

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmakologie a toxikologie

STUDIUM TRANSPORTNÍCH MECHANISMŮ PRO XENOBIOTIKA

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2008

Monika Richtrová

Děkuji Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc., školiteli mé diplomové práce, za poskytnuté materiály, rady a pomoc při řešení a zpracování práce. Děkuji také paní Ivaně Filipové za pomoc během měření, a také oběma za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále děkuji Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za značení experimentálních peptidů radionuklidy a PharmDr. Ludmile Melicharové za poskytnutí biologického materiálu.

Prohlášení:

„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.“

V Hradci Králové dne2008

Podpis

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
2	ÚVOD A CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ ANALOGY SOMATOSTATINU V NUKLEÁRNÍ MEDICÍNĚ	10
3.2	TRANSPORT PEPTIDŮ V LEDVINÁCH	16
3.3	METABOLIZMUS PROTEINŮ A PEPTIDŮ V LEDVINÁCH.....	19
3.4	STUDOVANÉ PEPTIDY A MODELOVÉ LÁTKY	21
4	METODICKÁ ČÁST	23
4.1	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	24
4.2	POSTUP	26
5	VÝSLEDKY	32
5.1	Akumulace ¹⁴ C-metylglukózy	33
5.2	Akumulace ¹⁴ C-sacharózy	37
5.3	Porovnání akumulace ¹⁴ C-sacharózy a ¹⁴ C-metylglukózy v ledvinných a pankreatických nádorových buňkách	39
5.4	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu při různém množství buněk v inkubační směsi.....	40
5.5	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu při různých koncentracích	42
5.6	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu s albuminem	43
5.7	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu s gentamicinem.....	45
5.8	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu s lysinem a maleátem	47
5.9	Porovnání akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu v přítomnosti gentamicinu, albuminu, maleátu a lysinu	48
5.10	Akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu při inkubaci za nízkých teplot.....	49
5.11	Akumulace ¹²⁵ I-DOTA-oktreotátu v přítomnosti lysinu.....	51
5.12	Porovnání akumulace ¹¹¹ In-DOTA-oktreotátu a ¹²⁵ I-DOTA-oktreotátu v přítomnosti lysinu.....	52
6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR	57
8	ABSTRAKT	59
9	ABSTRACT.....	60
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -MG - α -metylglukóza

BBM – kartáčový lem apikální membrány (brush border membrane)

BLM – bazolaterální membrána

CNS – centrální nervový systém

DOTA – 1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-N, N', N'', N'''-tetraoctová kyselina

DTPA – diethylentriaminpentaoctová kyselina

GIT – gastrointestinální trakt

K-H – Krebs-Henseleitův roztok

LDL – lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)

LET – lineární energetický transfer (linear energy transfer)

MRP – multidrug resistance protein

OA – organické anionty

OAT – transportéry pro organické anionty

OC – organické kationty

OCT – transportéry pro organické kationty

Pgp – P-glykoprotein

ppMB – průměrný počet mrtvých buněk

ppŽB – průměrný počet živých buněk

PRRT – radionuklidová terapie založená na peptidových receptorech (peptide receptor radionuclide therapy)

SRI – zobrazování somatostatinových receptorů (somatostatin receptor-mediated imaging)

TOC – Tyr³-oktreotid

TOCA – Tyr³-oktreotát

2 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V diagnostice a terapii některých nádorů rezistentních ke klasické léčbě se rozvíjejí nové přístupy, které využívají různých receptorově specifických peptidů značených vhodnými radionuklidy. Mezi nejčastější zkoumané radiopeptidy patří analogy somatostatinu. Tyto peptidy se mohou vázat na specifické somatostatinové receptory vyskytující se ve zvýšené míře u některých typů neuroendokrinních nádorů (endokrinní nádory pankreatu, nádory hypofýzy, gastrinomy aj.). Peptidy mohou být značeny gama - zářiči (^{99m}Tc , ^{111}In , ^{131}I a další) pro použití v radiodiagnostice pro zobrazení vybraných nádorů nebo jsou značeny radionuklidy emitujícími záření beta (např. ^{90}Y), které jsou vhodné pro specifickou destrukci nádorové tkáně. Mezi hlavní negativa těchto peptidů při použití v terapii je jejich radiotoxický účinek, který nastává jako následek po akumulaci v ledvinné tkáni. Přestože existují metody pro částečné snížení ledvinné akumulace, není zatím možné zabránit nežádoucí retenci v ledvinách. Pro další vývoj této skupiny radiofarmak je tedy důležité poznání mechanismů transportu a akumulace těchto látek v ledvinách.

V této diplomové práci byla studována akumulace vybraných radioizotopy značených receptorově specifických analogů somatostatinu. Ke studiu bylo využito experimentálního modelu založeném na čerstvě izolovaných ledvinných buňkách, které byly připravovány v čase potřeby přímo z čerstvé tkáně. Bylo provedeno srovnání akumulace vybraných modelových látek, u kterých jsou ledvinné transportní mechanismy dobře popsány, s akumulačními parametry dvou vybraných radiopeptidů ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu. Byly zkoumány i ligandy megalin/kubilinového endocytárního transportéru jako specifické inhibitory ledvinných membránových transportních systémů s cílem najít takové látky, které by potencionálně mohly snižovat míru akumulace a retence studovaných radiopeptidů v ledvinných buňkách a tím i radiotoxikologické poškození ledvinné tkáně.

3 TEORETICKÁ ČÁST

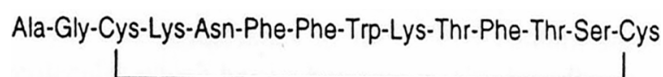
3.1 RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ ANALOGY SOMATOSTATINU V NUKLEÁRNÍ MEDICÍNĚ

Receptorově specifické peptidy ze skupiny analogů somatostatinu značené vhodnými radionuklidy lze použít k diagnostice i léčbě některých neuroendokrinních nádorů.

Technika zobrazování peptidového receptoru radioaktivně značenými peptidy je citlivá a specifická metoda, která umožňuje in vivo znázornění receptorů přítomných v různých nádorech. Touto technikou mohou být znázorněny primární nádory a metastázy obsahující dané receptory. Jakmile bylo zobrazování peptidových receptorů pro vizualizaci nádorů zavedeno, tak dalším logickým krokem bylo značení těchto peptidů radionuklidy emitující α - či β -částice, včetně Augerových či konverzních elektronů a využití těchto peptidů v radionuklidové terapii založené na peptidových receptorech (peptide receptor radionuclide therapy, PRRT) (Kwekkeboom a kol. 2000).

Somatostatin-14 (somatostatin) a jeho analogy jsou pro zobrazování somatostatinových receptorů (somatostatin receptor-mediated imaging, SRI) a PRRT ze všech peptidů užívány nejčastěji. Stále se diskutuje o nových analozích, chelátorech, radionuklidech a jejich kombinacích. Také jsou zvažovány nedostatky a budoucí výhledy v jejich využití.

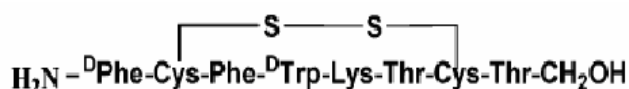
3.1.1 Somatostatin a jeho analogy



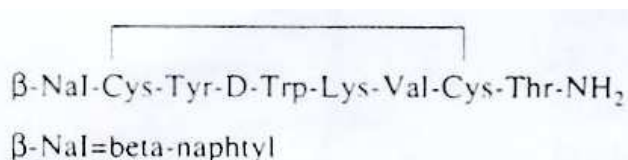
Obr. 1. Struktura somatostatinu

Somatostatin je cyklický disulfid ze skupiny peptidových hormonů skládající se ze 14 aminokyselin (obr. 1). Je přítomný v celém centrálním nervovém systému (CNS) včetně hypotalamu, mozkové kůry a mozkového kmene, a také v gastrointestinálním traktu (GIT), např. v pankreatu. Somatostatinové receptory byly identifikovány nejen v CNS a GIT, ale

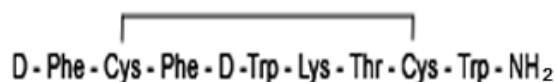
také na mnoha buňkách neuroendokrinního původu. Nicméně i jiné než neuroendokrinní buňky, např. lymfocyty, mají tyto receptory také. V CNS funguje somatostatin jako neurotransmitter. Inhibuje uvolňování růstového hormonu, inzulínu, glukagonu a gastrinu. Hlavní inhibiční efekt somatostatinu na hormonální sekreci různých žláz pak vedl k možným prospěšným účinkům somatostatinu při léčbě nemocí založených na hyperfunkci žláz či nadprodukcí hormonů endokrinně aktivních tumorů. Nicméně sám somatostatin se ukázal být pro tuto terapii nevhodný, protože po intravenózní aplikaci má vzhledem k rychlé enzymatické degradaci plazmatický poločas kolem 3 min. Na začátku osmdesátých let dvacátého století byly vyvinuty analogy somatostatinu, které byly více odolné k biodegradaci než samotný somatostatin. Molekula somatostatinu byla různými způsoby modifikována při zachování většiny biologické aktivity původní molekuly. Zavedení D-aminokyselin a zkrácení molekuly na ústřední bioaktivní sekvenci vedlo k somatostatinovým analogům, které obsahují osm aminokyselin - oktreotid (Sandostatin – dříve známý jako SMS 201-995) (obr. 2), lanreotid (BIM23014) (obr. 3) a RC-160 (vapreotid) (obr. 4).



Obr. 2. Struktura oktreotidu



Obr. 3. Struktura lanreotidu



Obr. 4. Struktura vapreotidu

Lanreotid a oktreotid jsou široce užívány pro symptomatickou léčbu neuroendokrinně aktivních tumorů. Mezi ně patří adenomy hypofýzy produkující růstový hormon a gastro-entero-pankreatické tumory. Jak biologické vlastnosti, tak klinické aplikace somatostatinu a jeho analogů byly již obšírně popsány (Lamberts a kol. 1991, Arnold a kol. 2000).

3.1.2 Receptory pro somatostatin

Somatostatinové receptory jsou popsány v řadě primárních lidských tumorů a buněčných linií. S užitím různých radioaktivně značených somatostatinových analogů bylo možné somatostatinové receptory farmakologicky rozlišit. Původně byly popsány dvě třídy somatostatinových receptorů. Třída 1 vykazující relativně vysokou afinitu k biologicky stabilním ligandům a třída 2 nevykazující tuto afinitu. Do současné doby bylo naklonováno 5 různých typů somatostatinových receptorů. Jsou pojmenovány sst 1-5 chronologicky dle objevu. Do třídy 1 patří sst2, sst3 a sst5 receptory. Třída 2 zahrnuje sst1 a sst4 receptory. Každý sst receptor je produktem jednotlivého genu, který je lokalizovaný na jiném chromozomu. Toto dovoluje tkáňově specifickou regulaci a rozlišení funkcí somatostatinových receptorů v různých orgánech. Strukturálně sst receptory patří do rodiny G-proteinových receptorů, které jsou charakterizované sedmi transmembránovými doménami. Extracelulární část je odpovědná za vazbu ligandu. Intracelulární část přenáší signál do buňky (Breeman a kol. 2001).

Všechny podtypy receptoru váží somatostatin (somatostatin-14) a somatostatin-28 (polypeptid tvořený 28 aminokyselinami) s vysokou afinitou. V tumorech byla detekována mRNA pro většinu typů receptorů, ale exprese proteinů byla různá. Většina neuroblastomů, meningiomů, meduloblastomů, lymfomů, karcinomů prsu, karcinomů renálních buněk, paragangliomů, hepatocelulárních karcinomů a malobuněčných plicních karcinomů exprimuje sst2 receptory. Karcinomy a sarkomy prostaty exprimují zejména sst1 receptory. Přítomnost receptorů sst3 vykazuje většina inaktivních hypofyzárních adenomů. Adenomy hypofýzy, sekretující růstový hormon, exprimují zejména sst2 a sst5 receptory. Gastro-entero-pankreatické tumory a feochromocytoomy vykazují nejčastěji receptory sst2 a sst1. Non-neoplastické lidské tkáně exprimují hlavně receptory sst2 (Reubi a kol. 2001, de Herder a kol. 2003).

Wulbrand a kol. popsali expresi typu somatostatinového receptoru na čtyřech nejčastějších neuroendokrinních nádorech. Exprimovány jsou sst1, sst2 a v menší míře sst5 receptory. Všechny studie ukázaly malý výskyt receptorů sst3 v gastrinomech (v žaludečních tumorech) a karcinoidech. Typ receptorů sst4 se vyskytuje proměnlivě od 22% do 86%. Autoři mají několik vysvětlení pro tyto rozdíly. Může to být například původem vzorků (pankreatické vs. extrapankreatické, primární vs. metastázy). Tyto nálezy ukazují, že radioaktivně značené analogy, které se vážou na všechny sst receptory, stejně jako analogy, které mají afinitu jen k některým sst receptorům, jsou pro další budoucí výzkum velmi vítány (Wulbrand a kol. 1998).

3.1.3 Nové analogy a radionuklidy pro diagnostiku a terapii

Jeden z prvních analogů somatostatinu, zavedený do klinické praxe pro zobrazení neuroendokrinních tumorů - [$^{111}\text{In-DTPA}^0$]oktreotid - není ideální radiopeptid pro SRI a PRRT. Jedním z jeho nedostatků je, že je značený produktem cyklotronu - ^{111}In . Proto byly vyvíjeny somatostatinové analogy značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Nižší afinita [DTPA^0]oktreotidu pro sst3 receptory a absence afinity k receptorům sst1 a sst4 může být považováno za další nedostatek [$^{111}\text{In-DTPA}^0$]oktreotidu. Nicméně velká většina nádorů exprimuje sst2, včetně gastro-entero-pankreatických nádorů (Breeman a kol. 2001) .

Mezi nověji testované analogy patří [$\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotid a [$\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotát. První analog užívaný pro in vivo zobrazení sst receptorů byl [Tyr^3]oktreotid (TOC) (obr. 5). V těchto analogiích byl Phe^3 nahrazen tyrosinem (Tyr). Tím se snížila lipofilita a umožnila radiojodace. V [Tyr^3]oktreotátu (TOCA) (obr. 6) byl na C konci threoninol (Thr-ol) nahrazen přírodní aminokyselinou threoninem pro posouzení efektů dalšího záporného náboje na buněčný uptake. Inkorporací chelátoru DTPA (obr. 7) na N-konec vzniká [$\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotid (DTPA-TOC) a [$\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotát (DTPA-TOCA), které umožňují značení ^{111}In . Dalšími testovanými látkami byly [$\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotid a [$\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3$]oktreotát, které vznikly připojením DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan- N' , N'' , N''' -tetraoctové kyseliny) (obr. 8). V in vitro studiích byla pozorována vysoká a specifická vazba k somatostatinovým receptorům s hodnotami IC_{50} v nízkém nanomolárním rozmezí. Tato studie také ukázala, že tyto záměny a také povaha kovového komplexu mají významný vliv na afinitu, až může být také významné pro další vývoj peptidových

radioligandů. Zejména afinity k receptorům sst3 a sst5 byly ovlivněny výše uvedenými záměnami (např. Phe³→Tyr, Thr(ol)→Thr, neznačený vs. značený indiem či yttriem) (Reubi a kol. 2000).

