

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

Katedra farmakologie a toxikologie



**MECHANISMY MEMBRÁNOVÉHO TRANSPORTU**  
**RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH RECEPTOROVĚ SPECIFICKÝCH**  
**PEPTIDŮ V LEDVINÁCH**  
**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2015

PharmDr. Marie Volková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Františka Trejtnara, CSc. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 5. 11. 2015

.....  
PharmDr. Marie Volková

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem spolupracovníkům z Katedry farmakologie a toxikologie, kteří mě po celou dobu studia ochotně pomáhali, dělili se se svými zkušenostmi a vytvářeli příjemné pracovní prostředí. Zvláště bych chtěla poděkovat pracovní skupině z Oddělení radiofarmak, Jarmile Hoderové a Evě Teichmanové, které prováděly experimenty s potkany. Veliký dík patří kolegyni Janě Mandíkové, která mě učila praktickým laboratorním dovednostem a byla vždy ochotná pomoci. Stejně tak děkuji Pavlu Bártovi za pomoc s analýzou čistoty metabolitů. Děkuji za spolupráci doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc., která mi cennými radami pomáhala při značení peptidů.

Největší díky však patří školiteli doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc. za vedení doktorského studia, trpělivost a hodnotné konzultace.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK No. 376411/FaF/C-LEK) a MŠMT ČR (SVV 260 185).

Práce je věnována mé matce, která mě ve studiu celý život podporovala a jehož úspěšné absolvování patřilo k jejím životním cílům.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: PharmDr. Marie Volková  
Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.  
Název disertační práce: Mechanismy membránového transportu radioaktivně značených receptorově specifických peptidů v ledvinách

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy jsou látky využívané pro diagnostické zobrazování, ale i radioterapii některých nádorů, převážně neuroendokrinního původu. Přes poměrně dynamický vývoj v této skupině radiofarmak v posledním období existuje stále nedostatek relevantních informací o mechanismech determinujících jejich farmakokinetiku, včetně údajů o interakcích radiopeptidů s membránovými transportními systémy. Tyto transportéry mohou být zodpovědné za nežádoucí ledvinnou kumulaci a následné radiotoxické poškození ledvin, které je významným limitem použití radiopeptidů v nukleární medicíně.

Cílem této práce bylo posoudit roli několika transportních mechanismů, které se mohou potenciálně podílet na transmembránovém transportu radiopeptidů v ledvinné tkáni. Studie byla zaměřena na zkoumání úlohy aktivní endocytózy megalinovým systémem, fluidní endocytózy a významných lidských ledvinných SLC transportérů hOAT1 a hOCT2. Současně byl studován potenciální transport vybraných radiometabolitů těchto radiopeptidů uvedenými transportními mechanismy v kontextu s jejich biodistribucí a ledvinnou eliminací *in vivo*. Součástí projektu bylo i pilotní ověření případné interakce radiopeptidů s významnými efluxními transportéry P-glykoproteinem a BCRP.

Ve studii byly zkoumány *in vitro* transportní mechanismy šesti radiopeptidů ze skupiny analogů somatostatinu, gastrinu, bombesinu a dvou modelových metabolitů radiopeptidů -  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, který je degradačním produktem  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-minigastrinu 11, a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe, který je potenciálním metabolitem somatostatinových derivátů jako je např.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC. S využitím buněčných linií byly pro zkoumání transportních mechanismů provedeny inhibiční studie s ligandy megalinu, inhibitorem fluidní endocytózy rottlerinem, a akumulací studie za nízké teploty. Pro

stanovení role SLC transportérů byly využity akumulační studie s přechodně transfekovanými buňkami se zvýšenou expresí hOAT1 nebo hOCT2. Studie *in vivo* porovnávaly biodistribuční a eliminační parametry dvou parentních radiopeptidů a jejich potenciálních radiometabolitů u potkanů po i.v. aplikaci.

Ligandy megalinového endocytárního receptoru snižovaly významně akumulaci všech studovaných radiopeptidů. Pouze s jedinou výjimkou vedla inkubace s rottlerinem ke koncentračně závislé inhibici buněčné akumulace u všech studovaných intaktních radiopeptidů. Akumulační studie neprokázaly vliv hOCT2 nebo hOAT1 na transport intaktních radiopeptidů. Na rozdíl od metabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, který též nevykazoval žádnou interakci s SLC transportéry, v případě  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe byl prokázán *in vitro* uptake pomocí transportéru hOCT2.  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin slabě interagoval s BCRP transportérem, peptidy konjugované s chelátorem DOTA však žádnou interakci s efluxními transportéry nevykazovaly. Farmakokinetika obou studovaných radiometabolitů u potkanů byla charakterizována poměrně rychlou eliminací radioaktivity z krve a organismu s převažující ledvinnou exkrecí. Uptake radiometabolitů v na receptory pozitivních tkáních byl očekávatelně nižší než u intaktních radiopeptidů. Dlouhodobá retence menšího radiometabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe byla nižší než v případě tripeptidového metabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr. Ledvinná kumulace radiometabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr byla srovnatelná s parentním peptidem, kumulace  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe byla ve srovnání s intaktním peptidem  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC nižší.

Výsledky práce dokazují rozhodující úlohu aktivních transportních mechanismů při akumulaci všech testovaných intaktních radiopeptidů ve zkoumaných buňkách. Kromě aktivní endocytózy zprostředkované megalinovým systémem se na buněčném uptake může podílet i fluidní endocytóza. Zkoumané SLC transportéry významnou roli v tomto procesu pravděpodobně nemají. Získaná experimentální data přinášejí první údaje o systémové dispozici radiometabolitů receptorově specifických radiopeptidů v organismu a ukazují, že se na ledvinném transportu jejich pokročilých degradačních produktů mohou podílet i SLC transportéry. Naproti tomu výsledky provedených farmakokinetických studií naznačují, že nežádoucí ledvinná akumulace a retence extrarenálních metabolitů může být ve srovnání s parentními radiopeptidy nižší. Získaná experimentální data naznačují negativní korelaci mezi stupněm degradace peptidového řetězce parentního peptidu a ledvinnou retencí radiometabolitu.

## Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: PharmDr. Marie Volková  
Supervisor: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.  
Title of doctoral thesis: Mechanisms of membrane transport of radiolabeled receptor-specific peptides in the kidney

Radiolabelled receptor-specific peptides are a useful tool for radiodiagnostic and radiotherapy of some neuroendocrine tumours. Despite many recent developments in this radiopharmaceutical group, there is still a lack of relevant information about the mechanisms determining the pharmacokinetics and describing interactions with membrane transport systems. These transporters may be responsible for undesirable renal accumulation and subsequent radiotoxic kidney damage, which significantly limited the use of radiopeptides in nuclear medicine.

The aim of our work was to assess the role of several transport mechanisms that can be potentially involved in the transmembrane transport of radiopeptides in the renal tissue. We mainly focused on studying the role of megalin mediated active endocytosis, fluid phase endocytosis and important human renal SLC transporters - hOAT1 and hOCT2. Simultaneously, the potential transport of selected radiometabolites of these peptides was studied *in vitro* and their biodistribution and renal excretion were studied *in vivo*. The project also included a pilot testing of potential interactions of radiopeptides with the important efflux transporters P-glycoprotein and BCRP.

The study analysed *in vitro* transport mechanisms of six radiopeptides from the group of somatostatin, gastrin, and bombesin analogs and two model radiopeptide metabolites -  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, which is degradation product of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-minigastrin 11, and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe, which is the potential metabolite of somatostatin analogs such as  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC. Using cell lines, an inhibition study was carried out to reveal the transport mechanisms with megalin ligands, rottlerin as fluid phase inhibitor and low incubation temperature. The role of SLC transporters was tested by accumulation studies with transiently transfected cells overexpressing hOAT1 or hOCT2. *In vivo* study compared biodistributional

and elimination characteristics of two parent radiopeptides and their potential radiometabolites in rats after i.v. administration.

Ligands of endocytic receptor megalin reduced significantly the accumulation of all studied radiopeptides. Incubation with rottlerin caused concentration-dependent inhibition of cell accumulation of all studied peptides with only one exception.

Accumulation studies demonstrated no contribution of hOCT2 or hOAT1 to intact radiopeptides transport. Unlike metabolite  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, which also showed no interaction with SLC transporters, in the case of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe uptake by hOCT2 was demonstrated *in vitro*.  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin weakly interacted with the BCRP transporter, peptides chelated DOTA showed no interaction with efflux transporters. The pharmacokinetics of both studied radiometabolites in rats has been characterized by relatively rapid elimination of radioactivity from the blood and body with predominant renal excretion. Uptake of the radiometabolites in receptor-positive tissues was expectable lower than that of the intact radiopeptides. Long-term retention of smaller radiometabolite  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe was lower than in the case of tripeptidic metabolite  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr. Renal accumulation of radiometabolite  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr was comparable to parent peptide, accumulation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe was significantly lower compared to intact peptide  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC.

The results have proved the decisive role of active transport mechanisms in the accumulation of all tested intact radiopeptides in the used cell lines. Fluid endocytosis may also participate in cellular uptake besides active endocytosis mediated by megalin system. Tested SLC transporters have probably no significant role in this process. The experimental data we have obtained the first insight into the systemic disposition of the radiometabolites of receptor-specific radiopeptides in the body and show that the SLC transporters may participate in renal transport of their advanced degradation products. In contrast, the results of pharmacokinetic studies we have performed suggest that the undesirable renal accumulation and retention of extrarenal metabolites could be lower compared to parent radiopeptides. The experimental data may suggest a negative correlation between the degree of peptide chain degradation and renal retention of radiometabolites.

# Obsah

Seznam zkratk.....	1
1. Úvod.....	3
2. Teoretická část.....	6
2.1. Význam receptorově specifických radiopeptidů v nukleární medicíně.....	6
2.1.1. Výhody použití receptorově specifických radiopeptidů.....	9
2.1.2. Limity aplikace receptorově specifických radiopeptidů .....	10
2.1.3. Terapie pomocí radioaktivně značených peptidů zaměřených na specifické receptory .....	11
2.2. Vývojové skupiny radiopeptidů.....	12
2.2.1. Analoga somatostatinu .....	12
2.2.2. Analoga cholecystokininu a gastrinu .....	16
2.2.3. Analoga bombesinu.....	18
2.3. Radioaktivní značení peptidů .....	20
2.3.1. Typy dostupných radionuklidů.....	20
2.3.2. Vazba radionuklidů pomocí bifunkčních chelatačních činidel.....	24
2.4. Farmakokinetické aspekty využití radiopeptidů.....	27
2.4.1. Biodistribuce a eliminace radiopeptidů.....	27
2.4.2. Ledvinná kumulace radiopeptidů a související rizika .....	30
2.5. Transportní mechanismy potenciálně odpovědné za transport radiopeptidů v ledvinách .....	33
2.5.1. Aktivní endocytóza prostřednictvím megalinu .....	33
2.5.2. Fluidní endocytóza .....	35
2.5.3. SLC a ABC transportéry proximálního tubulu ledvin.....	36
3. Cíle práce.....	49
4. Experimentální část.....	50
4.1. Materiál.....	50
4.1.1. Použité přístroje a vybavení .....	50



4.1.2.	Použité chemikálie .....	50
4.2.	Buněčné linie .....	51
4.3.	Použité metody .....	52
4.3.1.	Transfekce .....	52
4.3.2.	Western blotting .....	53
4.3.3.	Značení peptidů <sup>177</sup> Lu.....	54
4.3.4.	Transportní studie <i>in vitro</i> .....	55
4.3.5.	Farmakokinetické studie <i>in vivo</i> .....	58
4.4.	Statistická analýza .....	59
5.	Výsledky.....	60
5.1.	Validace buněčných modelů.....	60
5.1.1.	Ověření účinnosti tranzientní transfekce hOAT1 a hOCT2.....	60
5.1.2.	Ověření exprese megalinu v buněčných modelech .....	62
5.2.	Příprava a kontrola radioaktivně značených peptidů.....	63
5.3.	Transmembránový transport radiopeptidů <i>in vitro</i> .....	65
5.3.1.	Posouzení podílu aktivního a pasivního transportu na buněčné kumulaci radiopeptidů.....	65
5.3.2.	Transport radiopeptidů SLC transportéry.....	66
5.4.	Farmakokinetické studie <i>in vivo</i> .....	78
5.4.1.	Biodistribuce radiopeptidů a radiometabolitů u potkanů .....	78
5.4.2.	Eliminace radiopeptidů a radiometabolitů u potkanů.....	81
6.	Diskuze.....	82
7.	Závěr.....	96
8.	Zdroje literatury.....	98
9.	Seznam publikovaných vědeckých prací .....	111
9.1	Práce související s disertační prací .....	111
9.2	Seznam publikovaných vědeckých prací.....	111

10	Výstupy na odborných konferencích.....	113
11	Přílohy .....	115

## Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
Ala	alanin
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
BCA	kyselina bicinchonová (bicinchonic acid)
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CCK	cholecystokinin
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSA	dimerkaptojantarová kyselina (dimercaptosuccinic acid)
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTA	1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctová kyselina (tetraazacyclododecane tetraacetic acid)
<i>D</i> -Glu	kyselina glutamová
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium (Eagle's minimal essential medium)
GIT	gastrointestinální trakt
GMO	geneticky modifikovaný organismus
GRP	gastrin uvolňující peptid (gastrin-releasing peptide)
HEK293	lidské ledvinné embryonální buňky (human embryonic kidney 293 cells)
HeLa	lidské epiteliální buňky z nádoru děložního hrdla (human epithelial carcinoma cell line)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HK-2	standardní linie lidských ledvinných buněk (human kidney cells)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPMP	3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace potřebná k inhibici procesu o 50 %
ITLC	instantní tenkovrstvá chromatografie (instant-thin layer chromatography-silica gel)
LLC-PK1	prasečí buňky proximálního tubulu ledvin (pig kidney proximal tubule cell line)
MAG3	merkptoacetyltriglycin
MATE	multidrug and toxic compound extrusion transporter
MDCKII	Madin-Darbyho psí ledvinné buňky (Madin Darby canine kidney cells II)
MDR	multidrug resistance transporter
MDR1	gen kódující P-glykoprotein (multidrug resistance 1 gene)

MPP <sup>+</sup>	1-methyl-4-fenylpyridinium
MRPs	multidrug resistance-associated proteins
NET	neuroendokrinní tumory
NOC	1-Nal <sup>3</sup> -oktreotid (1-Nal <sup>3</sup> -octreotide)
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
OATPs	polypeptidy transportující organické anionty (organic anion-transporting polypeptides)
OATs	transportéry pro organické anionty (organic anion transporters)
OCTs	transportéry pro organické kationty (organic cation transporters)
PAH	kyselina <i>p</i> -aminohipurová ( <i>p</i> -aminohippuric acid)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCTA	tetraazacyklopentadekatrientrioctová kyselina (tetra-azabicyclopentadecatrienetricetic acid)
PEPT	peptidový transportér (peptide transporter)
PET	pozitronová emisní tomografie
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid
P-gp	P-glykoprotein
PRRT	receptorově zprostředkovaná terapie (peptide receptor related therapy)
RAP	s receptorem spojený protein (receptor associated protein)
RFU	relativní fluorescenční jednotka
RIPA	radioimunoprecipitační pufr
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie (single-photon emission computed tomography)
SST	somatostatin
SSTR	somatostatinový receptor
TATE	[Tyr <sup>3</sup> ]oktreotát
TETA	1,4,8,11-tetraazacyklododekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
TOC	[Tyr <sup>3</sup> ]-oktreotid
Tyr	tyrosin

## 1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou narůstajícím celosvětovým zdravotnickým problémem. Výskyt rakoviny a bohužel i počet úmrtí na tuto diagnózu meziročně stále narůstá ([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)). Příčiny vzniku těchto malignit jsou stále nejasné a proto jedinou možností, jak účinně proti rozvoji rakoviny zakročit, je včasná diagnóza a účinná terapie. Hledání diagnostických prostředků pro zobrazování a terapeutických postupů je v této oblasti tedy stále výzvou pro další výzkum a vývoj.

