

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

TRANSPORT VYBRANÝCH LÉČIV V LEDVINNÝCH BUŇKÁCH

(DIPLOMOVÁ PRÁCE)

Vedoucí diplomové práce:

Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc

Hradec Králové 2008

Tereza Lysá

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

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 dne 2008

Podpis:

OBSAH

| | |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk | 6 |
| 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE | 7 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1. Transport léčiv v ledvinách | 10 |
| 2.1.1. Transportní mechanismy pro nízkomolekulární léčiva | 10 |
| 2.1.2. Transportní mechanismy pro proteinová léčiva | 13 |
| 2.1.2.1. Struktura | 14 |
| 2.1.2.2. Výskyt a syntéza | 15 |
| 2.1.2.3. Funkce | 18 |
| 2.1.2.4. Ligandy | 19 |
| 2.2. Radionuklidy značené deriváty somatostatinu | 22 |
| 2.2.1. Chování radionuklidy značených derivátů somatostatinu v ledvinách | 24 |
| 2.3. Studované látky | 25 |
| 2.3.1. ^{111}In -DOTA-NOC | 25 |
| 2.3.2. ^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotát | 26 |
| 2.3.3. ^{14}C -metylglukóza a ^{14}C -sacharóza | 26 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 27 |
| 3.1. Materiál | 28 |
| 3.1.1. Biologický materiál | 28 |
| 3.1.2. Chemikálie | 28 |
| 3.1.3. Použité přístroje | 29 |
| 3.2. Metodika | 30 |
| 3.2.1. Příprava roztoků | 30 |
| 3.2.2. Preparace ledvin a izolace a separace ledvinných buněk | 30 |
| 3.2.3. Stanovení počtu živých buněk a životnosti | 31 |
| 3.2.4. Akumulační studie | 32 |
| 3.2.4.1. Akumulace ^{14}C -metylglukózy a ^{14}C -sacharózy v ledvinných a pankreatických buňkách | 32 |
| 3.2.4.2. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na počtu buněk ve vzorku | 33 |
| 3.2.4.3. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na teplotě | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4.4. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na množství peptidu ve vzorku..... | 34 |
| 3.2.4.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotátu) v buňkách v přítomnosti potenciálních inhibitorů..... | 35 |
| 3.3. Výsledky | 37 |
| 3.3.1. Akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných buňkách | 37 |
| 3.3.2. Akumulace ^{14}C -metylglukózy v pankreatických buňkách | 39 |
| 3.3.3. Akumulace ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách | 41 |
| 3.3.4. Porovnání akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách s akumulací ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách..... | 43 |
| 3.3.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v závislosti na teplotě..... | 44 |
| 3.3.6. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v závislosti na počtu buněk ve vzorku | 46 |
| 3.3.7. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v závislosti na množství peptidu ve vzorku | 48 |
| 3.3.8. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti gentamicinu | 50 |
| 3.3.9. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti lysinu | 51 |
| 3.3.10. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti maleátu | 52 |
| 3.3.11. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti albuminu..... | 53 |
| 3.3.12. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC | 55 |
| 3.3.13. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotátu v přítomnosti gentamicinu | 57 |
| 3.3.14. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotátu v přítomnosti maleátu | 58 |
| 3.3.15. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotátu..... | 59 |
| 4. DISKUZE | 60 |
| 5. ZÁVĚR | 65 |
| 6. ABSTRAKT | 67 |
| 7. ABSTRACT..... | 69 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 71 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|--------|---|
| BBM | apikální membrána (brush-border membrane) |
| BLM | bazolaterální membrána (basolateral membrane) |
| CV | potažené vezikuly (coated vesiculs) |
| CUB | cubilinové (domény) |
| DAT | densní apikální tubuly (dence apical tubules) |
| DBP | protein vázající vitamin D (vitamin D-binding protein) |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina |
| DTPA | diethylentriaminopentaoctová kyselina |
| E | endozomální kompartment (endosomal compartment) |
| HDL | lipoprotein o vysoké hustotě (high-density lipoprotein) |
| IMVA | intermikrovilární oblast (intermicrovilar area) |
| LAN | D-2-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂ |
| LDL | lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein) |
| MRP | multidrug-resistant associated proteins |
| NOC | 1-Nal ³ -oktreotid = D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr |
| OA, OC | organický anion, organický kation |
| OATs | transportéry organických aniontů (organic anion transporters) |
| OCTs | transportéry anorganických kationtů (organic anion transporters) |
| PAP1 | pankreatid asociační protein (pancreatid-associated protein) |
| PAI-1 | inhibitor aktivátoru plasminogenu-1 (plasminogen activator inhibitor-1) |
| PEPT | peptidové transportéry (peptide transporters) |
| PTH | parathyroidální hormon (parathyroid hormon) |
| RAP | receptor associated protein (receptor-associated protein) |
| RBP | protein vázající retinol (retinol-binding protein) |
| RC-160 | D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH ₂ |
| RER | drsne endoplazmatické retikulum (rough endoplasmatic reticulum) |
| SRIF | somatotropin releasing inhibiční faktor |
| sstr | somatostatinový receptor (somatostatin receptor) |
| TATE | D-Phe ¹ -Tyr ³ -Thr ⁸ -oktreotid |
| TOC | Tyr ³ -oktreotid |
| tPA | tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator) |
| VLDL | lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein) |

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Hlavním tématem této práce je studium receptorově specifických peptidů ze skupiny analogů somatostatinu značených radionuklidy se zaměřením na jejich chování v ledvinách. Tyto peptidy jsou používány pro diagnózu a terapii některých nádorových onemocnění, především neuroendokrinních, u kterých se vyskytují receptory specificky vázající zkoumané peptidy. Radionuklidy značené analogy somatostatinu, jsou vylučovány ledvinami a v různé míře také reabsorbovány v buňkách proximálních tubulů ledvin, čímž dochází k akumulaci radioaktivity v ledvinné tkáni. S touto akumulací jsou spojeny nefrotoxické nežádoucí účinky, které limitují jejich použití jak pro diagnózu, tak pro terapii, protože dosud nebyl nalezen způsob, jak této kumulaci zcela zabránit.

Cílem této práce je poznání ledvinných transportních systémů, které jsou odpovědné za ledvinou reabsorpci léčiv, a které by tedy mohly být odpovědné i za ledvinou retenci a akumulaci radionuklidy značených analogů somatostatinu a tím objasnit mechanismus jejich nežádoucích účinků. Na základě těchto poznání pak nalézt látky, které by teoreticky mohly ledvinou retenci a akumulaci těchto peptidů ovlivnit a tak snížit poškození ledvinné tkáně.

Při praktickém řešení je nejprve prokázána životnost izolovaných ledvinných buněk, na kterých byly studie prováděny, a zachování přítomnosti a funkce transportních systémů. To se provádí porovnáváním akumulace indikátorů pasivního a aktivního transportu v buňkách. Porovnáním akumulace indikátorů s akumulací radionuklidem značených derivátů somatostatinu a případnou změnou akumulace radiopeptidu při snížené teplotě, lze také určit typ transportu derivátů somatostatinu do ledvinných buněk.

Hlavní zaměření této práce je na megalin/cubilinový membránový transportní systém vyskytující se v proximálním tubulu ledvin, který byl nalezen jako systém přenášející do ledvinných buněk léčiva s vyšší molekulovou hmotností typu oligopeptidů a proteinů. Pomocí známých inhibitorů tohoto transportního systému se snažíme ovlivnit akumulaci studovaných radionuklidy značených derivátů somatostatinu ^{111}In -DOTA-NOC a ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Transport léčiv v ledvinách

Ledviny jsou orgánem účastnícím se exkrece léčiv a jejich metabolitů, který má rozvinutý vysokokapacitní transportní systém, určený k rychlé eliminaci velkého množství cizích sloučenin. Základním mechanismem exkrece léčiv a jejich metabolitů do moči je glomerulární filtrace. Látky mohou být také vylučovány do lumen renálního tubulu z krve aktivním transcelulárním transportem pomocí specifických selektivních transportérů (kariérů) pro organické anionty a kationty na apikální a bazální membráně epitelálních buněk tubulů. Dalším transportním mechanismem je tubulární reabsorpce. Ta zahrnuje pasivní difúzi lipofilních léčiv z glomerulárního filtrátu přes buňky renálního tubulu do krve v závislosti na pKa látky a pH moči (prostupují neionizovaná léčiva) a aktivní přenos zprostředkovaný specifickými přenašeči. Nejnověji nalezeným transportním systémem v ledvinách je přenašečový receptor odpovědný za aktivní endocytózu látek z moče.

2.1.1. Transportní mechanismy pro nízkomolekulární léčiva

Na začátku dvacátého století byla demonstrována renální eliminace léčiv po zjištění, že červený fenol, podaný ve formě očních kapek, zbarvuje moč. První klinická aplikace tohoto konceptu byla provedena u penicilinu. Během druhé světové války byl široce používán a lékaři měli problémy s udržením jeho krevní hladiny díky velmi rychlé renální eliminaci. V roce 1951 byl vyvinut probenecid jako kompetitivní inhibitor renální sekrece penicilinu, tím se prodloužila doba po podání léčiva, po kterou se udržuje jeho dostatečná hladina. Daleko později byl probenecid použit k nefroprotektivní terapii renální tubulární toxicity cidofoviru. Ukázalo se, že penicilin inhibuje vstup cidofoviru do tubulárních buněk. To dobře ukazuje, že léčiva jsou aktivně vylučována do renálních tubulů prostřednictvím transportérů, a že některé látky mohou na této úrovni interagovat (Launay-Vacher a kol. 2006).

V ledvinných tubulech se vyskytuje mnoho transportérů léčiv. Mezi hlavní skupiny transportérů patří transportéry organických aniontů (OATs = organic anion

transporters) a kationtů (OCTs = organic anion transporters). Tyto transportéry se vyskytují na obou pólech buněk ledvinných tubulů. OATs jsou převážně lokalizovány na basolaterální membráně, zatímco OCTs můžeme nejčastěji nalézt na kartáčovém lemu apikální membrány. OATs tedy přenášejí léčiva z krve do tubulárních buněk ledvin a OCTs z buněk do tubulárního lumen (obr. 1). Lokalizace těchto transportérů byla zjištěna na základě molekulární charakterizace OATs a OCTs provedené v nedávných letech (Koepsel a kol 1999).

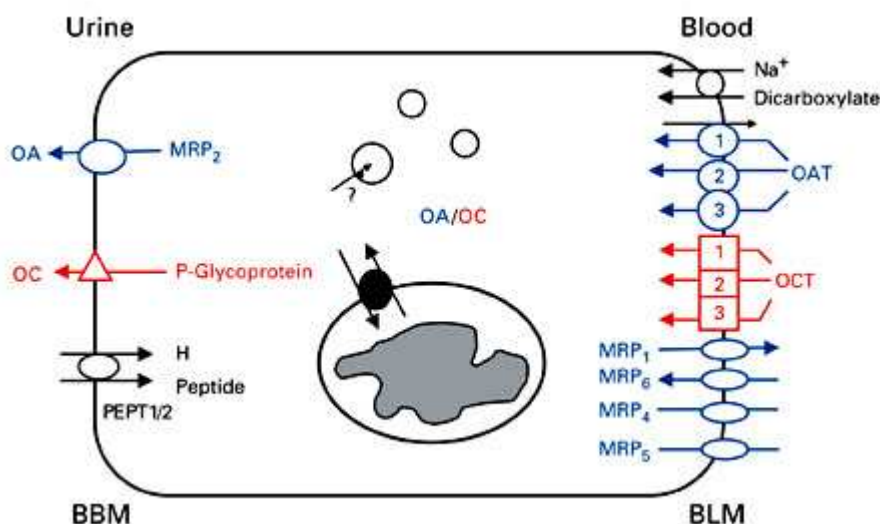
K dalším přenašečům léčiv patří P-glykoproteinová skupina a MRP přenašeče (MRP = multidrug-resistant associated proteins) (Launay-Vacher a kol. 2006).

V renálních tubulech jsou také sekretována a reabsorbována léčiva typu peptidů. Jejich reabsorpce probíhá peptidovými transportéry pro oligopeptidy (PEPT = peptide transporters) na kartáčovém lemu apikální membrány renálních tubulárních buněk (obr. 1). U savců byly objeveny dva tyto transportéry PEPT1 a PEPT2. Kromě dipeptidů a tripeptidů přenáší β -laktámová antibiotika, inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu, inhibitory aminopeptidáz, různá proléčiva a nepeptidické sloučeniny. Tyto transportéry jsou stereoselektivní s větší afinitou k L-enantiomerům a využívají elektrochemického protonového gradientu k přenášení peptidů proti koncentračnímu spádu. Uptake substrátu tedy závisí na extracelulárním pH a membránovém potenciálu, s optimálním pH 4,5-6,5 v závislosti na celkovém náboji substrátu. Protože pH na kartáčovém lemu je relativně stabilní, lehce kyselé (pH 6,5), uptake je optimální pro sloučeniny, které jsou při tomto pH bez celkového náboje. Peptidové transportéry mají sekundární účinky na transportní systémy, které jsou zapojeny do homeostázy intracelulárního pH, jako je Na^+/H^+ výměník, zvyšují buněčný uptake Na^+ iontů (Rubio-Aliaga a Hannelore 2002).

Dipeptidy a tripeptidy, které jsou přenášeny do buněk, jsou cytosolickými peptidázami rychle hydrolyzovány na aminokyseliny, které jsou využity buňkou nebo uvolněny do cirkulace pomocí přenašečů pro aminokyseliny na basolaterální membráně. Látky rezistentní vůči hydrolýze a produkty hydrolýzy jsou buď přeneseny transportéry pro organické anionty a kationty nebo basolaterálními peptidovými přenašeči, které ještě nebyly molekulárně identifikovány. Jsou podobné přenašečům na apikální straně, ale mají daleko menší afinitu k substrátům (Rubio-Aliaga a Hannelore 2002).

Uvedené mechanismy aktivní sekrece a reabsorpce mají významný podíl na exkreci léčiv. Změna rovnováhy mezi transportem krev-buňka a buňka-lumen tubulu může vyústit v intracelulární akumulaci léčiv a tím způsobit lokální toxicitu léčiva.

Také interakce léčivo-léčivo na jednom nebo několika transportérech může mít podobné důsledky, jako je renální toxicita nebo systémová akumulace v závislosti na tom, jaké transportéry se interakce účastní.



Obr. 1. Schematický model transportérů v renálním proximálním tubulu. Uptake organických aniontů (OA) přes basolaterální membránu (BLM) je zprostředkován na sodíku závislým OAT systémem, který zahrnuje ketoglutarátový (KG2)/OA výměník OAT1, sodíko-ketoglutarátový kotransport a Na^+ /dicarboxylátový kotransportér. Apikální (brush-border) membrána (BBM) obsahuje transportní systémy pro efflux OA do lumen tubulu nebo pro reabsorpci z lumen do buňky. Multidrug resistance transportéry, MRP2, zprostředkovávají primární aktivní luminální sekreci. Buněčný uptake organických kationtů (OC) na BLM je zprostředkován transportérem organických kationtů (OCT). Efluxní transport OC z buněk přes BBM je zprostředkován P-glykoproteinem. PEPT1 a PEPT2 zprostředkovávají luminální uptake peptidových léčiv (Launay-Vacher a kol. 2006).

2.1.2. Transportní mechanismy pro proteinová léčiva

Léčiva s vyšší molekulovou hmotností typu oligopeptidů a proteinů jsou v ledvinných tubulech přenášeny do buněk systémem megalin/cubilin.

Megalin je multiligandový endocytární receptor, patří do skupiny receptorů lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). Vyskytuje se především v renálním proximálním tubulu, kde slouží k vychytávání proteinů obsažených v glomerulárním filtrátu. Díky této funkci byla nalezena většina jeho ligandů, mezi které patří například protein vázající vitamíny a některé hormony. Z toho vyplývá jeho role v metabolismu a homeostáze esenciálních vitamínů, např. vitaminu D a také kalcia.

Cubilin, známý jako intestinální receptor vázající komplex intrinsic faktor-kobalamin (intrinsic factor-cobalamin receptor), je také exprimován v ledvinném proximálním tubulu společně s megalinem. Ačkoliv se strukturně velice liší, mají mnoho společných znaků. Jedná se o multiligandové přenašeče, některé ligandy sdílejí a jsou důležité pro tubulární reabsorpci proteinů. Navíc se ukázalo, že megalin zřejmě váže cubilin a je zapojen do jím zprostředkované endocytózy. Oba receptory se vyskytují společně v buňkách proximálních tubulů ledvin a pravděpodobně se podílejí na endocytóze řady látek ve vzájemné spolupráci (Christensen a Birn 2001).

Megalin byl poprvé identifikován jako antigen Heymannovy nefritidy u potkanů. Byl izolován z ledvinného kartáčového lemu proximálního tubulu a pojmenován gp330 na základě molekulární hmotnosti. Lokalizován byl v apikální nitrobuňkové části buněk renálního proximálního tubulu a v glomerulu. Později byl nalezen také v jiných epitelích a zjistilo se, že váže mnoho proteinů, například receptor-associated protein (RAP), lipoproteiny, některé enzymy a enzymové inhibitory. Po naklonování se ukázalo, že jde o glykoprotein s hmotností 600kDa, a získal název "megalin". V roce 1996 byla vyšlechtěna myš s deficitem megalinu, což umožnilo dokázat jeho význam (Wilnow a kol. 1996).