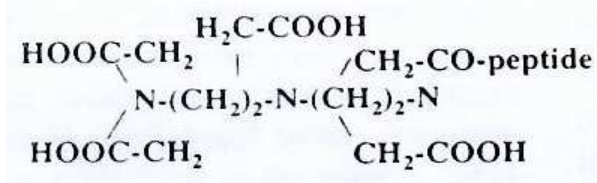
Porovnání specifické internalizace ¹¹¹In-značených sloučenin na buněčných liniích pozitivních na somatostatinové receptory ukázaly, že internalizovaná radioaktivita byla značně vyšší po inkubaci s [¹¹¹In-DTPA⁰, Tyr³]oktreotátem. Toto pozorování bylo potvrzeno in vivo u potkanů a u lidí.

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)

Obr. 5. Struktura Tyr³-oktreotidu (TOC)

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr

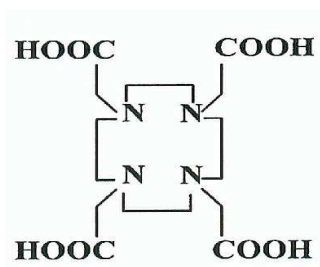
Obr. 6. Struktura Tyr³-oktreotátu (TOCA)



Obr. 7. Struktura diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA)

3.1.4 DOTA analogy

DOTA sloučeniny mohou být stabilně radioaktivně značeny ¹¹¹In, ⁹⁰Y a ¹⁷⁷Lu. ⁹⁰Y je β-zářič, s max. energií elektronů 2,3 MeV a s dosahem několika milimetrů ve tkáni. ¹⁷⁷Lu je β-zářič s max. energií 0,5 MeV a tkáňovým rozmezím kolem 1 mm. ¹⁷⁷Lu je také γ-zářič (113 až 208 keV, množství 6% a 11%), který umožňuje zobrazení zařízením pro gama a tedy dosimetrii a diferenciaci nádorů. Porovnání fyzikálních konstant ⁹⁰Y a ¹⁷⁷Lu ukazuje, že analogy značené ⁹⁰Y jsou vhodnější pro PRRT větších tumorů. Preklinické studie a následné klinické pokusy, které se týkaly terapie na somatostatinové receptory pozitivních nádorů s [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]oktreotátem, přinesly nadějně výsledky (Kwekkeboom a kol. 2000).



Obr. 8. Struktura 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-*N,N',N'',N'''*-tetraoctové kyseliny (DOTA)

3.1.5 Radionuklidová terapie založená na peptidových receptorech

Studie o internalizaci radioaktivně značeného [DTPA⁰]oktrotidu metodami in vitro a in vivo ozřejmily průběh receptorem zprostředkovaného somatostatinu. Po internalizaci do buněk je radioligand blíž k jádru. Polarita DTPA konjugovaného radiometabolitu, jako je ¹¹¹In-DTPA-D-Phe, brání průchodu přes lyzozomální a buněčné membrány. Toto odráží situace u radiojodovaných analogů (analogů značených radioaktivním jódem). In vivo jsou tyto analogy rychle odbourány na radiojodovaný tyrosin s následným uvolněním z buňky, až brání jejich aplikaci při PRRT.

¹¹¹In emituje nejen γ -záření, ale také Augerovy elektrony s krátkým dosahem. Jestliže je DNA buňky v dosahu částic, je radiotoxicita Augerových elektronů velmi vysoká. V takovém případě lze očekávat účinek na nádorové bujení (Stepanek a kol. 1996). Protože energie konverzních a Augerových elektronů je obvykle menší než energie β -částic, jejich lineární energetický transfer (linear energy transfer, LET) a následně i jejich schopnost zabíjet buňky, tedy cytotoxická aktivita, je větší než u β -částic. LET (udávaný v keV na μm jako parametr pravděpodobnosti buněčné smrti) je pro Augerovy elektrony 1,1-17 a maximální dosah ve tkáni je mezi 20 nm a 15 μm , zatímco pro β -částice s energiemi mezi 150 a 2000 keV, je LET 0,2-0,8 s dosahem 40-4000 μm . Z tohoto důvodu je radiotoxicita radionuklidu s vysokou hodnotou LET velmi vysoká (Breeman a kol. 2001).

3.2 TRANSPORT PEPTIDŮ V LEDVINÁCH

Léčiva, další látky a jejich metabolity jsou z organismu vylučovány především ledvinami. Mechanismus renální exkrece zahrnuje glomerulární filtraci, tubulární reabsorpci a tubulární sekreci. V glomerulech jsou filtrovány látky s molekulární hmotností do 60 kDa v závislosti na míře vazby k vazebným proteinům. Tubulární reabsorpce zahrnuje pasivní difúzi lipofilních látek z glomerulárního filtrátu zpět do krve a aktivní přenos zprostředkovaný přenašečem. Některé sloučeniny jsou v ledvinných tubulech vylučovány do tubulární tekutiny aktivním procesem zahrnujícím různé přenašečové systémy.

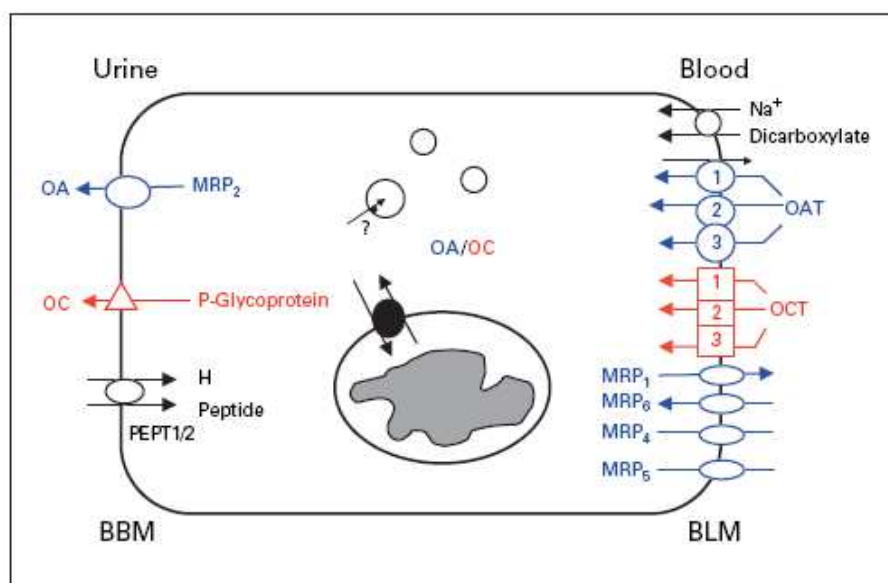
Tyto transportní systémy umožňují tubulární sekreci řady organických iontů. Do řady ledvinných tubulárních transportérů pro léčiva patří transportéry pro organické anionty (OAT) a transportéry pro organické kationty (OCT). Tyto transportéry jsou exprimovány na obou pólech renálních tubulárních buněk. Nicméně OAT jsou hlavně na bazolaterální membráně, kdežto OCT jsou z větší části umístěny na kartáčovém lemu apikální membrány. OAT tak přenáší látky z krve do renálních tubulárních buněk a OCT je zodpovědný za eflux z buněk do tubulárního lumen. Mezi další transportéry patří P-glykoprotein (Pgp) a efluxní pumpa MRP (multidrug resistance protein) (Pritchard a Miller 1996).

Tubulární reabsorpce léčiv peptidového charakteru (např. beta-laktámových antibiotik) probíhá na kartáčovém lemu apikální membrány renálních tubulárních buněk pomocí dvou vodíkem spřažených oligopeptidových transportérů PEPT1 a PEPT2. Velké peptidy a proteiny jsou reabsorbovány z moči pinocytózou a v buňkách jsou metabolizovány. Jejich metabolické produkty mohou být přeneseny do krve či zpět do moče.

Tyto aktivní sekreční a reabsorpční mechanismy jsou odpovědné za významnou část exkrece. Změny této rovnováhy mezi transporty krev-buňka a krev-lumen mohou mít za následek intracelulární akumulace xenobiotik, které mohou vyústit v lokální toxicitu.

Na obr. 9 je znázorněn schematický model transportérů pro organické anionty a kationty v renálním proximálním tubulu. Uptake organických anionů (OA) přes bazolaterální membránu (BLM) je zprostředkován na Na^+ závislým OAT systémem, který obsahuje ketoglutarát (-KG2)/OA a vymění se pomocí OAT1. Kotransport sodík-ketoglutarát je zprostředkován pomocí kotransportéru Na^+ /dikarboxylát. Kartáčový lem apikální membrány

(BBM) obsahuje různé transportní systémy pro eflux OA do lumen či reabsorpci z lumen do buňky. MRP2 (multidrug resistance transporter) zprostředkovává primární aktivní luminální sekreci. Buněčný uptake organických kationů (OC) přes BLM je zprostředkován transportéry pro organické kationy (OTC) jako je OCT1, OCT2, OCT3. Výstup buněčné OC přes BBM je zprostředkován P-glykoproteinem. PEPT1 a PEPT2 zprostředkovávají luminální uptake peptidů (Launay-Vacher a kol. 2006).

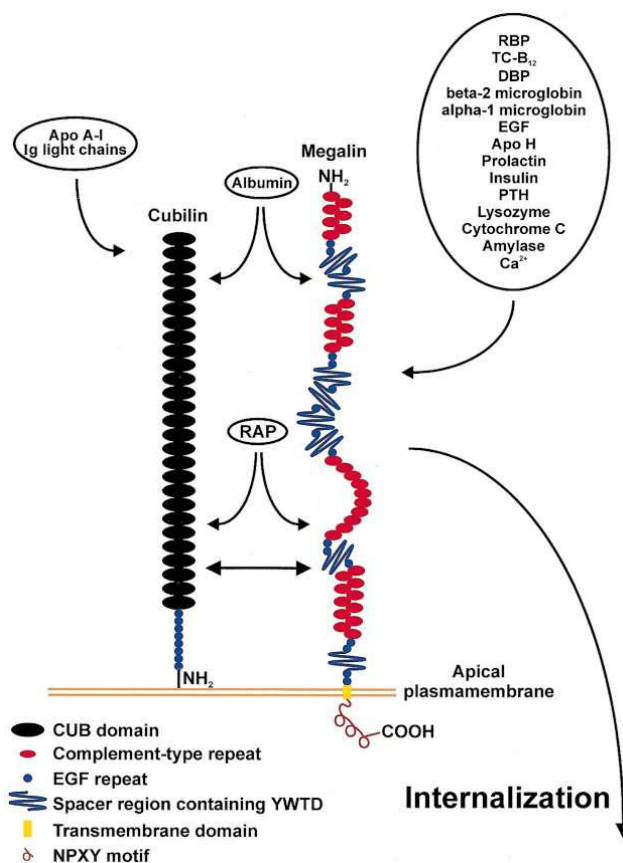


Obr. 9. Transportní systémy v buňkách ledvinných tubulů

3.2.1 Megalinový transportér

Peptidy jsou v ledvinách transportovány aktivní reabsorpcí pomocí aktivních přenašečů (viz výše). Za fyziologických podmínek jsou téměř všechny filtrované peptidy a proteiny reabsorbovány. Mezi důležité mechanismy aktivní reabsorpce v buňkách proximálního tubulu patří multiligandové endocytární receptory megalin a kubilin. Megalin je transmembránový protein o velikosti 600 kDa, který patří do skupiny receptorů o nízké hustotě (LDL). Kubilin, také známý jako intestinální intrinsic faktor-kobalaminový receptor, má velikost 460 kDa. V renálním proximálním tubulu je exprimován společně s megalinem. Přestože jsou tyto receptory strukturálně velmi odlišné, některé rysy mají podobné. Jsou to multiligandové

endocytární receptory, sdílí spolu několik ligandů a oba jsou důležité pro normální tubulární reabsorpci proteinů včetně albuminu. Kubilin váže albumin, lehké řetězce imunoglobulinů a apolipoprotein A-I. Mezi ligandy identifikující megalin patří proteiny vázající vitaminy, hormony, enzymy, apolipoprotein H, albumin, β_2 - a α_1 -mikroglobulin (obr. 10). Ztráta těchto proteinů a vitamínů močí u myší postrádajících megalin dokumentuje fyziologický význam tohoto receptoru. Uvažuje se i o roli megalinu a kubilinu při metabolismu a homeostáze esenciálních vitamínů, včetně vitamínu D, a také při homeostáze kalcia. Megalin je zapojený i v tubulárním uptake potenciálních nefrotoxických léčiv včetně aminoglykosidů - gentamicinu, netilmicinu, amikacinu (Christensen a Birn 2001).



Obr. 10. Znárodnění strukturální organizace a interakce mezi kubilinem a megalinem

3.3 METABOLIZMUS PROTEINŮ A PEPTIDŮ V LEDVINÁCH

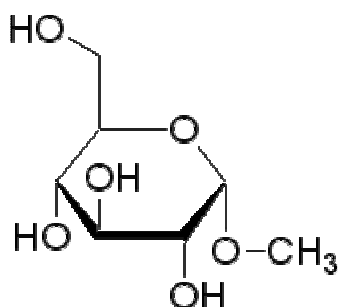
Ledviny jsou dobře známé jako hlavní místo katabolizmu nízkomolekulárních proteinů. Jedná se o komplex procesů, který zahrnuje několik odlišných mechanismů působících na různá mikroanatomická místa uvnitř ledvin. Renální uptake peptidů a malých proteinů je výsledkem jejich glomerulární filtrace, následované tubulární reabsorpcí a lysozomální degradací. Proteiny z plazmy se dostanou do glomerulárních kapilár v ledvinách přes renální artérie a jejich větve. Glomerulus filtruje proteiny v závislosti na molekulární hmotnosti. Jestliže jejich molekulární hmotnost překročí hmotnost kolem 60 kDa, pak jsou tyto proteiny příliš velké k filtrování přes intaktní glomerulární bazální membránu. Větší molekuly, např. kompletní IgG o velikosti 150 kDa, budou proto procházet glomerulem bez objevení se v primární moči. Menší molekuly jsou naopak schopné projít bazální membránou. Bazální membrána glomerulu je negativně nabitá. Kationaktivní peptidy a proteiny jsou přichyceny k bazální membráně a mohou přejít velmi snadno do primární moči. Naopak filtrace anionických proteinů a peptidů je méně efektivní kvůli elektrostatickému odporu bazální membrány (Maack a kol. 1979).

