, T. M., JENNER, N., RADEZKY, S., BÉHÉ, M. P., GRATZ, S., YÜCEKENT, S., RAUE, F., BECKER, W. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabeled gastrin. *Eur J Nucl Med*, 1998, vol. 25, pp. 424-430.

BEHR, T. M., JENNER, N., BÉHÉ, M., ANGERSTEIN, C., GRATZ, S., FRIEDHELM, R., BECKER, W. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med*, 1999, vol. 40, pp. 1029-1044.

CHERVU, L. R., BLAUFOX, M. D. Renal radiopharmaceuticals- an update. *Seminj Nucl Med*, 1982, vol. 12, pp. 224- 245.

CHRISTENSEN, E. I., BIRN, H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, vol. 280, pp. F562- F573.

DIJGRAAF, I., BOERMAN, O. C., OYEN, W. J. G., CORSTENS, F. H. M., GOTTHARDT, M. Development and application of peptide- based radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med Chem*, 2007, vol. 7, pp. 543-551.

ENLANDER, D., WEBER, P. M., DOS REMEDIOS, L. V. Renal cortical imaging in 35 patients: superior quality with ^{99m}Tc-DMSA. *J Nucl Med*, 1974, vol. 15, pp. 743-749.

FICHNA, J., JANECKA, A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjug Chem*, 2003, vol. 14, pp. 3-17.

FORRER, F., VALKEMA, R., KWEKKEBOOM, D. J., DE JONG, M., KRENNING, E. P. Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, vol. 21, pp. 111-129.

FOUCAUD, M., ARCHER-LAHLLOU, E., MARCO, E., TIKHONOVA, I. G., MAIGRET, B., ESCRIEUT, C., LANGER, I., FOURMY, D. Insights into the binding and activation sites of the receptors for cholecystokinin and gastrin. *Regul Pept*, 2008, vol. 145, pp. 17-23.

JONES, D. P., SUNDBY, G. B., ORMSTAD, K., ORRENIUS, S. Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochem Pharmacol*, 1979, vol. 28, pp. 929-935.

DE JONG, M., BREEMAN, W. A., KWEKKEBOOM, D. J., VALKEMA, R., KRENNING, E. P. Tumor imaging and therapy using radiolabelled somatostatin analogues. *Acc Chem Res*, 2009, vol. 42, pp. 873-880.

KHAN, I. U., BECK-SICKINGER, A. G. Targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones as radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, vol. 8, pp. 186-199.

KUBAČKOVÁ, T. (2010): *Studium membránového transportu xenobiotik in vitro*. Diplomová práce. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 28- 30, 49- 51.

KWEKKEBOOM, D. J., KAM, B. L., VAN ESSEN, M., TEUNISSEN, J. J., VAN EIJCK, C. H., VALKEMA, R., DE JONG, M., DE HERDER, W. W., KRENNING, E.P. Somatostatin-receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 2010, vol. 17, pp. R53-73.

LYSÁ, T. (2008): *Transport vybraných léčiv v ledvinných buňkách*. Diplomová práce. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 10- 13.

MATHER, S. J., MCKENZIE, A. J., SOSABOWSKI, J. K., MORRIS, T. M., ELLISON, D., WATSON, S. A. Selection of radiolabeled gastrin analogs for peptide receptor-targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med*, 2007, vol. 48, pp. 615-622.

MORETTI, J. L., RAPIN, J. R., SACCAVINI, J. C., LAGERON, A., LE PONCIN, M., BARDY, A. 2,3- Dimercaptosuccinic- acid chelates- 1. Structure and pharmacokinetic studies. *J Nucl Med*, 1984, vol. 11, pp. 270- 274.

NANDA, P. K., LANE, S. R., RETZLOFF, L. B., PANDEY, U. S., SMITH, C. J. Radiolabeled regulatory peptides for imaging and therapy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, vol. 17, pp. 69-76.

NOBLE, F., ROQUES, B. P., CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol*, 1999, vol. 58, pp. 349-379.

NOCK, B. A., MAINA, T., BÉHÉ, M. P., NIKOLOPOULOU, A., GOTTHARDT, M., SCHMITT, J. S., BEHR, T. M., MAECKE, H. R. CCK-2/gastrin receptor- targeted tumor imaging with ^{99m}Tc- labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med*, 2005, vol. 46, pp. 1727-1736.

NOVÝ, Z., MANDÍKOVÁ, J., TREJTNAR, F. Study on ^{99m}Tc-MAG3 and ^{99m}Tc-DMSA renal accumulation using in vitro cellular model. *Čes. Slov. Farm*, 2011, vol. 60, pp. 7- 10.

REUBI, J. C., WASER, B. Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer*, 1996, vol. 67, pp. 644-647.

REUBI, J. C., SCHAER, J. C., WASER, B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, pp. 1377- 1386.

REUBI, J. C., WASER, B., SCHAER, J. C., LAEDERACH, U., ERION, J., SRINIVASAN, A., SCHMIDT, M., BUGAJ, J. E. Unsulfated DTPA- and DOTA- CCK analogs as specific high- affinity ligands for CCK-B receptor- expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med*, 1998, vol. 25, pp. 481- 490.

REUBI, J. C., MÄCKE, H. R., KRENNING, E. P. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in future. *J Nucl Med*, 2005, vol. 46, pp. 67S- 75S

REUBI, J. C., MÄCKE, H. R. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med*, 2008, vol. 49, pp. 1735-1738.

ROOSENBURG, S., LAVERMAN, P., VAN DELFT, F. L., BOERMAN, O. C. *Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors*. [online]. 2010. [cit. 2011-03-28]. Dostupné z < <http://www.springerlink.com/content/5385715m86g40565/fulltext.pdf> >

SEDLÁČEK, J. Fyziologie vylučování. In *Lékařská fyziologie*. TROJAN, S., Praha, Grada, 2003, str. 431- 440

TREJTNAR, F., NOVÝ, Z., PETŘÍK, M., LÁZNÍČKOVÁ, A., MELICHAROVÁ, L., VAŇKOVÁ, M., LÁZNÍČEK, M. In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111. *Ann Nucl Med*, 2008, vol. 22, pp. 859-867.

VERROUST, P. J., CHRISTENSEN, E. I. Megalin and cubilin- the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, vol. 17, pp. 1867-1871.

WANG, S. C., TING, K. S., WU, C. C. Chelating therapy with NA- DMS in occupational lead and mercury intoxications. *Chinese Med J*, 1965, vol. 84, pp. 437-439.

WANK, S. A. G- protein coupled receptors in gastrointestinal physiology I. CCK receptors: an exemplary family. *Am J Physiol*, 1998, vol. 274, pp. G607- G613.

WILLIS, K. V., MARTINEZ, D. A., HEDLEY-WHYTE, E. T., DAVIS, M. A., JUDY, P. F., TREVES, S. Renal localization of ^{99m}Tc- stannous glucoheptonate and ^{99m}Tc- stannous dimercaptosuccinate in the rat by frozen section autoradiography. *Radiat Res*, 1977, vol. 69, pp. 475- 488.

ZWANZIGER, D., BECK-SICKINGER, A. G. Radiometal targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones. *Curr Pharm Des*, 2008, vol. 14, pp. 2385- 2400.