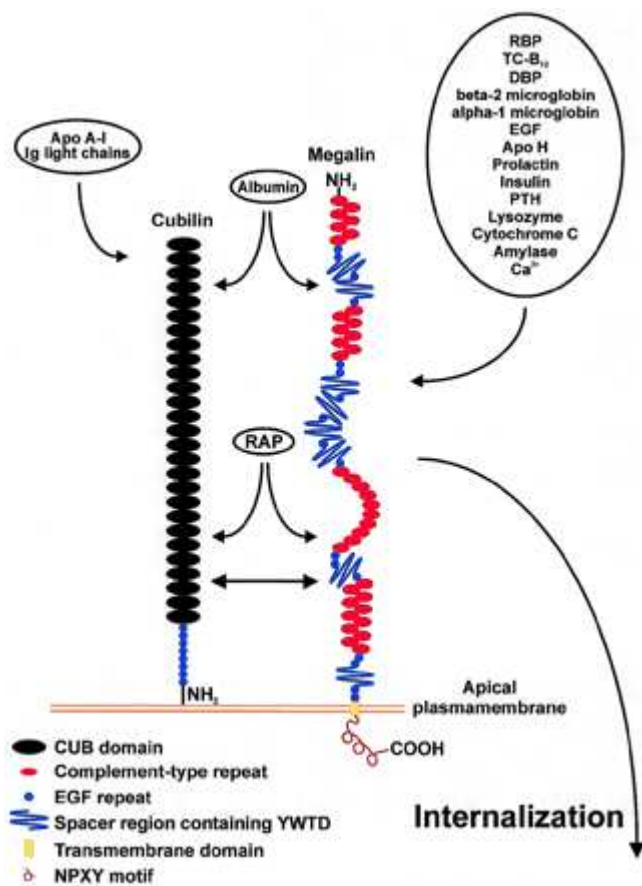
Cubilin byl identifikován jako cíl teratogenních protilátek tvořených u králíků poté, co jim byl podán preparát ledvinného kartáčovitěho lemu. Na základě nalezené molekulové hmotnosti byl pojmenován gp280. Lokalizován byl na apikálním endocytárním aparátu ledvinného proximálního tubulu a na viscerálních epitelích žloutkového váčku. Do roku 1997 nebyly nalezeny žádné jeho ligandy. Poté bylo zjištěno, že je identický s intestinálním receptorem pro komplex intrinsic faktor-

kobalamin a jeho ligandem je RAP spolu s dalšími proteiny. Po naklonování receptoru se ukázalo, že jde o 460kDa velký glykoprotein bez zjevné cytoplazmatické domény a byl pojmenován cubilin (Christensen a Birn 2001).

2.1.2.1. Struktura

Megalin je přibližně 4600 aminokyselin velký transmembránový protein s NH₂ koncovou extracelulární doménou, jednoduchou transmembránovou doménou a krátkým cytoplazmatickým řetězcem (obr. 2). Patří do skupiny receptorů lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), má podobné vlastnosti jako další savčí receptory, například LDL receptor, LDL příbuzné receptory, receptory pro lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) a receptor pro apolipoprotein E. (Christensen a Birn 2001).

Cubilin má velikost přibližně 3600 aminokyselin, neobsahuje transmembránovou doménu. Kompletní sekvence jeho DNA byla identifikována jak u lidí, tak u potkanů a psů. S ostatními známými endocytárními receptory nemá mnoho společných rysů. Obsahuje 27 CUB (cubilinových) domén (obr. 2). Tyto domény pravděpodobně tvoří části vážící ligandy. CUB doménám předchází úsek ze 110 aminokyselin. Začátek aminokyselinového úseku obsahuje furinem štěpené místo, které může indikovat proteolytický proces v trans-síti Golgiho aparátu. Poslední NH₂-skupina je nutná k uchycení proteinu na membránu. Obsahuje amfipatickou šroubovicovou strukturu, která se podobá oblasti vážící lipidy u apolipoproteinu (obr. 2) (Christensen a Birn 2001).



Obr. 2. Strukturální organizace a integrace mezi cubilinem a megalinem (Christensen a Birn 2001)

2.1.2.2. Výskyt a syntéza

Megalin se vyskytuje v mnoha epiteliálních buňkách, v absorpčním epitelu obklopujícím transcelulární tekutiny, který je v proximálním tubulu ledvin, podocytech glomerulu, v choroideálním plexu, v buňkách thyroidei, v buňkách labyrintu vnitřního ucha a v ciliárním epitelu oka. Dále byl nalezen ve viscerálním žlutkovém váčku, v pneumocytech typu 2, v buňkách přštítného tělíska produkujících parathyroidální hormon, v tenkém střevě, endometriu, vejcovodech a v placentárním cytotrofoblastu. Také byl objeven v embryonální tkáni (Sahali a kol. 1993). Během vývoje tkání, se může megalin vyskytnout v mesonefronu, ledvinném váčku i močovém měchýři. Vyskytuje se v esovitých buňkách, ze kterých později vznikne jak glomerulus, tak

proximální a distální tubulus. V dalším vývoji je ovšem přítomen pouze v proximálním tubulu a v menší míře v glomerulu (Sahali a kol. 1993).

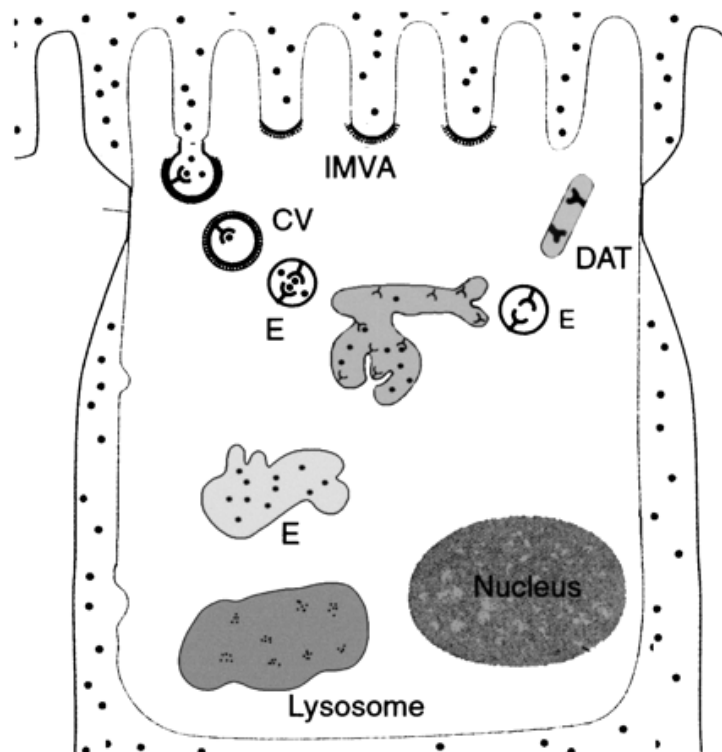
V ledvinném proximálním tubulu je megalin lokalizován na kartáčovém lemu, potažených vezikulách, endocytárních vezikulách, membránu recyklujících částech a na densních apikálních tubulech (obr. 3). Membránová exprese je značná v malých a velkých endosomech buněk proximálního tubulu, ale prakticky chybí v pozdních endosomech/prelysozomech (Christensen 1998). Avšak menší množství neporušeného i degradovaného megalinu bylo nalezeno v matrix lysozomů. U potkanů se liší exprese megalinu v různých segmentech kartáčového lemu proximálního tubulu, největší je v segmentu 2. Byl také nalezen v podocytech potkaních glomerulů (Christensen a Birn 2001).

Po translaci v drsném endoplazmatickém retikulu (RER), se megalin rychle a s velkou afinitou váže na 40 kDa velký protein RAP. Ten váže i ostatní členy LDL-receptorové skupiny, čímž slouží k ochraně nově syntetizovaných receptorů před předčasným navázáním ligandů. Může být také odpovědný za zaujetí správné funkční konformace receptorů. Deficit RAP je spojen s významným poklesem exprese megalinu a s jeho subcelulární redistribucí v proximálním tubulu. RAP se vyskytuje převážně v RER, je tedy intracelulární ligand. Vzhledem k jeho vysoké afinitě k megalinu inhibuje vazbu mnoha dalších ligandů, může sloužit jako důležitý prostředek pro studium vazby ligandů k megalinu (Christensen a Birn 2001).

Cubilin je výrazně exprimován v ledvinném proximálním tubulu, ve viscerálním žloutkovém váčku, v epitelu tenkého střeva, placentárním cytotrophoblastu, a možná také v dalších tkáních jako je thymus. V současné době se však zdá, že jeho exprese je v porovnání s megalinem omezenější (Christensen a Birn 2001).

V proximálním tubulu se cubilin nachází, podobně jako megalin, na kartáčovém lemu a na všech potažených vezikulech endocytické a membránu recyklující cesty (obr. 3). Cubilin byl také identifikován v lysozomech (Seetharam a kol. 1997). Podobně jako megalin se nachází během vývoje ledvin v esovitých buňkách, ačkoliv pozdější exprese je omezena na proximální tubulus (Sahali a kol. 1993). Dosud nebyl nalezen v glomerulu (Christensen a Birn 2001).

Zjistilo se také, že psí onemocnění, které bylo charakterizováno defektem přenosu cubilinu do apikální membrány a tím nedostatkem funkčního cubilinu, nebylo způsobeno poškozením genu pro cubilin, ale že k expresi cubilinu na kartáčovém lemu je potřeba dříve neznámý doplňkový protein (Christensen a Birn 2001).



Obr.3. Schematické znázornění endocytárního procesu zprostředkovaného megalinem a cubilinem v renálním proximálním tubulu. Ligandy jsou přeneseny skrz apikální vezikuly potažené vrstvou zpolymerovaného klathrinu v intermikrovilární oblasti (IMVA) do potažených vezikul (CV) a následně do endozomů, ve kterých dojde k jejich oddělení od receptoru. Ligandy jsou přeneseny prostřednictvím endozomálních kompartmentů (E) do lysozomů k degradaci a dalšímu zpracování. Receptory se vrací ve formě densních apikálních tubulů (DAT) do apikální plasmatické membrány (Verroust a Christensen 2002).

2.1.2.3. Funkce

Megalin byl identifikován jako endocytární receptor, který je odpovědný za uptake proteinů v proximálním tubulu. Ačkoliv málo z jeho ligandů lze v glomerulárním filtrátu očekávat, mnoho z nich indikuje defekt tubulární reabsorpce, například vitamin D vázající protein (DBP), retinol vázající protein (RBP), β_2 -mikroglobulin a α_1 -mikroglobulin. Při analýzách u myši s deficitem megalinu a na pacientech s Fanconiho syndromem byla nalezena nízkomolekulární proteinurie (Christensen a Birn 2001).

Ligandů cubilinu bylo dosud nalezeno méně, avšak studie ukázaly, že je pro tubulární reabsorpci proteinů stejně důležitý. Závažná proteinurie je pozorována u mnoha pacientů trpících Imerslund-Grasbechovým syndromem (Broch a kol. 1984), vzácným deficitem vitamínu B₁₂, který je charakterizován porušenou intestinální absorpcí komplexu intrinsic faktor-kobalamin. Nedávno se ukázalo, na případu dvou finských rodin, že toto onemocnění je spojeno s mutací genu pro cubilin (Aminoff a kol. 1999). Byly identifikovány dvě bodové mutace: první způsobí substituci jedné aminokyseliny v CUB doméně 8 a tím poškodí vazbu intrinsic faktor-kobalamin a druhá, která zřejmě aktivuje intronové vazebné místo a způsobí tak inserci několika stop kodonů, má za následek změnu receptoru CUB domény 6. Rozdíl v typu mutace vysvětluje, proč někteří pacienti trpí pouze malabsorpcí komplexu intrinsic faktor-kobalamin, zatímco proteinurií netrpí nebo pouze nepatrně. Intenzivní proteinurie je tedy pravděpodobně způsobena mutací cubilinového genu, která způsobí vznik více vazebných míst nebo nedostatek funkčních receptorů (Christensen a Birn 2001).

Proteinurie a partikulární albuminurie byly také pozorovány u psů s defektem zpracování a vkládání cubilinu do epiteliálních buněk. Tento defekt dále způsobí malabsorpční syndrom vitamínu B₁₂.

Strukturní a funkční defekty megalinu i cubilinu spojené s proteinurií tedy dokazují jejich nepostradatelnou funkci při normální tubulární reabsorpci filtrovaných proteinů (Christensen a Birn 2001).

2.1.2.4. Ligandy

Mezi ligandy megalinu, které jsou v glomerulu za normálních podmínek filtrovány, patří DBP, RBP, protein přenášející kobalamin v plasmě, transkobalamin- B_{12} , insulin, prolaktin, albumin, α_1 a β_2 -mikroglobulin, apolipoprotein H, transthyrenin, lysozym, cytochrom c, α -amylasa, Ca^{2+} (tab. 1) Mnoho z těchto proteinů jsou buď přenašečové proteiny, nebo hormony, což ukazuje na vliv megalinu na metabolismus vitamínů a na renální clearance filtrovaných hormonů endocytárním vychytáváním a degradací.

Ve většině případů je vazba ligandu závislá na vápenatých iontech, megalin váže kalcium velmi silně (Christensen a kol. 1992). To bylo dokázáno při místně řízené mutagenní analýze, kdy mutace aminokyselinového zbytku aprotininu, inhibitoru proteinázy a ligandu megalinu snížila afinitu k receptoru. Tím bylo dokázáno, že je upřednostňovaná vazba kationtové skupiny ligandu. Avšak mnoho ligandů jsou anionické proteiny, což napovídá tomu, že pro vazbu je rozložení náboje důležitější než celkový náboj (Christensen a Birn 2001).

RAP může inhibovat vazbu téměř všech ligandů. Tato velká afinita vazby je využívána pro studium funkce receptoru. Megalin má pro RAP dvě vazebná místa, jak bylo ukázáno pomocí optické analýzy s povrchovými plasmony. Vazba první RAP molekuly s vysokou afinitou je následována vazbou druhé molekuly s nižší afinitou (Moestrup a kol. 1996).

Na základě imunoprecipitačních studií bylo dokázáno, že megalin tvoří komplex s Na^+/H^+ -výměňkem v ledvinném proximálním tubulu a tak může být zprostředkovanou endocytózou zapojen do regulace tohoto transportéru. Přesto jsou k potvrzení této hypotézy nutné další důkazy.

K ligandům, které se váží na cubilin a zároveň jsou za normálních podmínek přítomny v glomerulárním filtrátu, patří zatím pouze albumin, imunoglobuliny s lehkým řetězcem a apolipoprotein A-I (Christensen a Birn 2001).

Nedávná studie ukázala, že cubilin je nepostradatelný pro normální renální reabsorpci albuminu z filtrátu, jinak dochází k albuminurii, která je znakem onemocnění ledvin. Několik studií ukázalo, že tubulární uptake při zvýšeném množství profiltrovaných proteinů včetně albuminu, přispívá k rozvoji tubulárního a intestinálního zánětu a fibróze. Takže cubilinem zprostředkovaný uptake albuminu

během hyperfiltrace proteinů, může být důležitým faktorem při rozvoji a progresi chronického renálního onemocnění (Christensen a Birn 2001).

Cubilin také váže RAP, ale význam této vazby není znám. Zato vazba apolipoproteinu A-I naznačuje roli cubilinu v renální degradaci tohoto apolipoproteinu (tab. 1). Ledviny jsou totiž hlavním místem katabolismu apolipoproteinu A-I zahrnující glomerulární filtraci a následný uptake v tubulech (Christensen a Birn 2001).

Většina ligandů, ne-li všechny, přenášené megalinem nebo cubilinem v proximálním tubulu, je degradováno v lysozomech. Dosud nebyl publikován žádný důkaz transcelulárního přenosu proteinových ligandů včetně kariérových proteinů. Vitamíny, steroidy, mastné kyseliny a ostatní sloučeniny přenášené kariérovými proteiny, filtrované, reabsorbované receptory a uvolněné v buňce, jsou nejpravděpodobněji po biochemické modifikaci transportovány zpět do cirkulace. Megalinem zprostředkovaný transcelulární transport proteinů byl dokázán v jiných tkáních, například ve štítné žláze transport thyreoglobulinu a v cerebrovaskulárním endotelu a v epitelu chorionu transport apolipoproteinu J (Christensen a Birn 2001).

Ukázalo se, že megalin váže a zprostředkovává uptake několika polybazických a potenciálně nefrotoxických látek v proximálním tubulu ledvin, mezi tyto látky patří například aminoglykosidy gentamicin, netilimicin, amikacin a polymyxin B. Tato léčiva jsou filtrována v glomerulu s následným endocytárním uptake a akumulací v endocytárním aparátu a lysozomech buněk proximálního tubulu (Christensen a Birn 2001).

Tabulka 1. Ligandy megalinu a cubilinu (Christensen a Birn 2001)

| Megalin | Cubilin |
|---|--|
| <i>Proteiny vázající vitamíny</i> | |
| Transkobalamin-vitamín B ₁₂ Protein vázající vitamín D Protein vázající retinol | Intrinsic faktor-vitamin B ₁₂ |
| <i>Apolipoproteiny</i> | |
| Apolipoprotein B Apolipoprotein E Apolipoprotein J/klusterin Apolipoprotein H | Apolipoprotein A-I HDL |
| <i>Nízkomolekulární peptidy a hormony</i> | |
| PTH Inzulin β ₂ -Mikroglobulin Epidermální růstový faktor Prolaktin Lysozyme α ₁ -Mikroglobulin Cytochrome c PAP1 Odorant-binding protein Transthyretin | |
| <i>Ostatní</i> | |
| Albumin RAP Thyreoglobulin Plazminogen Laktoferrin Ca ²⁺ | Albumin RAP Ig lehké řetězce |
| <i>Léčiva</i> | |
| Aminoglykosidy Polymyxin B Aprotinin | |
| <i>Enzymy a inhibitory enzymů</i> | |
| PAI-1 PAI-1-urokináza PAI-1-tPA Prourokináza Lipoproteinová lipáza | |

Zkratky použité v tabulce:

HDL=lipoprotein o vysoké hustotě

PTH=parathyroidální hormon

PAP1=pancreatid-asociační protein

RAP=receptor associated protein

PAI-1=inhibitor-1 aktivátoru plazminogenu

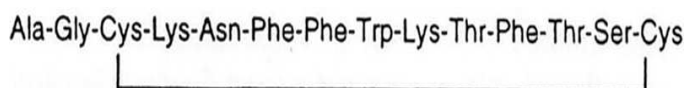
tPA=tkáňový aktivátor

plazminogenu

2.2. Radionuklidy značené deriváty somatostatinu

Zájem o radiopeptidy se zvyšuje díky jejich využití při lokalizaci a radioterapii nádorů. Mezi tyto peptidy patří somatostatin (obr. 4) a analogy somatotropin realising inhibičního faktoru (SRIF) značené radioaktivními gama-, pozitron- a beta- zářiči.