Zjištění, že některé typy nádorů na svém povrchu ve velké míře exprimují receptory pro peptidové hormony je datováno do 80. let minulého století. Tento objev poskytl molekulární základ pro výzkum a využití receptorově specifických peptidů. Ty se specificky vážou na daný typ receptoru a jsou tak schopny ovlivňovat určité tkáně a funkce organismu. Vysoká míra exprese somatostatinových receptorů různými typy nádorových buněk dala molekulární základ úspěšnému používání radioaktivně značených somatostatinových analogů pro scintigrafické zobrazení nádorů (Ambosini et al. 2011). Obdobně došlo k vývoji v dalších skupinách receptorově specifických peptidů – analogů gastrinu/cholecystokininu, bombesinu, substance P, vazoaktivního intestinálního peptidu či neuropeptidu (Fani et al. 2012). Díky vysoce selektivnímu targetingu nádorových buněk dochází k vyšší kumulaci cytotoxického materiálu uvnitř nádoru s menším rizikem poškození okolní tkáně. Tento koncept je podkladem tzv. cílené receptorově zprostředkované terapie. Tato forma terapie je vhodná především pro maligní, roztroušené nebo příliš malé nádory, které jsou obtížně odstranitelné klasickými chirurgickými postupy.

Prvním a dodnes nejúspěšnějším registrovaným peptidem používaným pro zobrazování nádorů je somatostatinový analog  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid ( $^{111}\text{In}$ -Octreoscan<sup>®</sup>). Tento radiopeptid se váže na somatostatinové receptory, které jsou ve zvýšené míře exprimovány některými neuroendokrinními nádory (Ambrosini et al. 2011). Výzkum se v minulosti zaměřil i na jeho potenciální radioterapeutické použití. Kromě somatostatinových receptorů jsou pro radiodiagnostiku a radioterapii klinicky využitelné především gastrin/cholecystokininové receptory a receptory pro gastrin uvolňující peptidy (Fani et al. 2012).

Přes velké pokroky ve vývoji radiopeptidových přípravků založených na targetingu těchto typů receptorů existuje však řada faktorů, které zatím brání širšímu použití těchto látek v nukleární medicíně. Jednou z překážek širšího použití peptidů byl jejich krátký biologický poločas způsobený rychlou metabolickou degradací. Tento problém se u syntetických analogů

podarilo snížit modifikací jejich aminokyselinové sekvence. Přesto je u některých skupin peptidů, jako jsou např. gastrinové deriváty, problémem příliš rychlý metabolismus (Behr a Behe 2002). Zásadní komplikací používání radiopeptidů je radiotoxické poškození zdravé necílové tkáně. Peptidy jsou radioaktivně značeny nuklidem, který je vhodný pro diagnostiku nebo terapii, případně pro obojí. Pro diagnostické účely se používají nuklidy emitující vysokoenergetické fotony ( $\gamma$ -zářiče) či pozitrony ( $\beta^+$  zářiče) umožňující neinvazivní diagnostiku s malým vlivem na necílovou tkáň. K radionuklidové terapii jsou ovšem peptidy značeny radionuklidy emitujícími biologicky účinnější  $\alpha$  nebo  $\beta$  záření, Augerovy či konverzní elektrony, jejichž využívanou vlastností je toxické působení na nádorové buňky. Vedle dalších radionuklidů, potenciálně využitelných pro terapii, má v současnosti velmi důležité postavení  $\beta$  zářič  $^{177}\text{Lu}$ .

Přes cílené působení receptorově specifických peptidů značených terapeutickými radionuklidy může docházet k různému stupni poškození necílové tkáně, speciálně v místech nežádoucí kumulace, která může být výrazná např. ve vylučovacích orgánech. Agresivní chování emitovaného terapeutického záření pak vede k rozvoji nežádoucích účinků. Výsledky neklinických i klinických studií ukázaly, že limitem pro dávkování radiopetidů jsou zpravidla kostní dřeň a ledviny (Fani et al. 2012). Ledviny jsou hlavním exkretčním místem těchto polárních látek. Ačkoliv je většina radioaktivity močí rychle vyloučena, určitá část radioaktivity se v ledvinách kumuluje a retenuje, což může vyústit v nefrotoxický účinek (Cwikla et al. 2010). Jak již bylo zmíněno, peptidy podléhají větší či menší proteolýze v plazmě, a tak je otázkou, zda se v buňkách proximálních kanálků zachytává celý intaktní peptid, či se zde mohou hromadit i metabolity vyskytující se v systémovém řečišti a ultrafiltrátu. Experimentální data o transportních mechanismech zprostředkovávajících ledvinou kumulaci radiopeptidů jsou však pouze velmi omezená, u transportních mechanismů radiometabolitů zcela chybějí.

Základním cílem této práce bylo posoudit účast vybraných transportních mechanismů v ledvinné kumulaci radioaktivně značených receptorově specifických peptidů a jejich metabolitů. Experimentální práce zahrnovala dva přístupy zkoumání - *in vivo* a *in vitro*. Zatímco farmakokinetické chování parentních radiopeptidů *in vivo* bylo již rozsáhle studováno v minulosti, systémové chování radiometabolitů zatím zkoumáno nebylo. Z tohoto důvodu byly cíle práce zaměřeny na *in vivo* chování vybraných radiometabolitů. *In vitro* experimenty posuzovaly možný transport radiopeptidů a radiometabolitů prostřednictvím studovaných transportních mechanismů. Využití buněčných *in vitro* modelů umožnilo

detailní posouzení účasti jednotlivých membránových transportních mechanismů. Pro posouzení meziskupinových a mezilátkových rozdílů v transportních mechanismech byla do této studie zahrnuta široká paleta peptidů ze skupiny derivátů somatostinu, gastrinu a bombesinu.

Dle dosavadních poznatků (de Jong et al. 2005a) se zdá, že významným transportním mechanismem zajišťujícím uptake radiopeptidů v ledvinách je megalinový receptor, který zprostředkovává aktivní endocytózu proteinů a peptidů do tubulárních buněk. Možná účast tohoto mechanismu na transportu štěpů radiopeptidů však není vyjasněna. Další cestou, kterou by radiopeptidy a jejich metabolity mohly přestupovat do ledvinných buněk je fluidní endocytóza. Jedná se o mechanismus zprostředkovávající buněčný příjem tekutin. Protože při fyziologickém pH vykazují molekuly radiopeptidů zpravidla určitý náboj, nelze vyloučit i jejich interakci s transportéry pro organické anionty nebo kationty. Obě skupiny transportérů jsou v ledvinách výrazně exprimovány a mohly by se tedy při ledvinné kumulaci radiopeptidů uplatnit. Tato možnost připadá v úvahu zvláště u metabolitů radiopeptidů s menší molekulovou hmotností. Pro testování transportu látek těmito transportéry je vhodné použití transfekovaných buněčných linií s vysokou expresí zájmových transportérů. Pro dokreslení cest transportu radiopeptidů a radiometabolitů byl posouzen i transport studovaných látek dvěma efluxními transportéry, které jsou též v ledvinách významně exprimovány a je prokázán jejich podíl na transportu řady xenobiotik v ledvinách. Účast na transportu v ledvinách by mohla v případě rozdílů mezi parentními peptidy a jejich metabolity upřesnit podíl těchto agens na kumulaci radioaktivity v ledvinách. O interakcích receptorově specifických radiopeptidů s těmito transportéry nejsou dosud žádné relevantní informace.

Cesta k objasnění přesného mechanismu ledvinného zachytávání radioaktivně značených receptorově specifických peptidů a jejich metabolitů bude jistě předmětem zkoumání i v dalších letech, neboť znalosti v této oblasti by mohly přispět k formulaci strategií ke snížení nefrotoxicity radiopeptidů. Limitování či eliminace tohoto nežádoucího účinku by umožnilo podávání vyšších dávek radioaktivity, a tím zvýšení účinnosti radioterapie. Doufáme, že tato disertační práce a publikované výsledky mohou určitou měrou přispět k osvětlení některých důležitých rysů farmakokinetického chování radiopeptidů a jejich metabolitů a tím k optimalizaci receptorově zprostředkované radioterapie pomocí radiopeptidů.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Význam receptorově specifických radiopeptidů v nukleární medicíně

Neuroendokrinní tumory (NET) zahrnují skupinu plicních a gastroenteropankreatických nádorů, které představují pouze 0,5 % všech malignit. Jejich výskyt je přibližně 2,5-5 případů/100 000 lidí za rok, přičemž vyšší incidence je u žen (Oberg a Castellano 2011). Výskyt těchto nádorů se ale v poslední době zvyšuje, což může být zapříčiněno i lepšími diagnostickými metodami. Společným znakem je pomalý růst, díky kterému jsou diagnostikovány až v relativně pozdním stádiu, kdy je již u většiny pacientů přítomno metastatické rozšíření (Yao et al. 2008). Vzhledem k tomu, že ozařování či chemoterapie nejsou většinou schopny léčby vzdálených metastáz, mají tyto terapeutické možnosti omezenou hodnotu.

NET představují heterogenní skupinu nádorů, jejichž společnou charakteristikou je endokrinní diferenciací nádorových buněk. Ty jsou regulovány hormony působícími přes specifické receptory v jejich membránách. Nejčastěji se jedná o receptory spřažené s G-proteinem (Reubi 2003). Nádory vzniklé bujením neuroendokrinních tkání na svém povrchu obvykle exprimují tyto receptory ve zvýšené míře. Tento objev je datován do 80. let minulého století a poskytl molekulární základ pro výzkum a využití receptorově specifických peptidů. Tyto látky se vyznačují specifickou vazbou na určitý typ receptoru a jsou tak schopny cíleně ovlivňovat určité části těla. Výhodou peptidů je vysoká clearance, dobrý průnik do tkání a nízká antigenita. V současné době se používají či jsou testovány především radioaktivně značené receptorově specifické peptidy ze skupiny analogů somatostatinu, cholecystokininu, gastrinu, bombesinu, substance P, vazoaktivního intestinálního peptidu a glukagon-like peptidu. Příklady nádorů a typy receptorů, jejichž exprese je zajímavá z hlediska targetingu s využitím radiopeptidů, jsou shrnuty v tab. 1.



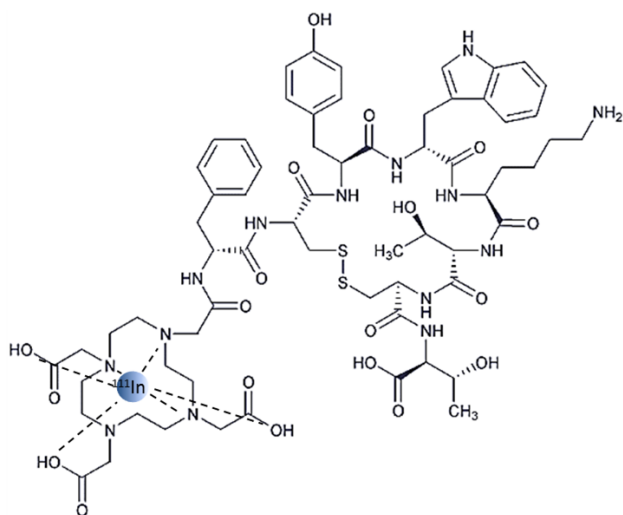
**Tab. 1.** Exprese receptorů pro neuroendokrinní peptidy v nádorech. Převažující typ receptoru je znázorněn tučně (modifikováno z Fani et al. 2012).

PEPTID	TYP RECEPTORU	TYP NÁDORU
Somatostatin	sst <sub>1</sub> , <b>sst<sub>2</sub></b> , sst <sub>3</sub> , sst <sub>4</sub> , sst <sub>5</sub>	Neuroendokrinní nádory (gastroenteropankreatické nádory, nádory hypofýzy), lymfomy, karcinoidy, paragangliomy, prsní, ledvinné a mozkové nádory, malobuněčný karcinom plic, medulární karcinom štítné žlázy
Bombesin/gastrin uvolňující peptid	BB <sub>1</sub> (NMB-R), <b>BB<sub>2</sub></b> ( <b>GRP-R</b> ), BB <sub>3</sub> , BB <sub>4</sub>	Rakovina prostaty, prsu, slinivky břišní a žaludku, malobuněčný karcinom plic, kolorektální karcinom
Cholecystokinin/gastrin	CCK <sub>1</sub> , <b>CCK<sub>2</sub></b>	Medulární karcinom štítné žlázy, malobuněčný karcinom plic, gastrointestinální nádory, stromální nádory a stromální ovariální karcinom, astrocytomy
α- M2 peptid	<b>α-M2-R</b>	Rakovina prsu
α-Melanocyty stimulující hormon	<b>MC1-5R</b>	Melanomy
Vazoaktivní intestinální peptid	<b>VPAC<sub>1</sub></b> , VPAC <sub>2</sub>	Adenokarcinom jater, prostaty, prsu, tlustého střeva a žaludku, neuroendokrinní nádory
Neurotensin	<b>NTR<sub>1</sub></b> , NTR <sub>2</sub> , NTR <sub>3</sub>	Malobuněčný karcinom, nádor tlustého střeva, exokrinní karcinom pankreatu, Ewingův sarkom, meningiom, astrocytomy, plicní nádor, nádor prostaty a prsu
Gonadorelin	<b>LHRH-R</b>	Nádor prostaty a prsu
Substance P	<b>NK<sub>1</sub></b> , NK <sub>2</sub> , NK <sub>3</sub>	Gliální nádory (glioblastomy, medulární karcinom štítné žlázy, nádory slinivky břišní a plic, malobuněčný karcinom plic
Exendin	<b>GLP-1</b> (glukagon-like peptid)	Insulinomy, gastrinomy, pheochromocytohy, paragangliomy a medulární karcinom štítné žlázy
RGD-peptidy	<b>α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-integrin</b>	Gliomy, nádor prostaty a prsu

Vzhledem k příznivé farmakokinetice a specifickému zaměření na receptory nadměrně exprimované na povrchu nádorů mohou být radioaktivně značené peptidy cenné

biologické nástroje pro zobrazení a terapii nádorů (Okarvi 2004). Díky vysoce selektivnímu zacílení na nádorové buňky dochází k vyšší kumulaci cytotoxického materiálu uvnitř nádoru bez/či s minimalizovaným poškozením okolní tkáně, což může být popsáno jako zvýšení účinnosti a snížení nespecifické toxicity. Tento koncept je podkladem tzv. cílené terapie.

Řada peptidů, od nichž jsou odvozena analoga studovaná pro aplikaci v nukleární medicíně, je přirozeně syntetizována v mozku, zejména v neuronech. Protože je ale většina z těchto peptidů přítomna také ve střevě, lymfatické tkáni, endokrinním systému apod., používá se pro jejich označení obecný termín "regulační peptidy" (Langer a Beck-Sickinger 2001). Účinek regulačních peptidů je zprostředkován vazbou na specifické membránově vázané receptory, které většinou patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem (Pool et al. 2010). Tyto receptory jsou složeny z jediného polypeptidického řetězce se sedmi transmembránovými doménami, extracelulární doménou s vazebným místem pro ligand a intracelulární doménou spojenou s G-proteinem a arestinem pro aktivaci druhých posílů a internalizaci (Homan a Tesmer 2014). Extracelulární doména představuje cíl, na který se vážou receptorově specifické radioaktivně značené peptidy, a tím je umožněna detekce nádorových buněk. Po navázání radioligandu na membránový receptor dojde k internalizaci celého komplexu receptor-ligand, což vyústí v retenci radioaktivity v nádorových buňkách (Madani et al. 2011).



**Obr. 1.** Chemická struktura  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidu (převzato z Santini et al. 2014).

Peptidy se začaly v klinické praxi používat jako radiofarmaka před více jak 20 lety. První a dodnes nejúspěšnější registrovaný peptid používaný pro zobrazování nádorů je somatostatinový (SST) analog,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid ( $^{111}\text{In}$ -Octreoscan<sup>®</sup>,  $^{111}\text{In}$ -pentetretotid, obr. 1) (Charrier et al. 2011), který byl schválen jako vhodný pro zobrazování lézí pozitivních

na SST receptory (SSTR), jako jsou neuroendokrinních nádory, nádory prsu a malobuněčný karcinom plic (Sainz-Esteban et al. 2014; Mezi et al. 2005; Genestreti et al. 2014). Tento přípravek je injekčně aplikován pacientovi a pomocí SPECT je provedeno vyšetření. Skenovací procedura může odhalit lokalizaci primárního nádoru a ve většině případů i sekundárních metastáz. Úspěšné zavedení tohoto somatostatinového radiopeptidu do klinické praxe vyústilo v intenzivní zájem o celou skupinu peptidů, díky kterému byly objeveny bombesiny s vazbou na receptory pro bombesin/gastrin uvolňující peptid, které jsou ve vyšší míře exprimovány u mnoha běžných typů nádorů. V dalším období následovalo testování řady dalších radiopeptidů, z nichž některé jsou v současné době v preklinickém či klinickém hodnocení (Fani et al. 2012).