Filtrované proteiny prochází přes proximální tubulus. Téměř všechny proteiny a peptidy jsou kvantitativně reabsorbovány buňkami proximálního tubulu pomocí endocytózy. Za tímto účelem se proteiny a peptidy váží k záporně nabitým receptorům na povrchu proximálních tubulárních buněk prostřednictvím elektrostatické interakce. Kationické proteiny jsou v porovnání s anionickými lépe reabsorbovány. Jakmile vstoupí do tubulárních buněk, jsou peptidy přeneseny do lysozomů a rozkládány proteolytickými enzymy. Výsledné rozkladné produkty (např. aminokyseliny, radioaktivně značené deriváty) jsou převážně přenášeny zpět do krevního řečiště, ale v určité míře jsou vylučovány do moče. Jodovaný tyrozin, který je hlavním metabolickým produktem proteinů značených radioaktivním jódem, je rychle uvolněn z tubulárních buněk. Naopak aminokyseliny (^{111}In -, $^{88/90}\text{Y}$ - či ^{161}Tb -DTPA-lysin nebo $^{125/131}\text{I}$ - dilaktitol-tyramin), nemohou opustit lysozomy a zůstávají zachycené v proximálních tubulárních buňkách. Bazická aminokyselina lysin je schopná snižovat renální uptake. Je kladně nabitá a brání přenosu proteinů přes membránu buněk proximálního tubulu. Také maleát je látka snižující renálního uptake peptidů. Tyto látky způsobují proteinurii neutralizací negativně nabitého lumenálního povrchu tubulárních buněk, kde se právě váží

proteiny a peptidy k jejich receptorům. Proteinurie vzniká tedy v důsledku snížené tubulární reabsorpce proteinů, což snižuje transport proteinů z endocytárních vakuol do lysozomů v proximálních tubulárních buňkách s následným nízkým tubulárním katabolizmem proteinů (Behr a kol. 1998).

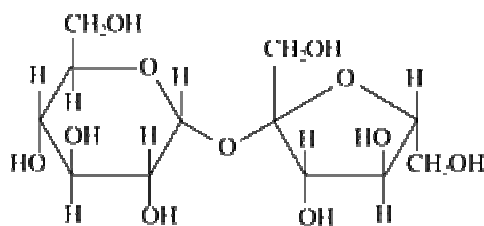
3.4 STUDOVANÉ PEPTIDY A MODELOVÉ LÁTKY

Metylglukóza, (α -methyl glykosid; α -MG) (obr. 11), má jasně definovaný transportní mechanismus a může sloužit jako srovnávací látka pro porovnávání transportu dalších studovaných látek. Metylglukóza patří mezi analogy glukózy. 1-O-methyl- α -D-glukopyranosid nemůže být v buňce metabolizován. Je vhodným substrátem pro aktivní sodíko-glukózový kotransportový přenašeč na apikální membráně buněk, ale nepřenáší se přenašečem pro usnadněný transport na basolaterální membráně z buňky ven, a proto je α -MG kumulována v buňce (Boogaard a kol. 1989).



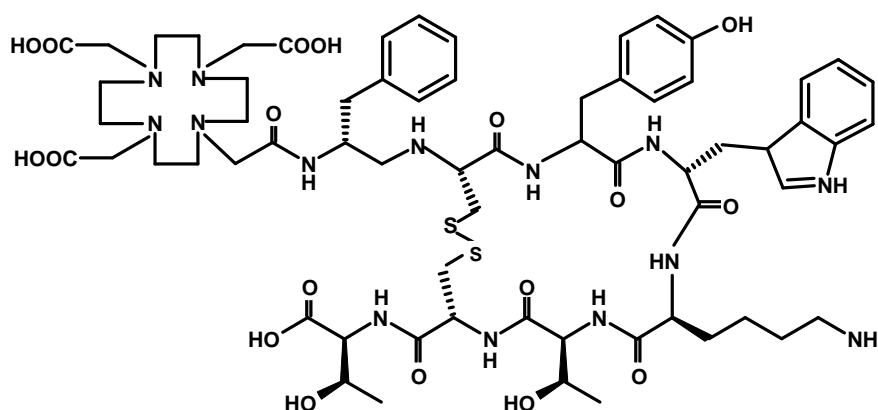
Obr. 11. Strukturální vzorec metylglukózy

Sacharóza (obr. 12) je látka běžně dostupná, u které je jako u metylglukózy také dobře popsán charakter transportu v ledvinách. V tomto případě sacharóza přechází do buněk pasivní difúzí.



Obr. 12. Strukturální vzorec sacharózy

^{111}In -DOTA-oktreotát je peptid, který patří do skupiny analogů somatostatinu značených radionuklidem ^{111}In . Ve studiích bylo prokázáno, že ve srovnání s $[\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3]$ oktreotidem, má $[\text{DTPA}^0, \text{Tyr}^3]$ oktreotát, ve kterém je threoninol na C konci nahrazen threoninem, lepší vazbu na somatostatinové receptory v tkáních obsahujících tyto receptory. Také DOTA analog, $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ oktreotát, značený radiokovem ^{177}Lu , má velmi dobrý účinek na regresi nádorů. Bylo také zjištěno, že afinita $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ oktreotátu k somatostatinovým receptorům typu sst2 je devítinásobně vyšší v porovnání s $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ oktreotidem (Kwekkeboom a kol. 2001).



Obr. 13. Struktura DOTA-Tyr³-oktreotátu

Mezi studované látky patřil také ^{125}I -DOTA-oktreotát, který má radionuklid ^{125}I navázaný na benzenovém jádře ve struktuře tyrosinu.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

Při experimentech byl použit biologický, chemický materiál a přístrojové vybavení Oddělení radiofarmak na Katedře farmakologie a toxikologie FaFUK.

4.1.1 Biologický materiál

Ledvinový buněčný model – izolované nativní buňky potkana byly získány z laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 350 – 400 g (z chovné stanice BIOTEST s.r.o., Konárovice, ČR). Potkani byli chováni za konvenčních podmínek při dvanáctihodinovém světelném režimu. Zvířatům byla odejmuta potrava 12 hod. před pokusy.

Suspenze pankreatických buněk byla poskytnuta PharmDr. Melicharovou z Katedry farmakologie a toxikologie FaFUK. Buňky pocházejí z buněčné linie potkaních exokrinních pankreatických nádorových buněk AR42J.

4.1.2 Chemikálie

Kolagenáza = collagenasa cruda (Sevapharma, ČR)

Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

Krebs-Henseleitův roztok

Sacharóza = (U-¹⁴C)sucrose, specifická aktivita 22,2 GBq/mmol, (Amersham, Biosciences, VB)

Metylglukóza = methyl- α -D-(U-¹⁴C)glucopyranoside, specifická aktivita 10,0 GBq/mmol, (Amersham, Biosciences, VB)

DOTA-Tyr³-oktreotát = DOTA-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr, (piCHEM, Graz, Rakousko)

Scintilační roztok = Sigma – Fluor High Performance LSC cocktail, (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

Gentamicin Lek, inj. 80mg/2ml

Albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

Maleát (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

4.1.3 Přístroje

Mikroskop, Meopta, ČR

Centrifuga 3K30H, Sigma, Laborentrifugen GmbH, Osterode, Německo

Laboratorní třepačka KS – 15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15, Johanna Otto GmbH, Hechingen, Německo

Beta-spektrometr 1219 Rackbeta, Wallac, Turku, Finsko

Gama-spektrometr 1480 WizardTM 3", Wallac, Turku, Finsko

4.2 POSTUP

4.2.1 Příprava roztoků

Zásobní roztoky pro přípravu Krebs-Henseleitova roztoku (každý zvlášť připravený v zásobě)

Název soli	Množství v g/l
NaCl	160,9
KCl	11,0
KH ₂ PO ₄	29,92
MgSO ₄ · 7H ₂ O	27,4
CaCl ₂ · 2H ₂ O	15,73
nebo CaCl ₂ bezv.	11,88
NaHCO ₃	9,71

KREBS-HENSELEIT zásobní B

Název roztoku	Množství v ml
NaHCO ₃	100,0

KREBS-HENSELEIT zásobní A

Název roztoku	Množství v ml
destilovaná voda	78,5
NaCl	20,0
KCl	15,0
CaCl ₂	11,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0

Smíchat A a B v čas potřeby = Krebs-Henseleit zásobní

KREBS-HENSELEIT C

Krebs-Henseleit zásobní	150,0 ml
destilovaná voda	150,0 ml
HEPES	0,9 g

KREBS-HENSELEIT D – s glukózou

Krebs-Henseleit C	150,0 ml
glukóza	150 mg

Roztoky C aD chladit v ledové drti (2-4°C)

4.2.2 Příprava buněčného materiálu – izolované potkaní ledvinné buňky

(příprava prováděna Doc. Trejtnarem a paní laborantkou I. Filipovou z Katedry farmakologie a toxikologie FaFUK)

1. Aparatura byla naplněna roztokem Hanks I a Hanks II, kolagenázou a byla temperována.
2. Z potkana byly vypreparovány ledviny a po opláchnutí teplým fyziologickým roztokem byly přeneseny do aparatury.
3. Po dostatečném rozvolnění kolagenního pojiva ledvinných buněk byly buňky přeneseny do kádinky s 50 ml K-H pufru, který obsahuje albumin a kolagenázu. Zde bylo provedeno úplné rozvolnění ledvinné tkáně mechanicky pinzetou a na elektromagnetické míchačce.
4. Získaná suspenze ledvinných buněk byla přefiltrována přes gázu a sílonové síto. Podrobnější popis přípravy aparatury, postupu preparace a izolace ledvinných buněk je uveden v rigorózní práci (Vaňková 2007).

5. Takto získaná suspenze buněk byla rozdělena na dvě stejné části a centrifugována v silnostěnných zkumavkách - 25 ml v chlazené centrifuze (při 130 g, po dobu 5 min, při teplotě 4°C) .
6. Supernatant byl odsán s maximální opatrností. K buňkám bylo do každé zkumavky přidáno 5 ml chladného roztoku Krebs-Henseleit + glukóza a byla opět provedena centrifugace (80 g, 1 min, 4°C).
7. Postup dle bodu 6 byl zopakován ještě dvakrát.
8. Na závěr byly po odsátí supernatantu ledvinné buňky slity do jedné zkumavky a doplněny a dispergovány do 20 ml K-H pufru s glukózou.

Připravená suspenze ledvinných buněk byla použita pro transportní studie.

4.2.3 Příprava potkaních exokrinních pankreatických buněk AR42J

(příprava prováděna PharmDr. Melicharovou z Katedry farmakologie a toxikologie FaFUK)

Tyto buňky jsou odvozené z tumoru potkaního pankreatu.

Buňky rostou v sférických koloniích, které mohou být volně spojeny. Kultury 1:2 se každých 48 hodin rozdělují do nových baněk a udržují si mezi 1-9x100,000 buněk/ml. Přichycené buňky by měly být vytlačené s použitím 0,2% EDTA. Kultivační médium obsahuje RPMI 1640, 10% zárodečné hovězí sérum (FBS) a 2mM glutamin. Podle dostupných údajů tyto buňky neexprimují megalinový receptor.

Podobně jako u ledvinných buněk i zde byla předána připravená suspenze pankreatických buněk a použita pro vybranou transportní studii.

4.2.4 Sledování životnosti ledvinných buněk

1. Před každým experimentem bylo 60 µl suspenze buněk smícháno s 60 µl trypanové modři.
2. Buňky byly počítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce při zvětšení 10x10.
3. Byl zjištěn průměrný počet živých (ppŽB) a průměrný počet mrtvých buněk (ppMB).
4. Dle vzorce: $[(ppŽB) / (ppŽB + ppMB)] \cdot 100$ (v %) byla vypočtena životnost ledvinných buněk.

4.2.5 Akumulační studie

4.2.5.1 Obecný postup:

1. Podle počtu živých buněk byla naředěna suspenze buněk Krebs-Henseleitovým pufrem D tak, aby bylo v 1 ml suspenze přibližně 1,5 - 2 miliony buněk.
2. Buňky byly dispergovány a 1 či 2 ml byly napipetovány do jednotlivých inkubačních zkumavek.
3. Zkumavky s buňkami byly ponechány 3 až 5 min v inkubátoru při 37°C kvůli teplotě na kultivační teplotu za třepání (280 kmitů/min). Při transportních experimentech za nižších teplot byly umístěny na cca 5 minut do ledové lázně pro teplotu 1-2°C či 5-6°C.
4. Do každého vzorku byla přidána zkoumaná značená látka a zkumavky byly inkubovány za výše uvedených podmínek.
5. Po uplynutí doby byly přidány 4 ml K-H pufru C o teplotě 4°C pro inhibici transportních procesů.
6. Poté byly inkubační zkumavky centrifugovány 1 minutu při 80 g a 4°C a následně bylo odebráno 0,5 ml supernatantu z každé zkumavky jako vzorek inkubačního média.
7. Zbytek supernatantu byl kvantitativně odsán a k buňkám byly přidány další 4 ml ledového pufru. Následovala další centrifugace za stejných podmínek jako v bodě 6. Supernatant byl opatrně odsán a buňky byly znovu dispergovány ve 4 ml pufru a znovu centrifugovány a supernatant odsán. Tento postup byl ještě jednou opakován.
8. Na závěr byly buňky ze zkumavek převedeny do měřících lahvíček výplachem pomocí pufru (vymývání zkumavek 3x2 ml).
9. Radioaktivita odebraných vzorků a standardů byla měřena pomocí β - či γ -spektrometru .

4.2.5.2 Akumulace ^{14}C -sacharózy a ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách

Akumulace u metylglukózy a sacharózy byla studována v šesti časových intervalech: 1, 2, 5, 10, 20, 30 min.

Bylo použito 10 μl roztoku sacharózy o koncentraci 33 $\mu\text{mol/l}$ (finální koncentrace - 0,16 $\mu\text{mol/l}$) a 10 μl roztoku metylglukózy o koncentraci 49 $\mu\text{mol/l}$ (finální koncentrace - 0,24 $\mu\text{mol/l}$) .