Somatostatin je cyklický peptidový hormon, který se vyskytuje ve dvou bioaktivních formách: somatostatin-14 a jeho na N-konci prodloužená forma somatostatin-28. Každá forma má rozdílné biologické účinky v mozku, hypofýze, pankreatu, střevě a některých částech imunitního systému. Jejich účinky zahrnují inhibici hormonální sekrece a modulaci neurotransmise a buněčné proliferace. Toto působení je zprostředkováno specifickými receptory spojenými s G-proteinem (Wild a kol. 2003).



Obr. 4. Struktura somatostatinu

V současné době je známo pět subtypů somatostatinových receptorů (sstr1-5), z nichž každý je odpovědný za různé biologické účinky. Díky tomu, že se některé z těchto receptorů vyskytují v lidských nádorech, převážně neuroendokrinních, a v jejich metastázách, mohou být tyto nádory zobrazeny in vivo s použitím analogů somatostatinu konjugovaných s radiometalovými cheláty, například [^{111}In -DTPA-D-Phe¹]-oktreotidem (DTPA=diethylentriaminpentaocetová kyselina) (OctreoScan). Ukázalo se, že scintigrafie somatostatinových receptorů s použitím této sloučeniny je nejcitlivější metodou lokalizace primárních a metastazujících onemocnění endokrinního pankreatu kromě insulinomů (Wild a kol. 2003).

Novější konjugáty mohou vykazovat vyšší citlivost, například $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid je registrován v mnoha zemích pro vyhodnocování izolovaných plicních nodulů, prsních nádorů a také melanomů (Wild a kol. 2003). Na druhé straně, nedávná studie, která porovnávala OctreoScan s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotidem na 44 pacientech s neuroendokrinními

nádory, ukázala, že peptid značený ^{111}In vykazuje daleko vyšší detekci u neuroendokrinních nádorů, obzvláště u jaterních metastáz (Lebtahi a kol. 2002).

Bylo zjištěno, že [^{111}In]DOTA-TOC (DOTA = 1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina; TOC = Tyr³-oktreotid) a [^{90}Y]DOTA-TOC jsou efektivně vychytávané a terapeuticky účinné jak u zvířat, tak u lidí. Navíc výměna alkoholové skupiny na C-konci oktapeptidu za kyselou karboxylovou skupinu vede ke zvýšení afinity k receptoru sstr2. [^{177}Lu -DOTA]-D-Phe¹-Tyr³-Thr⁸-oktreotid ([^{177}Lu]DOTA-TATE) vykazoval vyšší uptake v tumorech než [^{111}In -DTPA]-oktreotid u pacientů s nádory pozitivními na somatostatinové receptory (Wild a kol. 2003).

Tyto nové radiopeptidy mají zřetelně vyšší afinitu k sst2 receptorům v porovnání s OctreoScanem, ale jejich afinita k sstr5 je nízká, k sstr3 téměř zanedbatelná a k sstr4 a sstr1 nebyla nalezena afinita těchto nových sloučenin vůbec. Ačkoli většina studií s radioaktivně značenými analogy somatostatinu pracuje s sst2 receptorem (Reubi a kol. 2001), nedávné studie napovídají, že také sstr1 a sstr3-5 mohou být v tumorech přítomny.

Například při vazebné studii s využitím [^{125}I]-RC-160 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂) jako radioligandu, byly objeveny somatostatinové receptory v 76 % nádorů lidských ovaríí. S použitím in situ hybridizace, byla nalezena m-RNA receptoru sst1, 2 a 3 v různých lidských nádorech. Ve většině nádorů štítné žlázy ve studii na 68 pacientech bylo pomocí Northern blottingu objeveno málo sst2 receptorů (kromě medulárního karcinomu štítné žlázy). Přesto se ve všech nádorech vyskytovaly receptory sst1, sst3, sst4 a sst5. Primární pankreatický adenokarcinom byl zobrazen in vivo [^{111}In]DOTA-ianreotidem (LAN; D-2-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂), avšak ne pomocí [^{111}In]DTPA-oktreotidu. Také bylo zjištěno, že [^{111}In]DOTA-LAN má vysokou citlivost pro detekci plicních nádorů. Avšak tvrzení, že tento peptid se váže na sstr2-5 s velkou afinitou a na sstr1 s menší, nebylo v jiné studii potvrzeno (Wild a kol. 2003).

Pro zlepšení profilu biologické aktivity radioaktivně značených analogů somatostatinu se tedy začal syntetizovat radiopeptid s afinitou ke všem subtypům somatostatinových receptorů za účelem potenciálního zvětšení spektra nádorů dostupných pro diagnózu a radioterapii (Wild a kol. 2003). Kovovými radionuklidy značené radiopeptidy mají výrazný a dlouhodobý ledvinný uptake, což limituje jejich terapeutický potenciál. Jedním z cílů vývoje nových radionuklidů odvozených od somatostatinu je také snížit tento uptake.

2.2.1. Chování radionuklidy značených derivátů somatostatinu v ledvinách

Nedávné studie dokazují, že deriváty somatostatinu značené radionuklidy vykazují vysokou akumulaci v ledvinách. Po glomerulární filtraci dochází k jejich reabsorpci v buňkách ledvinných tubulů a transportu do lysozomů, kde jsou metabolizovány. Konečné radiometabolity, vytvořené proteolýzou v lysozomech, zde setrvávají po dlouhou dobu, čímž dochází k výskytu přetrvávající radioaktivity v buňkách ledvinných tubulů. Za tuto akumulaci jsou odpovědné vlastnosti těchto derivátů. Na druhou stranu, některé značené deriváty somatostatinu jsou přeneseny do cílových buněk a tam jsou metabolizovány na konečné radiometabolity. V cílových místech je dlouhá doba rezidence konečných radiometabolitů výhodou, protože dochází k zachování vysoké hladiny radioaktivity, a zároveň se tím může snížit množství látky vychytávané v buňkách ledvinných tubulů (Akizawa a kol 2001).

Studie ukazují, že uptake derivátů oktreotidu značených radionuklidy může být inhibován pozitivně nabitými aminokyselinami L-lysinem a L-argininem, které blokuje kationická vazebná místa buněk tubulů ledvin. To naznačuje, že elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitým peptidem a negativně nabitým povrchem buněk ledvinných tubulů mohou hrát významnou roli v reabsorpci peptidů z glomerulárního filtrátu do buněk tubulů. K snížení reabsorpce může tedy dojít změnou molekulárního náboje peptidu (Akizawa a kol 2001).

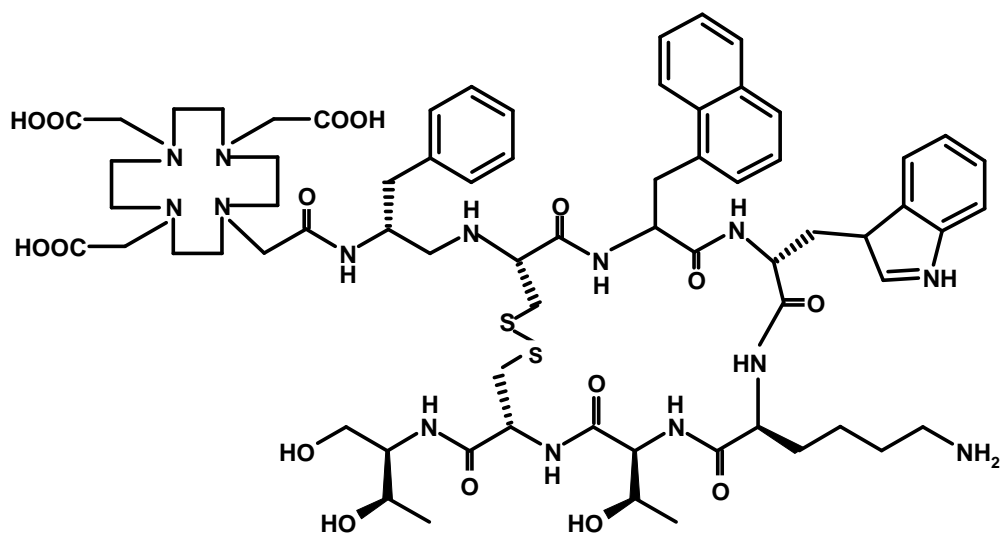
Molekulární mechanismus uptake derivátů somatostatinu značených radionuklidy v buňkách ledvinných tubulů není úplně vyjasněn, ale předpokládá se, že určitou roli v něm hraje megalin/cubilinový transportní systém (Verroust a Christensen 2002). Také studie prováděné na myších se specificky inaktivovaným genem pro megalin dokazují, že ledvinový uptake somatostatinových analogů je v tomto případě daleko menší než u myší bez inaktivace genu pro megalin (Lehste a kol. 2003).

2.3. Studované látky

2.3.1. ^{111}In -DOTA-NOC

Záměna aminokyseliny v pozici 3 oktreetidu vedla k radiopeptidu [^{111}In -DOTA]-1-Nal³-oktreetid ([^{111}In]-DOTA-NOC) (obr. 5), který má zlepšenou afinitu k sstr2 a vysokou afinitu k sstr3 a sstr5 v porovnání s [^{111}In]DOTA-TOC. Strukturální vlastnosti, které vedou k tomuto rozšíření afinitního profilu, nejsou ještě zcela prozkoumány. Ukázalo se však, že záměna Phe³ za Tyr³ u oktapeptidů konjugovaných s DOTA vede k zvýšení afinity k sstr2, zatímco afinita k sstr3 klesá. Zvýšení afinity ^{111}In -DOTA-NOC k sstr3 a sstr5 je pravděpodobně způsobeno vyšší lipofilitou skupiny 1-Nal (Wild a kol. 2003).

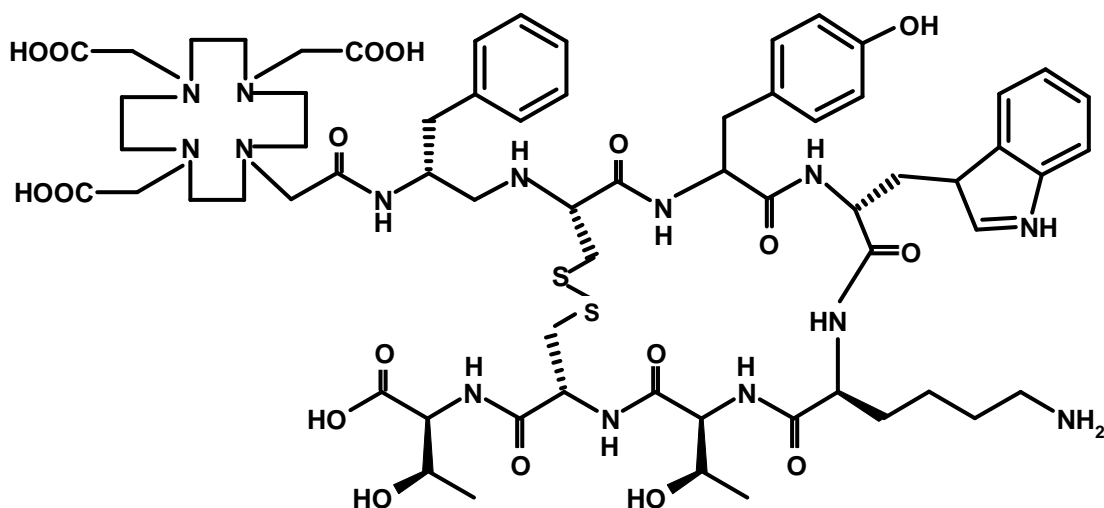
[^{111}In]DOTA-NOC má poměr vychytávání nádor/ledviny 2,5krát větší ve srovnání s [^{111}In]DOTA-TOC (Wild a kol. 2003).



Obr. 5. Struktura DOTA-NOC

2.3.2. ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotát

^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotát (^{125}I -DOTA-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr) (obr. 6) má radionuklid vázán na tyrozinovou skupinu, na rozdíl od radiopeptidů značených kovovými radionuklidy, kde jsou radionuklidy chelatovány na DOTA.



Obr. 6. Struktura DOTA-Tyr³-oktreotátu

2.3.3. ^{14}C -metylglukóza a ^{14}C -sacharóza

Analog glukózy, 1-O-methyl- α -D-glukopyranosid (α -metylglukóza), je aktivně transportován sodíko-glukózovým kotransportovým přenašečem na apikální membráně buněk ledvinných tubulů. Na rozdíl od glukózy není v buňkách metabolizován a nepřenáší se přenašečem pro usnadněný transport na basolaterální membráně z buňky ven, proto je kumulován v buňce (Boogaard a kol. 1989).

Bylo také zjištěno, že uptake α -metylglukózy je závislý na koncentraci a je saturační. Mezi inhibitory tohoto procesu patří např. florigin, který znemožňuje transport glukózy závislý na sodíku (Boogaard a kol. 1989).

Díky aktivnímu influxu by měla být α -metylglukóza kumulována v buňce ve větší míře než sacharóza, která je do buněk transportována pouze pasivní difuzí (Boogaard a kol. 1989).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

3.1.1. Biologický materiál

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

Dále byly použity pankreatické buňky, v podobě buněčné linie AR42J pocházející z tumoru exokrinního pankreatu potkanů, které byly poskytnuty dr. Melicharovou z katedry farmakologie a toxikologie FaF UK. Tato linie je tumorogenní a vykazuje významnou sekreci amylázy a dalších endokrinních enzymů. Buňky žijí ve sférických koloniích volně spojené, každých 48 hodin se rozdělují v poměru 1:2 do čisté baňky, čímž se udržuje hodnota 10^5 - $9 \cdot 10^5$ buněk/1ml. Adherentní buňky mohou být rozvolněny 0,2% roztokem EDTA. Jako médium se používá RPMI 1640, 2mM glutamin a 10% zárodečné bovinní sérum.

3.1.2. Chemikálie

- Metylglukóza = methyl- α -D-(U- 14 C)glucopyranoside (Amersham Biosciences, VB), specifická aktivita 10 GBq/mmol, koncentrace 7,4 MBq/ml.
- Sacharóza = (U- 14 C)sucrose (Amersham Biosciences, VB), specifická aktivita 22,2 MBq/mmol, koncentrace 7,4 MBq/ml.
- DOTA-Tyr³-oktrotát = DOTA-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (piCHEM, Graz, Austria)
- DOTA-NOC = DOTA-1-Nal³-oktrotid = DOTA-D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (piCHEM, Graz, Austria)
- Gentamicin (Lek, inj. 80 mg/2 ml)
- Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)
- Maleát (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)
- Collagenasa cruda (Sevapharma, ČR)

- Hovězí albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- D-glukóza (Lachema a. s., Neratovice, ČR)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)
- Scintilační roztok (Fluor High Performance LSC cocktail, Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN)

3.1.3. Použité přístroje

- Centrifuga 3K30H, Sigma, Laborentrifugen GmbH, Osterode, Německo
- Laboratorní třepačka KS – 15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15, Johanna Otto GmbH, Hechingen, Německo
- Gama-spektrometr 1480 WizardTM 3'', Wallac, Turku, Finsko
- Beta-spektrometr 1219 Rackbeta, Wallac, Turku, Finsko
- Světelný mikroskop Meopta, ČR

3.2. Metodika

3.2.1. Příprava roztoků

Roztoky byly připravovány spolupracovníky. Zásobní roztoky pro přípravu Krebs-Henseleitova roztoku A a B se připravovaly ve větším množství a z nich se v čas potřeby připravovaly Krebs-Henseleit A a B roztoky, které se smíchaly za vzniku Krebs-Henseleitova pracovního roztoku.

Příprava zásobních roztoků (množství v gramech na 1 litr zásobního roztoku): NaCl (160,9 g/l), KCl (11,0 g/l), KH_2PO_4 (29,92 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27,4 g/l), CaCl_2 bezvodý (11,88 g/l), NaHCO_3 (9,71 g/l).

Krebs-Henseleitův roztok A je složen z destilované vody (78,5 ml) a ze zásobních roztoků NaCl (20,0 ml), KCl (15,0 ml), CaCl_2 (11,0 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0 ml) a KH_2PO_4 (2,0 ml). Krebs-Henseleitův roztok B byl představován ze zásobního roztoku NaHCO_3 (100 ml).

Krebs-Henseleitův roztok byl připravován z pracovního Krebs-Henseleitova roztoku (150,0 ml), destilované vody (150,0 ml) a HEPES (0,9 g), byl chlazen v ledové drti.

Krebs-Henseleitův roztok s glukózou byl připravován z Krebs-Henseleitova roztoku (150,0 ml) a glukózy (0,15 g). Uchovával se také v ledové drti.

Krebs-Henseleitův roztok s glukózou, albuminem a kolagenázou byl připravován z Krebs-Henseleitova roztoku s glukózou (50,0 ml), kolagenázy (0,05 g) a albuminu (1,25 g).

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

3.2.2. Preparace ledvin a izolace a separace ledvinných buněk

Preparace ledvin a izolace a separace ledvinných buněk byla prováděna spolupracovníky dvoufázovou perfúzní metodou.

Ledviny byly vyjmuty, opláchnuty fyziologickým roztokem a přeneseny do kádinky ponořené ve vodní lázni s teplotou 37 °C a recirkulujícím Hanksovým roztokem, kde během cca 3 minut došlo k propláchnutí tkáně.

Poté byly přeneseny do další kádinky ve vodní lázni, která obsahovala 120 ml Hanksova roztoku s kolagenázou. Když byly zpozorovány známky dostatečného rozvolnění kolagenního pojiva ledvinných buněk, ledviny byly přeneseny do připravené skleněné misky s 50 ml Krebs-Henseleitova roztoku s albuminem a kolagenázou, kde bylo enzymaticky a mechanicky pinzetou a poté míchadlem prováděno úplné rozvolnění ledvinné tkáně po dobu asi 20 min za průběžného okysličování.

Získaná suspenze ledvinných buněk byla přefiltrována přes gázu a sílonové síto s oky 85 µm a centrifugována v silnostěnných zkumavkách (5 min, 80 g, 4 °C). Supernatant byl odsát a buňky byly resuspendovány 5 ml Krebs-Henseleitova roztoku s glukózou a provedla se centrifugace (1 min, 80 g, 4 °C), celkem 3krát.