Poměrně novou aplikací radioaktivně značených peptidů je receptory zprostředkovaná terapie (PRRT), která se testuje pro léčbu neoperovatelných nebo metastazujících neuroendokrinních nádorů (Bodei et al. 2014; Kulkarni a Baum 2014). Vzhledem k dynamickému vývoji v oblasti radioaktivně značených receptorově specifických peptidů je obtížné teoreticky pokrýt všechny typy dosud známých peptidů, a proto se tato práce zaměřuje především na látky s vazbou na SST, bombesinové a cholecystokininové receptory. Tyto skupiny se zdají být z hlediska terapie pomocí radioaktivně značených peptidů nejperspektivnějšími skupinami, což dokládají s úspěchem provedené klinické studie (Brogsitter et al. 2014; von Guggenberg et al. 2012).

### **2.1.1. Výhody použití receptorově specifických radiopeptidů**

Vysoká míra exprese peptidových receptorů různými nádorovými buňkami poskytla molekulární základ pro úspěšné využití radioaktivně značených peptidů jako nosičů radioaktivity v nukleární medicíně. Díky své malé velikosti vykazují peptidy rychlou farmakokinetiku, výborné zacílení a účinnou penetraci do nádoru (Okarvi 2004). Další výhodou je jednoduchá příprava pomocí automatizovaných peptidových syntetizérů, které umožňují i modulaci požadovaných farmakokinetických vlastností změnou v peptidové sekvenci či přidáním biomodifikujících komponent (Antunes et al. 2007).

Protože se jedná o deriváty původně endogenních látek, vykazují peptidy k příslušným receptorům vysokou afinitu a po navázání ligandu dochází k rozvoji účinku. Pro diagnostické účely se tedy peptidy musí používat v co nejnižší koncentraci, aby se zabránilo rozvoji nežádoucích účinků. Většina receptorů vykazuje tak vysokou afinitu ke svým ligandům, že k saturaci dochází již při nanomolárních koncentracích peptidů. Je proto

důležité, aby radioaktivní značení peptidu proběhlo kvantitativně a aby výsledný radiopeptid vykazoval vysokou specifickou radioaktivitu a bylo možno nádor zobrazit použitím mikro- až pikomolárních koncentrací (Mankoff et al. 2008). Do praxe zavedené peptidy jsou dostupné ve formě kitu, který umožňuje jednoduchou a rychlou přípravu se standardizovanými výsledky. Peptidy na rozdíl od protilátek nevzbuzují imunitní odpověď, a proto je jejich aplikace dobře snášena.

### 2.1.2. Limity aplikace receptorově specifických radiopeptidů

Hlavní problém spojený s použitím lineárních peptidů je krátký biologický poločas. Peptidy jsou rychle degradovány proteolýzou v plazmě dříve, než dosáhnou zamýšleného cíle. Bylo zjištěno, že na jejich rozkladu se podílí ektoenzymy, které jsou na povrchu buněk, především v játrech a ledvinách (Konkoy a Davis 1996). Stále není přesně známo, který enzym se na štěpení podílí v nejvyšší míře, avšak Pauwels et al. (1989) publikovali práci popisující štěpení gastrinu a cholecystokininu (CCK) na různých místech neutrální endopeptidázou 24.11 (Pauwels et al. 1989). Proto jsou přirozené peptidy chemicky modifikovány, aby došlo k minimalizaci rychlé enzymové degradace (Behr et al. 2001). Pro vytvoření metabolicky stabilního peptidu vhodného pro klinické použití bylo vynaloženo velké úsilí. Mezi způsoby zvyšující stabilitu patří použití stabilnějších *D*-aminokyselin namísto *L*-aminokyselin, použití pseudopeptidových vazeb, zařazení aminoalkoholů a vložení nepřirodních aminokyselin nebo aminokyselinových zbytků s modifikovanými postranními řetězci bez ovlivnění vazebné schopnosti peptidu. Těchto modifikací bylo využito například u oktreotidu. Zatímco přírodní SST má plazmatický poločas 2–3 min, modifikací byl získán analog o poločase 1,5-2 h, který je využitelný pro klinickou aplikaci (Mankoff et al. 2008).

Zásadním limitem pro aplikaci receptorově specifických peptidů je ledvinná kumulace a retence. Týká se to především peptidů určených k potenciální cílené radioterapii, které jsou značeny biologicky účinnými radionuklidy s delším poločasem, jako jsou např.  $^{177}\text{Lu}$  nebo  $^{90}\text{Y}$  (Kunikowska et al. 2011). Díky převažujícímu vylučování radiopetidů ledvinnou exkrecí jsou ledviny vystaveny vysoké expozici a radioaktivita zde kumulovaná může dosáhnout poměrně vysokých hodnot. Protože ledvinná retence radiopeptidů je relativně dlouhodobá, může dojít k radiotoxickému poškození ledvinné tkáně s následným selháváním ledvin (Cwikla et al. 2010). Tento nežádoucí jev tak omezuje možnou použitelnou dávku radiopeptidu a snižuje efektivitu léčby. Diagnostické radiopeptidy značené gama-zářiči zásadní riziko nepředstavují. Přestože existuje řada možností, jak riziko ledvinné kumulace a

radiotoxicity radiopeptidů omezit (viz část 2.4.2), představuje ledvinné poškození terapeutickými radiopeptidy závažný problém a stále řešenou výzkumnou oblast.

### **2.1.3. Terapie pomocí radioaktivně značených peptidů zaměřených na specifické receptory**

PRRT využívá peptidů značených terapeutickými radionuklidy, které jsou schopny se specificky vázat na receptory na nádorových buňkách, a tak cíleně dopravit zářič k nádoru s co nejmenší zátěží pro ostatní tkáň. Úspěch této terapie závisí především na vysokém a homogenním výskytu peptidových receptorů jak na povrchu primárního nádoru, tak i metastáz (Reubi 2003). Po úspěšném navázání peptidu na receptor dochází k internalizaci komplexu receptor-ligand, který je uvnitř buňky degradován a receptor se znovu navrácí na povrch buňky. Rychlost tohoto procesu a jeho rozsah je dalším faktorem určujícím úspěšnost léčby.

Pro tento typ terapie je také velice důležitá volba vhodného pacienta, protože je zatím používána jen jako krajní řešení. Mezi pacienty vhodné pro PRRT patří lidé s mnohočetnými neoperovatelnými metastázemi či mozkovým nádorem, kteří byli již léčeni chemoterapií či radioterapií s pouze malým nebo žádným úspěchem (Kwekkeboom et al. 2000). Vzhledem k tomu, že peptidy překonávají hematoencefalickou bariéru jen s obtížemi, volí se u mozkových nádorů lokální aplikace peptidické léčby (Merlo et al. 1999). Lokalizace nádoru je tedy dalším určujícím faktorem, stejně tak jako jeho velikost a citlivost na radioaktivní záření (radiosenzitivita) (Brans et al. 2006).

Díky dobré dostupnosti nádorových buněčných linií, bylo provedeno velké množství *in vitro* testů sledujících výskyt receptorů u různých typů nádorů a jejich denzitu. To je první informace, podle které lze rozhodnout o vhodnosti, popřípadě typu PRRT (Reubi 2003). Následuje receptorová scintigrafie, kde je již nádor konkrétního pacienta snímán pomocí peptidu s navázaným zobrazovacím nuklidem. Nejčastěji je dnes v klinické praxi používán <sup>111</sup>In-DTPA-oktreotid (Ambrosini et al. 2011). Ze snímků lze zjistit hustotu receptorů a také je možné vypočítat poměr mezi zachytem nuklidu v nádoru a játrech, který by měl být co nejvyšší (Kwekkeboom et al. 2000). Limitací je ale nedostatek informací o homogenitě či heterogenitě receptorového rozložení v nádoru, které nám právě poskytnou pouze *in vitro* testy. Pokud se jedná o nádor s více typy receptoru, jejichž rozložení je na povrchu různé, bylo testováno použití takzvané multipeptidové receptorové terapie (Okarvi 2008). Při použití SST a CCK analoga současně, dosáhneme vyššího obsazení receptorů na nádoru a tím vyšší

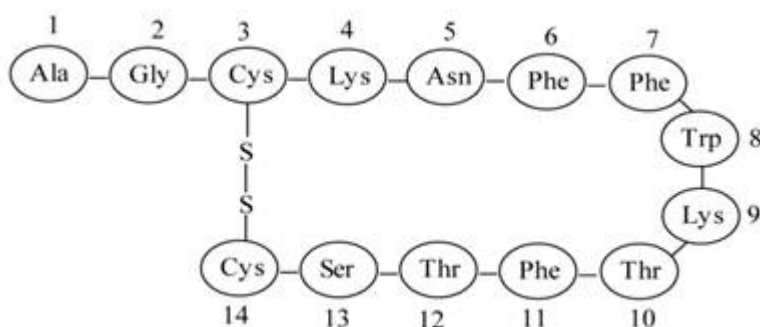
radioaktivity, která zde může působit, a také jejího homogennějšího rozptýlení. Možnými terapeutickými cíli jsou především prsní nádory a nádory gastrointestinálního traktu (Reubi et al. 2002; Reubi et al. 2004).

Pro značení radiopeptidů připadá v úvahu řada radionuklidů. Jednotlivé radionuklidy se liší typem emitovaného záření, jeho energií, prostupností a poločasem rozpadu. Výběr radionuklidu pro terapii je závislý na zamýšlené klinické aplikaci a na fyzikálních a chemických vlastnostech radionuklidu. Obecně se dá říci, že pro terapeutické účely se používají především  $\beta$  zářiče, které mohou mít i  $\gamma$  složku záření, a novým přístupem je i využití  $\alpha$  zářičů. V rámci PRRT se také testuje kombinování radionuklidů s různými energiemi a dosahem záření, čímž lze docílit lepších léčebných výsledků u nádorů s různými velikostmi (de Jong et al. 2005b).

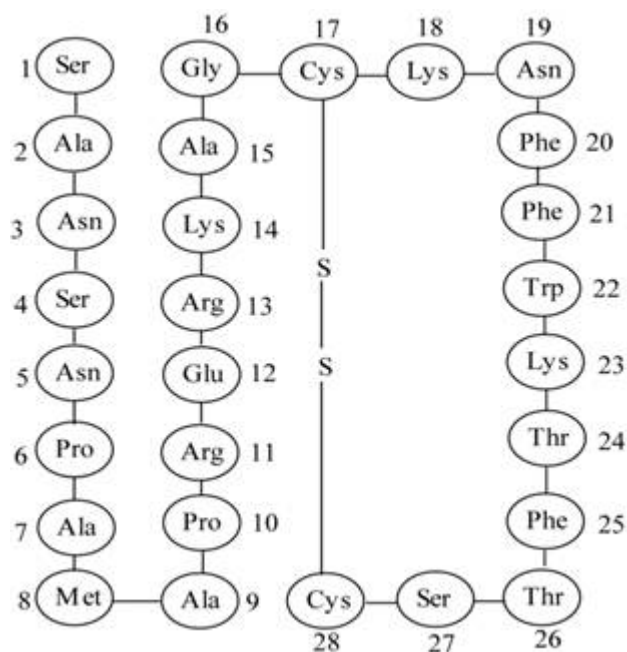
## 2.2. Vývojové skupiny radiopeptidů

### 2.2.1. Analoga somatostatinu

SST je biologicky aktivní neuropeptid produkovaný hypotalamem a parakrinními buňkami v gastrointestinálním traktu a jeho funkcí je inhibice sekrece celé škály hormonů. Kromě kontroly sekrece růstového hormonu inhibuje intestinální motilitu a absorpci, vazokonstrikci a buněčnou proliferaci. SST má dvě biologicky aktivní formy, jejichž řetězec tvoří 14 či 28 aminokyselin (SST-14, SST-28), které vytvářejí pomocí disulfidického můstku cyklickou strukturu (obr. 2, obr. 3). SST-14 i SST-28 mají vysokou afinitu ke všem pěti známým podtypům SST receptorů (SSTR1-5). Tyto receptory patří do rodiny G-protein vázajících receptorů a jsou exprimovány v různých orgánech, jako je GIT a slinivka břišní (Taniyama et al. 2005). Kromě fyziologické orgánové exprese jsou SSTR nadměrně exprimovány některými maligními tkáněmi, především neuroendokrinními (Reubi et al. 1990), což při použití radioaktivně značených SST analogů umožňuje jejich lokalizaci *in vivo*.



**Obr. 2.** Sekvence aminokyselin v molekule somatostatinu-14 (převzato z Fani et al. 2012).



**Obr. 3.** Sekvence aminokyselin v molekule somatostatinu-28 (převzato z Fani et al. 2012).

Po navázání SST na SSTR dojde nejčastěji k inhibici adenylátcyklázy, aktivaci draselných a vápenatých kanálů, aktivaci proteinové fosfatázy a k aktivaci nitrobuněčné tyrosinové fosfatázy. SST má navíc přímý antiproliferativní účinek díky inhibičnímu působení na růstové faktory a nádorovou angiogenezi (Garcia de la Torre et al. 2002).

Nevýhodou přirozeného SST při klinickém užití je krátký plazmatický poločas vlivem rychlé enzymatické degradace endogenními peptidázami (Susini a Buscail 2006). Proto byla modifikací jeho struktury připravena řada syntetických analogů, které mají zachovanou biologickou aktivitu SST, ale vyznačují se vyšší odolností k enzymatické degradaci. Strukturální změny spočívaly v záměně *L*-aminokyseliny v pozici 8 (Tyr) za *D*-izomer, zavedení *D*-aminokyseliny na N-konec řetězce a na C-konec byl přidán aminoalkohol (obr. 4 a obr. 5). Disulfidický můstek přispívá k lepší odolnosti vůči endopeptidázám (obr. 1, 4, 5). Kromě toho došlo ještě ke zkrácení peptidového řetězce. Takto upravená analoga SST, značená vhodným radionuklidem umožňujícím SPECT a PET diagnostiku, se úspěšně používají či testují pro zobrazování nádorů, plánování léčby a následnou monitoraci odpovědi na léčbu. Tyto deriváty dovolují i detekci malých metastáz, což je velkou výhodou oproti jiným diagnostickým přístupům (Rossi et al. 2014). Díky zachované vazebnosti k receptorům u nich zůstává i biologická aktivita snižující příznaky spojené s nadměrnou hormonální produkcí a mohou tak mít i přímý protinádorový účinek

(Mankoff et al. 2008). Ve vývojové posloupnosti byly prvními takto modifikovanými analogy SST oktreotid a oktreotát, později i další deriváty (viz níže).

### **DTPA-oktreotid**

Oktreotid, oktapeptidový SST analog, vznikl zavedením *D*-aminokyselin a zmenšováním velikosti kruhu až na biologicky aktivní základní sekvenci, kterou představují pouze 4 aminokyseliny (Phe-*D*Trp-Lys-Thr), které jsou nezbytně nutné pro vazbu na receptor. Jeho struktura je znázorněna na obr. 1. Touto úpravou vznikl analog s výrazně delším plazmatickým poločasem ve srovnání s původním endogenním peptidem a pouze osmi aminokyselinami, od čehož je odvozen i jeho název (oktreotid). Pro význam této práce je důležitý především radioaktivně značený oktreotid, ale v klinické praxi se používá i neznačený, dlouho působící oktreotid (oktreotid LAR), který je podáván jako počáteční léčba pacientům s metastatickými střevními NET (Rinke et al. 2009). Využití biologického účinku přirozeného SST má stabilizující efekt na růst nádorů a vede k oddálení progresu onemocnění (Arnold et al. 1996).