1. Do každé zkumavky se suspenzí buněk o objemu 2 ml bylo přidáno 10 μ l značené látky.
2. Buňky byly inkubovány při 37°C; po uplynutí inkubační doby byly přidány 3 ml ledového pufru. Po centrifugaci bylo odebráno 0,5 ml média. Zbytek supernatantu byl odstraněn a k buňkám byly přidány 4 ml K-H pufru. Po následné centrifugaci a odsátí supernatantu byly buňky promyty ještě 2x 5 ml K-H pufru.
3. Standard byl připraven smísením 10 μ l radioizotopu s 5 ml destilované vody. U každého pokusu byly připravovány 3 standardy.

Před měřením radioaktivity beta-spektrometrem bylo k médiím, buňkám a standardům přidáno 10ml scintilačního roztoku. Směs byla před měřením vždy řádně protřepána.

Naměřené hodnoty aktivity jsou uvedeny v jednotkách DPM – počet rozpadů za minutu.

4.2.5.3 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách

V experimentech s ^{111}In -DOTA-oktreotátem byla sledována závislost akumulace na množství buněk (0,5; 1; 2 a 3×10^6 buněk v 1 ml suspenze) a závislost na množství přidávaného oktreotátu. Dále byly provedeny experimenty, v kterých byly přidány různé látky s potencionálním účinkem na akumulaci peptidu v tomto množství: 20 a 100 μ l albuminu o $c = 5$ mmol/l (finální koncentrace - 0,1 a 0,5 mmol/l), 10; 30 a 100 μ l gentamicinu o $c = 84$ mmol/l (finální koncentrace - 0,8; 2,5 a 8 mmol/l), 100 μ l lysinu o $c = 1$ mol/l (finální koncentrace - 0,1 mol/l) a 176 μ l maleátu o $c = 145$ mmol/l (finální koncentrace - 22 mmol/l).

Bylo použito 10 μ l roztoku ^{111}In -DOTA-oktreotátu o koncentraci 645 nmol/l (finální koncentrace - 6,4 nmol/l).

1. Do každé zkumavky byl vždy napipetován 1 ml suspenze ledvinných buněk, ke kterému bylo přidáno 10 μ l ^{111}In -DOTA-oktreotátu (kontrola). V případě akumulace v závislosti na množství peptidu bylo přidáno 2, 10 nebo 50 μ l oktreotátu. Albumin (20 a 100 μ l), gentamicin (10, 30 a 100 μ l), lysin (100 μ l) a maleát (176 μ l) byly do vzorku pipetovány před přidavkem oktreotátu. Případný nestejný objem vzorků byl vyrovnáván doplněním adekvátním objemem pufru.
2. Po inkubaci při 37°C byly ke vzorkům přidány 4 ml studeného pufru a po centrifugaci bylo odebráno 0,5 ml média, ke kterému bylo přidáno 5 ml destilované vody. Zbytek

supernatantu byl odsán a buňky byly promývány a přeneseny do měřících lahvíček dle obecného postupu 4.2.5.1.

3. Část vzorků byla inkubována při teplotě 1-2°C nebo při teplotě 5-6°C. Kromě inkubační teploty byl postup shodný jako v bodě 2.
4. Standardy byly připraveny smísením 10 µl radioizotopu s 5 ml destilované vody. Pro každý pokus 3.

Měření radioaktivity vzorků bylo prováděno pomocí γ -spektrometru ve srovnání se standardními vzorky.

Naměřené hodnoty aktivity jsou uvedeny v jednotkách CPM – počet impulzů za minutu.

4.2.5.4 Akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu v buňkách

Vedle standardní inkubace byly provedeny akumulací experimenty za přítomnosti 100 µl lysinu o $c = 1 \text{ mol/l}$ (finální koncentrace - 0,1 mol/l).

Bylo použito 10 µl roztoku ^{125}I -DOTA-oktreotátu o koncentraci 640 nmol/l (finální koncentrace - 6,3 nmol/l).

1. Do každé zkumavky byl vždy napipetován 1 ml suspenze ledvinných buněk, ke kterému bylo přidáno 10 µl ^{125}I -DOTA-oktreotátu (kontrola). Lysin (100 µl) byl ke vzorku přidán před přidáním oktreotátu. Další postup byl shodný jako v obecném postupu 4.2.5.1.
2. Po inkubaci (30 min, 37°C) byly ke vzorkům přidány 4 ml pufru a po centrifugaci bylo odebráno 0,5 ml média, ke kterému bylo přidáno 5 ml destilované vody. Zbytek supernatantu byl odstraněn a buňky byly 3x promyty dle obecného postupu v bodě 4.2.5.1.
3. Standardy byly připraveny smísením 10 µl radioizotopu s 5 ml destilované vody. Pro každý pokus 3.

Měření radioaktivity vzorků bylo prováděno pomocí γ -spektrometru ve srovnání se standardními vzorky.

Naměřené hodnoty aktivity jsou uvedeny v jednotkách CPM – počet impulzů za minutu.

5 VÝSLEDKY

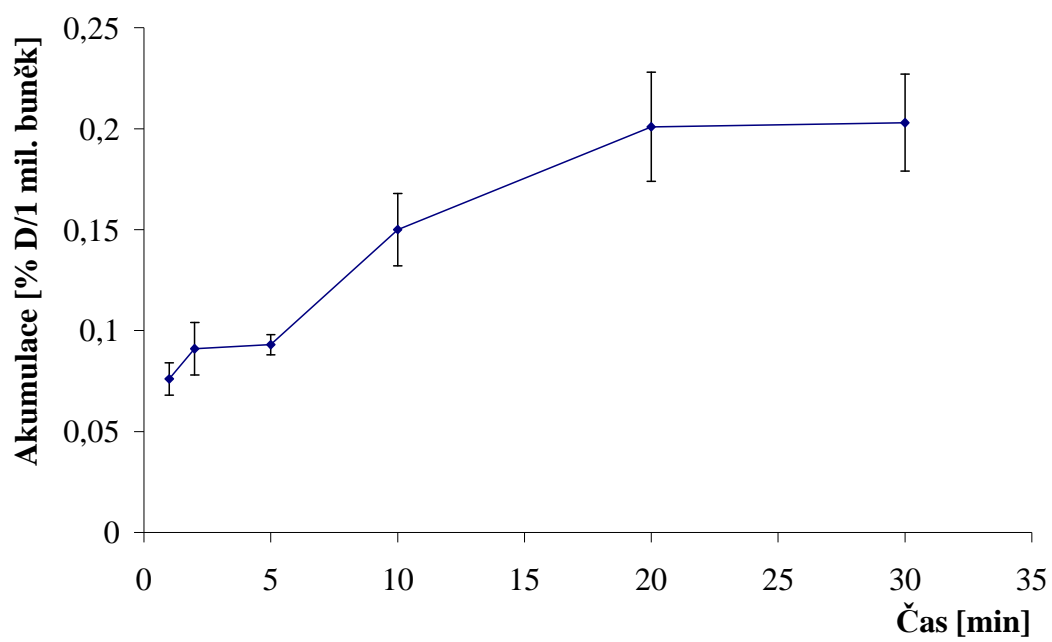
5.1 Akumulace ¹⁴C-metylglukózy

Následující tabulky obsahují výsledky měření průběhu akumulace ¹⁴C-metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách v závislosti na době inkubace.

Tabulka 1. Akumulace ¹⁴C-metylglukózy v ledvinných buňkách

Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buněčné frakci (dpm)	Přepočtená radioaktivita (dpm/10 ⁶ bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr ± SD
1	766,6	239,6	3195,19	0,075	0,076 ± 0,008
	652,2	203,8	3195,19	0,064	
	846,4	262,2	3035,04	0,086	
	758,3	234,9	3035,04	0,077	
2	845,6	264,3	3195,19	0,083	0,091 ± 0,013
	757,9	236,8	3195,19	0,074	
	1015,8	314,7	3035,04	0,104	
	1023,7	317,1	3035,04	0,104	
5	1007,4	314,8	3195,19	0,099	0,093 ± 0,005
	955,7	298,7	3195,19	0,093	
	839,2	260,0	3035,04	0,086	
	-	-	-	-	
10	1369,6	428,0	3195,19	0,134	0,150 ± 0,018
	-	-	-	-	
	1711,5	530,2	3035,04	0,175	
	1381,2	427,9	3035,04	0,141	
20	1879,5	587,3	3195,19	0,184	0,201 ± 0,027
	1850,6	578,3	3195,19	0,181	
	2345,5	726,6	3035,04	0,239	
	-	-	-	-	
30	1853,1	579,1	3195,19	0,181	0,203 ± 0,024
	2086,9	652,2	3195,19	0,204	
	2363,5	732,2	3035,04	0,241	
	1798,1	557,0	3035,04	0,184	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.

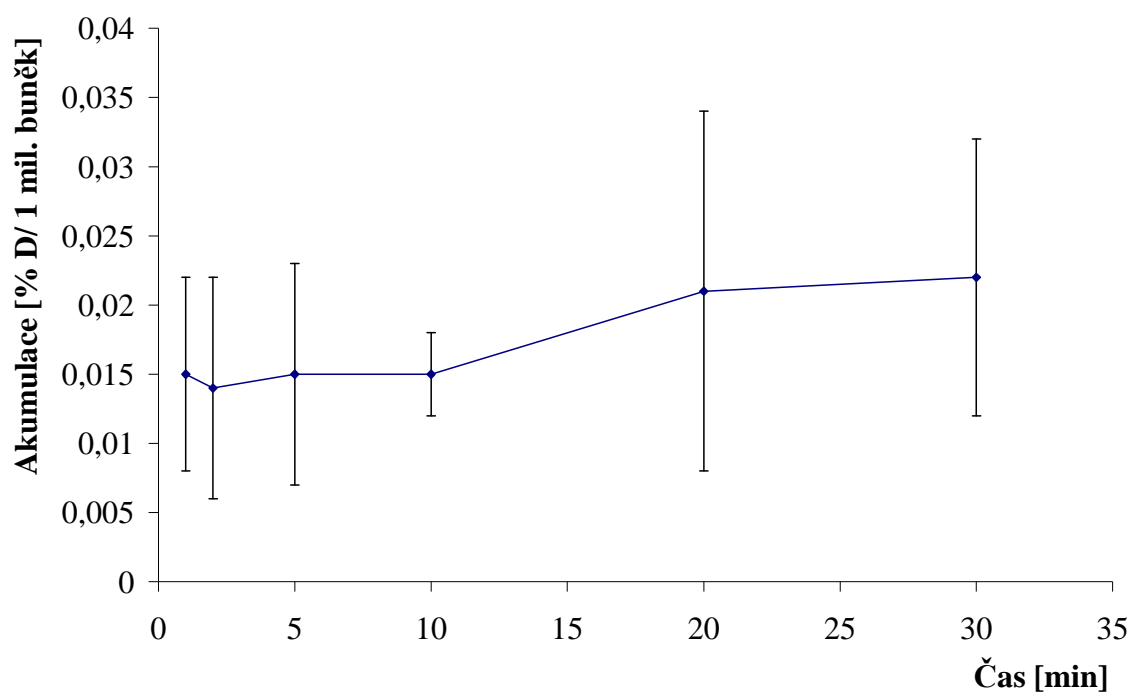


Graf 1. Akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných buňkách

Tabulka 2. Akumulace ^{14}C -metylglukózy v exokrinních pankreatických nádorových buňkách

Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buněčné frakci (dpm)	Přepočtená radioaktivita (dpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
1	111,3	27,8	3517,59	0,008	0,015 \pm 0,007
	104,4	26,1	3517,59	0,007	
	124,9	76,4	3598,61	0,021	
	131,7	80,6	3598,61	0,022	
2	114,1	28,5	3517,59	0,008	0,014 \pm 0,008
	73,1	18,3	3517,59	0,005	
	115,5	70,7	3598,61	0,020	
	142,1	87,0	3598,61	0,024	
5	95,5	23,9	3517,59	0,007	0,015 \pm 0,008
	117,1	29,3	3517,59	0,008	
	156,4	95,7	3598,61	0,027	
	96,2	58,9	3598,61	0,016	
10	162,0	40,5	3517,59	0,012	0,015 \pm 0,003
	169,1	42,3	3517,59	0,012	
	86,7	53,1	3598,61	0,015	
	117,8	72,1	3598,61	0,020	
20	181,2	45,3	3517,59	0,013	0,021 \pm 0,013
	127,3	31,8	3517,59	0,009	
	250,2	153,1	3598,61	0,043	
	116,5	71,3	3598,61	0,020	
30	169,7	42,4	3517,59	0,012	0,022 \pm 0,010
	166,7	41,7	3517,59	0,012	
	177,8	108,8	3598,61	0,030	
	197,2	120,7	3598,61	0,034	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 2. Akumulace ^{14}C -metylglukózy v exokrinních pankreatických nádorových buňkách AR42J

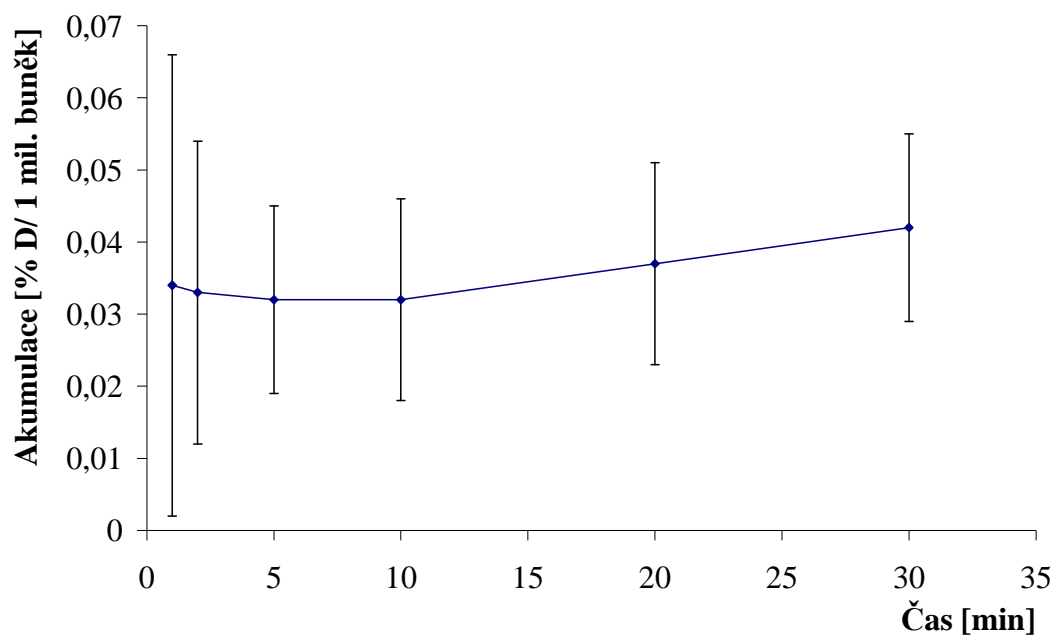
5.2 Akumulace ¹⁴C-sacharózy

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ¹⁴C-sacharózy v ledvinných buňkách v závislosti na době inkubace.