3.2.3. Stanovení počtu živých buněk a životnosti

Počet živých a mrtvých buněk byl určován v Bürkerově komůrce pod mikroskopem (zvětšení 10×10) z 60 µl vzorku, který byl získán promícháním 60 µl suspenze buněk obarvených 60 µl trypanové modří.

Z počtu živých buněk byl určen počet živých buněk v 1ml buněčné suspenze jako průměr počtu živých buněk nalezených ve třech malých čtvercích Bürkerovy komůrky násobený faktorem $2 \cdot 10^4$.

Životnost buněk byla vypočítána jako poměr živých buněk a součtu živých a mrtvých buněk (v %).

3.2.4. Akumulační studie

V akumulčních studiích byla zkoumána závislost akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách a akumulace ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách v časové závislosti. Poté byla míra akumulace vzájemně porovnána.

Dále byla zjišťována akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na počtu buněk ve vzorku, na teplotě a na množství peptidu ve vzorku. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách byla dále sledována v přítomnosti potenciálních inhibitorů, jako jsou gentamicin, lysin, maleát nebo albumin o různé koncentraci a vliv těchto látek byl vzájemně porovnán.

Dále byla zjišťována akumulace dalšího radiopeptidu - ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách a ovlivnění této akumulace přítomností gentamicinu a maleátu.

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

Poté, co byl zjištěn počet živých buněk v jednom ml, byla suspenze buněk doplněna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na objem, při kterém byla koncentrace $2 \cdot 10^6$ buněk na 1 ml.

Buněčná suspenze byla rozdělena do 24 inkubačních zkumavek (čtyři vzorky od každé doby inkubace) po 1 ml (pankreatické buňky po 2 ml). Buňky byly vloženy do inkubátoru, kde byly temperovány na teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 minut. Poté bylo do vzorků přidáno 10 μl zkoumané značené látky (^{14}C -metylglukóza ve finální koncentraci 0,35 $\mu\text{mol/l}$; ^{14}C -sacharóza ve finální koncentraci 0,33 $\mu\text{mol/l}$) a po požadovanou dobu (1, 2, 5, 10, 20, 30 minut) byly vzorky inkubovány při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ za standardního třepání (280 kmitů/min).

Po uplynutí požadované doby byla inkubace ukončena přidáním 3 ml Krebs-Henseleitova roztoku o teplotě $4\text{ }^\circ\text{C}$. Byla provedena centrifugace (1 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 80 g) a poté bylo odebráno 0,5 ml supernatantu (média). Zbytek média byl odsán a buňky byly promíchány přidáním 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku. Poté byla provedena centrifugace za stejných podmínek a celé médium bylo odsáto. Bylo přidáno 5 ml Krebs-Henseleitova roztoku, buňky se promíchaly a poté proběhla znovu centrifugace a

odsátí buněk. Znovu bylo přidáno 5 ml Krebs-Henseleitova roztoku, vzorky byly stejným způsobem zcentrifugovány a médium bylo odsáto.

Zkumavky s buňkami byly propláchnuty 3krát 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku, bylo odebráno 0,5 ml suspenze buněk a k nim bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku. Poté byly vzorky měřeny beta-spektrometrem. Ke vzorkům média bylo také přidáno 5 ml scintilačního roztoku a jejich radioaktivita byla změřena pomocí beta-spektrometru.

Dále byly připraveny 4 standardy. Z 10 μl značené látky a 5 ml destilované vody, bylo odebráno 0,5 ml, ke kterému bylo přidáno 5 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita standardů byla změřena a po přepočtu bylo s jejich průměrnou hodnotou dále počítáno jako s vloženou dávkou radioaktivity.

3.2.4.2. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na počtu buněk ve vzorku

Po zjištění počtu buněk na 1 ml, byla suspenze buněk postupně naředěna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na $3 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ a $0,5 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml a od každé koncentrace byl 3krát 1 ml přenesen do inkubační zkumavky.

Buněčné vzorky byly temperovány na teplotu 37 °C po dobu 3 minut. Poté bylo do vzorků přidáno 10 μl ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) a po dobu 30 min byly inkubovány při 37 °C a třepány rychlostí 280 kmitů/min.

Po této době byla inkubace zastavena 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku o teplotě 4 °C, proběhla centrifugace (1 min, 4 °C, 80 g) a bylo odebráno 0,5 ml média. Zbytek média byl odsán a k buňkám byly ještě 2krát přidány 4 ml roztoku Krebs-Henseleitova, včetně centrifugace a odsátí. Druhá centrifugace trvala 1 min (4 °C, 80 g) a třetí 3 min (4 °C, 80 g).

Zkumavky s buňkami byly propláchnuty 3krát 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku a obsah byl přelit do měřících nádobek. Poté byla radioaktivita vzorků měřena gama-spektrometrem spolu se vzorky médií, ke kterým bylo přidáno 5 ml destilované vody.

Byly připraveny 3 standardy, složené z 10 μl ^{111}In -DOTA-NOC a 5 ml destilované vody. Radioaktivita standardů byla změřena a s jejich průměrnou hodnotou bylo dále počítáno jako s vloženou dávkou radioaktivity.

3.2.4.3. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na teplotě

Po zjištění počtu buněk na 1 ml, byla buněčná suspenze naředěna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na $2 \cdot 10^6$ buněk/1 ml a po 1 ml napipetována do inkubačních zkumavek. Část zkumavek byla předem nahřána na $37\text{ }^\circ\text{C}$ v inkubátoru a část ochlazena v třepací ledové lázni na $4\text{--}8\text{ }^\circ\text{C}$ a $1\text{--}2\text{ }^\circ\text{C}$. Po temperaci zkumavek na tyto teploty bylo přidáno $10\text{ }\mu\text{l}$ ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace $6,4\text{ nmol/l}$) a vzorky byly 30 min za třepání rychlostí 280 kmitů/min inkubovány.

Po této době byla inkubace zastavena 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku o teplotě $4\text{ }^\circ\text{C}$, proběhla centrifugace (1 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 80 g) a bylo odebráno 0,5 ml média. Zbytek média byl odsán a k buňkám byly ještě 2krát přidány 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku, včetně centrifugace a odsátí. Druhá centrifugace trvala 1 min ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 80 g) a třetí 3 min ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 80 g).

Zkumavky s buňkami byly propláchnuty 3krát 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku a obsah byl přelit do měřicích nádobek. Poté byla radioaktivita vzorků měřena gama-spektrometrem spolu se vzorky médií, ke kterým bylo přidáno 5 ml destilované vody.

Byly připraveny 3 standardy, složené z $10\text{ }\mu\text{l}$ ^{111}In -DOTA-NOC a 5 ml destilované vody. Radioaktivita standardů byla změřena a s jejich průměrnou hodnotou bylo dále počítáno jako s vloženou dávkou radioaktivity.

3.2.4.4. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v buňkách v závislosti na množství peptidu ve vzorku

Po zjištění počtu živých buněk na 1 ml, byla buněčná suspenze doplněna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na objem, při kterém byla koncentrace $2 \cdot 10^6$ buněk na 1 ml.

Buněčná suspenze byla po 1 ml nepipetována do inkubačních zkumavek, které byly předem temperovány na teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$. Po preinkubaci buněk 3 min při $37\text{ }^\circ\text{C}$, byl přidán značený peptid ^{111}In -DOTA-NOC v množství $2\text{ }\mu\text{l}$ (finální koncentrace $1,3\text{ nmol/l}$), $10\text{ }\mu\text{l}$ (finální koncentrace $6,4\text{ nmol/l}$) a $50\text{ }\mu\text{l}$ (finální koncentrace $31,9\text{ nmol/l}$), každý do třech zkumavek. Vzorky byly inkubovány 30 min při $37\text{ }^\circ\text{C}$ v třepačce při 280 kmitů/min.

Po této době byla inkubace zastavena 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku o teplotě 4 °C, proběhla centrifugace (1 min, 4 °C, 80 g) a bylo odebráno 0,5 ml supernatantu (médiu). Zbytek média byl odsán a k buňkám byly ještě 2krát přidány 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku, včetně centrifugace a odsátí. Druhá centrifugace trvala 1 min (4 °C, 80 g) a třetí 3 min (4 °C, 80 g).

Zkumavky s buňkami byly propláchnuty 3krát 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku a obsah byl přelit do měřících nádobek. Poté byla radioaktivita vzorků měřena gama-spektrometrem spolu se vzorky média, ke kterým bylo přidáno 5 ml destilované vody, a se standardy.

Standardy byly tvořeny 10 µl ^{111}In -DOTA-NOC a 5 ml destilované vody. Jejich radioaktivita byla změřena a s průměrnou hodnotou bylo dále počítáno jako s vloženou dávkou radioaktivity.

3.2.4.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu) v buňkách v přítomnosti potenciálních inhibitorů

Po zjištění počtu buněk obsažených v 1 ml, byla buněčná suspenze naředěna Krebs-Henseleitovým roztokem s glukózou na koncentraci $2 \cdot 10^6$ buněk/1ml.

Do části inkubačních zkumavek byla napipetována zkoumaná látka (další vzorky sloužily jako kontrolní) a do všech 1 ml buněčné suspenze. Po inkubaci 3 min za teploty 37 °C bylo přidáno do všech zkumavek 10 µl značeného peptidu (^{111}In -DOTA-NOC, finální koncentrace 6,4 nmol/l; ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotát, finální koncentrace 6,4 nmol/l) a vzorky byly inkubovány 30 min při teplotě 37 °C a za promíchávání rychlostí 280 kmitů/min.

Po této době byla inkubace zastavena 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku o teplotě 4 °C, proběhla centrifugace (1 min, 4 °C, 80 g) a bylo odebráno 0,5 ml média. Zbytek média byl odsán a k buňkám byly ještě 2krát přidány 4 ml Krebs-Henseleitova roztoku, včetně centrifugace a odsátí. Druhá centrifugace trvala 1 min (4 °C, 80 g) a třetí 3 min (4 °C, 80 g).

Zkumavky s buňkami byly propláchnuty 3krát 2 ml Krebs-Henseleitova roztoku a obsah byl přelit do měřících nádobek. Poté byla radioaktivita vzorků měřena gama-spektrometrem spolu se vzorky médií, ke kterým bylo přidáno 5 ml destilované vody, a se standardními vzorky.

Byly připraveny 3 standardy složené z 10 μl ^{111}In -DOTA-NOC (^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu) a 5 ml destilované vody. Radioaktivita standardů byla změřena a s jejich průměrnou hodnotou bylo dále počítáno jako s vloženou dávkou radioaktivity.

Látky používané k ovlivnění akumulace ^{111}In -DOTA-NOC:

lysin 100 μl o koncentraci 1 mol/l (finální koncentrace 0,1 mol/l)

maleát 175 μl o koncentraci 145 mmol/l (finální koncentrace 22 mmol/l)

gentamicin 10 μl o koncentraci 84 mmol/l (finální koncentrace 0,8 mmol/l)

albumin 20 a 100 μl o koncentraci 5 mmol/l (finální koncentrace 0,1 a 0,5 mmol/l)

Látky používané k ovlivnění akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu:

gentamicin 30 μl o koncentraci 84 mmol/l (finální koncentrace 2,5 mmol/l)

maleát 10 μl o koncentraci 145 mmol/l (finální koncentrace 1,5 mmol/l)

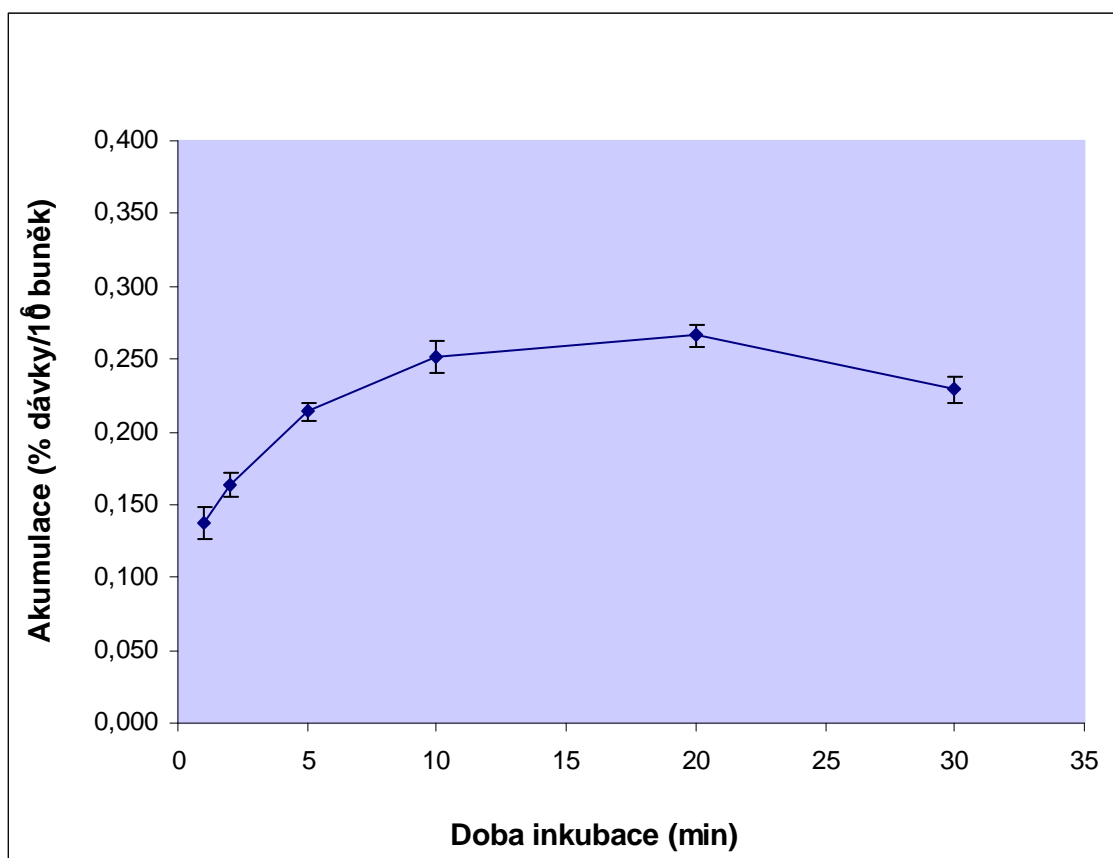
3.3. Výsledky

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

Tabulka 2 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{14}C -metylglukózy (finální koncentrace 0,35 $\mu\text{mol/l}$) v ledvinných buňkách v závislosti na čase. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace z každé doby inkubace.

Tabulka 2. Hodnoty akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných buňkách v závislosti na čase

| Doba inkubace (min) | Radioaktivita v buněčných vzorcích (dpm) | Přepočtená radioaktivita ($\text{dpm}/10^6$) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|---------------------|--|--|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka |
| 1 | 588,0 | 308,2 | 2 083,9 | 0,148 | 0,138 \pm 0,011 |
| | 552,0 | 289,3 | 2 083,9 | 0,139 | |
| | 504,0 | 264,2 | 2 083,9 | 0,127 | |
| 2 | 696,0 | 364,8 | 2 083,9 | 0,175 | 0,164 \pm 0,008 |
| | 636,0 | 333,3 | 2 083,9 | 0,160 | |
| | 636,0 | 333,3 | 2 083,9 | 0,160 | |
| | 636,0 | 333,3 | 2 083,9 | 0,160 | |
| 5 | 864,0 | 452,8 | 2 083,9 | 0,217 | 0,214 \pm 0,006 |
| | 876,0 | 459,1 | 2 083,9 | 0,220 | |
| | 828,0 | 434,0 | 2 083,9 | 0,208 | |
| | 840,0 | 440,3 | 2 083,9 | 0,211 | |
| 10 | 936,0 | 490,6 | 2 083,9 | 0,235 | 0,251 \pm 0,011 |
| | 1 020,0 | 534,6 | 2 083,9 | 0,257 | |
| | 1 020,0 | 534,6 | 2 083,9 | 0,257 | |
| | 1 020,0 | 534,6 | 2 083,9 | 0,257 | |
| 20 | 1 032,0 | 540,9 | 2 083,9 | 0,260 | 0,266 \pm 0,008 |
| | 1 044,0 | 547,2 | 2 083,9 | 0,263 | |
| | 1 092,0 | 572,3 | 2 083,9 | 0,275 | |
| 30 | 900,0 | 471,7 | 2 083,9 | 0,226 | 0,229 \pm 0,009 |
| | 876,0 | 459,1 | 2 083,9 | 0,220 | |
| | 960,0 | 503,1 | 2 083,9 | 0,241 | |
| | 912,0 | 478,0 | 2 083,9 | 0,229 | |



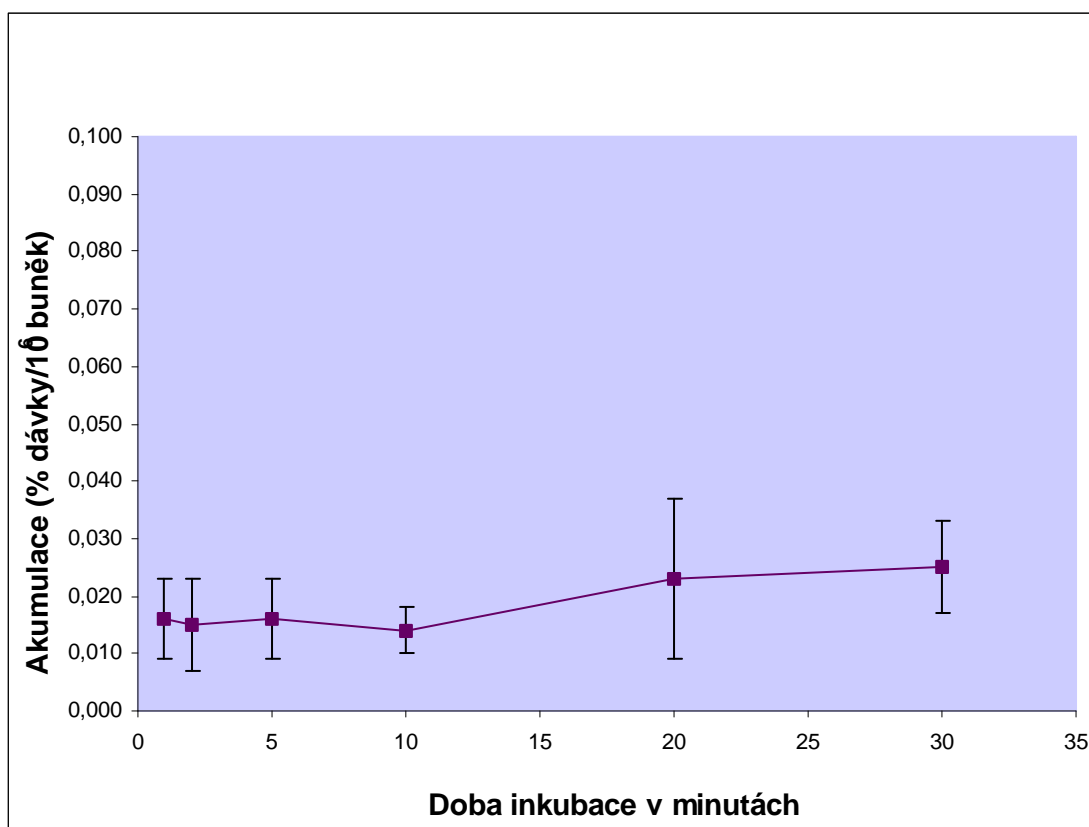
Graf 1. Závislost akumulace ¹⁴C-metylglukózy v ledvinných buňkách na čase

3.3.2. Akumulace ¹⁴C-metylglukózy v pankreatických buňkách

Tabulka 3 zobrazuje výsledky měření akumulace ¹⁴C-metylglukózy (finální koncentrace 0,35 μmol/l) v pankreatických buňkách v závislosti na čase. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10⁶ buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace z každé doby inkubace.