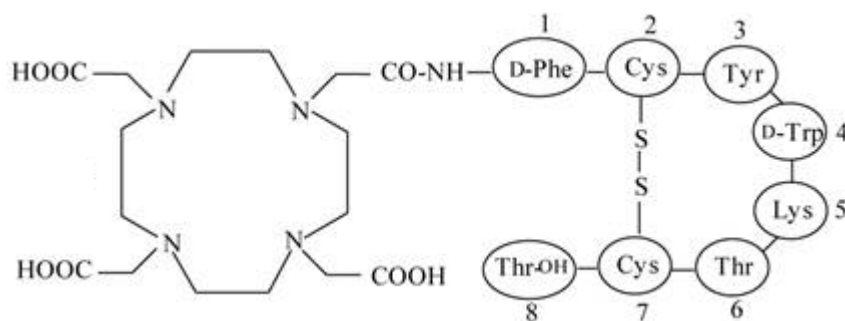
<sup>111</sup>In-DTPA-oktreotid je v současnosti zatím jediný registrovaný SST peptid pro scintigrafické zobrazování v ČR. Scintigrafie pomocí této látky se ukázala být velice citlivou a specifickou metodou pro zobrazování nádorů a jejich metastáz s expresí SSTR. Z tohoto důvodu vznikla snaha využít nejen  $\gamma$ -záření, které tento nuklid emituje, ale pomocí podání vysokých dávek radiopeptidu využít i účinku emitovaných Augerových a konverzních elektronů k terapii metastazujících nádorů. Přestože u pacientů léčených <sup>111</sup>In-oktreotidem byla zaznamenána úleva, objektivní odpověď nádorů k léčbě byla velice malá (Valkema et al. 2002).

### **DOTA-[Tyr<sup>3</sup>]oktreotát (DOTA-TATE)**

Oktreotát (TATE), který je dalším vývojovým stupněm ve skupině analogů SST, se liší od svého předchůdce oktreotidu nahrazením threoninolu na C konci za přírodní aminokyselinu threonin (obr. 4), čímž došlo k výrazně vyšší schopnosti vazby na SSTR2. Podle provedených studií je uptake radioaktivně značeného DOTA-TATE v nádorech několikanásobně vyšší než u starších SST analogů, zatímco nežádoucí záchyt v ledvinách, slezině a játrech zůstává stejný (Reubi et al. 2000). V případě tohoto peptidu bylo testováno pro terapeutické použití značení <sup>177</sup>Lu. Výhodou tohoto zářiče je, že vedle  $\beta$  emituje též  $\gamma$  záření. Peptidy značené tímto radionuklidem mohou být tedy použity jak pro léčbu, tak pro



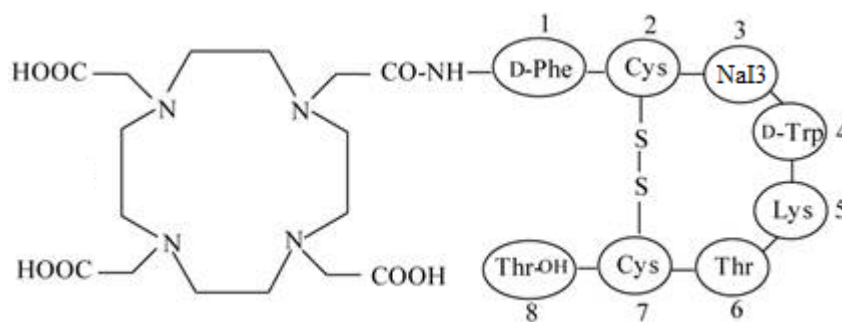
dozimetrii a monitorování nádorové odpovědi. Léčba pacientů s endokrinními nádory pomocí cílené radionuklidové terapie s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE vedla k terapeutické odpovědi, u 30-38 % pacientů došlo k zlepšení kvality života a prodloužení doby přežití až o dva roky (Van Essen et al. 2007). Limitujícím orgánem jsou stejně jako u dalších podobných radiopeptidů ledviny. Pro zjištění bezpečnosti a tolerance léčby  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Tyr<sup>3</sup>]oktreotátem probíhají klinické studie třetí fáze (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01578239>).



**Obr. 4.** Struktura DOTA-[Tyr<sup>3</sup>]oktreotátu (převzato z Fani et al. 2012).

#### **DOTA-[NaI<sup>3</sup>]-oktreotid (DOTA-NOC)**

Dalším významným analogem SST je DOTA-NOC, u něhož byla třetí aminokyselina v řetězci oktreotidu (fenyalanin) nahrazena (1-naftyl)alaninem (obr. 5). Touto modifikací byla zachována dobrá vazebnost na SSTR2, ale oproti DOTA-TATE má tento peptid i vysokou afinitu k SSTR3 a SSTR5, což je využitelné u nádorů s nízkou expresí SSTR2 a naopak se zvýšenou expresí SSTR3 a SSTR5.  $^{111}\text{In}$  značený DOTA-NOC vykazoval v preklinických studiích s buněčnými liniemi a u zvířat s experimentálními nádory dobrou vazebnost i vstup do nádoru. Klinické studie však předběžná očekávání adekvátně nenaplnily. Při klinickém testování sice zůstala retence  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC v ledvinách a slezině srovnatelná s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC však zůstával navázan i v dalších orgánech. Uptake tohoto radiopeptidu v nádorech byl ale ve srovnání s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE nižší (Wehrmann et al. 2007).



**Obr. 5.** Chemická struktura DOTA-[NaI<sup>3</sup>]-oktreotidu.

### 2.2.2. Analoga cholecystokininu a gastrinu

Peptidy gastrinové a CCK rodiny jsou charakteristické peptidovou sekvencí Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> na C konci, která odpovídá za vazbu na CCK receptory (obr. 6). Gastrinové peptidy mají navíc pentaglutamovou sekvenci, která u CCK peptidů chybí (obr. 7). Bylo prokázáno, že sekvence 8 aminokyselin na C konci CCK má stejnou účinnost jako přírodní peptid obsahující 33 aminokyselin (Laverman et al. 2004). Na tomto základě byla vyvinuta řada analogů gastrinu s kratším řetězcem, avšak se zachovanou vysokou afinitou k CCK receptorům, které získaly označení minigastriny.

**Gly-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>**

**Obr. 6.** Aminokyselinová sekvence CCK8.

**DGlu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Tpr-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>**

**Obr. 7.** Aminokyselinová sekvence minigastrinu 0.

Peptidy CCK a gastrin působí na CCK2/gastrinové a CCK1 receptory, které jsou fyziologicky exprimovány v tenkém střevě a mozku (Reubi 2003). Vysoká exprese CCK2/gastrinových receptorů byla zjištěna v buňkách medulárního karcinomu štítné žlázy, malobuněčného karcinomu plic, astrocytomů, stromálního ovariálního karcinomu, gastroenteropankreatických neuroendokrinních nádorů a gastrointestinálních stromálních tumorů (Brans et al. 2006).

Radioaktivně značená CCK/gastrinová analoga mají perspektivu pro *in vivo* targeting CCK/gastrinových receptorů exprimovaných nádory. Mezi klinicky nejúspěšnější látky patří  $^{99m}\text{Tc}$ -demogastrin 2,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-minigastrin 11 ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-MG11) a  $^{111}\text{In}$ -DOTA-CCK. Především  $^{99m}\text{Tc}$ -demogastrin 2 vykazoval slibný klinický potenciál pro diagnostické účely, protože je velice dobře detekovatelný, zobrazuje několik typů nádorů a jeho transport do nádorů u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy a metastázami byl vyšší než u dalších peptidů z této skupiny (Froberg et al. 2009).

V posledních letech byla připravena a testována poměrně široká paleta radioaktivně značených CCK/gastrinových analogů pro radionuklidové zobrazování a terapii nádorů pozitivních na CCK/gastrinové receptory. Základním problémem komplikujícím širší použití CCK a gastrinových analogů je vysoký ledvinový záchyt a vysoká míra metabolismu. Zatímco analogy CCK vykazují nižší uptake v nádorech spolu s nižší ledvinovou kumulací, analogy gastrinu mají záchyt v nádorech mnohem vyšší, bohužel je však zvýšena i kumulace v ledvinách (Behr a Behe 2002).

### **DOTA-minigastrin 0 (MG0)**

Struktura MG0 je tvořena aminokyselinovou sekvencí *D*Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>. Radioaktivně značená forma vykazuje spolu s podobně vysoce kumulovanými deriváty sargastrinu mezi gastrinovými analogy nejvyšší retenci v ledvinách. Ledvinový uptake je možné částečně blokovat současným podáním štěpů albuminu či želatinových plazma expandérů (Vegt et al. 2010b). Kumulace byla také snížena při současném podání polyglutamových řetězců různé délky (Behe et al. 2005), přičemž nejúčinnější se zdá být použití oligořetězců o délce větší než pět aminokyselin. Na základě těchto skutečností se předpokládá, že za ledvinovou kumulaci MG0 je odpovědná přítomnost pěti glutamových zbytků v jeho molekule (Laverman et al. 2011), které jsou odpovědné za negativní náboj molekuly peptidu.

### **DOTA-sargastrin**

Sargastrin je analog lidského gastrinu-17. Stejně jako MG0 obsahuje pentaglutamovou sekvenci, která dává molekule negativní náboj. Úplná aminokyselinová sekvence sargastrinu je Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>. Sargastrin se vyznačuje vysokou vazbou na nádory exprimující CCK2

receptory. Jeho retence v ledvinách je u pokusných zvířat vysoká a srovnatelná s ledvinným uptake MG0 (Laverman et al. 2011).

### **DOTA-minigastrin 11 (MG11)**

U MG11 byla odstraněna pentaglutamová sekvence a byl tak připraven oktapeptid s mnohem nižším ledvinným záchytem (Good et al. 2008), ovšem i s třetinovou vazbou na nádory ve srovnání s MG0. Jeho struktura je tvořena řetězcem *D*Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>. Tento peptid je ovšem méně stabilní v séru, pravděpodobně díky chybějící glutamové sekvenci v jeho molekule (Good et al. 2008). V experimentech *in vivo* s využitím BALB/c myši s indukovanými nádory, kterým byl aplikován <sup>177</sup>Lu-DOTA-MG11, byly hlavními metabolity nalezenými v moči zvířat tripeptid <sup>177</sup>Lu-DOTA-*D*Glu-Ala-Tyr a o jednu aminokyselinu delší <sup>177</sup>Lu-DOTA-*D*Glu-Ala-Tyr-Gly (Ocak et al. 2011).

### **2.2.3. Analoga bombesinu**

Bombesin je peptid složený ze 14 aminokyselin, který se vyskytuje u obojživelníků. U savců je přítomen jeho homolog o 27 aminokyselinách - gastrin uvolňující peptid (GRP). Bombesin i GRP obsahují charakteristickou sekvenci 7 aminokyselin na C-konci řetězce Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (viz obr. 8 a 9), která odpovídá za vazbu na vysokoafinitní receptory pro bombesin/gastrin (Pansky et al. 2000). Obě látky mají silnou vazbu na lidský GRP receptor. Tyto receptory jsou exprimovány mnoha typy nádorových buněk, jako jsou buňky nádorů prostaty, prsu, gastrointestinální tumory a malobuněčný plicní karcinom (Gonzalez et al. 2008).

**Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Trp-Pro-Arg-(Gly-Asn-His-)Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>**

**Obr. 8.** Aminokyselinová sekvence gastrin uvolňujícího peptidu.

**pGlu-Gln-Arg-Leu--(Gly-Asn-Gln-)Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>**

**Obr. 9.** Aminokyselinová sekvence bombesinu.

Rodina bombesinových receptorů patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny a skládá se ze čtyř podtypů: neuromedin B receptor (BB1), GRP receptor (BB2),

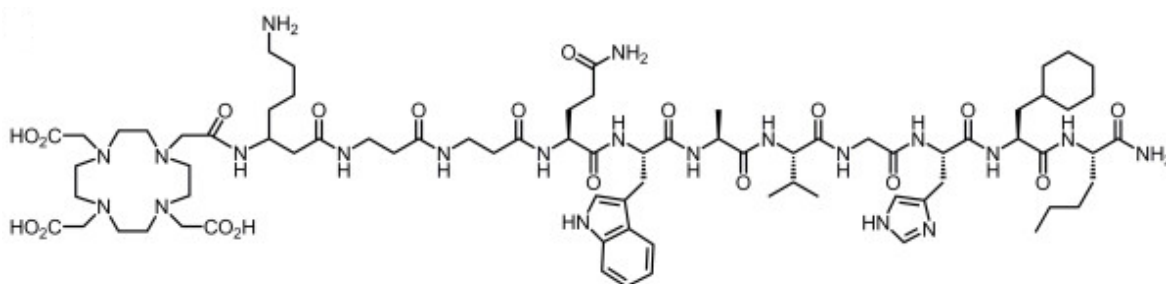
sirotčí receptor (BB3) a receptor nalezený u obojživelníků (BB4) (Ohki-Hamazaki et al. 2005). Bombesin a GRP po vazbě a aktivaci těchto receptorů vykazují mnoho fyziologických a farmakologických funkcí. Hrají také důležitou roli ve stimulaci růstu různých typů nádorů (Reubi 2003). U lidských nádorů se však vyskytují pouze tři typy receptorů - BB1, BB2 a BB3. Nejdůležitějším se zdá být exprese receptoru BB2, který byl detekován v nádorech plic, prsu, gastrointestinálního systému a prostaty (Gonzalez et al. 2008).

Radioaktivně značené peptidy odvozené od struktury bombesinu, které mají zachovanou vysokou specifickou schopnost vazby na bombesinové/GRP receptory, mají vývojový potenciál pro případné diagnostické a/nebo terapeutické použití u výše zmíněných typů nádorů. Pro značení radionuklidy, jako je např.  $^{64}\text{Cu}$  nebo  $^{177}\text{Lu}$  byla vytvořena řada analogů s variantními peptidovými řetězci, které byly konjugovány s DOTA (Lears et al. 2011; Pujatti et al. 2011). Mezi tyto vývojové látky patří DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin nebo DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesin, které byly syntetizovány a biologicky testovány nizozemskou skupinou Breeman et al. (2002). Tito pracovníci vycházeli z předpokladu, že GRP receptory by mohly být indikátory karcinogeneze již v raném stádiu a následné označení radionuklidy by umožňovalo jak diagnostiku, tak terapii, obdobně jako se to podařilo s analogy somatostatinu.

Hlavním problémem spojeným s použitím bombesinových peptidů je jejich tendence se hromadit v játrech a tenkém střevě, díky vysoké hepatobiliární clearance i přesto, že mají hydrofilní povahu. Z tohoto důvodu je tak scintigrafické zobrazování v abdominální oblasti problematické (Reubi et al. 2005). Vysoká hepatobiliární clearance může být způsobena právě přítomností GRP receptorů v gastrointestinálních tkáních (Pansky et al. 2000). Proto byly postupně vyvinuty bombesinové deriváty s nízkou akumulací v játrech a intestinální oblasti (Lin et al. 2005). Tyto látky značené  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$  a  $^{177}\text{Lu}$  byly zkoumány v testech na zvířecích modelech lidských nádorů prostaty a prsou (Zhang et al. 2004; Maddalena et al. 2009; Smith et al. 2003; Zhang et al. 2007). Při přenosu preklinických výsledků do klinického prostředí však byla zjištěna bezpečnostní rizika související s intravenózním podáním silných bombesinových agonistů. Nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky byly abdominální křeče, stimulace sekrece gastrointestinálních hormonů a ovlivnění termoregulace. Účinky pravděpodobně souvisejí s aktivací bombesinových receptorů v periferních tkáních, a to především ve střevě (Sancho et al. 2011).

## DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin

V preklinických studiích u myši s nádory prostaty indukovanými pomocí linií PC-3 a CWR22 vykazoval DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin značený <sup>64</sup>Cu vysokou afinitu a internalizaci v buňkách karcinomu. Tato kumulace byla vyšší v nádorech nezávislých na androgenech, než v nádorech závislých na androgenech. Tento peptid též vykazoval příznivý poměr mezi množstvím radioaktivity kumulované v nádorech a celotělovým pozadím. Chemická struktura DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu je zobrazena na obr. 10.



**Obr. 10.** Chemická struktura DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu (převzato z Dapp et al. 2012).

## DOTA-[Pro<sup>1</sup>, Tyr<sup>4</sup>]bombesin

Tento analog vykazuje velice nízkou akumulaci radioaktivity v krvi a slezině a vynikající vazebnost a kumulaci v nádorech a tkáních exprimujících GRP receptory. Jeho struktura je tvořena sekvencí DOTA-Pro-Gln-Arg-Tyr-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Výhodou tohoto peptidu je vyhovující způsob přípravy a jeho stabilita (Breeman et al. 2002).