Tabulka 3. Akumulace ¹⁴C-sacharózy v ledvinných buňkách

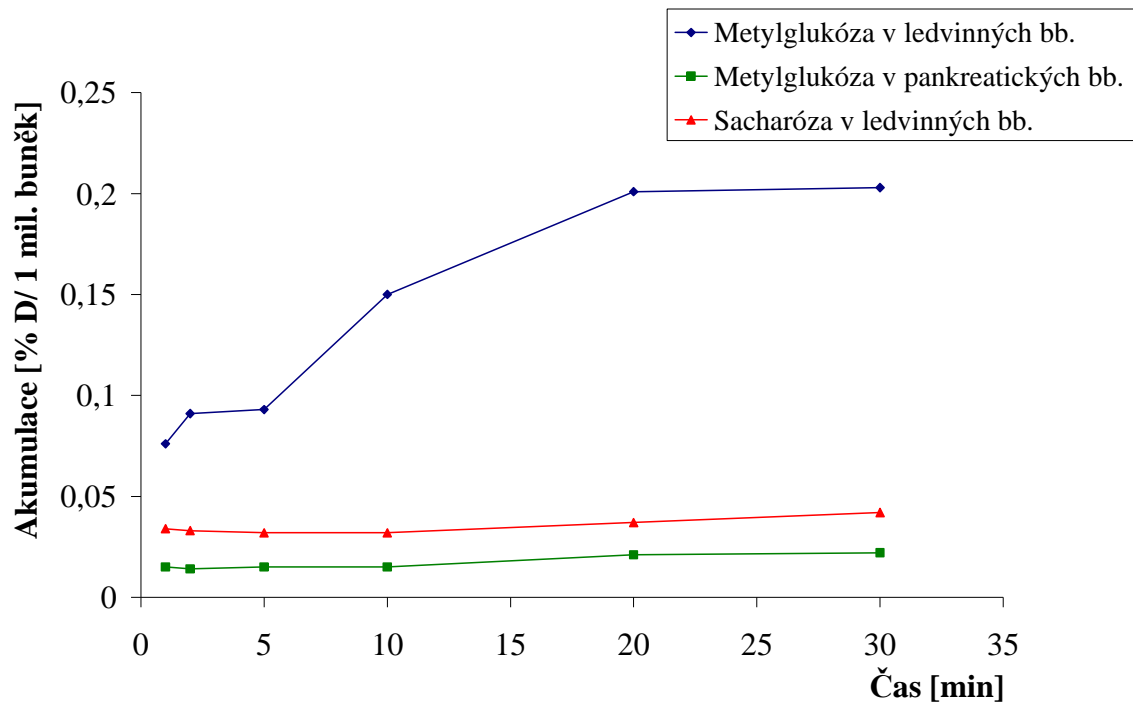
Doba inkubace (min)	Radioaktivita v buněčné frakci (dpm)	Přepočtená radioaktivita (dpm/10 ⁶ bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr ± SD
1	194,0	60,1	4784,10	0,013	0,034 ± 0,032
	149,3	46,3	4784,10	0,010	
	-	-	-	-	
	729,6	364,8	4658,77	0,078	
2	252,1	78,1	4784,10	0,016	0,033 ± 0,021
	155,6	48,2	4784,10	0,010	
	575,8	287,9	4658,77	0,062	
	405,9	203,0	4658,77	0,044	
5	324,4	100,5	4784,10	0,021	0,032 ± 0,013
	266,0	82,4	4784,10	0,017	
	425,4	212,7	4658,77	0,046	
	420,1	210,1	4658,77	0,045	
10	299,6	92,8	4784,10	0,019	0,032 ± 0,014
	267,0	82,7	4784,10	0,017	
	453,3	226,7	4658,77	0,049	
	391,5	195,8	4658,77	0,042	
20	397,6	123,2	4784,10	0,026	0,037 ± 0,014
	315,8	97,8	4784,10	0,020	
	469,8	234,9	4658,77	0,050	
	460,8	230,4	4658,77	0,049	
30	432,1	133,9	4784,10	0,028	0,042 ± 0,013
	485,9	150,5	4784,10	0,031	
	525,9	263,0	4658,77	0,056	
	504,0	252,0	4658,77	0,054	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 3. Akumulace ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách

5.3 Porovnání akumulace ^{14}C -sacharózy a ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických nádorových buňkách



Graf 4. Porovnání akumulace ^{14}C -sacharózy a ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách

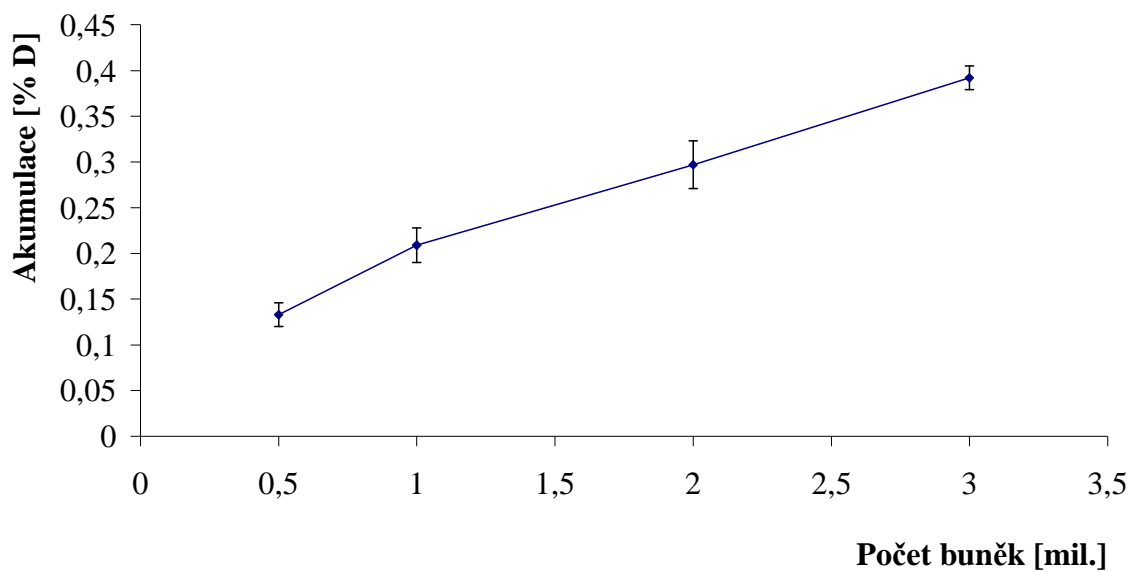
5.4 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu při různém množství buněk v inkubační směsi

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v různém množství ledvinných buněk.

Tabulka 4. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v závislosti na zvyšujícím se množství buněk

Počet buněk ($\times 10^6$)	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
			Hodnoty	Průměr \pm SD
0,5	1678,9	13907,58	0,121	0,133 \pm 0,010
	2031,7	13907,58	0,146	
	1832,6	13907,58	0,132	
1	2941,0	13907,58	0,211	0,209 \pm 0,015
	3136,7	13907,58	0,226	
	2623,5	13907,58	0,189	
2	3703,0	13907,58	0,266	0,297 \pm 0,021
	4299,2	13907,58	0,309	
	4369,1	13907,58	0,314	
3	5598,9	13907,58	0,403	0,392 \pm 0,010
	5511,8	13907,58	0,396	
	5261,9	13907,58	0,378	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 5. Závislost akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách na množství buněk

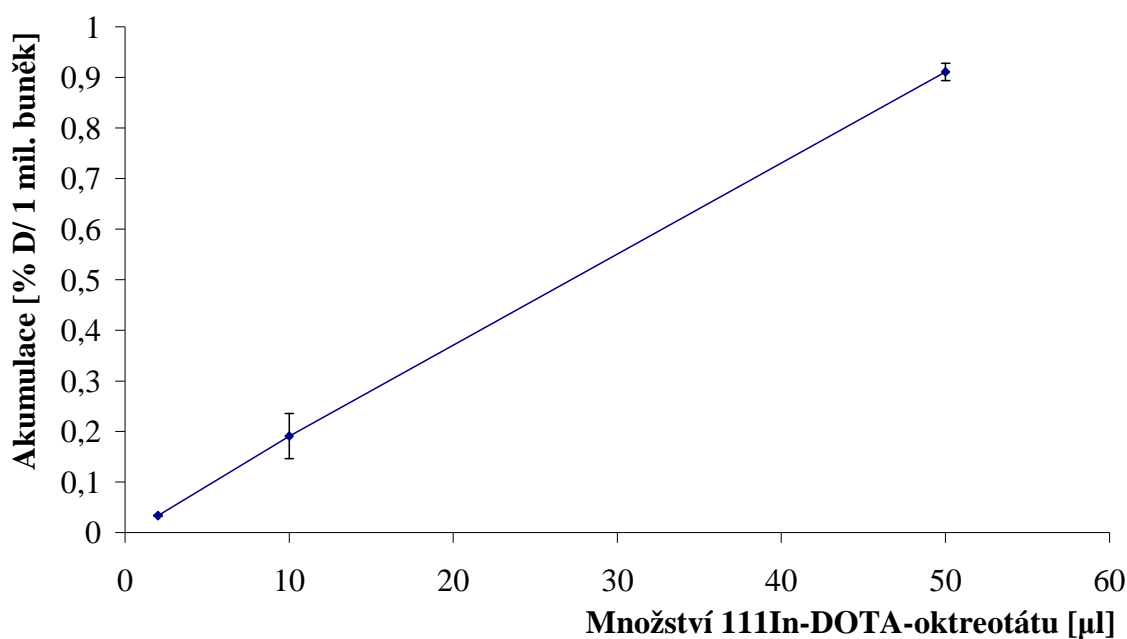
5.5 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu při různých koncentracích

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v závislosti na různém množství přidávaného peptidu. Finální koncentrace 2; 10 a 50 μl peptidu o $c = 645 \text{ nmol/l}$ jsou 1,3; 6,4 a 31 nmol/l .

Tabulka 5. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v závislosti na množství přidávaného peptidu

Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
peptid 2 μl	438,3	219,2	6 695,02	0,033	0,034 \pm 0,002
	450,4	225,2	6 695,02	0,034	
	485,7	242,9	6 695,02	0,036	
peptid 10 μl	3 399,1	1 699,6	6 695,02	0,254	0,191 \pm 0,044
	2 179,2	1 089,6	6 695,02	0,163	
	2 098,3	1 049,2	6 695,02	0,157	
peptid 50 μl	11 877,2	5 938,6	6 695,02	0,887	0,911 \pm 0,017
	12 350,7	6 175,4	6 695,02	0,922	
	12 371,7	6 185,9	6 695,02	0,924	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 6. Závislost akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách na množství peptidu

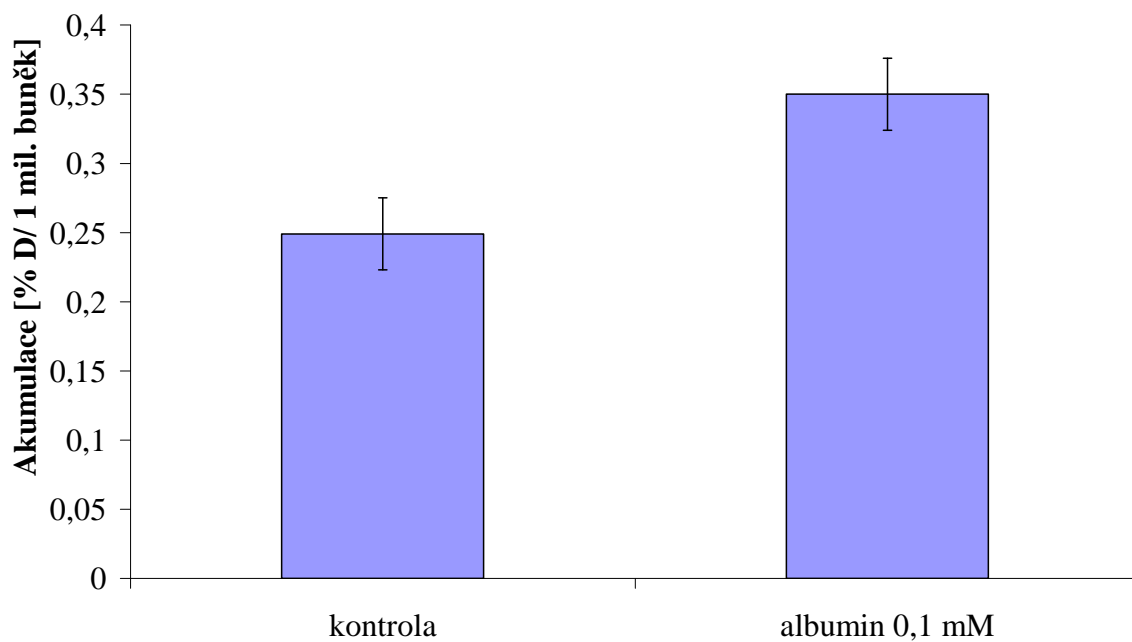
5.6 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s albuminem

Následující tabulky obsahují výsledky měření průběhu akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s dvěmi koncentracemi albuminu v ledvinných buňkách - 20 a 100 μl albuminu o $c = 5$ mmol/l (finální koncentrace – 0,1 a 0,5 mmol/l).

Tabulka 6. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti albuminu

Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	6171,4	3085,7	14 103,72	0,219	0,249 \pm 0,026
	6493,9	3247,0	14 103,72	0,230	
	8051,8	4025,9	14 103,72	0,285	
	7382,8	3691,4	14 103,72	0,262	
albumin 0,1 mM	9187,1	4593,6	14 103,72	0,326	0,350 \pm 0,026
	9498,5	4749,3	14 103,72	0,337	
	9661,8	4830,9	14 103,72	0,343	
	11129,4	5564,7	14 103,72	0,395	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.