Tabulka 3. Hodnoty akumulace ¹⁴C-metylglukózy v pankreatických buňkách v závislosti na čase

| Doba inkubace (min) | Radioaktivita v buněčných vzorcích (dpm) | Přepočtená radioaktivita (dpm/10 ⁶) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|---------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| 1 | 124,9 | 76,4 | 3 598,613 | 0,021 | 0,016 ± 0,007 |
| | 131,7 | 80,6 | 3 598,613 | 0,022 | |
| | 140,2 | 35,8 | 3 524,106 | 0,010 | |
| | 133,0 | 33,9 | 3 524,106 | 0,010 | |
| 2 | 115,5 | 70,7 | 3 598,613 | 0,020 | 0,015 ± 0,008 |
| | 142,1 | 87,0 | 3 598,613 | 0,024 | |
| | 121,0 | 30,9 | 3 524,106 | 0,009 | |
| | 115,4 | 29,4 | 3 524,106 | 0,008 | |
| 5 | 156,4 | 95,7 | 3 598,613 | 0,027 | 0,016 ± 0,007 |
| | 96,2 | 58,9 | 3 598,613 | 0,016 | |
| | 148,3 | 37,8 | 3 524,106 | 0,011 | |
| | 167,5 | 42,7 | 3 524,106 | 0,012 | |
| 10 | 86,7 | 53,1 | 3 598,613 | 0,015 | 0,014 ± 0,004 |
| | 117,8 | 72,1 | 3 598,613 | 0,020 | |
| | 142,7 | 36,4 | 3 524,106 | 0,010 | |
| | 158,2 | 40,4 | 3 524,106 | 0,011 | |
| 20 | 250,2 | 153,1 | 3 598,613 | 0,043 | 0,023 ± 0,014 |
| | 116,5 | 71,3 | 3 598,613 | 0,020 | |
| | 200,0 | 51,0 | 3 524,106 | 0,014 | |
| | 185,6 | 47,3 | 3 524,106 | 0,013 | |
| 30 | 177,8 | 108,8 | 3 598,613 | 0,030 | 0,025 ± 0,008 |
| | 197,2 | 120,7 | 3 598,613 | 0,034 | |
| | 252,0 | 64,3 | 3 524,106 | 0,018 | |
| | 237,3 | 60,5 | 3 524,106 | 0,017 | |



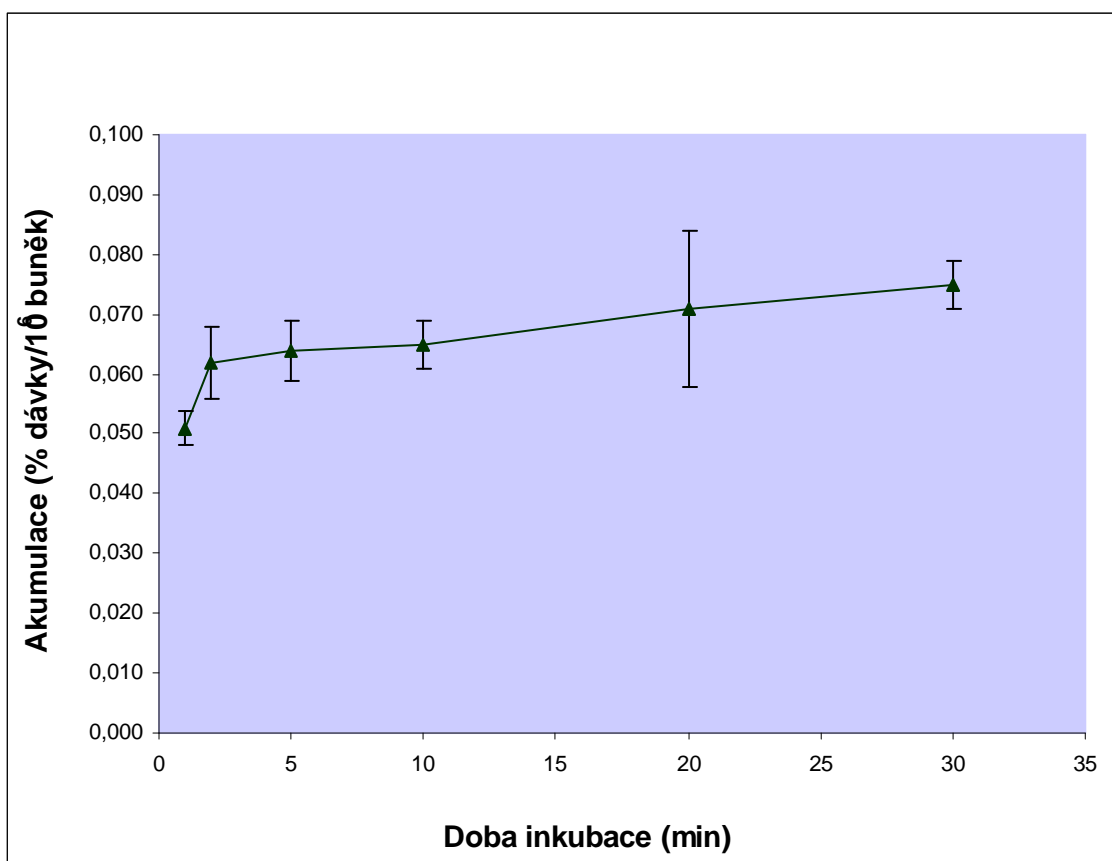
Graf 2. Závislost akumulace ¹⁴C-metylglukózy v pankreatických buňkách na čase

3.3.3. Akumulace ¹⁴C-sacharózy v ledvinných buňkách

Tabulka 4 zobrazuje výsledky měření akumulace ¹⁴C-sacharózy (finální koncentrace 0,33 μmol/l) v ledvinných buňkách v závislosti na čase. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10⁶ buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace z každé doby inkubace.

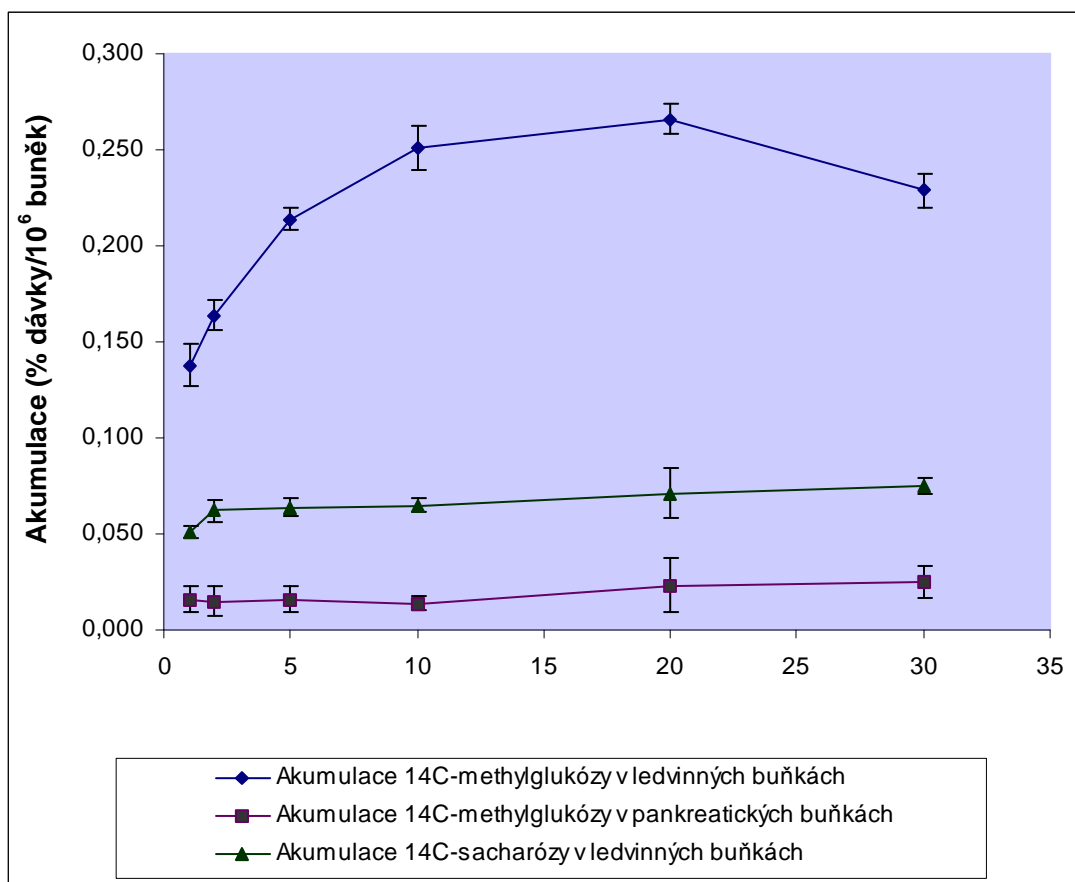
Tabulka 4. Hodnoty akumulace ¹⁴C-sacharózy v ledvinných buňkách v závislosti na čase

| Doba inkubace (min) | Radioaktivita v buněčných vzorcích (dpm) | Přepočtená radioaktivita (dpm/10 ⁶) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|---------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| 1 | 408,0 | 213,8 | 4 379,68 | 0,049 | 0,051 ± 0,003 |
| | 396,0 | 207,5 | 4 379,68 | 0,047 | |
| | 444,0 | 232,7 | 4 379,68 | 0,053 | |
| | 444,0 | 232,7 | 4 379,68 | 0,053 | |
| 2 | 588,0 | 308,2 | 4 379,68 | 0,070 | 0,062 ± 0,006 |
| | 492,0 | 257,9 | 4 379,68 | 0,059 | |
| | 492,0 | 257,9 | 4 379,68 | 0,059 | |
| | 504,0 | 264,2 | 4 379,68 | 0,060 | |
| 5 | 516,0 | 270,4 | 4 379,68 | 0,062 | 0,064 ± 0,005 |
| | 540,0 | 283,0 | 4 379,68 | 0,065 | |
| | 588,0 | 308,2 | 4 379,68 | 0,070 | |
| | 480,0 | 251,6 | 4 379,68 | 0,057 | |
| 10 | 516,0 | 270,4 | 4 379,68 | 0,062 | 0,065 ± 0,004 |
| | 576,0 | 301,9 | 4 379,68 | 0,069 | |
| | 540,0 | 283,0 | 4 379,68 | 0,065 | |
| 20 | 504,0 | 264,2 | 4 379,68 | 0,060 | 0,071 ± 0,013 |
| | 720,0 | 377,4 | 4 379,68 | 0,086 | |
| | 648,0 | 339,6 | 4 379,68 | 0,078 | |
| | 516,0 | 270,4 | 4 379,68 | 0,062 | |
| 30 | 660,0 | 345,9 | 4 379,68 | 0,079 | 0,075 ± 0,004 |
| | 588,0 | 308,2 | 4 379,68 | 0,070 | |
| | 636,0 | 333,3 | 4 379,68 | 0,076 | |



Graf 3. Závislost akumulace ¹⁴C-sacharózy v ledvinných buňkách na čase

3.3.4. Porovnání akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách s akumulací ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách



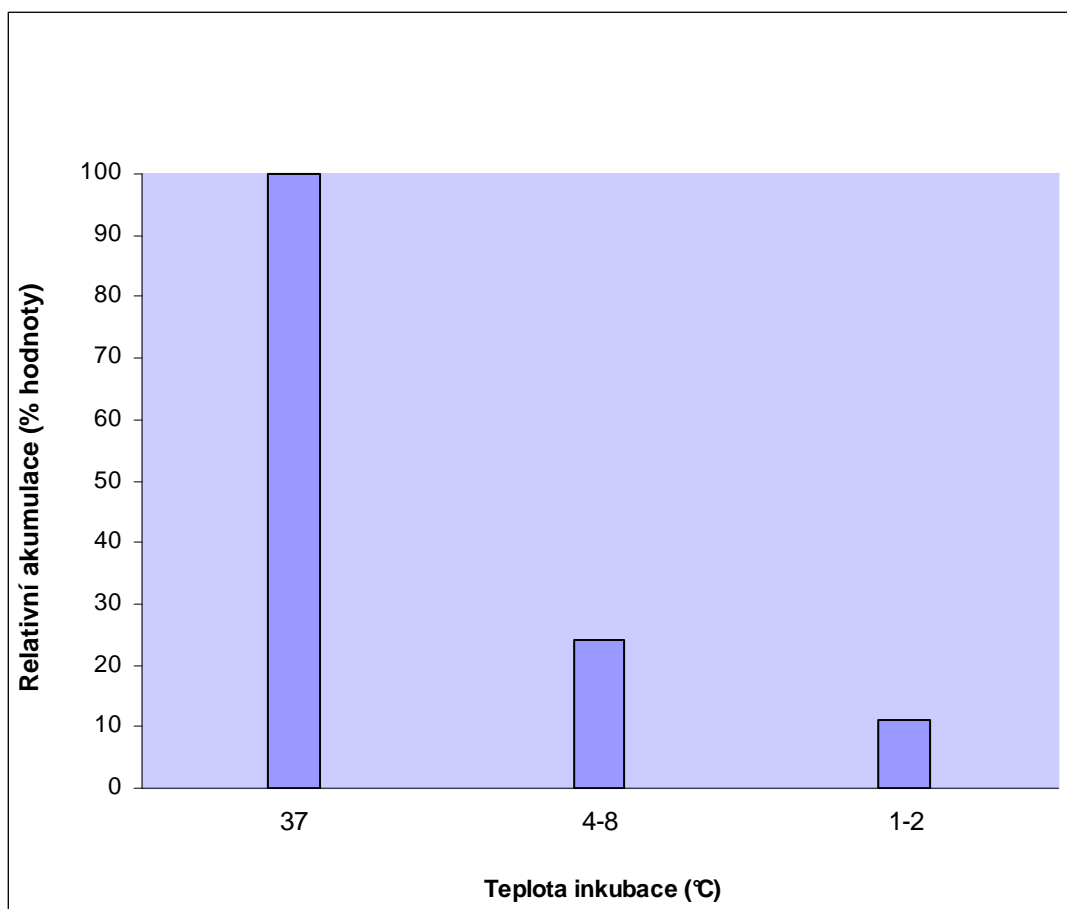
Graf 4. Porovnání akumulace ^{14}C -metylglukózy v ledvinných a pankreatických buňkách a ^{14}C -sacharózy v ledvinných buňkách v závislosti na čase

3.3.5. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v závislosti na teplotě

Tabulka 5 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách v závislosti na teplotě při konstantním množství vloženého peptidu. Doba inkubace je 30 minut při teplotě 37 °C, 4-8 °C a 1-2 °C. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Dále jsou hodnoty se sníženou teplotou přepočteny na procentuální část průměrné akumulace při dané teplotě z průměrné akumulace při 37° stejného měření (kontrola).