## 2.3. Radioaktivní značení peptidů

### 2.3.1. Typy dostupných radionuklidů

Peptidy určené pro použití v radiodiagnostice nebo radioterapii musí obsahovat radionuklid, který umožňuje jejich detekci po aplikaci do těla pacienta nebo vyvolá jejich terapeutický účinek. Obecně můžeme říci, že pro radionuklidovou terapii peptidy jsou používány radiokovy emitující  $\alpha$  nebo  $\beta^-$  záření, Augerovy či konverzní elektrony, zatímco pro diagnostické účely se používají nuklidy emitující pozitrony ( $\beta^+$  zářiče), či vysokoenergetické fotony ( $\gamma$  zářiče). Některé nuklidy, např. <sup>111</sup>In či <sup>131</sup>I se řadí mezi smíšené

zářiče a v tomto případě je možné je využít k oběma účelům. Další vlastností radionuklidu, jež určuje jeho další použití je poločas radioaktivní přeměny. Pro použití v nukleární medicíně je vhodné, aby poločas radioaktivní přeměny koreloval s biologickým poločasem a farmakokinetickými vlastnostmi použitého radiofarmaka. Protože peptidy obecně mají krátký biologický poločas, používají se k jejich značení nuklidy s poločasem přeměny desítky minut či hodin. Pro terapeutické účely je však vhodné použití nuklidů s delším poločasem, který umožní delší terapeutické působení v místě nádoru. Přehled radionuklidů nejčastěji využívaných pro značení peptidů v preklinickém a klinickém výzkumu je uveden v tab. 2.

### Radionuklidy pro diagnostiku

$^{99m}\text{Tc}$  je metastabilní radionuklid, který je k diagnostickým účelům využíván v nukleární medicíně velmi frekventně a představuje tak nejpoužívanější radioizotop v klinické praxi. Dobře detekovatelné emitované gama záření o energii 140 KeV a poločas přeměny 6 h umožňují kvalitní diagnostiku při nízké radiační zátěži pacientů. Výhodou je též dobrá dostupnost přímo na pracovištích nukleární medicíny, kde se obvykle získává těsně před přípravou radiofarmak z  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  generátoru. Používá se ke značení velké škály radiofarmak, která jsou většinou již dostupná ve formě kitu. Pro značení radiopeptidů bylo  $^{99m}\text{Tc}$  použito jak k přípravě SST analogů (Gambini et al. 2011), tak i gastrinových a bombesinových analogů (Nock et al. 2003; Nock et al. 2005).

Dalším radionuklidem, který se používá především pro diagnostické účely u pacientů při onemocnění štítné žlázy, je  $^{123}\text{I}$ . Tento radionuklid s poločasem přeměny 13,2 h emituje  $\gamma$  záření o energii 159 KeV (Park 2002). Pro použití v PRRT je vhodnější další izotop jódu -  $^{131}\text{I}$ . Tento radionuklid se získává v jaderném reaktoru a převahu tvoří  $\beta$  složka s energií 971 KeV. Díky dlouhému poločasu 8 dní a cenové dostupnosti představuje  $^{131}\text{I}$  cenově přijatelnou alternativu pro peptidy, které mohou být značené  $^{177}\text{Lu}$  a používané pro terapii neuroendokrinních nádorů (de Araujo et al. 2009).

$^{18}\text{F}$  se zdá být velmi vhodným radionuklidem pro značení peptidů a následné využití pro PET diagnostiku. Hlavní překážkou jeho použití je pracná a časově náročná příprava  $^{18}\text{F}$  značených látek. Výhodou  $^{18}\text{F}$  však je krátký poločas - 110 min, který umožňuje provést syntézu i zobrazovací proceduru. K výbornému bezpečnostnímu profilu přispívá netoxický produkt přeměny, kterým je  $^{18}\text{O}$ . Nízká energie pozitronů (0,64 MeV) a krátký dosah v tkáních (2-3 mm) minimálně radiačně zatěžují pacienta (Okarvi 2001).

## Radionuklidy pro terapeutické aplikace

Přestože je  $^{111}\text{In}$  používáno ke značení dosud nejúspěšnějšího diagnostického přípravku vyvinutého v rámci skupiny receptorově specifických radiopeptidů -  $^{111}\text{In}$ -DTPA-otretotidu, jeho použití v terapii nebylo úspěšné kvůli malé prostupnosti emitovaných Augerových elektronů do tkání (Kwekkeboom et al. 2005). Pro terapeutické účely jsou vhodnější radiokovy emitující  $\beta$  částice, a to především  $^{90}\text{Y}$  a  $^{177}\text{Lu}$ . Tyto radionuklidy emitují částice o takové energii, že jejich záření je schopno vyvolat zánik buněk, avšak zároveň nedochází k rozsáhlému poškození okolní tkáně (Kaltsas et al. 2005).

$^{90}\text{Y}$  emituje vysokoenergetické elektrony o maximální energii 2,3 MeV. Jedná se o  $\beta$  zářič s maximálním vstupem do tkání 12 mm, který je účinnější při léčbě větších nádorů s průměrem do několika desítek mm. Poločas radioaktivní přeměny  $^{90}\text{Y}$  je 2,7 dní.

Naproti tomu záření  $^{177}\text{Lu}$  proniká maximálně 1,8 mm do tkání, což je tedy vhodné pro léčbu menších nádorů a metastáz, optimálně několik mm velkých (O'Donoghue et al. 1995). Poločas přeměny  $^{177}\text{Lu}$  je 6,7 dní a jeho elektrony mají nižší energii (0,5 MeV) než v případě  $^{90}\text{Y}$ . Výhodou je, že  $^{177}\text{Lu}$  emituje i  $\gamma$  záření, které umožňuje scintigrafii nádorů, dozimetrii a sledování velikosti lézí. Kombinace těchto dvou radiokovů se zdá být ideálním prostředkem pro současnou léčbu velkých nádorů díky vysokoenergetickému  $^{90}\text{Y}$  a jeho malých přidružených metastáz působením nízkoenergetického  $^{177}\text{Lu}$ . Ze zatím provedených klinických studií, které testovaly použití  $^{90}\text{Y}$  a  $^{177}\text{Lu}$  značených DOTA-TATE a DOTA-TOC vyplynulo, že kombinovaná léčba sice jednoznačně prodloužila pacientům život, avšak její bezpečnost byla v některých studiích problematická (Kunikowska et al. 2011; Villard et al. 2012; Seregni et al. 2014).

Dalšími vývojovými radionuklidy, které by mohly být využity pro terapeutické aplikace receptorově specifických radiopeptidů jsou alfa zářiče. Nejnovější výzkum je zaměřen na radionuklidy emitující  $\alpha$  částice jako jsou  $^{213}\text{Bi}$  či  $^{225}\text{Ac}$ . Tyto radioaktivní kovy emitují částice s vysokou energií a s přenosem energie na biologické struktury mnohem vyšším než u  $\beta$  částic. Charakteristiky záření alfa emitůrů jsou podkladem pro jejich vyšší terapeutickou účinnost při léčbě malých nádorů a mikrometastáz. Výhodou použití  $\alpha$  zářičů je také nezávislost cytotoxického efektu na fázi buněčného cyklu a koncentraci kyslíku. Proto se mohou tyto zářiče s výhodou používat i k léčbě méně okysličených, hypoxických nádorů (Miederer et al. 2008), u kterých může být proliferace téměř úplně zastavena nejčastěji v  $G_0/G_1$  fázi při zachované invazivitě transformovaných buněk (Krtolica a Ludlow 1996).



## Radionuklidy pro diagnostické i terapeutické účely

Nejpoužívanějším radiokovem je v oblasti radiopeptidů  $^{111}\text{In}$ , které emituje nejen záření gama umožňující scintigrafické zobrazení, ale je též zdrojem terapeuticky využitelných Augerových a konverzních elektronů s prostupností do tkání 0,02-10  $\mu\text{m}$  a 200-550  $\mu\text{m}$ . Během několika posledních let se ale pro PET zobrazení začala testovat SST analoga radioaktivně značená pozitrony emitujícím  $^{68}\text{Ga}$ . V porovnání se SPECT využívajícím SST analoga značená  $^{111}\text{In}$  vykazuje PET snímkování s použitím  $^{68}\text{Ga}$  vyšší rozlišení, lepší kontrast tkání a vyšší citlivost při detekci metastáz (Gabriel et al. 2007; Hofmann et al. 2001). Navíc  $^{68}\text{Ga}$  je produkováno  $^{68}\text{Ge} - ^{68}\text{Ga}$  generátorem, což umožňuje jeho výrobu a použití i v laboratořích, které nemají přístup k cyklotronu. Použití generátoru je také vhodné kvůli krátkému poločasu  $^{68}\text{Ga}$ , které činí 68 min (Breeman a Verbruggen 2007). Maximální energie  $\beta^+$  složky tohoto záření je 1,92 MeV (Asti et al. 2008).

Mezi další radiokovy, jejichž využití pro formulaci receptorově specifických radiopeptidů je v současnosti zkoumáno, patří  $^{64}\text{Cu}$ . Poločas přeměny tohoto radiokovu je 12,7 h. Radionuklid emituje záření  $\beta^+$  o energii 0,653 MeV a  $\beta^-$  s energií 0,579 MeV, což umožňuje jak použití pro zobrazování pomocí PET, tak případně i cílenou radioterapii. Při porovnání přípravků  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidu a  $^{64}\text{Cu}$ -TETA-oktreotidu (TETA; 1,4,8,11-tetraazacyklododekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina) se ukázalo, že druhá sloučenina má vyšší citlivost při zobrazování neuroendokrinních nádorů, což je ale částečně dáno také vyšší citlivostí PET používané pro  $^{64}\text{Cu}$  než SPECT zobrazování, které bylo použito u  $^{111}\text{In}$  (Anderson a Ferdani 2009). Díky poločasu radioaktivní přeměny je možné tento radionuklid distribuovat z místa výroby v cyklotronu do lokálních center nukleární medicíny s akceptovatelnou ztrátou aktivity. Vazba  $^{64}\text{Cu}$  k peptidu je díky dobře prostudované koordinační chemii možná s využitím velké řady chelatačních molekul, což poskytuje široký prostor pro aplikaci tohoto radiokovu v nukleární medicíně.

**Tab. 2.** Přehled radionuklidů používaných ke značení receptorově specifických peptidů.

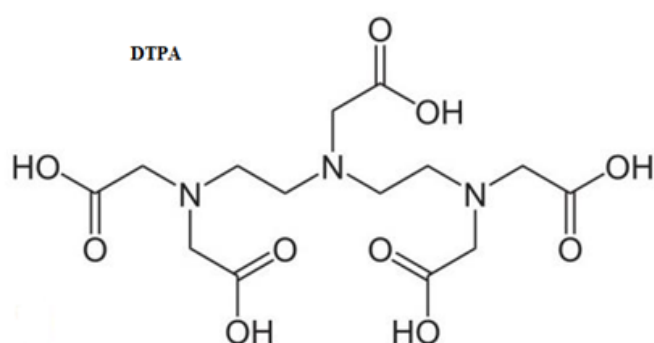
Radionuklid	Poločas	Maximální energie	Maximální dosah (μm)	Aplikace
<sup>99m</sup> Tc	6,0 h	γ 140 KeV	-	Diagnostika
<sup>18</sup> F	1,8 h	β <sup>+</sup> 0,6 MeV	3000	Diagnostika
<sup>123</sup> I	13,2 h	γ 159 KeV	-	Diagnostika
<sup>68</sup> Ga	1,1 h	β <sup>+</sup> 1,9 MeV	2000	Diagnostika
<sup>64</sup> Cu	12,7 h	β <sup>+</sup> 0,7 MeV β <sup>-</sup> 0,6 MeV	3000	Diagnostika/terapie
<sup>111</sup> In	67,2 h	γ 245 KeV	-	Diagnostika/terapie
<sup>177</sup> Lu	160,8 h	β 0,5 MeV	1800	Terapie
<sup>90</sup> Y	64,1 h	β 2,3 MeV	11300	Terapie
<sup>213</sup> Bi	45,6 min	α 8,4 MeV	48	Terapie

### 2.3.2. Vazba radionuklidů pomocí bifunkčních chelatačních činidel

U tak malých sloučenin, jako jsou peptidy, může značení radionuklidem významně ovlivnit vazebnost radiopeptidu na receptor a jeho metabolismus v organismu. Z těchto důvodů je tedy výběr radionuklidu a způsob jeho připojení k peptidu klíčový. Navázání radionuklidu nesmí být v oblasti vazebného místa pro receptory a nesmí ani ovlivnit biologickou aktivitu peptidu. Tyto podmínky řeší v případě kovových radionuklidů použití bifunkčních chelatačních činidel, která jsou na jedné straně kovalentně vázána na peptidový řetězec, a zároveň tvoří komplex s radiokovem pomocí funkčních skupin, jako jsou karboxylová, esterová, isothiokyanátová či maleimidová. Důležitou vlastností bifunkčních chelatačních činidel je schopnost vázat radiokov s vysokou stabilitou *in vivo* s cílem, aby docházelo pouze k minimálnímu uvolňování a následnému ukládání volného radiokovu ve zdravých tkáních. V posledních letech bylo vyvinuto velké množství bifunkčních chelatačních činidel, které umožňují rychlé a pohodlné značení peptidů různými radiokovy.

Chelátory se dělí podle své chemické struktury na dvě skupiny – makrocyclické a acyclické. Makrocyclické chelátory jsou kineticky stabilnější. Ke koordinaci kovu

nepotřebují další úpravu, protože mají přesně danou stabilní geometrii, kde je již vytvořeno vazebné místo pro radiokov. Acyklické chelátory naproti tomu musí podstupovat více zásadních změn ve své geometrii, aby byla možná vazba donorových skupin na kovový kationt. Jejich výhodou je schopnost kvantitativně vázat radiokov za méně než 15 min při teplotě místnosti, čehož se využívá při značení termolabilních peptidů a při práci s radionuklidy s krátkým poločasem přeměny. Vzniklý komplex je ale méně termodynamicky stabilní a v *in vivo* podmínkách může docházet k uvolnění radiokovu, což může být zdrojem nežádoucích účinků (Price a Orvig 2014). Tradiční sloučeninou, která je využívána pro chelataci radiokovů je diethylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA) (obr. 11), která je využívána především pro značení radiofarmak  $^{99m}\text{Tc}$ .

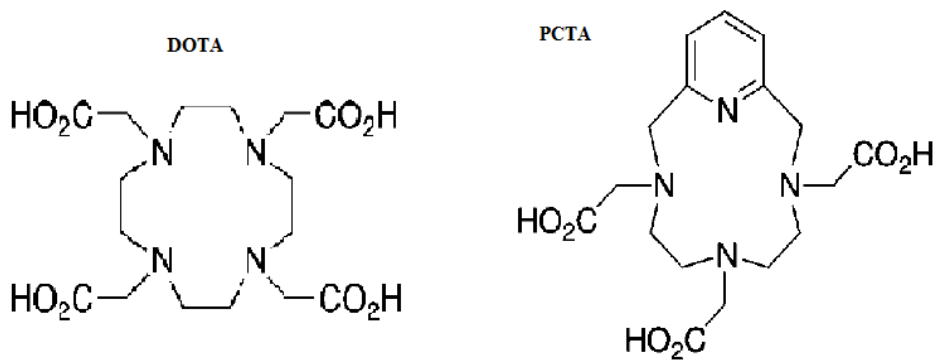


**Obr. 11.** Chemická struktura acyklického chelátoru DTPA.

V případě makrocyclických chelátorů je při přípravě komplexu pro reakci s radiokovem nutné zahřátí na 60-90°C a to na dobu 30-90 min. Vzniklý komplex je však termodynamicky stabilnější v *in vivo* podmínkách. Tento typ chelátorů je v klinických podmínkách používán více než acyklické chelátory a dnes mezi ně patří velké množství sloučenin. Velmi významným chelátorem, který byl použit pro značení řady biologických molekul, patří 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA). DOTA je jedním z nejpoužívanějších makrocyclických chelátorů (viz obr. 12). Vyznačuje se výjimečnou stabilitou vzniklého komplexu s radiokovem *in vivo* a umožňuje vazbu např.  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  či  $^{44/47}\text{Sc}$ . Pro chelataci  $^{177}\text{Lu}$  v biomolekulách se používá DOTA jako téměř výhradní chelátor, o čemž svědčí řada preklinických a klinických studií (Bison et al. 2014b; Cihlo et al. 2008; Cwikla et al. 2010).