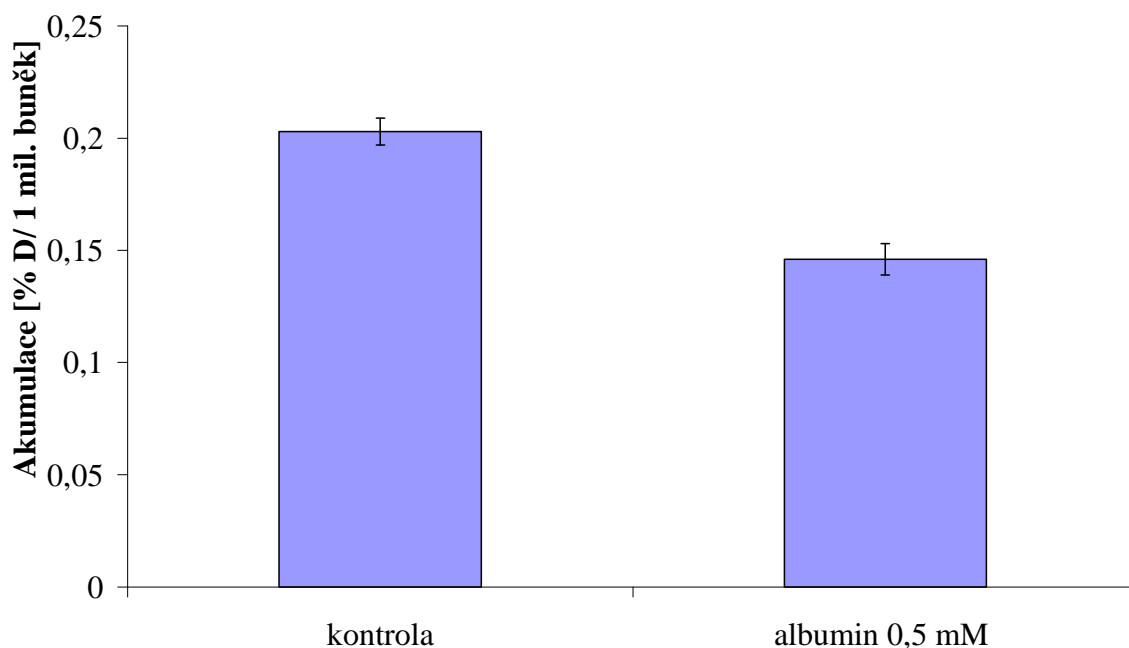


Graf 7. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti 20 μl albuminu

Tabulka 7. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti albuminu

Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	5 610,3	2 805,2	14 274,74	0,197	0,203 \pm 0,006
	6 016,9	3 008,5	14 274,74	0,211	
	5 873,9	2 937,0	14 274,74	0,206	
	5 678,2	2 839,1	14 274,74	0,199	
albumin 0,5 mM	3 929,5	1 964,8	14 274,74	0,138	0,146 \pm 0,007
	-	-	-	-	
	4 429,4	2 214,7	14 274,74	0,155	
	4 173,7	2 086,9	14 274,74	0,146	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 8. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti 100 μl albuminu

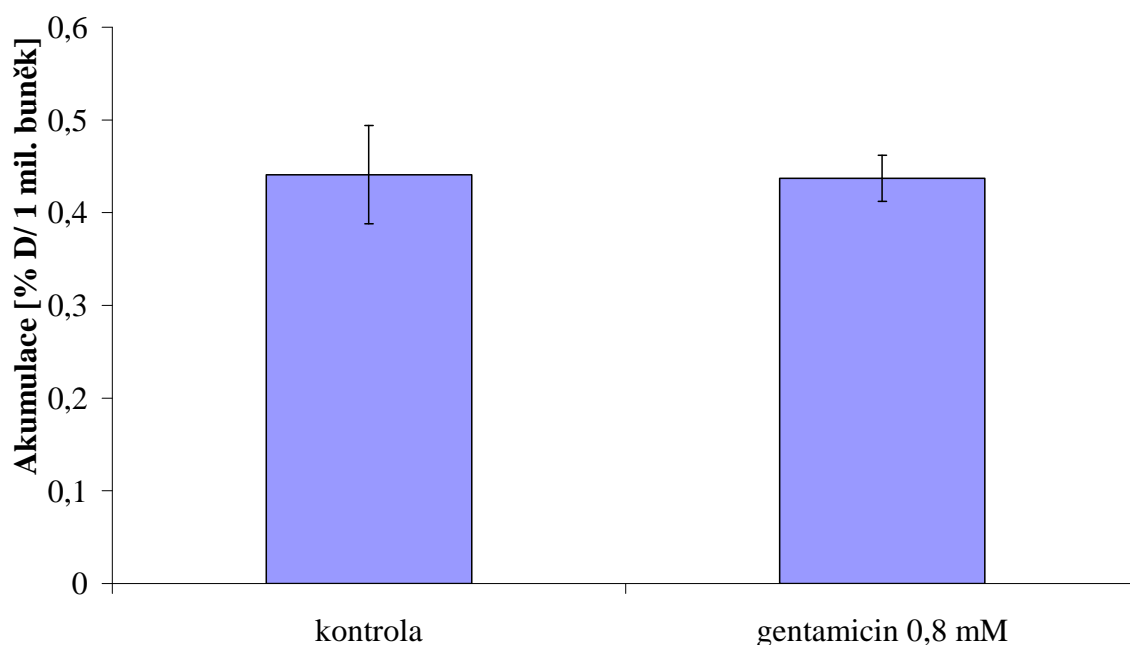
5.7 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s gentamicinem

Následující tabulky obsahují výsledky měření průběhu akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s gentamicinem v ledvinných buňkách – 10; 30 a 100 μl gentamicinu o $c = 84 \text{ mmol/l}$ (finální koncentrace – 0,8; 2,5 a 8 mmol/l).

Tabulka 8. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	5 167,8	2 583,9	7 049,54	0,367	0,441 \pm 0,053
	6 888,3	3 444,2	7 049,54	0,489	
	6 592,5	3 296,3	7 049,54	0,468	
gentamicin 0,8 mM	6 410,2	3 205,1	7 049,54	0,455	0,437 \pm 0,025
	5 660,9	2 830,5	7 049,54	0,402	
	6 415,5	3 207,8	7 049,54	0,455	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.

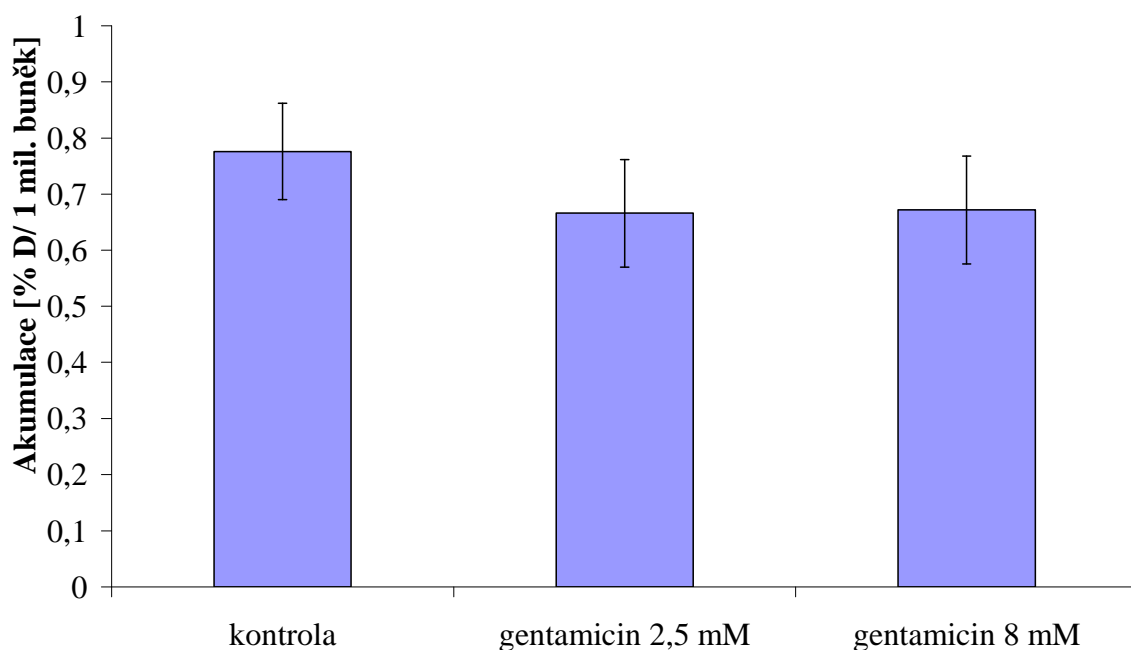


Graf 9. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti 10 μl gentamicinu

Tabulka 9. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	39479,3	19739,7	27522,11	0,717	0,776 \pm 0,086
	49391,7	24695,9	27522,11	0,897	
	39252,6	19626,3	27522,11	0,713	
gentamicin 2,5 mM	43600,5	21800,3	27522,11	0,792	0,666 \pm 0,096
	35757,2	17878,6	27522,11	0,650	
	30701,2	15350,6	27522,11	0,558	
gentamicin 8 mM	31570,7	15785,4	27522,11	0,574	0,672 \pm 0,096
	35164,5	17582,3	27522,11	0,639	
	44185,5	22092,8	27522,11	0,803	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 10. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti 30 a 100 μl gentamicinu

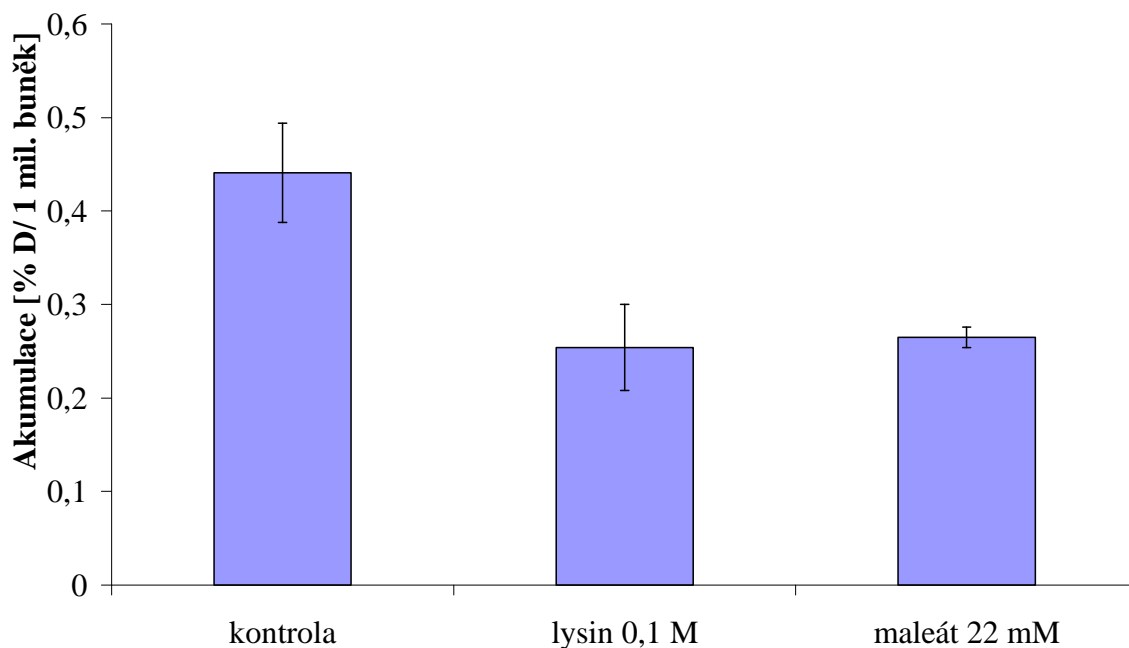
5.8 Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s lysinem a maleátem

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu s lysinem a maleátem v ledvinných buňkách – 100 μl lysinu o $c = 1 \text{ mol/l}$ (finální konc. – 0,1 mol/l), 176 μl maleátu o $c = 145 \text{ mmol/l}$ (finální konc. – 22 mmol/l).

Tabulka 10. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu a maleátu

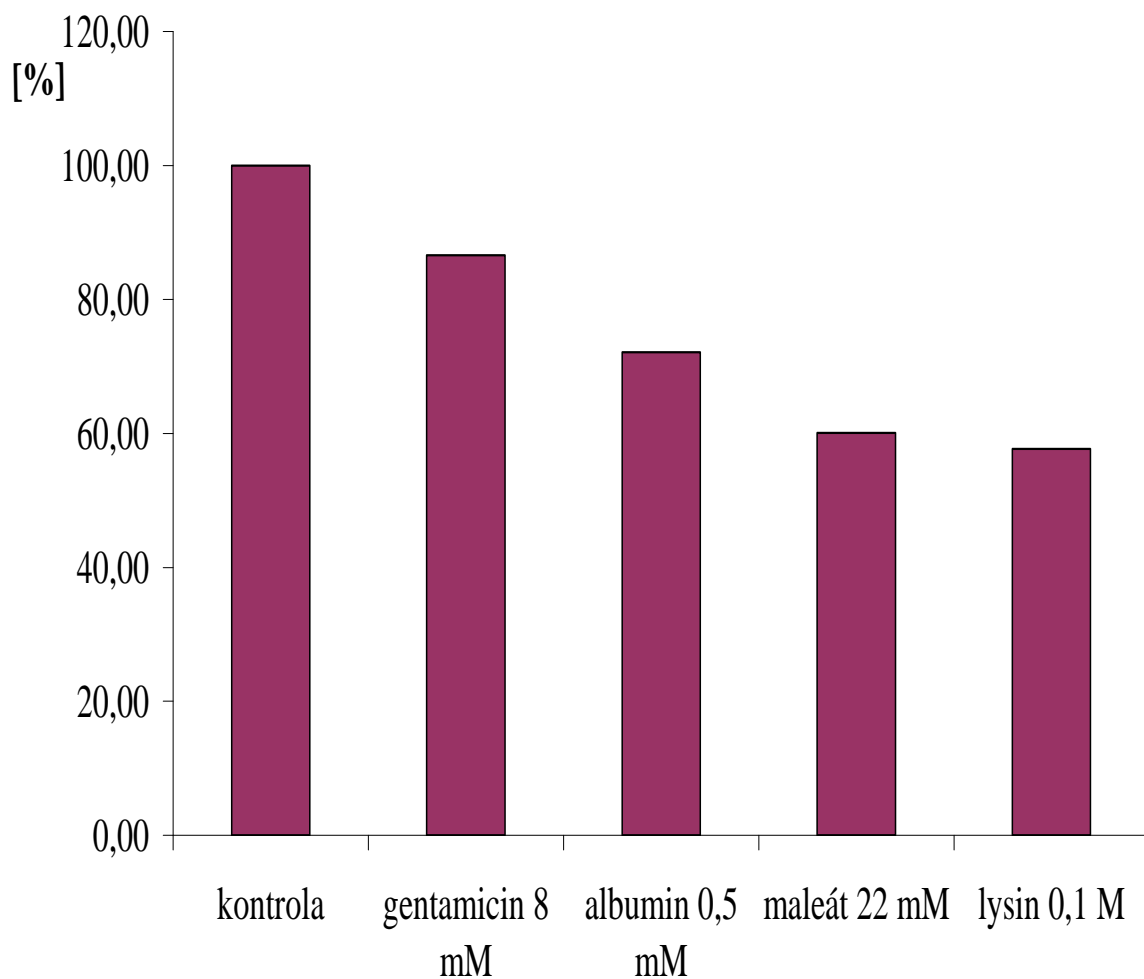
Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	5 167,8	2 583,9	7 049,54	0,367	0,441 \pm 0,053
	6 888,3	3 444,2	7 049,54	0,489	
	6 592,5	3 296,3	7 049,54	0,468	
lysín 0,1 M	4 464,0	2 232,0	7 049,54	0,317	0,254 \pm 0,046
	3 361,8	1 680,9	7 049,54	0,238	
	2 934,1	1 467,1	7 049,54	0,208	
maleát 22 mM	3 516,6	1 758,3	7 049,54	0,249	0,265 \pm 0,011
	3 815,3	1 907,7	7 049,54	0,271	
	3 869,8	1 934,9	7 049,54	0,274	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 11. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu a maleátu