Tabulka 5. Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na teplotě

| Teplota (°C) | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | | Relativní akumulace (% kontroly) |
|--------------|--|---|-------------------|---------------------|--|----------------------------------|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka | |
| 37 | 24 828,3 | 12 414,15 | 7 316,32 | 1,697 | 1,569 ± 0,119 | 100,00 |
| | 22 657,8 | 11 328,90 | 7 316,32 | 1,548 | | |
| | 21 387,7 | 10 693,85 | 7 316,32 | 1,462 | | |
| | 1 128,9 | 564,45 | 669,15 | 0,844 | 0,757 ± 0,087 | |
| | 896,4 | 448,20 | 669,15 | 0,670 | | |
| | 47 081,5 | 23 540,75 | 11 945,31 | 1,971 | 1,965 ± 0,098 | |
| | 50 525,1 | 25 262,55 | 11 945,31 | 2,115 | | |
| | 44 058,4 | 22 029,20 | 11 945,31 | 1,844 | | |
| 46 123,2 | 23 061,60 | 11 945,31 | 1,931 | | | |
| 4-8 | 2 714,8 | 1 357,40 | 7 316,32 | 0,186 | 0,454 ± 0,313 | 24,23 |
| | 5 539,6 | 2 769,80 | 7 316,32 | 0,379 | | |
| | 11 670,2 | 5 835,10 | 7 316,32 | 0,798 | | |
| | 141,8 | 70,90 | 669,15 | 0,106 | 0,148 ± 0,031 | |
| | 211,1 | 105,55 | 669,15 | 0,158 | | |
| | 240,2 | 120,10 | 669,15 | 0,179 | | |
| 1-2 | 5 075,7 | 2 537,85 | 11 945,31 | 0,212 | 0,218 ± 0,062 | 11,11 |
| | 3 280,2 | 1 640,10 | 11 945,31 | 0,137 | | |
| | 7 433,1 | 3 716,55 | 11 945,31 | 0,311 | | |
| | 5 079,2 | 2 539,60 | 11 945,31 | 0,213 | | |



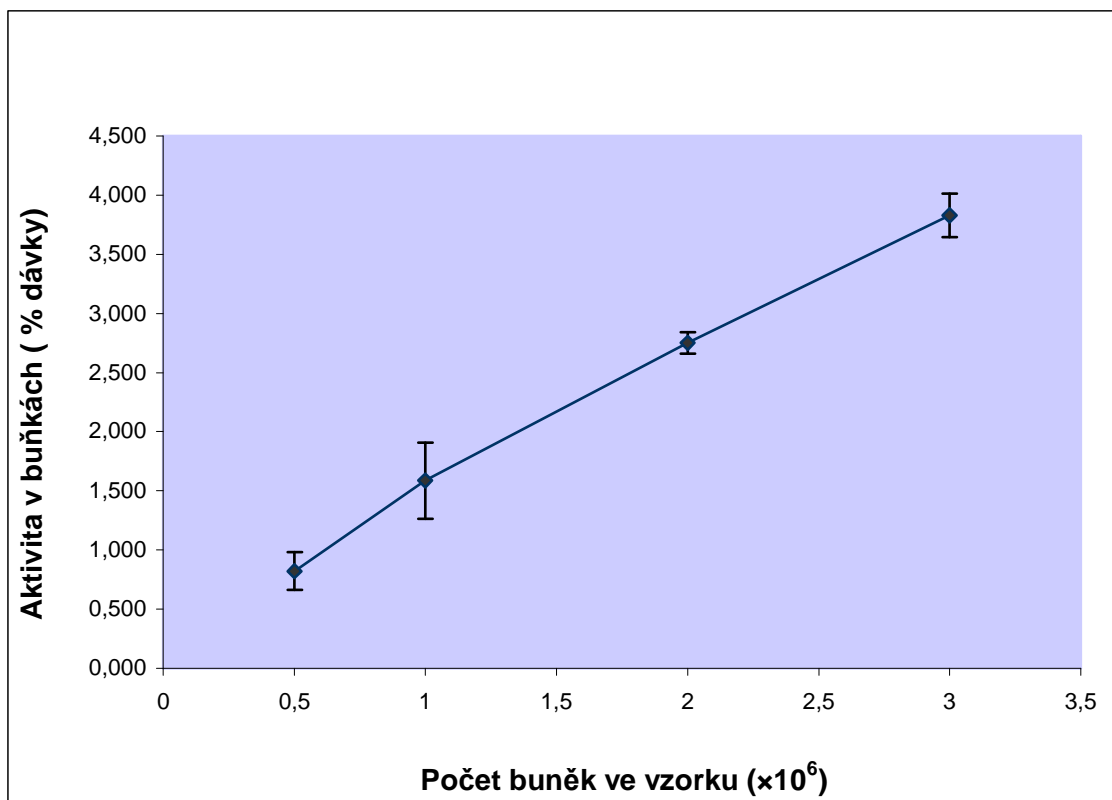
Graf 5. Akumulace $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ v ledvinných buňkách v závislosti na teplotě vzhledem k teplotě 37 °C (akumulace při 37 °C = 100 %)

3.3.6. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v závislosti na počtu buněk ve vzorku

Tabulka 6 zobrazuje výsledky měření akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách v závislosti na počtu buněk ve vzorku při stejném množství vloženého peptidu. Doba inkubace je 30 minut při 37 °C. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10⁶ buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace každého počtu buněk ve vzorku.

Tabulka 6. Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na počtu buněk ve vzorku

| Počet buněk ve vzorku ($\times 10^6$) | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|---|--|-------------------|---------------------|--|
| | | | Hodnota | Průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka |
| 0,5 | 5 107,7 | 7 316,316 | 0,698 | 0,821 \pm 0,106 |
| | 6 455,6 | 7 316,316 | 0,882 | |
| | 6 453,5 | 7 316,316 | 0,882 | |
| 1,0 | 13 276,9 | 7 316,316 | 1,815 | 1,585 \pm 0,324 |
| | 9 922,2 | 7 316,316 | 1,356 | |
| 2,0 | 20 829,5 | 7 316,316 | 2,847 | 2,750 \pm 0,090 |
| | 20 011,5 | 7 316,316 | 2,735 | |
| | 19 523,1 | 7 316,316 | 2,668 | |
| 3,0 | 27 728,3 | 7 316,316 | 3,790 | 3,829 \pm 0,184 |
| | 26 839,6 | 7 316,316 | 3,668 | |
| | 29 478,3 | 7 316,316 | 4,029 | |



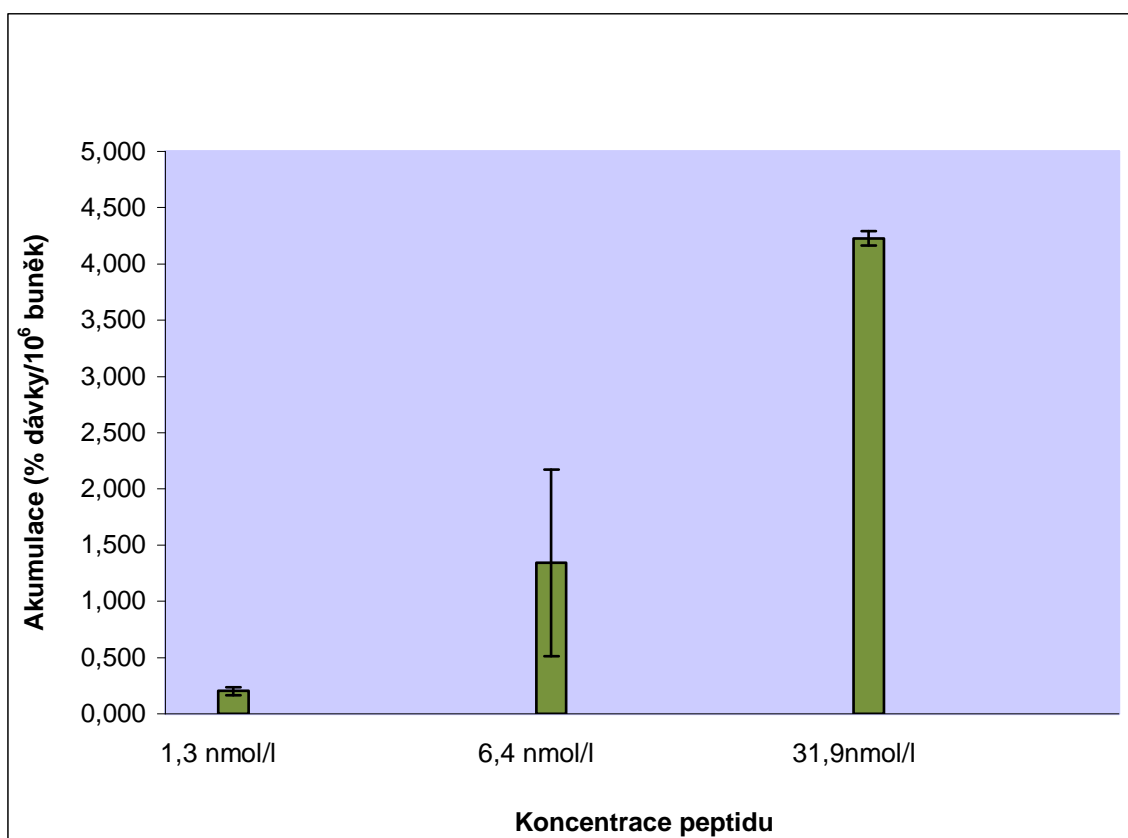
Graf 6. Závislost akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC na počtu buněk ve vzorku

3.3.7. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v závislosti na množství peptidu ve vzorku

Tabulka 7 zobrazuje výsledky měření akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na množství vloženého peptidu. Doba inkubace je 30 minut při 37 °C. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10⁶ buněk z vložené dávky radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace každého množství peptidu.

Tabulka 7. Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na množství peptidu ve vzorku

| Finální koncentrace ¹¹¹ In-DOTA-NOC | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/10 ⁶) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|--|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| 1,3 nmol/l | 298,9 | 149,5 | 669,151 | 0,223 | 0,202 ± 0,035 |
| | 307,6 | 153,8 | 669,151 | 0,230 | |
| | 203,2 | 101,6 | 669,151 | 0,152 | |
| 6,4 nmol/l | 3 362,1 | 1 681,1 | 669,151 | 2,512 | 1,342 ± 0,831 |
| | 1 128,9 | 564,5 | 669,151 | 0,844 | |
| | 896,4 | 448,2 | 669,151 | 0,670 | |
| 31,9 nmol/l | 5 543,3 | 2 771,7 | 669,151 | 4,142 | 4,228 ± 0,064 |
| | 5 686,4 | 2 843,2 | 669,151 | 4,249 | |
| | 5 746,7 | 2 873,4 | 669,151 | 4,294 | |



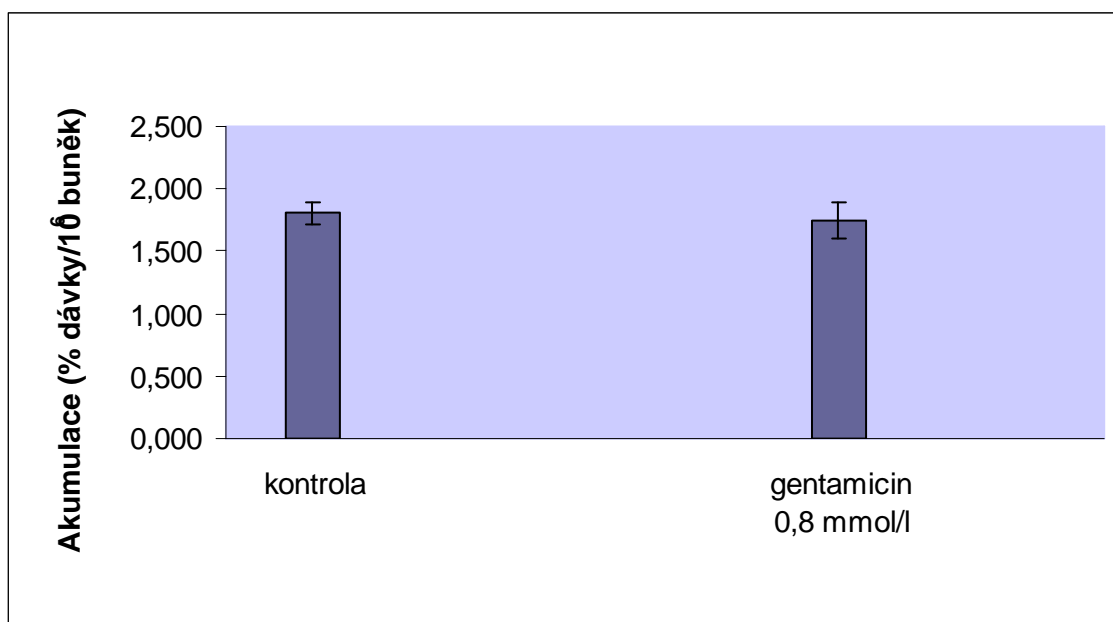
Graf 7. Závislost radioaktivity akumulované v buňkách na množství ¹¹¹In-DOTA-NOC

3.3.8. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti gentamicinu

Tabulka 8 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) a změnu akumulace v přítomnosti gentamicinu. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez (kontrola) a v přítomnosti gentamicinu.

Tabulka 8. Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|-----------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka |
| kontrola | 25 806,3 | 12 903,2 | 7 611,76 | 1,695 | 1,805 \pm 0,086 |
| | 29 014,3 | 14 507,2 | 7 611,76 | 1,906 | |
| | 27 633,2 | 13 816,6 | 7 611,76 | 1,815 | |
| gentamicin 0,8 mmol/l | 24 323,5 | 12 161,8 | 7 611,76 | 1,598 | 1,925 \pm 0,278 |
| | 28 901,5 | 14 450,8 | 7 611,76 | 1,898 | |
| | 34 685,3 | 17 342,7 | 7 611,76 | 2,278 | |



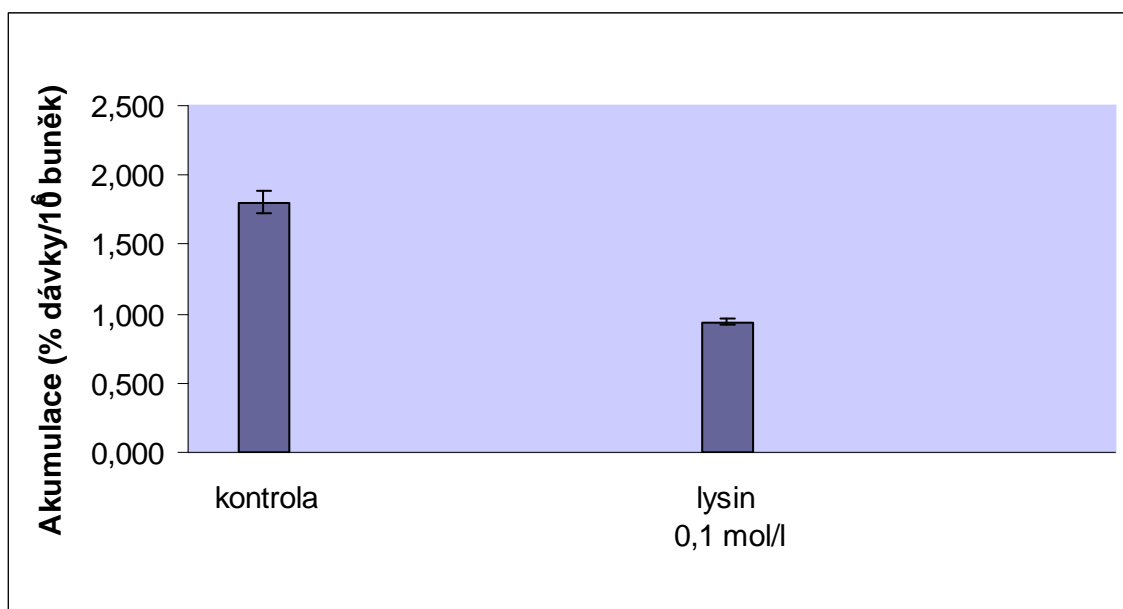
Graf 8. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

3.3.9. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti lysinu

Tabulka 9 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách a změnu akumulace v přítomnosti lysinu. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez (kontrola) a v přítomnosti lysinu.

Tabulka 9. Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|-----------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka |
| kontrola | 25 806,3 | 12 903,2 | 7 611,76 | 1,695 | 1,805 \pm 0,086 |
| | 29 014,3 | 14 507,2 | 7 611,76 | 1,906 | |
| | 27 633,2 | 13 816,6 | 7 611,76 | 1,815 | |
| lysin 0,1 mol/l | 13 932,7 | 6 966,4 | 7 611,76 | 0,915 | 0,940 \pm 0,018 |
| | 14 572,0 | 7 286,0 | 7 611,76 | 0,957 | |
| | 14 429,6 | 7 214,8 | 7 611,76 | 0,948 | |



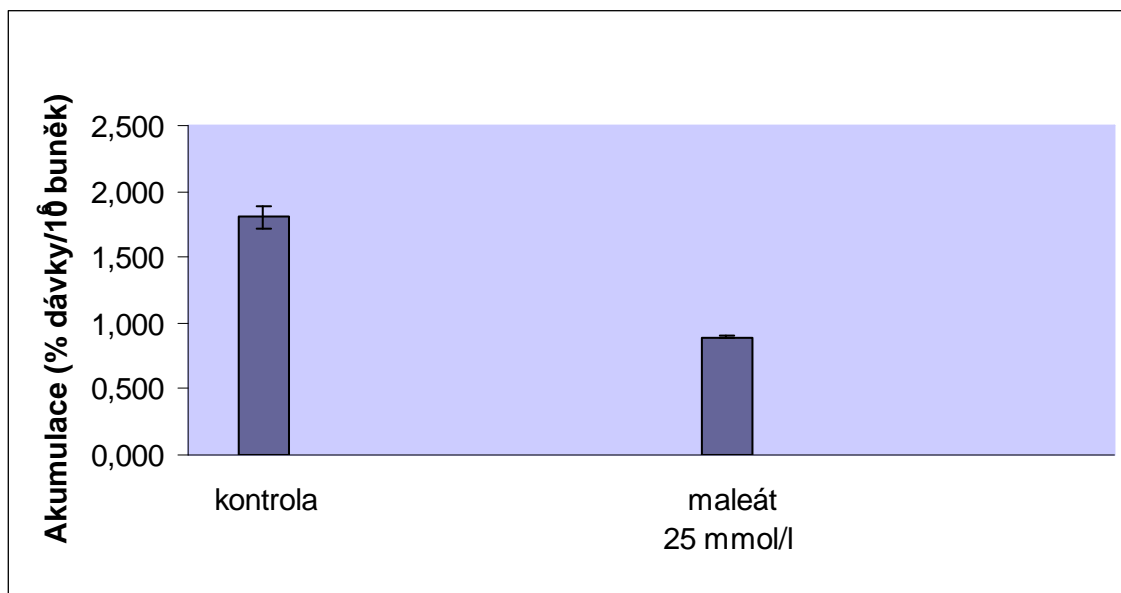
Graf 9. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti lysinu

3. 3. 10. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti maleátu

Tabulka 10 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{111}In -DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách a změnu akumulace v přítomnosti maleátu. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez (kontrola) a v přítomnosti maleátu.