K novějším chelátorům s možným dalším užitím pro značení radiokovy v radiofarmacii lze počítat 3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo [9.3.1]-pentadeka-1(15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctovou kyselinu (PCTA). PCTA byla původně syntetizována jako potenciální kontrastní látka pro zobrazování pomocí magnetické rezonance (Kim et al. 1995). Následně

bylo zjištěno, že vykazuje mnohem rychlejší reakční kinetiku s  $^{68}\text{Ga}$  a  $^{64}\text{Cu}$  než DOTA a vzniklý komplex je stabilnější. Komplex  $^{68}\text{Ga}$ -PCTA se navíc méně kumuloval v ledvinách (Ferreira et al. 2010). Přehled chelatačních skupin používaných pro značení receptorově specifických peptidů radiokovy zobrazuje tab. 3.



**Obr. 12.** Chemická struktura chelátorů DOTA a PCTA.

**Tab. 3.** Přehled chelátorů používaných pro značení receptorově specifických peptidů radiokovy.

Radionuklid	Chelátor	Aplikace
<sup>99m</sup> Tc	2-hydrazinnikotinová kyselina, mercaptoacetyltriglycin, diamindithiol	Diagnostika
<sup>18</sup> F	N-succinimidyl-4-[ <sup>18</sup> F]fluorobenzoát	Diagnostika
<sup>123</sup> I	N-succinimidyl-3-jodobenzoát, N-succinimidyl-5-jodo-3-pyridinkarboxylát	Diagnostika
<sup>68</sup> Ga	NOTA, DOTA	Diagnostika
<sup>64</sup> Cu	TETA, DOTA, NOTA	Diagnostika/terapie
<sup>111</sup> In	DTPA, DOTA	Diagnostika/terapie
<sup>177</sup> Lu	DOTA	Terapie
<sup>90</sup> Y	DOTA	Terapie
<sup>213</sup> Bi	DOTA	Terapie

DOTA = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina

DTPA = dietyltriainipentaoctová kyselina

NOTA = 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina

TETA = 1,4,8,11-tetraazacyklododekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina

## 2.4. Farmakokinetické aspekty využití radiopeptidů

### 2.4.1. Biodistribuce a eliminace radiopeptidů

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy jsou do těla aplikovány parenterálně. Obecně se většinou vyznačují rychlou distribucí a krevní clearancí. V důsledku rychlého vylučování ledvinami v organismu přetrvává jen velmi malé množství peptidu (Cremonesi et al. 2010; Dijkgraaf et al. 2007). O metabolických přeměnách radiopeptidů existují pouze omezené informace.

Základním požadavkem na distribuci peptidu je vysoká vazebnost a specifický přenos do míst s receptory, především v oblasti nádoru, zatímco nespecifické vychytávání peptidu v dalších částech těla zůstává nízké. Pro receptorově zprostředkovanou terapii je také důležité, aby po navázání radiopeptidu k receptoru došlo k internalizaci celého ligand-receptorového komplexu do nádorové buňky. Příjem radiopeptidu nádorem záleží nejen na afinitě peptidu k receptoru, ale i na farmakokinetických vlastnostech peptidu a chelátovaného nuklidu (Liu a Edwards 2001). Přirozené peptidy vykazují k receptorům vysokou afinitu, ale

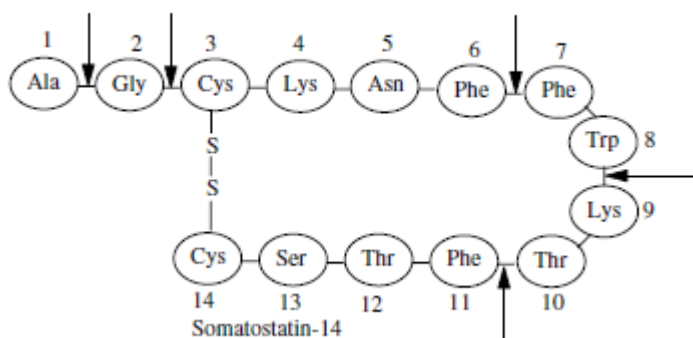
jejich biologický poločas se pohybuje v řádu minut (Susini a Buscail 2006). Je tedy žádoucí, aby syntetické peptidy měly vazebnost pokud možno ještě vyšší, ovšem s delším biologickým poločasem (Langer a Beck-Sickinger 2001). Tato vlastnost zajišťuje nejen dobré zobrazovací možnosti, ale snižuje i radiační zátěž pacienta a nežádoucí účinky. Kritickými orgány, které limitují velikost podané dávky, jsou především ledviny a kostní dřeň (Fani et al. 2012).

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že základními důležitými farmakokinetickými charakteristikami radiopeptidů, které předurčují jeho další využitelnost, jsou míra kumulace v cílové nádorové tkáni, rychlost eliminace z krve a retence v necílových orgánech. Ve farmakokinetických studiích se proto zpravidla stanovují poměry radioaktivity v nádorech vůči krvi a vůči necílovým orgánům jako jsou játra, ledviny, kostní dřeň aj. Zvláště důležitým parametrem je u radiopeptidů kumulace a retence v ledvinách, neboť močová exkrece je u většiny radiopeptidů základní exkreční cestou (Okarvi 2008). Vysoká expozice ledvin vůči vylučovaným radiopeptidům může vést k akumulaci radioaktivity v ledvinách a radiotoxickému poškození (Cwikla et al. 2010; Vegt et al. 2010a). Posouzení míry a mechanismů ledvinné akumulace je proto jedním ze základních testů u vývojových radiopeptidů. Lipofilnější radiopeptidy mohou být významně vylučovány i játry (Laznicek et al. 2002a). Takové látky jsou ovšem pro scintigrafické zobrazování poněkud nevýhodné, protože radioaktivita vylučovaná játry může významně interferovat se zobrazením cílových lézí v abdominální oblasti.

Receptorově specifické radiopeptidy mohou být podobně jako ostatní peptidy v organismu rozkládány pomocí peptidáz, což vede ke štěpení peptidového řetězce a tvorbě metabolitů. Přestože je metabolická stabilita řady receptorově specifických analogů ve srovnání s původními přírodními peptidy mnohem vyšší (Akizawa et al. 1998; Behr et al. 1999, určitou míru metabolismu lze očekávat ve všech případech. U mnoha radiopeptidů dochází pravděpodobně k tvorbě kratšího štěpu spojeného s chelátující částí a s chelatovaným radionuklidem. Představu o místech enzymatického štěpení peptidového řetězce somatostatinových derivátů mohou poskytnout např. údaje o způsobu štěpení SST (obr. 13). Komplexnější údaje o štěpení SST analogů konjugovaných s chelátory však chybějí. Finálním metabolitem může být u některých radiopeptidů konjugát komplexující částí s radionuklidem, který je spojený s poslední aminokyselinou (Akizawa et al. 1998; Akizawa et al. 2008). Mezi místa zodpovědná za degradaci radiopeptidů a tvorbu metabolitů v organismu patří játra, ledviny, plazma nebo nádorová tkáň (Bass et al. 1998; Ocak et al. 2011), ale předpokládá se i přispění dalších orgánů a tkání. Vzniklé metabolity pak mohou být navíc distribuovány

do dalších částí těla. Přestože jsou ledviny místem vzniku těchto radiometabolitů (Akizawa et al. 2008; Ocak et al. 2011), mohou být i možným místem působení radiometabolitů uvolněných z jater či nádorových buněk. Informace o tom, jak mohou být metabolity radiopeptidů transportovány z krve nebo moči do tkání však nejsou dostupné.

Předpokládaná klíčová místa enzymatického štěpení molekuly SST zobrazuje obr. 13.



**Obr. 13.** Místa enzymatické degradace somatostatinu 14 (Okarvi 2008).

Nízká *in vivo* stabilita v důsledku vysoké míry biodegradace je hlavním problémem ve vývoji radioaktivně značených CCK/gastrinových analogů. Po enzymatickém odštěpení ektoenzymy, lokalizovanými na povrchu buněk, u těchto látek navíc hrozí oxidace methioninového zbytku, která vyústí ve ztrátu vazebnosti na receptor. Nejčastějšími místy štěpení byla v *in vivo* testech se sérií CCK/gastrinových analogů vazba mezi koncovou aminokyselinou a Asp. Další citlivé vazby se nacházely mezi aminokyselinami Met-Asp a Tyr-Gly. Finálním metabolitem se stal peptid s koncovou aminokyselinou Gly po předchozím odštěpení Tyr. Vazba mezi chelátorem s navázaným radionuklidem a první aminokyselinou nebyla štěpena v žádném případě (Ocak et al. 2011). Místa štěpení peptidového řetězce gastrinových analogů jsou zobrazena na obr. 14. Při *in vivo* testech nebyl 10 min po aplikaci gastrinových analogů myším v jejich moči detekován žádný intaktní peptid. Stále ale není přesně známé, který enzym je za štěpení CCK/gastrinových analogů zodpovědný. Některé studie však ukazují na neutrální endopeptidázu 24.11 (Pauwels et al. 1989).

<b>MG0</b>	DOTA-DGlu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr↓Gly↓Trp-Met-Asp↓Phe-NH <sub>2</sub>
<b>Sargastrin</b>	DOTA-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr↓Gly↓Trp-Nle-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>
<b>MG11</b>	DOTA-DGlu-Ala-Tyr↓Gly↓Trp-Met-Asp↓Phe-NH <sub>2</sub>

**Obr. 14.** Místa štěpení gastrinových analogů v séru *in vitro* (Ocak et al. 2011).

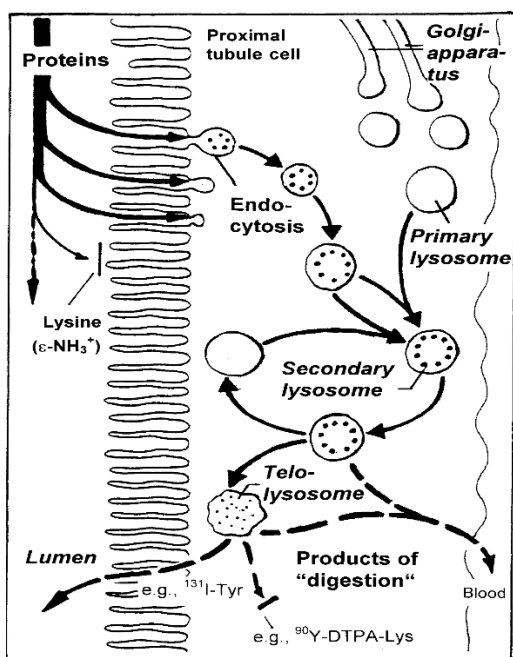
### 2.4.2. Ledvinná kumulace radiopeptidů a související rizika

V lidském ledvinném glomerulu se denně přefiltruje zhruba 180 l plazmy, ze které vznikne ultrafiltrát vstupující do proximálních tubulů. Rozsah filtrace určuje velikost látky, náboj a její vazebnost na proteiny. Většina radioaktivně značených peptidů není vázaná na proteiny a mají velikost menší než 12 kDa, jsou tedy z plazmy efektivně filtrovány glomerulární filtrací do ultrafiltrátu. Přes 99 % filtrované vody a velká část rozpuštěných látek je v proximálním tubulu znovu reabsorbována zpět do krevního řečiště. Zde se reabsorbuje i velká část peptidů a proteinů. Mechanismus transportu peptidů v ledvinných tubulech ještě stále není plně popsán, avšak je známo, že radioaktivní peptid se kumuluje především v korové části ledvin, kde příslušný radionuklid může ozařovat poměrně vysokými dávkami okolní tkáň, což může vést k radiotoxickému poškození a finálně až k selhání ledvin (Cwikla et al. 2010).

Po filtraci v ledvinných glomerulech dochází k navázání radiopeptidů na povrchovou strukturu membrán tubulárních buněk proximálních tubulů. Dle dosavadních znalostí se peptid následně dostává spolu s receptorem do intracelulárního prostoru endocytárním mechanismem - vchlípením plazmatické membrány. Intracelulární měchýřky, zvané endozomy, jsou rychle acidifikovány a v prostředí o nízkém pH dochází k uvolnění ligandu z receptoru. Receptor se vrací zpět na plazmatickou membránu, zatímco ligand zůstává uvnitř již vzniklého lysozomu (Vegt et al. 2008). Vlivem lysozomálních enzymů je molekula radiopeptidu hydrolyzována a vzniklé aminokyseliny jsou uvolněny zpět do krevního řečiště. Chelátor s navázaným radionuklidem a zbylými aminokyselinami zůstávají zachyceny uvnitř lysozomu díky náboji molekuly a jsou jen pomalu uvolňovány ven (Christensen a Gburek 2004). Schematické znázornění tohoto mechanismu je uvedeno na obr. 15.



Při studiu metabolismu  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DPhe-oktreotidu v ledvinách se ukázalo, že po aplikaci byla radioaktivita zachycená v lysozomech ledvin tvořena z více jak 96 % finálním metabolitem  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DPhe. Při záměně aminokyseliny DPhe za LPhe v molekule DPhe-oktreotidu zůstal jako finální metabolit opět jednoaminokyselinový chelátovaný zbytek -  $^{111}\text{In}$ -DTPA-LPhe. Ačkoliv obě látky vykazovaly po *in vivo* aplikaci stejnou distribuci, rychlost metabolické přeměny byla různá. Obě látky se navíc lišily i množstvím radioaktivních meziproductů, jež při metabolismu vznikaly. Oktreotid obsahující LPhe procházel menším množstvím meziproductů, než D-aminokyselinový analog. I přes značné rozdíly v rychlosti metabolismu bylo množství radioaktivity detekované v ledvinách u obou peptidů téměř shodné a intaktní peptid tvořil více jak 85 % radioaktivity nalezené v moči (Akizawa et al. 1998). Hypotézu, že po metabolizaci chelátovaného SST analoga vzniká jednoaminokyselinový zbytek s navázanou chelatační skupinou potvrzuje i studie provedená s  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Met-oktreotidem, kde finálním metabolitem zachyceným v lysozomech ledvin byl  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Met (Akizawa et al. 2001).



**Obr. 15.** Schematické znázornění resorpce a metabolismu proteinů v buňkách proximálního tubulu ledvin (převzato z Behr et al. 1998).

Ledvinná kumulace je důležitá především u radioterapie pomocí peptidů značených  $^{90}\text{Y}$  a případně i  $^{177}\text{Lu}$  (Kunikowska et al. 2011). Vyšší pravděpodobnost poškození, byla zaznamenána u diabetiků, hypertoniků, starších pacientů a lidí s ledvinnými abnormalitami.

Celkovou dávku radioaktivity u těchto rizikových skupin je doporučeno snížit na maximálně 28 Gy, zatímco u jinak zdravých jedinců se může pohybovat kolem 40 Gy (Bodei et al. 2008; Valkema et al. 2005).

Nežádoucí ledvinná kumulace může být částečně zmírněna současným podáváním infúze aminokyselin (lysin, arginin), což sníží kumulaci peptidů zhruba o 35 %. Bylo zjištěno, že především vysoké dávky aminokyseliny lysinu snižují retenci radioaktivity v ledvinách. Dávka lysinu je však limitována kvůli hrozící hyperkalémii (Rolleman et al. 2003; Vegt et al. 2008). Mechanismus inhibice kumulace peptidů lysinem je vysvětlován vazbou pozitivně nabitého lysinu na negativně nabitá místa membrány buněk ledvinných tubulů (de Jong et al. 1996; Behr et al. 1998). Tímto negativně nabitým místem může být i endocytární receptor megalin, což potvrzuje studie provedená autory Vegt et al. (2008), kdy došlo ke snížení vychytávání oktreotidu v ledvinách potkana pomocí frakcionovaného albuminu.

Další možností, jak snížit nežádoucí ledvinný záchyt, je aplikace gelofusinu, želatiny modifikované kyselinou jantarovou, která se ve formě 4% fyziologického roztoku používá jako krevní náhražka. Její výhodou jsou téměř nulové nežádoucí účinky a navíc umožňuje i kombinaci s lysinem, čímž je ledvinná kumulace dále snížena (Rolleman et al. 2008; Vegt et al. 2006).