5.9 Porovnání akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v přítomnosti gentamicinu, albuminu, maleátu a lysinu



Graf 12. Inhibice akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v přítomnosti gentamicinu, albuminu, maleátu a lysinu

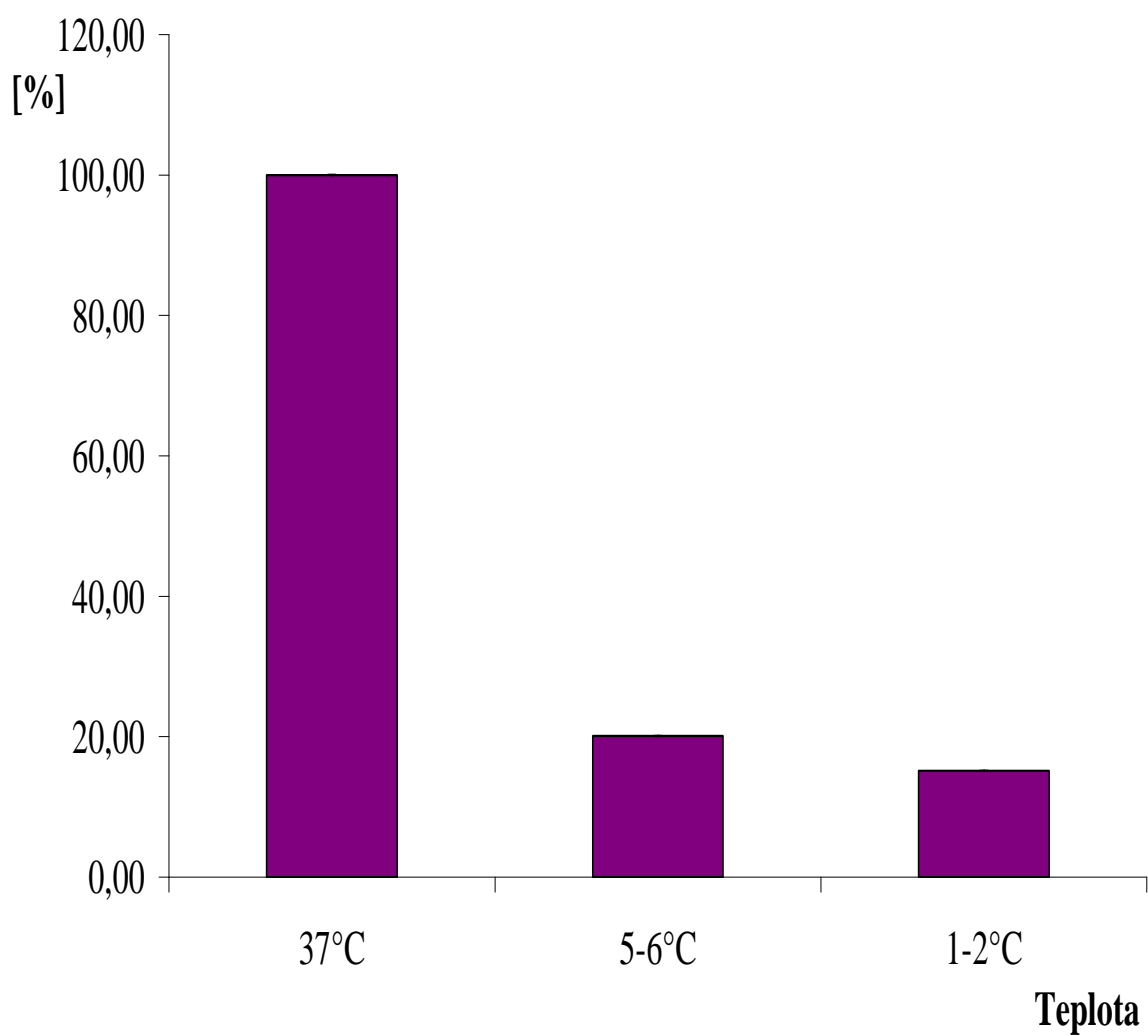
5.10 Akumulace ¹¹¹In-DOTA-oktreotátu při inkubaci za nízkých teplot

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ¹¹¹In-DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách při teplotě 1-2°C a 5-6°C.

Tabulka 11. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v závislosti na nízkých teplotách

Teplota při inkubaci	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/10 ⁶ bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)		Procentuální vyjádření
				Hodnoty	Průměr ± SD	
1-2°C	1120,3	560,2	14103,72	0,040	0,038 ± 0,003	15
	918,6	459,3	14103,72	0,033		
	1173,3	586,7	14103,72	0,042		
	1029,7	514,9	14103,72	0,037		
5-6°C	870,2	435,1	14274,74	0,030	0,041 ± 0,006	20
	1347,3	673,7	14274,74	0,047		
	1288,7	644,4	14274,74	0,045		
	1155,8	577,9	14274,74	0,040		
37°C - kontrola k 1-2°C	6171,4	3085,7	14103,72	0,219	0,249 ± 0,026	100
	6493,9	3247,0	14103,72	0,230		
	8051,8	4025,9	14103,72	0,285		
	7382,8	3691,4	14103,72	0,262		
37°C - kontrola k 5-6°C	5610,3	2805,2	14274,74	0,197	0,203 ± 0,006	100
	6016,9	3008,5	14274,74	0,211		
	5873,9	2937,0	14274,74	0,206		
	5678,2	2839,1	14274,74	0,199		

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 13. Závislost akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách na teplotě (100% = akumulace ve vzorcích inkubovaných při 37°C)

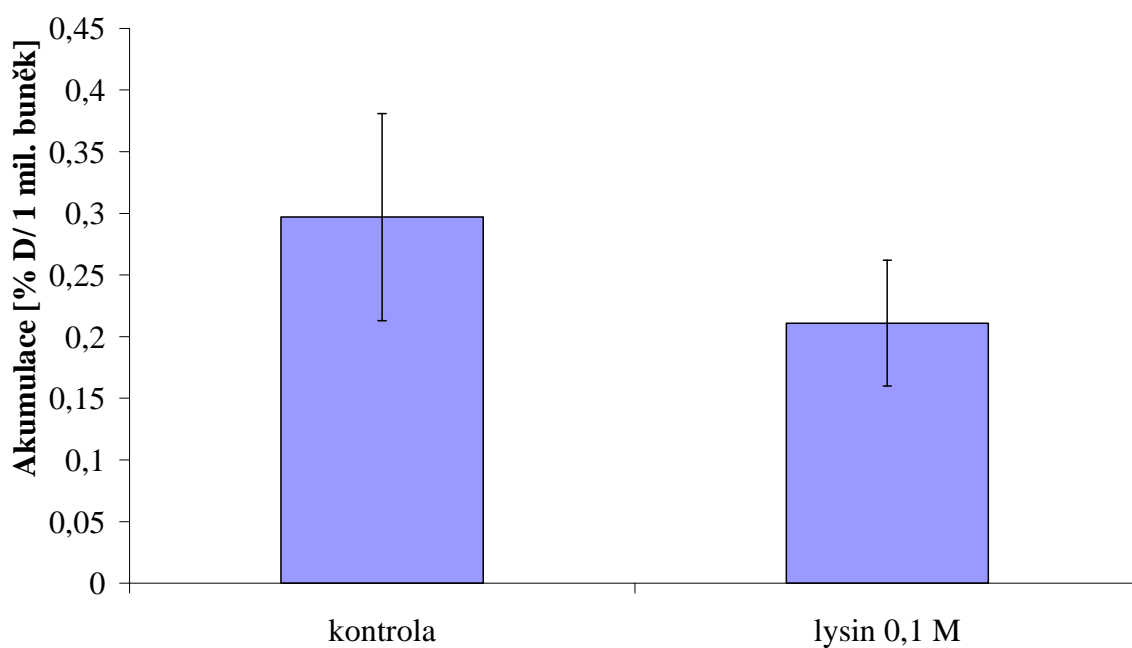
5.11 Akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu v přítomnosti lysinu

Následující tabulka obsahuje výsledky měření průběhu akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu s lysinem v ledvinných buňkách - 100 μl lysinu o $c = 1 \text{ mol/l}$ (finální konc. – 0,1 mol/l).

Tabulka 12. Akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu

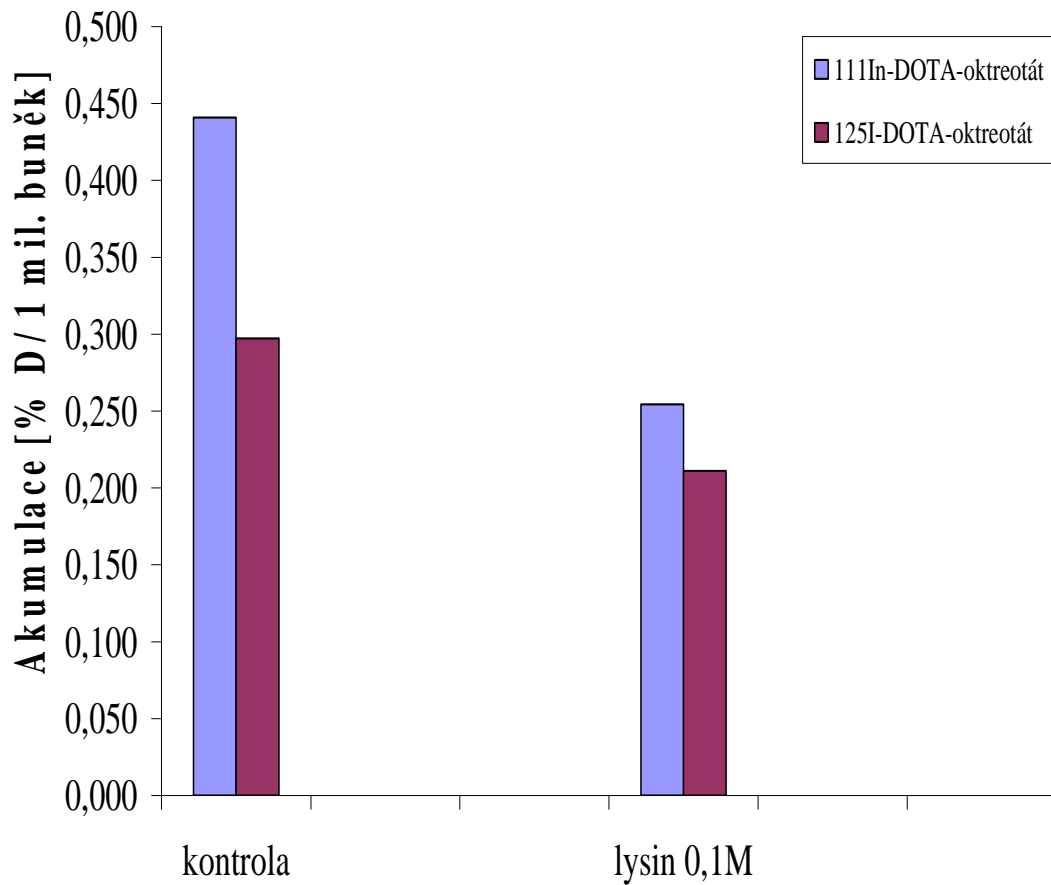
Vzorky	Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)	Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6 bb)	1% přidané dávky	Akumulace (% D)	
				Hodnoty	Průměr \pm SD
kontrola	4 824,7	2 412,4	10 933,88	0,221	0,297 \pm 0,084
	5 607,4	2 803,7	10 933,88	0,256	
	9 059,8	4 529,9	10 933,88	0,414	
lysin 0,1 M	3 614,7	1 807,4	10 933,88	0,165	0,211 \pm 0,051
	6 160,4	3 080,2	10 933,88	0,282	
	4 060,8	2 030,4	10 933,88	0,186	

1% přidané dávky je 1% vložené aktivity standardů.



Graf 14. Akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu

5.12 Porovnání akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu v přítomnosti lysinu



Graf 15. Srovnání vlivu lysinu na akumulaci ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu v přítomnosti lysinu

6 DISKUZE

U získané suspenze ledvinných buněk jsme zjišťovali jejich životnost pomocí testu s trypanovou modří. Po přidání tohoto barviva k buněčné suspenzi dochází k průniku barviva do buněk. Ty buňky, které mají intaktní membránu, nejsou zbarveny. Je to z toho důvodu, protože mají zachovanou schopnost aktivního efluxu barviva z intracelulárního prostoru. Životnost buněk se v našich experimentech pohybovala mezi 85 a 95 %.

V našich pokusech jsme nejdříve sledovali akumulární transportní studie s využitím substrátů s dobře definovaným chováním v ledvinách. Měli jsme k dispozici sacharózu a metylglukózu značené uhlíkem ^{14}C , jejichž ledvinné charakteristiky jsou v odborné literatuře dobře popsány. Průběh akumulace metylglukózy v závislosti na době inkubace jsme zkoušeli jak u izolovaných potkaních ledvinných buněk, tak u exokrinních pankreatických nádorových buněk potkana. Je známo, že influx metylglukózy v ledvinných buňkách je aktivní a probíhá pomocí přenašečů pro glukózu. Na rozdíl od glukózy není metylglukóza v buňce metabolizována a nepřenáší se usnadněným transportem z buňky. V našem pokusu jsme tento předpoklad dokázali. Akumulace metylglukózy v ledvinných buňkách se postupně zvyšovala a nejvyššího nárůstu dosáhla ve třicáté minutě. Pankreatické buňky AR42J akumulovaly metylglukózu výrazně méně, nalezené hodnoty se pohybovaly o jeden řád níže než v případě ledvinných buněk. Akumulace v pankreatických buňkách ve srovnání s ledvinnými byla tedy relativně nízká, což lze vysvětlit vysokou kapacitou ledvinných buněk pro transport glukózy, která je nutná k její fyziologické reabsorpci v ledvinných tubulech.