Tabulka 10. Hodnoty akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti maleátu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka |
| kontrola | 25 806,3 | 12 903,2 | 7 611,76 | 1,695 | 1,805 \pm 0,086 |
| | 29 014,3 | 14 507,2 | 7 611,76 | 1,906 | |
| | 27 633,2 | 13 816,6 | 7 611,76 | 1,815 | |
| maleát 22 mmol/l | 13 788,9 | 6 894,5 | 7 611,76 | 0,906 | 0,895 \pm 0,012 |
| | 13 718,7 | 6 859,4 | 7 611,76 | 0,901 | |
| | 13 365,1 | 6 682,6 | 7 611,76 | 0,878 | |



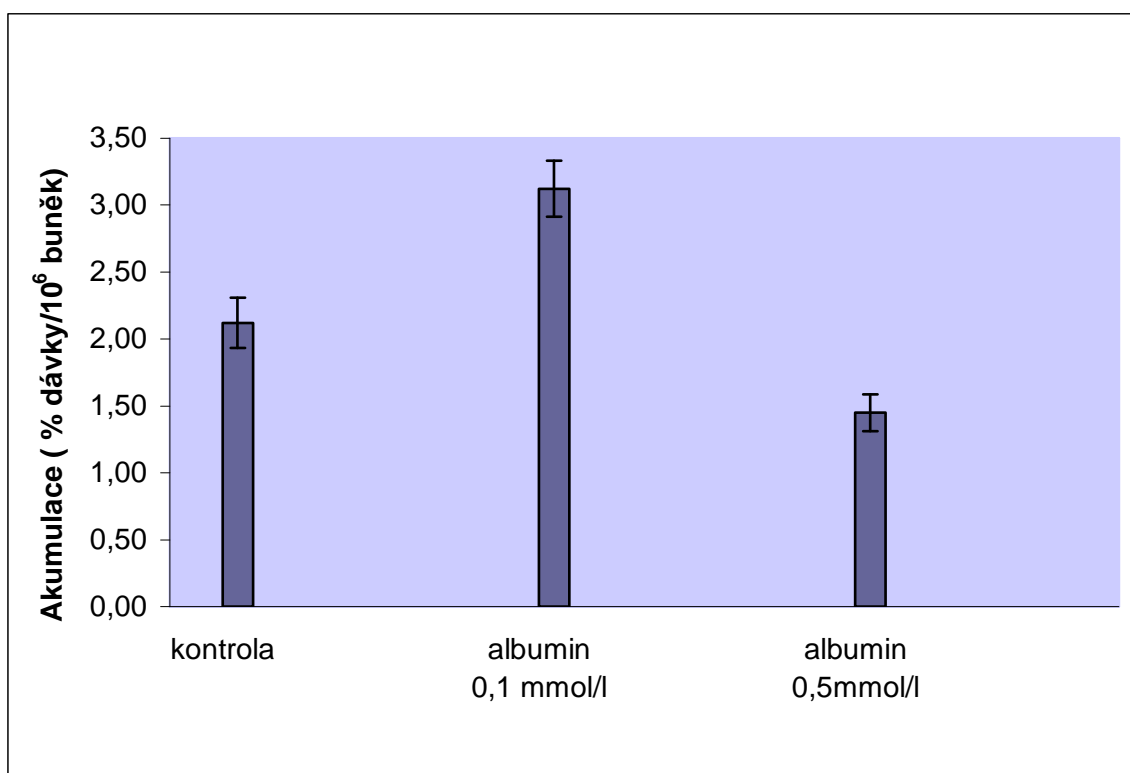
Graf 10. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti maleátu

3. 3. 11. Akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v přítomnosti albuminu

Tabulka 11 zobrazuje výsledky měření akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách a změnu akumulace v přítomnosti albuminu v různém množství. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10⁶ buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez přítomnosti albuminu (kontrola) a v přítomnosti albuminu o dvou různých koncentracích.

Tabulka 11. Hodnoty akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v ledvinných buňkách v přítomnosti maleátu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/10 ⁶) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|--------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| kontrola | 6 568,5 | 3 284,3 | 1 588,979 | 2,067 | 2,122 ± 0,187 |
| | 7 544,5 | 3 772,3 | 1 588,979 | 2,374 | |
| | 6 119,3 | 3 059,7 | 1 588,979 | 1,926 | |
| albumin 0,1 mmol/l | 9 125,0 | 4 562,5 | 1 588,979 | 2,871 | 3,123 ± 0,209 |
| | 9 892,5 | 4 946,3 | 1 588,979 | 3,113 | |
| | 10 754,8 | 5 377,4 | 1 588,979 | 3,384 | |
| albumin 0,5 mmol/l | 4 891,3 | 2 445,7 | 1 588,979 | 1,539 | 1,449 ± 0,138 |
| | 4 941,8 | 2 470,9 | 1 588,979 | 1,555 | |
| | 3 986,1 | 1 993,1 | 1 588,979 | 1,254 | |



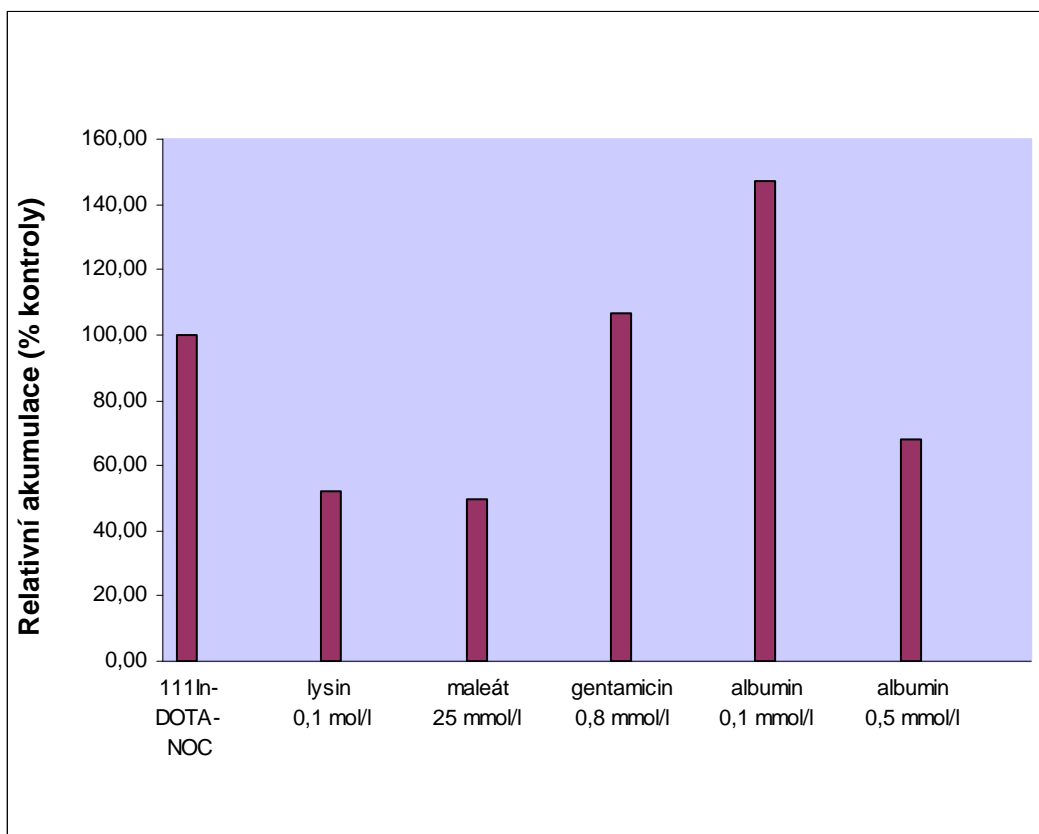
Graf 11. Závislost akumulace ¹¹¹In-DOTA-NOC v ledvinných buňkách na přítomnosti různého množství albuminu

3. 3. 12. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC

Tabulka 12 zobrazuje vliv inhibitorů na akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC o finální koncentraci 6,4 nmol/l (kontrola) v ledvinných buňkách.

Tabulka 12. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách

| Vzorky | Relativní akumulace (% kontroly) |
|--|----------------------------------|
| ^{111}In -DOTA-NOC 6,4 nmol/l | 100,00 |
| + lysin 0,1 mol/l | 52,07 |
| + maleát 22 mmol/l | 49,57 |
| + gentamicin 0,8 mmol/l | 106,62 |
| + albumin 0,1 mmol/l | 147,15 |
| + albumin 0,5 mmol/l | 68,30 |



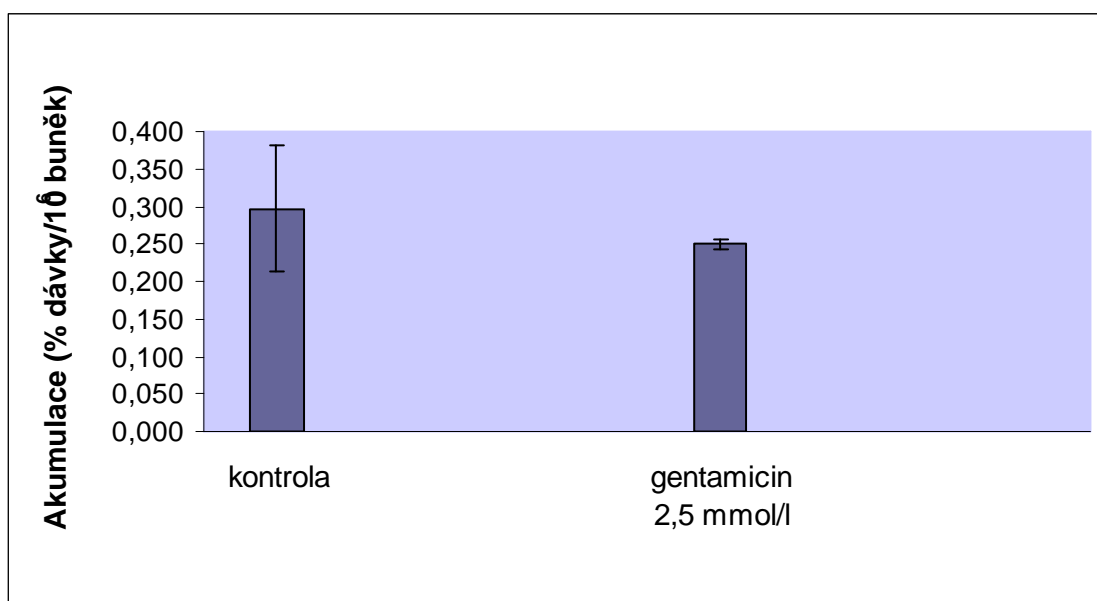
Graf 12. Porovnání akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v přítomnosti lysinu, maleátu, gentamicinu a albuminu (kontrola = 100 %)

3. 3. 13. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v přítomnosti gentamicinu

Tabulka 13 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách a změnu akumulace v přítomnosti gentamicinu. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez (kontrola) a v přítomnosti gentamicinu.

Tabulka 13. Hodnoty akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|-----------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| kontrola | 4 824,7 | 2 412,4 | 10 933,88 | 0,221 | 0,297 ± 0,084 |
| | 5 607,4 | 2 803,7 | 10 933,88 | 0,256 | |
| | 9 059,8 | 4 529,9 | 10 933,88 | 0,414 | |
| gentamicin 2,5 mmol/l | 5 249,3 | 2 624,7 | 10 933,88 | 0,240 | 0,250 ± 0,007 |
| | 5 608,6 | 2 804,3 | 10 933,88 | 0,256 | |
| | 5 531,0 | 2 765,5 | 10 933,88 | 0,253 | |



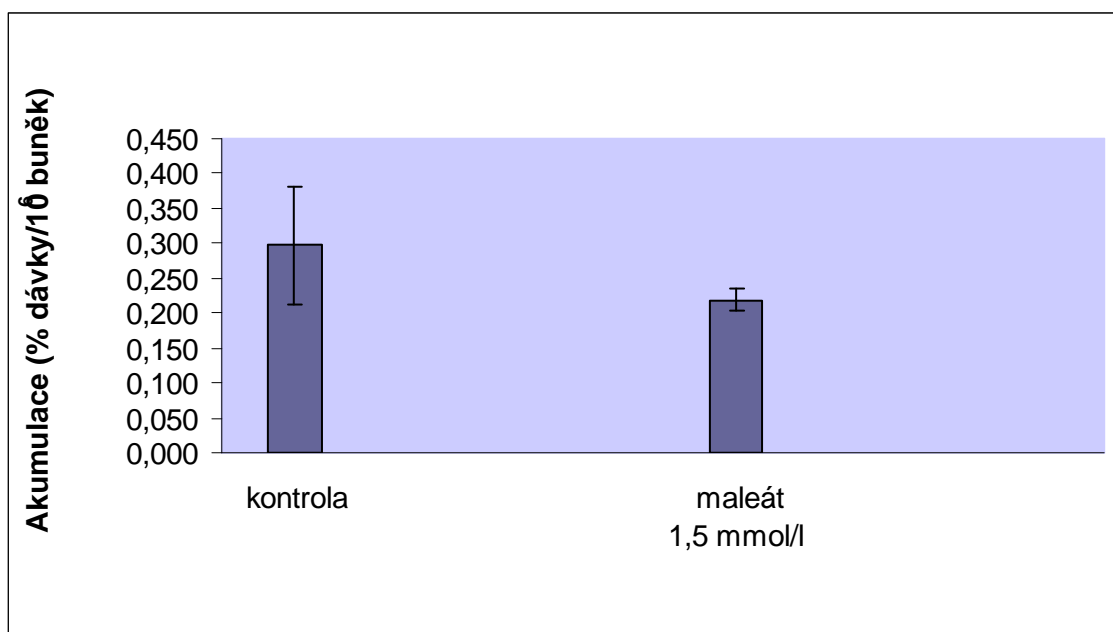
Graf 13. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu

3. 3. 14. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v přítomnosti maleátu

Tabulka 14 zobrazuje výsledky měření akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu (finální koncentrace 6,4 nmol/l) v ledvinných buňkách a změnu této akumulace v přítomnosti maleátu. Hodnoty akumulace jsou vztaženy na procenta radioaktivity v 10^6 buněk vůči vložené dávce radioaktivity. Konečné výsledky jsou průměrné hodnoty akumulace bez (kontrola) a v přítomnosti maleátu.

Tabulka 14. Hodnoty akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti maleátu

| Vzorky | Radioaktivita v buněčných vzorcích (cpm) | Přepočtená radioaktivita (cpm/ 10^6) | 1 % vložené dávky | Akumulace (% dávky) | |
|----------------------|--|---|-------------------|---------------------|--|
| | | | | Hodnota | Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka |
| kontrola | 4 824,7 | 2 412,4 | 10 933,88 | 0,221 | 0,297 ± 0,084 |
| | 5 607,4 | 2 803,7 | 10 933,88 | 0,256 | |
| | 9 059,8 | 4 529,9 | 10 933,88 | 0,414 | |
| maleát 1,5 mmol/l | 4 469,2 | 2 234,6 | 10 933,88 | 0,204 | 0,219 ± 0,016 |
| | 4 595,2 | 2 297,6 | 10 933,88 | 0,210 | |
| | 5 288,7 | 2 644,4 | 10 933,88 | 0,242 | |



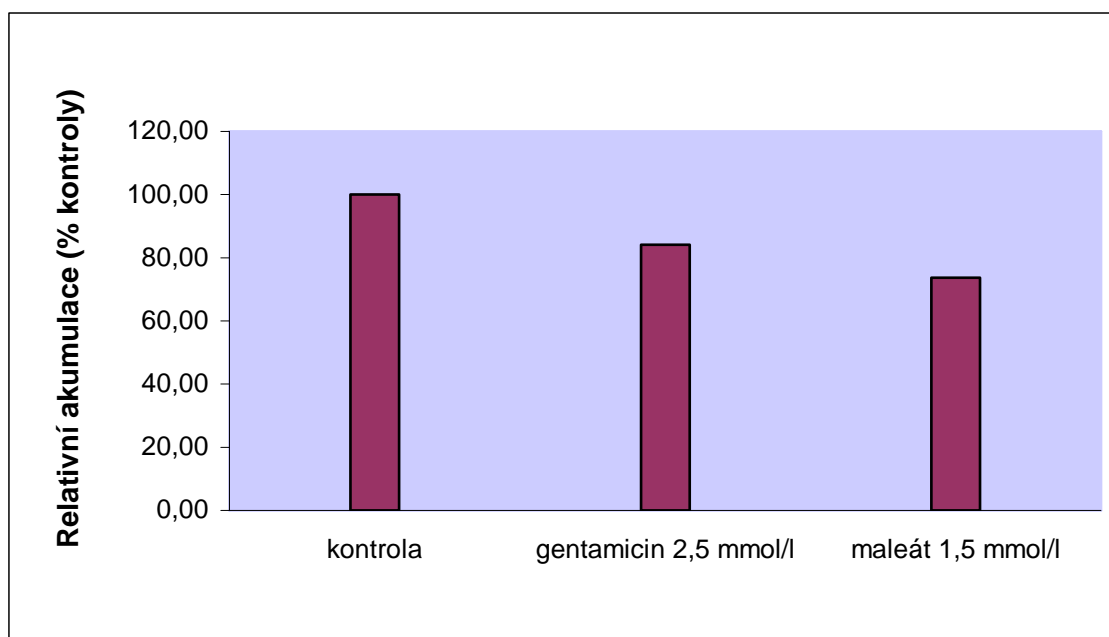
Graf 14. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti maleátu

3. 3. 15. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu

Tabulka 15 porovnává vliv inhibitorů na akumulaci ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu o finální koncentraci 6,4 nmol/l (kontrola) v ledvinných buňkách.

Tabulka 15. Porovnání vlivu inhibitorů na akumulaci ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách

| Vzorky | Relativní akumulace (% kontroly) |
|---|----------------------------------|
| ^{125}I -DOTA-Tyr ³ -oktreotát 6,4 nmol/l | 100,00 |
| + gentamicin 2,5 mmol/l | 84,18 |
| + maleát 1,5 mmol/l | 73,74 |



Graf 15. Porovnání akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách v přítomnosti gentamicinu a maleátu (kontrola = 100 %)

4. DISKUZE

Pro studium transportu vybraných látek byly použity jako experimentální model izolované ledvinné buňky, které byly připraveny pomocí dvoustupňové kolagenázové metody. Ta spočívá v rozvolnění mezibuněčných spojů ve vypreparovaných ledvinách experimentálního zvířete pomocí perfúze živným roztokem s kolagenázou. Po dalších úpravách byly použity k in vitro transportním studiím.