Nejnovějším testovaným přístupem je snížení ledviného uptake aplikací vychytávače volných radikálů – amifostinu. Jeho použití v PRRT je zatím pouze na neklinické úrovni (Melis et al. 2012). Amifostin snižoval jak radiační poškození, tak celkovou dávku radioaktivity absorbovanou ledvinami. Mechanismus protekce ledvin amifostinem však není zcela vyjasněn. K inhibici radiačně indukované nefrotoxicity přispěla dostatečně vysoká koncentrace aktivního metabolitu amifostinu v ledvinách, která má radioprotektivní účinek, ale tento metabolit mohl také působit jako kompetitor při endocytóze oktreotidu, která je závislá na náboji. Vlivem pozitivně nabitě aminokyseliny lysinu, která je na N-konci řetězce metabolitu amifostinu, může dojít k vazbě na negativně nabitá místa membrány ledvinných tubulů podobně, jako bylo popsáno v případě inhibice kumulace radiopeptidů lysinem (Melis et al. 2009; Rolleman et al. 2008).

## **2.5. Transportní mechanismy potenciálně odpovědné za transport radiopeptidů v ledvinách**

Během poměrně intenzivního zkoumání problematiky akumulace radiopetidů v ledvinách bylo zjištěno, že na reabsorpci peptidů z moči se pravděpodobně podílí megalinový receptorový systém pro aktivní endocytózu (de Jong et al. 2005a). Tento receptor však pravděpodobně není jedinou transportní cestou, kterou mohou radiopeptidy vstupovat do tubulárních buněk a akumulovat se v nich (Melis et al. 2007). Protože je v současné době známo velké množství transportérů exprimovaných v proximálním tubulu ledvin, které vzájemně spolupracují a zajišťují vstup a výstup látek přes buněčnou membránu, je následující část práce věnována popisu transportních systémů v této oblasti nefronu. Vzhledem k rozsahu této problematiky a s ohledem na zaměření práce se následující text soustřeďuje především na popis základních charakteristik transportních mechanismů, které mohou být potenciálně zodpovědné za transmembránový transport radiopeptidů a jejichž zkoumáním jsme se zabývali.

### **2.5.1. Aktivní endocytóza prostřednictvím megalinu**

Megalin je membránový glykoprotein o hmotnosti 600 kDa, který je řazen do rodiny LDL lipoproteinů. Dříve byl označován jako gp300, ale dnes se častěji označuje jako LRP2. Strukturu tvoří jedna malá transmembránová doména a obrovská extracelulární doména. Tato doména, odpovídající za funkce receptoru, se může vázat k chaperonu označovanému jako receptor associated protein (Christensen et al. 2012).

Expresi megalinu je v zásadě omezena na epitelální buňky, konkrétně na jejich apikální povrch. Pouze v určitých podmínkách, daných přítomností specifického ligandu, dojde po internalizaci receptoru namísto jeho vrácení zpět k transcytóze na opačnou stranu buňky. Tento mechanismus je využíván např. k přenosu thyreoglobulinu a nejznámějšího substrátu megalinu – albuminu (Russo et al. 2007). Výskyt megalinu byl zaznamenán v CNS a smyslových orgánech – vnitřním uchu a oku. Díky expresi v CNS a typu jeho substrátů se podílí na regeneraci a přežívání neuronů v centrálním a periferním nervovém systému (Marzolo a Farfan 2011). Megalin je také přítomen v plicích, štítné žláze, přívěsku varlete, děložní sliznici, mléčné žláze, žlučníku, tenkém střevě, placentě (Christensen a Birn 2002; Lundgren et al. 1997). Ovšem v nejvyšší míře je exprimován v proximálním tubulu ledvin na kartáčovém lemu a endocytárních váčcích, částečně je též přítomen v lysozomech a detekován

byl i v podocytech (Prabakaran et al. 2011). Na povrchu membrány je ve formě jamek, vystlaných klathrinem a část se nachází i na mikrokvlcích. Megalin má zásadní význam pro aktivní endocytózu v epiteliálních buňkách proximálních tubulů ledvin. Zajišťuje reabsorpci téměř všech proteinů filtrovaných v glomerulech a sekretovaných buňkami proximálního tubulu. Příklady jeho endogenních substrátů uvádí tab. 4. V ledvinných buňkách megalin často spolupracuje s dalším receptorovým membránovým proteinem - kubilinem, který nemá transmembránovou a intracelulární doménu, a endocytární funkci získává po interakci s megalinem (Kozyraki et al. 2001).

Mechanismus transportu radiopeptidů megalinem byl však zatím zkoumán pouze u dvou SST peptidů, neurotensinu, exendinu a jednoho MG (Barone et al. 2005; Vegt et al. 2011; de Jong et al. 2005a; Melis et al. 2005). V těchto studiích byly radiopeptidy podávány *in vivo*, a *ex vivo* byla prokázána kolokalizace radioaktivního peptidu a histochemicky označeného megalinu (de Jong et al. 2005a; Vegt et al. 2011). Současně byla potvrzena inhibice ledvinného uptake radiopeptidů *in vivo* podáním *D*-lysinu a maleátu sodného (Melis et al. 2005). V literatuře existuje jediná *in vitro* studie se SST radiopeptidem, ve které byly k průkazu transportu radiopeptidu megalinem použity inhibitory megalinu a model buněk vačice (Barone et al. 2005). Tato studie však zkoumala pouze uptake DTPA-*D*Phe-oktreotidu.

Přestože byl transport radiopeptidů megalinem v uvedených studiích potvrzen, nepodařilo se nikdy retenci radiopeptidů v ledvinných buňkách pomocí inhibice megalinu snížit o více jak 50-60 %. V těchto studiích byly použity jak knockoutované myši s modifikovanou expresí megalinu, tak celá řada inhibitorů megalinu (Melis et al. 2005). Na základě těchto výsledků se proto předpokládá, že na akumulaci a retenci radiopeptidů v ledvinách mohou mít vedle megalinu účast i další transportní mechanismy. Přesný mechanismus přenosu megalinem není do značné míry objasněn, bylo však zjištěno, že radioaktivně značené peptidy se v ultrafiltrátu vážou k endocytárním receptorům na luminálním povrchu buněk proximálního tubulu. Poté dojde k vychlípění plazmatické membrány dovnitř a k tvorbě klathrinem obalených váčků a časných endosomů. Časné endosomy splynou s pozdními, ve kterých kyselé pH způsobí disociaci ligandu z receptoru. Peptidy jsou zde proteolyticky degradovány na aminokyseliny (Christensen a Gburek 2004), které jsou transportovány zpět do krevního řečiště. Avšak koncová aminokyselina, chelátor a především navázaný radioaktivní zářič, zůstávají uvnitř lysozomu a poškozují tak ledvinné tubuly a glomeruly radiační zátěží (Akizawa et al. 2001) (viz též část 2.4.2.).

**Tab. 4.** Příklady endogenních substrátů megalinu (modifikováno z Marzolo a Farfan 2011).

Albumin	Inzulin	Polymyxin
$\alpha$ -amyláza	Laktoferin	Prolaktin
Angiotensin	Leptin	Prourokináza
Apolipoprotein B, E, H, J, M	Lipoproteinová lipáza	Rekombinantní aktivační faktor VIIa
Aprotinin	Protein vázající mastné kyseliny v játrech	Retinol vázající protein
Ca <sup>2+</sup>	Metalothionein	Selenoprotein P
Koagulační faktor VIII	Mikroglobulin $\alpha_2, \beta_1$	Sexuální hormony vázající globulin
Růstový faktor pojivové tkáně	Myoglobin	Thyreoglobulin
Cytochrom C	Parathormon	Transkobalamin
Epidermální růstový faktor	Plasminogen	Transthyretin
Hemoglobin	Inhibitor aktivátoru plasminogenu 1	Vitamin D vázající protein

### 2.5.2. Fluidní endocytóza

Fluidní endocytóza patří do skupiny transportních mechanismů souhrnně nazývaných jako endocytóza nezávislá na klathrinu. Tento transportní proces, označovaný také jako makropinocytóza, přenáší do buňky většinu tekutin a membrán. Podílí se na buněčné signalizaci, motilitě, a buněčném růstu. Schopnost endocytovat poškozenou část membrány je zásadní pro buněčné přežití. Je regulována buněčnou hustotou, polarizací ale i množstvím dalších buněčných signalizačních cest a je řízena aktinem (Kerr a Teasdale 2009).

Zahájení procesu makropinocytózy je spojeno s aktinem zprostředkovaným zvlněním membrány a jejím vychlípěním (Kerr a Teasdale 2009). Následně dojde k tvorbě relativně velkých váčků, nesoucích extracelulární tekutinu a součásti, které se nacházející na vychlípěné membráně (Sandvig et al. 2011). Z váčků jsou tvořeny časné endosomy a proces je dále identický, jako u receptorově zprostředkované endocytózy např. megalinem. Mechanismus je podobný fagocytóze, ale na rozdíl od ní není potřeba navázání kontaktu s internalizovaným materiálem.

Makropinocytóza je závislá kromě aktinu na cholesterolu a rac1, a vyžaduje aktivitu Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výměníku (Kerr a Teasdale 2009). Tento transport je substrátově značně nespecifický

a hraje roli v reabsorpci proteinů a peptidů v proximálním tubulu. Ovšem kapacita této transportní cesty je mnohem nižší než receptory zprostředkované endocytózy (Schwegler et al. 1991).

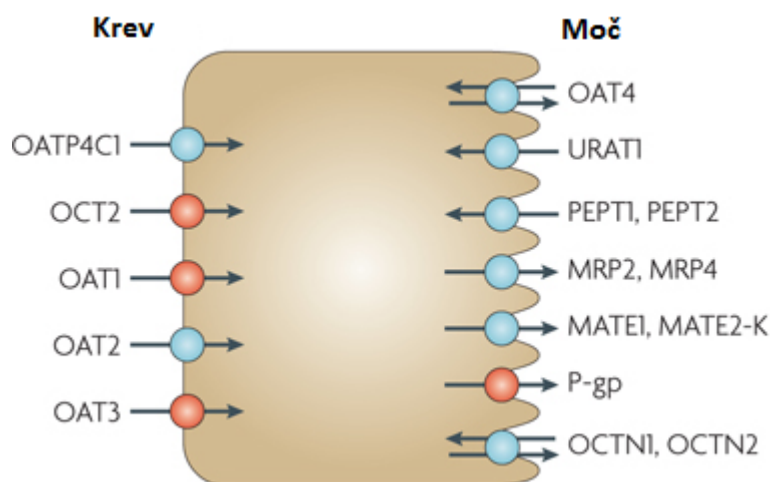
Význam endocytózy pro transport peptidů je stále diskutován a testován pomocí fluorescenčně značených substrátů či inhibitorů endocytózy. Výsledky účast endocytózy potvrzují (Lundberg et al. 2003), ale vzhledem k problematice testování není dosaženo jednotného konsenzu a dosud nebylo stanoveno do jaké míry a jakým mechanismem se tato cesta na přenosu proteinů podílí (Lundberg et al. 2003; Richard et al. 2003). Makropinocytóza je potvrzena jako transportní cesta pro buňky prostupující peptidy, kam se řadí např. transkripční – transaktivační protein HIV-1 (Deshayes et al. 2005). Tyto peptidy obsahují kolem stovky aminokyselin a jejich společným znakem, který však není podmínkou, je relativně vysoký počet pozitivně nabitých aminokyselin lysinu a argininu ve struktuře peptidu. Náboj kationického peptidu jim umožňuje vysoce interagovat s negativně nabitými místy na plazmatické membráně. Prostup buněčnou membránou není závislý na typu buňky, a tak tyto peptidy skýtají potenciál pro překonávání biologických bariér (Jones 2007).

Fluidní endocytóza jako pravděpodobný mechanismus přenosu somatostatinových analogů byla zvažována v *in vitro* studii s OK buňkami inkubovanými s  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DPhe-oktreotidem. I při použití různých inhibitorů blokujičích přenos peptidů megalinovým systémem docházelo ke kumulaci radiopeptidu v OK buňkách. Hladina detekované radioaktivity v přítomnosti inhibitorů megalinu odpovídala úrovni fluidní endocytózy měřené vychytáváním luciferázové žluti, ukazateli fluidní endocytózy (Barone et al. 2005).

### **2.5.3. SLC a ABC transportéry proximálního tubulu ledvin**

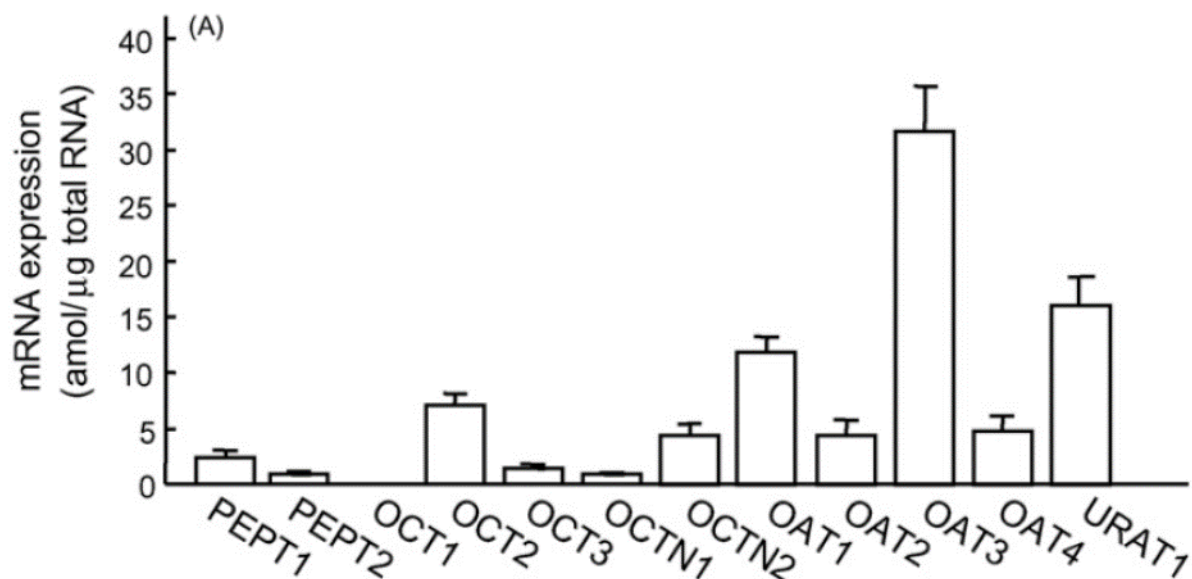
V oblasti proximálního tubulu ledvin je lokalizována řada membránových transportérů z dvou velkých nadrodin označovaných jako SLC (solute carrier) a ABC (ATP-binding cassette) transportéry. Tyto transportéry tvoří složitý transportní systém zajišťující sekreci a reabsorpci endogenních a exogenních látek. Přestup látek typu slabých kyselin či bazí přes basolaterální membránu, probíhá prostřednictvím transportérů pro organické anionty (OAT) 1-3, transportérů pro organické kationty (OCT) 1-3 a polypeptidických transportérů pro organické anionty (OATP). Následně mohou efluxní transportéry na apikální straně tubulárních buněk, jako je MRP (multidrug resistance protein), BCRP (breast cancer

resistance protein), transportér MATE (multidrug and toxic compound extrusion transporter) a MDR (multidrug resistance protein) secernovat látky z buněk do moči (obr. 16). Součinností transportérů na basolaterální a apikální membráně je zajištěna aktivní sekrece látek z krve do moče. Některé typy OAT jsou exprimovány i na apikální straně buněk tubulu, kde např. s transportéry pro peptidy PEPT (peptide transporters) zprostředkovávají reabsorpci látek z moči zpět do buněk tubulu a následně do krevního řečiště (obr. 16) (Klaassen a Aleksunes 2010). Schéma lokalizace a funkce důležitých SLC a ABC transportérů v ledvinách je znázorněna na obr. 17.



**Obr. 16.** Membránová lokalizace SLC a ABC transportérů v proximálním tubulu ledvin

(OATP = organic anion polypeptide transporter, OCT = organic cation transporter, OAT = organic anion transporter, URAT= urate transporter, PEPT = peptide transporter, MRP = multidrug resistance-associated protein, MATE = multidrug and toxin compound extrusion transporter, P-gp = P-glykoprotein, OCTN = organic cation transporter, novel (modifikováno z Giacomini et al. 2010).