Akumulace sacharózy byla v ledvinných buňkách velmi malá. Potvrzuje to tedy teoretický předpoklad, že přechod sacharózy do buněk by měl probíhat jen pasivní difúzí. Nárůst koncentrace sacharózy v buňkách v porovnání s metylglukózou byl během inkubace minimální. Maximálního uptake bylo dosaženo ve třicáté minutě inkubace a to hodnoty 0,042% z dávky. Hodnota v 1. minutě inkubace se vyznačuje velkým rozptylem hodnot. Velká směrodatná odchylka k dané hodnotě vypovídá o menší přesnosti nebo chybě měření, vyplývajících z krátkého časového intervalu a nízkých hodnot akumulace.

Dále byly experimenty zaměřeny na studium transportu ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu, dvou látek ze skupiny receptorově specifických analogů somatostatinu, do ledvinných buněk. Akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v ledvinných buňkách se s přibývajícím množstvím buněk zvyšovala a nejvyšších hodnot bylo dosaženo při největším množství buněk tedy ve 3 milionech buněk. Závislost aktivity na počtu buněk je lineární.

Lineární je také závislost aktivity na množství daného peptidu, kdy při pětinasobném zvýšení peptidu 2, 10 a 50 μl vzrostla pětkrát i aktivita akumulovaná v buňkách.

Průběh akumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu byl sledován v přítomnosti albuminu, látky, která je do ledvinných buněk transportována komplexem megalin/kubilin a měla by s analogy somatostatinu soutěžit o tento transportní membránový systém. Naše výsledky tuto skutečnost částečně potvrzují, protože v přítomnosti 100 μl albuminu o koncentraci 5 mmol/l (finální $c = 0,5$ mmol/l) byla akumulace snížena na 70% v porovnání s akumulací peptidu v nepřítomnosti daného albuminu. Jiných výsledků jsme dosáhli v přítomnosti 20 μl albuminu, tedy s 5x menší koncentrací, kdy se nám akumulace naopak zvýšila 1,4x, což lze jen obtížně vysvětlit. Je možné, že malé množství albuminu paradoxně podporuje uptake peptidu a aktivuje přenašečový systém. Tato hypotéza však nebyla v žádných studiích zatím zkoumána ani potvrzena.

Míra kumulace ^{111}In -DOTA-oktreotátu v izolovaných ledvinných buňkách byla sledována i v přítomnosti gentamicinu, aminoglykosidového antibiotika, které má vysokou afinitu k megalinu. Teoreticky by měl tedy kompetitivně snižovat vstup oktreotátu do ledvinných buněk. Akumulace se v našich pokusech výrazně nesnížila. I při vyšších dávkách gentamicinu, 100 μl a koncentraci 84 mmol/l (finální $c = 8$ mmol/l), byla akumulace snížena jen o necelých 15%. Při vyšších koncentracích by již mohl působit toxický účinek gentamicinu a mohl by tak snižovat životnost buněk. Na základě našeho pokusu se tedy nedá stoprocentně potvrdit možnost použití gentamicinu k inhibici uptake oktreotátu.

Lysin je kladně nabitá aminokyselina, která se užívá ke snižování renálního uptake peptidů. Brání tedy prostupu peptidů přes membránu buněk proximálního tubulu, tím snižuje jejich glomerulární filtraci a tubulární reabsorpci (Breeman a kol. 2001). Podobným mechanismem působí i maleát (Behr a kol. 1998). V našich experimentech jsme tento fakt dokázali, protože akumulace daného radiopeptidu se v přítomnosti lysinu i maleátu snížila na 60% v porovnání s akumulací bez přítomnosti daných látek.

Inkubací v ledové lázni za teplot 1-2°C a 5-6°C jsme prokázali aktivní povahu transportu ^{111}In -DOTA-oktreotátu. Za nízkých teplot probíhal přestup do buněk minimálně až na 15% vzhledem ke kontrole inkubované při 37°C.

U akumulčních studií s ^{125}I -DOTA-oktreotátem jsme pozorovali průběh akumulace tohoto peptidu v přítomnosti lysinu. V případě lysinu byla akumulace snížena na 70%. Lysin v tomto případě inhiboval transport méně než v případě ^{111}In -DOTA-oktreotátu.

V porovnání s ^{111}In -DOTA-oktreotátem je akumulace ^{125}I -DOTA-oktreotátu přibližně 1,5x menší. Mohlo by to být způsobeno tím, že se metabolický produkt ^{125}I -DOTA-oktreotátu - jodovaný tyrosin uvolňuje z buňky, kdežto aminokyseliny s radiokovy, např. ^{111}In , zůstávají zachyceny v buňkách (Behr a kol. 1998).

7 ZÁVĚR

Test viability pomocí trypanové modři potvrdil vysokou životnost buněčného preparátu. Buněčná suspenze byla tedy vhodná pro vlastní experimenty. Akumulační studie radioaktivně značené sacharózy a metylglukózy potvrdila fakta, která uvádějí u metylglukózy aktivní transport a u sacharózy pouze transport pasivní difúzí. Tím jsme potvrdili funkčnost našich buněk.

Při pokusech s radioaktivně značenými peptidy, konkrétně u ^{111}In -DOTA-oktreotátu, byl potvrzen jejich aktivní transport do izolovaných ledvinných buněk, neboť při inhibici energeticky závislých procesů nízkými teplotami byl jejich uptake výrazně nižší. Byla zjištěna lineární závislost míry ledvinné akumulace na množství peptidu a na počtu buněk. V přítomnosti vyšší koncentrace albuminu byla akumulace obou receptorově specifických peptidů snížena. To by mohlo vypovídat o účasti endocytárního membránového systému megalin/kubilin na transportu, protože albumin je uváděn mezi substráty tohoto systému a může soutěžit s jinými látkami při transportu. Avšak při použití menšího množství albuminu nastalo naopak zvýšení akumulace. Tento výsledek nelze zatím nijak vysvětlit. Akumulace těchto radiopeptidů byla také snížena v přítomnosti lysinu a maleátu. Tyto látky jsou popsány inhibitory aktivní endocytózy v ledvinných tubulech. Naproti tomu další známý substrát nehalinového systému – gentamicin – akumulaci významně neovlivnil.

8 ABSTRAKT

Cíl: Diplomová práce byla zaměřena na využití izolovaných potkaních ledvinných buněk ke studiu transportních mechanismů vybraných receptorově specifických peptidů ze skupiny analogů somatostatinu značených vhodnými radionuklidy - ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu. Byl proveden pokus s vybranými modelovými látkami sacharózou a metylglukózou jako markerů pasivního a aktivního transportu. Průběh akumulace metylglukózy byl zkoušen v ledvinných a pankreatických buňkách. Dále byla studována akumulace radiopeptidů v přítomnosti potenciálních inhibitorů, které by mohly snížit retenci daných radiopeptidů a tím i klinicky nežádoucí radiotoxické poškození ledvin.

Metody: Izolované ledvinné buňky potkana byly získány kolagenázovou metodou. Pankreatické exokrinní potkaní buňky byly získány z buněčné linie nádorových buněk. Životnost buněk byla zjištěna testem s trypanovou modří. Míra akumulace modelových látek byla porovnána s mírou akumulace daných radiopeptidů ^{111}In -DOTA-oktreotátu a ^{125}I -DOTA-oktreotátu. Povaha transportu byla sledována i za nízkých teplot. Megalin/kubilinový membránový transportní systém byl studován pomocí jejich ligandů (např. albumin, gentamicin), které by kompeticí při transportu mohly inhibovat akumulaci zkoumaných radiopeptidů.

Výsledky: Životnost buněk byla dostatečně vysoká. Akumulace sacharózy v ledvinných buňkách byla významně nižší než u metylglukózy. Akumulace metylglukózy v pankreatických buňkách ve srovnání s ledvinnými buňkami byla o řád nižší. Inkubace za nízkých teplot ($1-2^{\circ}\text{C}$, $5-6^{\circ}\text{C}$), která inhibuje aktivní transportní mechanismy, vedla k výraznému snížení uptake studovaných radiopeptidů. V přítomnosti daných inhibitorů byla akumulace snížena. Se zvyšujícím se počtem buněk či množstvím přidávaného peptidu se míra akumulace zvyšovala.

Závěr: Nízká akumulace sacharózy dokazovala jen její pasivní transport. Nízká akumulace metylglukózy v pankreatických buňkách ukazuje, že kapacita ledvinných buněk pro transport glukózy je výrazně vyšší. ^{111}In -DOTA-oktreotát a ^{125}I -DOTA-oktreotát jsou pravděpodobně akumulovány v izolovaných ledvinných buňkách částečně aktivním transportem. To bylo dokázáno sníženým uptake při inkubaci za nízkých teplot. Inhibiční působení na uptake danými inhibitory by mohlo dokazovat účast megalin/kubilinového transportního systému.

9 ABSTRACT

Aim: Graduation theses was aimed on the use of the isolated rat renal cells to study of transport mechanisms of the selected receptor – specific peptides from the group of somatostatin analogues labeled with convenient radionuclides - ^{111}In -DOTA-octreotate, ^{125}I -DOTA-octreotate. Experiment with the selected model substances - sucrose and α -methyl glucoside as markers of active and passive transport was executed. Accumulation process of α -methyl glucoside was tested in renal and pancreatic cells. Further, accumulation of the radiopeptides was researched in presence of the potential inhibitors, which could reduce to retention these radiopeptides and thus also clinically undesirable renal radiotoxic insult.

Methods: Isolated rat renal cells were prepared by collagenase technique. Pancreatic rat exocrine cells were prepared from cell line tumor cells. Viability of cells was tested with trypane blue. The accumulation rate of model substances was compared with the accumulation radiopeptides rate: ^{111}In -DOTA-octreotate, ^{125}I -DOTA-octreotate. Transport character was also monitored for low temperatures. Megalin/cubilin membran transport system was researched via their ligands (e.g. albumin, gentamicin), which could inhibit accumulation of the radiopeptides by competition in transport.

Results: Cells viability was enough high. Sucrose accumulation was significantly lower than α -methyl glucoside in the renal cells. In comparison α -methyl glucoside accumulation in pancreatic cells was lower for degree with renal cells. Incubation for low temperatures (1-2°C, 5-6°C), which inhibits active transport mechanisms, caused strong reduction of studied radiopeptides uptake. The accumulation was lowered in the presence of specific inhibitors. The accumulation rate increased with increasing cells number or quantity of radiopeptide.

Reason: Low accumulation of sucrose showed only its passive transport. Low α -methyl glucoside accumulation in pancreatic cells shows that renal cells capacity for transport of glucose is significantly higher. ^{111}In -DOTA-octreotate, ^{125}I -DOTA-octreotate are accumulated partially by active transport in isolated renal cells. This was showed in incubation for low temperatures. The inhibitive action of inhibitors on the uptake could demonstrate participation of megalin/cubilin transport system.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Arnold R., Simon B., Wied M.: Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues: a review. *Digestion*, 2000; 62 Suppl 1: 84 – 91

Behr T. M., Goldenberg D. M., Becker W.: Reducing the renal uptake of radiolabeled antipody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *J Nucl Med*, 1998; 25: 201 – 212

Boogaard P. J., Mulder G. J., Nagelkerke J. F.: Isolated Proximal Tubular Cells from Rat Kidney as an *in Vitro* Model for Studies on Nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 1989; 101: 135 - 143

Breeman W. A. P., de Jong M., Kwekkeboom D. J., Valkema R., Bakker W. H., Kooij P. P. M., Visser T. J., Krenning E. P.: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *J Nucl Med*, 2001; 28: 1421 – 1429

Hammond P. J., Wade A.F., Gwilliam M. E., Peters A. M., Myers M.J., Gilbey S. G., Bloom S. R., Calam J.: Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue. *Br J Cancer*, 1993; 67: 1437 – 1439

de Herder W. W., Hofland L. J., van der Lely A. J., Lamberts S. W. J.: Somatostatin receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Canc*, 2003; 10: 451 - 458

Christensen E. I., Birn H.: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001; 280: F562 – F573

de Jong M., Rolleman E. J., Bernard B. F., Visser T. J., Bakker W. H., Breeman W. A., Krenning E. P.: Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide *in vivo*. *J Nucl Med*, 1996; 37: 1388 – 1392

Kwekkeboom D., Krenning E. P., de Jong M.: Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med*, 2000; 41: 1704 – 1713

Kwekkeboom D. J., Kooij P. P., Bakker W. H., van der Pluijm M. E., Srinivasan A., Erion J., Schmidt M., Bugaj J., de Jong M., Krenning E. P.: Lu-177-DOTA-Tyr³-octreotate: comparison with In-111-DTPA-octreotide in patients. *Eur J Nucl Med*, 2000; 27: 963

Kwekkeboom D. J., Bakker W. H., Kooij P. P., Konijnenberg M. W., Srinivasan A., Erion J., Schmidt M., Bugaj J., de Jong M., Krenning E. P.: [¹¹⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]octreotate: comparison with [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide in patients. *Eur J Nucl Med*, 2001; 28: 1319 - 1325

Lamberts S. W., Krenning E. P., Reubi J. C.: The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev*, 1991; 12: 450 – 482

Launay-Vacher V., Izzedine H., Karie S., Hulot J. S., Baumelou A., Deray G.: Renal Tubular Drug Transporters. *Nephron Physiol*, 2006; 103: 97 - 106

Maack T., Johnson V., Kan S. T., Figueiredo J., Sigulem D.: Renal filtration, transport, and metabolism of low molecular weight proteins. *Kidney Int*, 1979; 16: 251 – 270

Pritchard J. B., Miller D.S.: Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int*, 1996; 49: 1649 – 1654

Reubi J. C., Schar J. C., Waser B., Wenger S., Heppeler A., Schmitt J. S., Macke H. R.: Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*, 2000; 27: 273 – 282

Reubi J. C., Waser B., Schaer J-C., Laissue J. A.: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 2001; 28: 836 – 846

Stepanek J., Larsson B., Weinreich R.: Auger-electron spectra of radionuclides for therapy and diagnostics. *Acta Oncol*, 1996; 35: 863 – 868

Vaňková M.: Transport a akumulace receptorově specifických peptidů v ledvinných buňkách. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2007; 37 - 38

Wulbrand U., Wied M., Zofel P., Goke B., Arnold R., Fehmann H.: Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest*, 1998; 28: 1038 - 1049