Nejprve jsme však ověřili životnost takto získaných buněk, jejich spočítáním v Bürkerově komůrce pomocí testu s trypanovou modří. Po přidání trypanové modří k buněčné suspenzi dochází k průniku barviva do buněk. Živé buňky s neporušenou membránou mají zachovanou schopnost aktivního efluxu barviva z buňky, takže nejsou obarveny, na rozdíl od buněk s porušenými membránami, kde je tato schopnost porušena a barvivo zůstává v buňkách. Životnost ledvinných buněk se pohybovala v rozmezí od 85 % do 95 %, což odpovídá údajům z jiných studií. Životnost buněk pankreatických se pohybovala okolo 95 %. Dále jsme sledovali životnost buněk v průběhu inkubace, v 30. minutě byla snížena nejvýše o 10 % avšak v 60. minutě byla snížena o více než 20 %, z tohoto důvodu jsme se rozhodli provádět měření nejdéle do 30. minuty.

Výhodou čerstvě izolovaných ledvinných buněk by mělo být zachování přítomnosti a funkce transportérů, což jsme dokázali porovnáním akumulace indikátorů pasivního a aktivního transportu (Boogaard a kol. 1989). Akumulace ^{14}C -sacharózy byla mnohem menší než akumulace ^{14}C -metylglukózy. To potvrzuje předpoklad, že přechod ^{14}C -sacharózy do ledvinných buněk se děje pouze na základě pasivní difúze, zatímco přechod ^{14}C -metylglukózy je zprostředkován aktivním transportem pomocí přenašečů pro glukózu, na rozdíl od glukózy není ovšem ^{14}C -metylglukóza v buňce metabolizována ani přenášena z buňky ven. Buněčné vzorky s oběma látkami byly inkubovány po dobu 1, 2, 5, 10, 20 a 30 minut. Maximální nárůst akumulace jsme zaznamenali v 1. minutě, poté byl nárůst u obou látek pozvolnější, ale u ^{14}C -metylglukózy byl větší i při delších inkubačních časech v porovnání s ^{14}C -sacharózou. Tento snižující se nárůst akumulace je možné vysvětlit zvyšující se koncentrací látky v buňce, která může působit proti dalšímu transportu do buňky. U ^{14}C -metylglukózy v 30. minutě dochází k mírnému poklesu akumulace, což mohlo být způsobeno sníženou životností buněk jako důsledek dlouhé doby inkubace anebo nedostatečným množstvím substrátů v médiu, které je nutné pro udržení transportních funkcí. V případě ^{14}C -sacharózy se kumulace zvyšovala postupně až do 30. minuty inkubace.

K akumulční studii ^{14}C -metylglukózy byly použity také pankreatické buňky AR42J, u kterých došlo v porovnání s ledvinnými buňkami k daleko menší akumulaci ^{14}C -metylglukózy, což by mohlo znamenat zachovalejší transportní funkce u čerstvě izolovaných ledvinných buněk v porovnání s použitou buněčnou linií pankreatických buněk AR42J.

Další experimenty byly zaměřeny na studium transportu dvou radionuklidů značených receptorově specifických analogů somatostatinu ^{111}In -DOTA-NOC a ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v ledvinných buňkách a na ovlivnění jejich akumulace.

Aktivní povahu transportu ^{111}In -DOTA-NOC do ledvinných buněk jsme ověřili pokusem, kdy jsme snížily teplotu inkubace buněk s přidaným radiopeptidem na 4-8 °C a 1-2 °C. Akumulace se snížila při 4-8 °C na 24,2 % v porovnání s akumulací při 37 °C. Při 1-2 °C se dále snížila na 11,1 % oproti hodnotě při 37 °C. To dokazuje, že snížením teploty došlo k inhibici energeticky závislých aktivních procesů v ledvinných buňkách.

Při pokusu, kdy jsme měnili množství buněk ve vzorku o objemu 1 ml při stejné koncentraci peptidu, jsme zjistili, že akumulované množství ^{111}In -DOTA-NOC je přímo úměrné množství buněk ve vzorku. Při $0,5 \cdot 10^6$ buněk se akumulace pohybovala kolem 0,8 % z vložené dávky radioaktivity, při $1 \cdot 10^6$ buněk okolo 1,6 %, při $2 \cdot 10^6$ buněk 2,8 % a při $3 \cdot 10^6$ buněk okolo 3,8 % z vložené dávky radioaktivity. Tímto zjištěním jsme ověřili, že při nestejném množství buněk ve vzorku je možné přepočítat akumulaci radiopeptidu na daný počet buněk ve vzorku, v našem případě na 10^6 buněk.

Studium akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách v závislosti na množství vloženého radiopeptidu ukázalo, že při zvyšující se koncentraci radiopeptidu ve vzorku se akumulace zvyšuje. Při nejmenší koncentraci peptidu 1,3 nmol/l byla zjištěna kumulace 0,2 % z vložené dávky radioaktivity, při koncentraci radiopeptidu 6,4 nmol/l kumulace 1,3 % z vložené dávky radioaktivity a při koncentraci 31,9 nmol/l kumulace 4,2 % z vložené dávky radioaktivity. V dalších pokusech jsme pracovali se střední koncentrací 6,4 nmol/l, kontrolní akumulovaná radioaktivita se pohybovala většinou kolem 1,8-1,95 % z vložené dávky radioaktivity.

Následnými pokusy jsme se pokoušeli ovlivnit, snížit, akumulaci radiopeptidů v ledvinných buňkách. K tomuto účelu jsme použili potenciální inhibitory ledvinné akumulace zkoumaných radiopeptidů.

Mezi tyto potenciální inhibitory patří gentamycin, aminoglykosidové antibiotikum, které je v proximálním tubulu ledvin substrátem megalin/cubilinového transportního systému. Pokud by byly radionuklidy značené peptidy transportovány do

ledvinných buněk právě tímto systémem, přidání gentamicinu by mělo kompetitivně snižovat vstup peptidu do ledvinných buněk. Při našich pokusech gentamicin o finální koncentraci 0,84 nmol/l s ^{111}In -DOTA-NOC akumulaci tohoto peptidu nesnížil, naopak ji nepatrně zvýšil, ale díky relativně velké směrodatné odchylce tohoto měření je pravděpodobné, že pouze nedošlo ke změně.

U pokusu s ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátem, kdy byla ve vzorku 3krát větší koncentrace gentamicinu (2,52 mmol/l), k potvrzení výše uvedené teorie došlo. Akumulace v ledvinných buňkách klesla na 84,2 % ze 100 % akumulace kontrolních vzorků.

K dalším substrátům megalin/cubilinového transportního systému patří albumin. Jeho účinek na akumulaci jsme zkoumali u ^{111}In -DOTA-NOC ve dvou koncentracích. Nižší finální koncentrace albuminu (0,1 mmol/l) způsobila zvýšení akumulace ^{111}In -DOTA-NOC na 147,1 % oproti porovnávacímu vzorku, 5krát vyšší koncentrace albuminu (0,5 mmol/l) snížila akumulaci na 68,3 % oproti porovnávacímu vzorku. Zvýšení akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v prvním případě je těžko vysvětlitelné, u vyšší koncentrace albuminu by mohlo jít o potvrzení účasti megalin/cubilinového systému při transportu do buněk tubulů ledvin, tím, že došlo ke kompetitivní inhibici na tomto transportním systému.

Dále jsme ovlivňovali akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC přidáním lysinu o finální koncentraci 0,1 mol/l. Studie ukazují, že uptake derivátů oktreotidu značených radionuklidy může být inhibován pozitivně nabitými aminokyselinami jako je lysin, které blokují kationická vazebná místa buněk tubulů ledvin. To naznačuje, že elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitým peptidem a negativně nabitým povrchem buněk ledviných tubulů, mohou hrát významnou roli v reabsorpci peptidů z glomerulárního filtrátu do buněk tubulů (Akizawa a kol 2001). To bylo zřejmě při našich pokusech potvrzeno, akumulace lysinu v buňkách byla snížena na téměř polovinu (52 %) oproti kontrolnímu vzorku.

Přidáním maleátu do vzorku se akumulace peptidu v buňkách také snížila, zřejmě na stejném principu jako tomu bylo u lysinu. Akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu se snížila v přítomnosti maleátu o finální koncentraci 1,5 mmol/l na 73,7 % kontrolního vzorku a akumulace ^{111}In -DOTA-NOC se snížena přítomností maleátu o finální koncentraci 22 mmol/l na 49,6 % kontrolního vzorku.

Při porovnání akumulace studovaných peptidů jsme zjistili, že ^{111}In -DOTA-NOC se akumuluje v ledvinných buňkách přibližně z 1,8-1,95 % a ^{125}I -DOTA-Tyr³-

oktreotát je vychytáván v ledvinných méně, akumuluje se kolem 0,3 %. Rozdíly akumulace v ledvinách jsou tedy v rámci značených receptorově specifických analogů poměrně velké. Posoudit vliv struktury těchto látek na jejich vychytávání tubulárními buňkami ledvin je obtížné, protože se liší jak strukturou peptidového řetězce, tak radionuklidem a jeho navázáním. Strukturou peptidového řetězce se liší na dvou místech, v poloze 3, kde $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ má 1-naftyl a $^{125}\text{I-DOTA-Tyr}^3\text{-oktreotát}$ tyrozin a v poloze 8, kde $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ má alkoholovou skupinu a $^{125}\text{I-DOTA-Tyr}^3\text{-oktreotát}$ skupinu karboxylovou. Co se týká navázání radionuklidu, indium je chelatováno na DOTA skupinu, zatímco jód je vázán na tyrozin peptidového řetězce. Pro porovnání přesného vlivu jednotlivých strukturních rozdílů by byla zapotřebí změna pouze jednoho z těchto strukturních parametrů.

5. ZÁVĚR

Test životnosti s pomocí trypanové modři potvrdil vysokou životnost izolovaných ledvinných buněk, která se pohybuje na úrovni uváděné v odborné literatuře.

Pomocí indikátorů aktivního a pasivního transportu jsme ověřili funkčnost transportních systémů izolovaných ledvinných buněk. Akumulační studie ^{14}C -metylglukózy a ^{14}C -sacharózy potvrdily aktivní transport ^{14}C -metylglukózy do ledvinných buněk pomocí přenašečů pro glukózu a pasivní transport daleko méně akumulované ^{14}C -sacharózy, která se akumuluje na základě pasivní difúze.

Při pokusech s radioaktivně značeným peptidem ^{111}In -DOTA-NOC byl potvrzen jejich aktivní transport do izolovaných ledvinných buněk, neboť při inhibici energeticky závislých procesů nízkými teplotami byl jejich uptake významně nižší.

Inhibiční působení albuminu na akumulaci ^{111}In -DOTA-NOC a gentamicinu na akumulaci ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu by mohlo svědčit o účasti megalin/cubilinového transportního systému na reabsorpci těchto látek v tubulech ledvinných buněk, protože albumin je uváděn mezi substráty tohoto systému, může tedy kompetovat při transportu s jinými látkami, a gentamicin patří mezi známé inhibitory tohoto systému.

Lysin a maleát také inhibovali akumulaci zkoumaných peptidů v ledvinných buňkách a to nejspíš tím, že došlo k jejich interakci s kationickými místy buněk tubulů ledvin a tím i k bloku navázání zkoumaného peptidu na tato místa.

Míra akumulace ^{111}In -DOTA-NOC byla šestkrát vyšší než akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu. Závislost míry ledvinné akumulace na struktuře radionuklidem značeného peptidu byla patrná, nemohla být však přesně definována, neboť se zkoumané látky lišily ve více než jednom strukturním rysu.

6. ABSTRAKT

Deriváty somatostatinu značené vhodnými radionuklidy jsou používány pro diagnózu a terapii některých, především neuroendokrinních, nádorových onemocnění, u kterých se vyskytují receptory specificky vázající tyto značené deriváty somatostatinu. Jejich terapeutické použití je však limitováno nefrotoxickými nežádoucími účinky, které vznikají v důsledku jejich akumulace v buňkách proximálních tubulů ledvin po reabsorpci z glomerulárního filtrátu.

Cílem této práce bylo přispět k poznání ledvinných transportních mechanismů, které jsou odpovědné za absorpci radionuklidy značených derivátů somatostatinu v buňkách tubulů ledvin. Na základě těchto poznání pak nalézt látky, které by mohly ledvinnou akumulaci snížit a tím zabránit i poškození ledvinné tkáně.

Při praktickém řešení byly používány izolované ledvinné buňky, získané z ledvin potkanů kolagenázovou metodou. Po ověření zachování přítomnosti a funkce transportních mechanismů pomocí známých indikátorů aktivního a pasivního transportu, byla studována akumulace dvou radionuklidy značených derivátů somatostatinu - ^{111}In -DOTA-NOC a ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu. Snížením teploty inkubační směsi, a tím inhibicí energeticky závislých aktivních procesů, byl ověřen jejich aktivní transport do ledvinných buněk. Dále byla zkoumána změna akumulace těchto peptidů po přidání látek, které by, na základě ovlivnění různých transportních mechanismů, mohly tuto akumulaci ovlivnit.

Z výsledků práce je patrné, že určitého ovlivnění bylo dosaženo. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC v ledvinných buňkách byla snížena v přítomnosti albuminu na 68 % a akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu v přítomnosti gentamicinu na 84 %, obě tyto látky jsou substráty megalin/cubilinového transportního systému vyskytujícího se v proximálním tubulu ledvin. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC byla dále snížena lysinem na 52 % a maleátem na 50 %, akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu byla snížena maleátem na 74 %, jedná se pravděpodobně o interakci s kationickými místy buněk tubulů ledvin a inhibici navázání zkoumaného peptidu na tato místa. Akumulace ^{111}In -DOTA-NOC byla šestkrát větší než akumulace ^{125}I -DOTA-Tyr³-oktreotátu.

Pokud by byly naše výsledky správné, znamenalo by to, že zkoumané peptidy jsou do buněk transportovány výše uvedenými transportními systémy. Dále byla demonstrována různá míra akumulace v ledvinách u různých radiopeptidů.

7. ABSTRACT

Somatostatin analogues labelled with radionuclides are used for diagnosis and therapy of some tumours, mainly neuroendocrine ones, in which receptors specifically binding these radiolabelled analogues of somatostatin are occurred. However, the therapeutic usage of these radiolabelled analogues of somatostatin is limited due to nephrotoxic undesirable effects originated because of their accumulation in the renal proximal tubules after reabsorption from the glomerular filtrate.

The aim of the study was to contribute to knowledge in the renal transport systems responsible for reabsorption of radiolabelled somatostatin analogues in the renal tubular cells and then on the base of such data to find some substances which could reduce the renal accumulation and prevent the damage of the renal tissue.

In experiments, the isolated renal cells obtained from rat kidney by collagenase method were used. After the verification of presence and function of transport mechanism by known indicators of active and passive transport, the accumulation of two somatostatin analogues labelled with radionuclides - ^{111}In -DOTA-NOC and ^{125}I -DOTA-Tyr³-octreotate were studied on these renal cells. The active transport of these radiopeptides was verified by reduce of incubation temperature. Then changes of accumulation of these peptides were investigated after adding substances affecting different membrane transport mechanisms.

From results of the work some influence of accumulation is unmistakable. The accumulation of ^{111}In -DOTA-NOC was reduced by albumin on 68 % and the accumulation of ^{125}I -DOTA-Tyr³-octreotate was reduced by gentamicin on 84 %. Both of these substances are substrates of megalin/cubilin transport system. The accumulation of ^{111}In -DOTA-NOC was also reduced by lysine on 52 % and by maleat on 50 %, the accumulation of ^{125}I -DOTA-Tyr³-octreotate was reduced by maleat on 74 %, it probably happened because of the interaction with cationic binding sites on renal tubular cells and the inhibition of binding studied peptide on these sites. The accumulation of ^{111}In -DOTA-NOC was six-times higher than the accumulation ^{125}I -DOTA-Tyr³-octreotate.

It means if our results were right, the studied peptides were transported to the cells by all of these transport systems. The different rate of accumulation in kidney was demonstrated in different radiopeptides.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akizawa H., Arano Y., Mifune M., Iwado A., Saito Y., Mukai T., Uehara T., Ono M., Fujioka Y., Ogawa K., Kiso Y., Saji H.: Effect of molecular charges on renal uptake of ¹¹¹In-DPTA-conjugated peptides. *Nucl Med and Biology* 2001; 28: 761-768.

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. *Tox Applied Pharmacol* 1989; 101: 135-143

Broch H., Imerslund O., Monn E., Hovig T., Seip M.: Imerslund-Grasbeck anemia. A long-term follow-up study. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73: 248-253.

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

Christensen E. I., Birn H., Verroust P., Moestrup S. K.: Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int Rev Cytol* 1998; 180: 237-284.

Christensen E. I., Gliemann J., Moestrup S. K.: Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1481-1490.

Koepsell H., Gorboulev V., Arndt P.: Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membr Biol* 1999;167:103-117.

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

Lebtahi R., Le Cloirec J., Houzard C. a kol.: Detection of neuroendocrine tumors: ^{99m}Tc-P829 scintigraphy compared with ¹¹¹In-pentetreotide scintigraphy. *J Nucl Med* 2002; 43:889-895.

Lehste J. R., Melsen F., Wellner M., a kol.: Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J.* 2003;17:247-249

Moestrup S. K., Birn H., Fischer P. B., Petersen C. M., Verroust P. J., Sim R. B., Christensen E. I., Nexø E.: Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B₁₂ complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B₁₂ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8612-8617.

Reubi J. C., Waser B., Schaer J., 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.

Rubio-Aliaga I., Hannelore D.: Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 9: 434-440.

Sahali D., Mulliez N., Chatelet F., Laurent Winter C., Citadelle D., Sabourin J. C., Roux C., Ronco P., Verroust P.: Comparative immunochemistry and ontogeny of two closely related coated pit proteins. The 280-kDa target of teratogenic antibodies and the 330-kDa target of nephritogenic antibodies. *Am J Pathol* 1993; 142: 1654-1667.

Seetharam B., Christensen E. I., Moestrup S. K., Hammond T. G., Verroust P. J.: Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest* 1997; 99: 2317-2322.

Verroust P., Christensen E. I.: Megalin and cubilin-the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1867-1871.

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

Willnow T. E., Hilpert J., Armstrong S. A., Rohlmann A., Hammer R. E., Burns D. K., and Herz J.: Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8460-8464.