**Obr. 17.** Expres transportérů pro organické ionty a pro peptidy v kůře lidských ledvin (Terada a Inui 2007).

## SLC TRANSPORTÉRY

Tato velká nadrodina transportérů zahrnuje necelých 400 členů seskupených do 52 rodin (SLC1-SLC52) v závislosti na jejich struktuře a biologické funkci. Jsou to z velké části influxní transportéry, ačkoliv u některých byl popsán obousměrný přenos (influx i eflux) (Klaassen a Aleksunes 2010). SLC transportéry využívají rozdíl v membránovém potenciálu a uloženou energii ve formě koncentračního gradientu, jako svou hnací sílu (He et al. 2009). Transportéry této nadrodiny mají důležitou roli v mnoha buněčných funkcích a často kooperují s dalšími skupinami proteinů, jako jsou receptory, enzymy a další transportéry (Schlessinger et al. 2013). SLC transportéry přenášejí různé endogenní substráty, exogenní toxiny a léčiva. Proto mohou mít důležitou roli při rozvoji patologických stavů a léčbě nemocí (Abdulhussein a Wallace 2014). Velký význam mají tyto transportní proteiny pro farmakokinetiku léčiv, protože u řady léčiv významně determinují jejich absorpci, distribuci a/nebo eliminaci.

Rodina SLC22 zahrnuje 13 funkčně charakterizovaných membránových proteinů, jejichž společným znakem je 12  $\alpha$ -helikálních transmembránových domén. Do této rodiny patří transportéry pro organické kationty (OCT), transportéry pro organické zwitterionty/kationty (OCTN) a transportéry pro organické anionty (OAT). Transportéry pracují jako jednosměrné přenašeče zprostředkující usnadněnou difúzi (OCT, OCTN), měniče



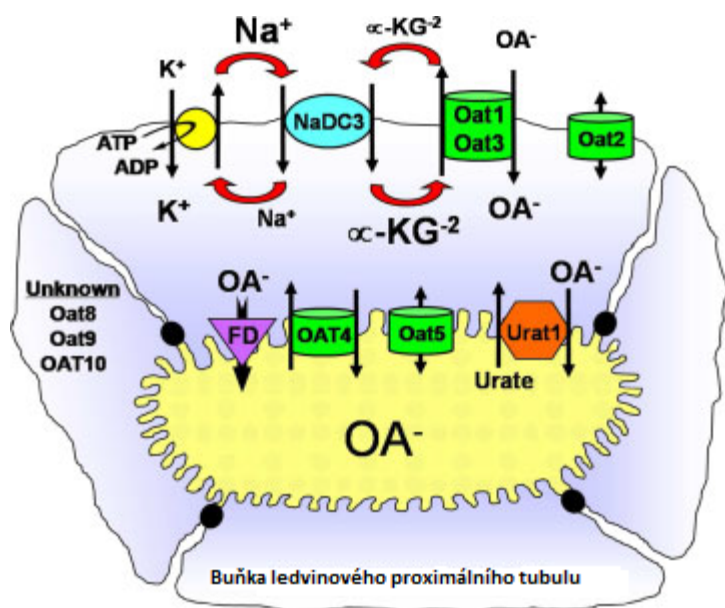
iontů (OAT) a kotransportéry  $\text{Na}^+$ /zwitteriont (OCTN). SLC22 transportéry se podílí na absorpci látek včetně léčiv v tenkém střevě, a na exkreci látek ledvinami a játry. Jsou však i součástí systémů pro udržování homeostázy v mozku a srdci (Koepsell 2013). Přehled významných transportérů patřících do rodiny SLC22 s prokázanou expresí u člověka uvádí tab. 5.

**Tab. 5.** Expresce transportérů ze skupiny SLC22 v orgánech a tkáních člověka (modifikováno z Koepsell 2013 a Wang a Sweet 2013).

Symbol lidského genu	Jméno proteinu	Tkáňová distribuce a buněčná exprese
SLC22A1	OCT1	Játra, tenké střevo, ledviny, plíce, kosterní svalstvo, mozek, tuková tkáň, buňky imunitního systému
SLC22A2	OCT2	Ledviny (bazolaterální membrána proximálního tubulu), tenké střevo, plíce, placenta, mozek, vnitřní ucho
SLC22A3	OCT3	Srdce, kosterní svalstvo, mozek, tenké střevo, játra, plíce, ledviny, močový měchýř, mléčné žlázy, kožní cévy
SLC22A4	OCTN1	Ledviny, střevo, slezina, srdce, kosterní svalstvo, mozek, mléčné žlázy, prostata, dýchací cesty, varlata, oči, sperma, buňky imunitního systému
SLC22A5	OCTN2	Kosterní svalstvo, ledviny (apikální membrána proximálních tubulů), prostata, plíce, slinivka, srdce, tenké střevo, štítná žláza, játra, atd.
SLC22A6	OAT1	Ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů), placenta, mozek
SLC22A7	OAT2	Játra, ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů)
SLC22A8	OAT3	Ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů), mozek, kosterní svalstvo, kost
SLC22A9	OAT7	Játra (bazolaterální membrána)
SLC22A11	OAT4	Ledviny (luminální membrána proximálních tubulů), placenta
SLC22A12	URAT1	Ledviny
SLC22A13	OAT10	Ledviny, tlusté střevo, tenké střevo, mozek, srdce

### 2.5.3.1. Transportéry pro organické kyseliny ( OAT)

OAT jsou poměrně důležitou a početnou skupinou SLC22 transportérů. OAT jsou typicky lokalizovány v plazmatické membráně epiteliálních buněk proximálních tubulů. Některé formy se ovšem vyskytují i mimo ledviny, a to např. v játrech, placentě, nosní sliznici a mozkové bariéře, kde zajišťují specializované funkce (Burekhardt 2012). Lze je charakterizovat jako výměníky mimobuněčných aniontů za vnitrobuněčné. Protože vstup aniontů do buňky probíhá proti vnitřnímu negativnímu membránovému potenciálu, vyžaduje tento proces přísun energie. OAT ji získávají výměnným mechanismem. Vyměňovaným aniontem, jenž je hnací silou, může být u této skupiny transportérů laktát, záporně nabitě mastné kyseliny s krátkým řetězcem, sukcinát či  $\alpha$ -ketoglutarát. Aby bylo možné udržet koncentrace těchto iontů v požadované vnitrobuněčné převaze, jsou opět transportovány dovnitř buněk sodno-laktátovým kotransportérem (Gopal et al. 2004) a sodno-dikarboxylátovým kotransportérem, který se na apikální straně označuje jako NaDC1 a na bazolaterální NaDC3 (Pajor 2006). Příklad transportního mechanismu pro organické anionty zprostředkovaného OAT je znázorněn na obr. 18.



**Obr. 18.** Model typické transportní cesty organického aniontu v buňce proximálního tubulu ledvin. ( $\alpha$ -KG<sup>-2</sup> =  $\alpha$ -ketoglutarát, ADP = adenosindifosfát, ATP = adenosintrifosfát, FD = usnadněná (facilitovaná) difúze, NaDC3 = sodno-dikarboxylátový kotransportér, OA<sup>-</sup> = organický anion, OAT = transportér pro organické anionty (modifikováno z VanWert et al. 2010).

OAT se řadí mezi polyspecifické transportéry, tj. mají širokou substrátovou specifitu. K substrátům patří řada endogenních látek a environmentálních toxinů, které existují ve formě aniontu. Funkce OAT je důležitá pro udržení homeostázy organismu a při rozvoji některých onemocnění. Interindividuální rozdílnosti v terapeutické odpovědi mohou být dány právě pozměněnou afinitou OAT, jinou úrovní exprese či umístěním, jako výsledkem dietních či genetických faktorů (Wang a Sweet 2013). OAT jsou významné i pro transport řady léčiv (diuretika, antihypertenziva, antibiotika, antivirotika, chemoterapeutika atd.), které se při fyziologickém pH nachází ve formě hydrofilního aniontu. Farmakokinetické, farmakodynamické a toxické vlastnosti substrátů těchto transportérů mohou být těmito transportními mechanismy zásadně ovlivněny. Negativní náboj a hydrofilní povaha látky nejsou nutně podmínkou transportu, neboť OAT jsou schopné transportovat i nenabitě, či dokonce kladně nabitě látky (Ahn et al. 2009).

K místu s vysokou expresí a důležitou funkcí OAT patří ledviny, ve kterých bylo detekováno již několik zástupců této skupiny transportérů. Vedle OAT3 a OAT2, patří mezi hlavní OAT transportéry exprimované buňkami proximálního tubulu lidských ledvin především transportér OAT1 (Feng et al. 2010).

### **Transportér OAT1**

OAT1 je transportér exprimovaný primárně na bazolaterální membráně proximálních tubulárních buněk ledvin. Nejvyšší exprese OAT1 byla detekována ve středním segmentu ledvin. U člověka se nachází pouze v ledvinách (Motohashi et al. 2002), zatímco u potkanů byl identifikován i v choroidálním plexu mozku, kosterním svalstvu a placentě (Choudhuri et al. 2003).

OAT1 pracuje jako multispecifický aniontový vyměňovač či antiportér, jehož funkcí je přenášet látky proti koncentračnímu gradientu z krve do buněk proximálního tubulu, odkud jsou následně transportovány do moči. Příjem substrátů do buňky je spojen s transportem dikarboxylátu (např.  $\alpha$ -ketoglutarátu) ven z buňky a to po koncentračním gradientu (Rizwan a Burckhardt 2007). Spolu s dalšími influxními (např. OAT3, OAT4, URAT1) a efluxními (např. MRP) transportéry se podílí na udržení systémových hladin endogenních anionických substrátů jako je např. kyselina močová. Velký význam má OAT1 jako součást systému pro aktivní ledvinnou sekreci léčiv (Koepsell 2013).

Substrátová specifita OAT1 se do velké míry překrývá s OAT3. Obecně jsou to malé, negativně nabitě molekuly, kam patří antibiotika, antivirotika, diuretika, nesteroidní

protizánětlivá léčiva, statiny, urikosurika, metotrexát a mnoho dalších látek. Příklady typů látek, které interagují s OAT1 uvádí tab. 6. O tom, že negativní náboj není absolutní podmínkou transportu pomocí OAT1 svědčí skutečnost, že OAT1 může přenášet i neutrální sloučeniny (např. cimetidin), přestože v těchto případech má k takovým látkám nižší afinitu (VanWert et al. 2010). Typickým standardním substrátem používaným pro *in vitro* testování OAT1 je *p*-aminohipurová kyselina (PAH). Přestože OAT1 transportuje především malé molekuly, může se podílet i na transportu velmi malých peptidů. Prokázaným substrátem je také např. <sup>99m</sup>Tc-merkaptacetyltriglycin (Shikano et al. 2004). Na vysoké sekreci <sup>99m</sup>Tc-tetrapeptidů, která byla prokázána v potkaní ledvině, se OAT transportéry mohou též podílet (Trejtnar et al. (2000). Přestože jsou radioaktivně značené deriváty SST sloučeninami s větší molekulou než uvedené peptidy, některé práce podíl OAT při akumulaci radiopeptidů v ledviných buňkách připouštějí (Gotthardt et al. 2007; Melis et al. 2007).

**Tab. 6.** Typy sloučenin interagujících s hOAT1 (modifikováno z Koepsell 2013).

<b>Endogenní sloučeniny a složky potravy</b>	Středně dlouhé mastné kyseliny, $\alpha$ -ketoglutarát, citrulin, cAMP, cGMP, prostaglandin E <sub>2</sub> , prostaglandin F <sub>2</sub> , kyselina močová, sulfatované flavonoidní konjugáty, hydroxyskořicové kyseliny
<b>Léčiva</b>	Tetracyklíny, acyklovir, adefovir, cidofovir, gancyklovir, tenofovir, zidovudin, cimetidin, ranitidin, bumetanid, furosemid, ibuprofen, indometacin, ketoprofen
<b>Toxiny</b>	Perfluoroktanová kyselina, 8-metoxy-6-nitro-fenantrol[3,4- <i>d</i> ]-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina
<b>Inhibitory</b>	Probenecid, novobiocin, rifampicin, tenofovir

### 2.5.3.2. Transportéry pro organické kationty (OCT)

OCT jsou podobně jako OAT polyspecifické transportéry, které ovšem transportují převážně kladně nabitě organické sloučeniny. Společným strukturálním rysem OCT je 12  $\alpha$ -helikálních transmembránových domén. OCT umožňují vstup látek do buněk pomocí usnadněné difúze. Primární hnací silou, která určuje směr přenosu, je elektrochemický gradient transportovaných organických kationtů, především negativní intracelulární membránový potenciál (Urakami et al. 1998).

Substráty OCT tvoří relativně nízkomolekulární a hydrofilní organické kationty různých molekulárních struktur, které se často vážou na více subtypů OCT. Mezi léčivy jsou substráty antidiabetika (metformin), antivirotika (acyklovir a zalcitabin), antineoplastika (cisplatina) a antagonisté H<sub>2</sub> receptorů (ranitidin) (Klaassen a Aleksunes 2010). Modelovým standardním substrátem, který se nejčastěji používá pro výzkumné transportní *in vitro* studie zaměřené na OCT transportéry, je 1-metyl-4-fenylpyridium (MPP<sup>+</sup>) (Gorboulev et al. 1997). Základní údaje o orgánové a tkáňové expresi jednotlivých typů transportérů ze skupiny OCT je uvedena v tab. 4. Z dosavadních poznatků vyplývá, že zásadním typem OCT, který je odpovědný za pohyb kationtů v ledvinách člověka, je hOCT2 (Motohashi et al. 2002).

### **Transportér OCT2**

OCT2 je ledvinový influxní transportér exprimovaný na bazolaterální membráně buněk proximálních tubulů. Představuje klíčové místo prvního kroku renální sekrece kationických léčiv (Karbach et al. 2000). V ledvinách OCT2 spolupracuje při exkreci látek s transportéry ze skupiny MATE (MATE1 a 2K), které látky transportované pomocí OCT2 do buňky, přenášejí z tubulárních buněk do moče. Přestože je schopný transportovat látky přes buněčnou membránu oběma směry, v *in vivo* podmínkách se chová jako klasický influxní transportér, přenášející látky z krve do buněk proximálního tubulu (Jonker a Schinkel 2004).

Protein OCT2 byl u lidí detekován i v centrálním nervovém systému (Busch et al. 1998), tenkém střevě, plicích, brzlíku, placentě a vnitřním uchu (Koepsell 2004). Exprese u hlodavců vykazuje ve srovnání s člověkem určité rozdíly. Exprese oct2 je u potkanů ovlivněná hormonální regulací, protože u samců je mnohem vyšší a podávání testosteronu samicím výrazně expresi oct2 v potkaních ledvinách zvyšuje (Urakami et al. 2000). OCT2 transportuje především kationty, ale i některé anionické sloučeniny a zwitterionty (Koepsell 2013). Příklady látek interagujících s OCT2 jsou uvedeny v tab. 7.

**Tab. 7.** Příklady látek interagujících s OCT2 (modifikováno z Koepsell 2013).

<b>Endogenní sloučeniny a složky potravy</b>	Acetylcholin, dopamin, adrenalin, noradrenalin, serotonin, histamin, putrescin, cholin, cyklo(His-Pro), salsolinol, agmatin
<b>Léčiva</b>	Memantin, amantadin, oxaliplatin, picoplatina, cisplatin, ifosfamid, cimetidin, famotidin, ranitidin, zalcitabin, lamivudin, amilorid, metformin, berberin
<b>Toxiny</b>	Aflatoxin B1, paraquat, ethidium bromid
<b>Inhibitory</b>	Cimetidin, cetirizin, chinidin, rifampicin, ritonavir

## ABC TRANSPORTÉRY

Název ABC (ATP-binding cassette) transportérů je odvozen od mechanismu jejich činnosti. Disponují doménou pro ATP, jejíž funkcí je hydrolýza ATP na ADP. Při tomto ději se uvolní energie, která je použita na přenos substrátu přes membránu, nejčastěji proti koncentračnímu gradientu. ABC transportéry jsou největší skupinou v rámci transportérových nadrodin. Skupina zahrnuje několik desítek rodin transportérů, které zprostředkovávají různé funkce, jako je extruze škodlivých látek, příjem živin, transport iontů a peptidů a buněčná signalizace (DeGorter et al. 2012; Mao a Unadkat 2015).

ABC transportéry zprostředkovávají přenos široké palety látek s významem pro fyziologické funkce organismu - endogenní živiny i produkty metabolismu. Jejich funkcí je i ochrana tkání před toxickými sloučeninami tělu nevlastními – xenobiotiky. Z tohoto důvodu jsou lokalizovány na důležitých bariérách organismu, kde hrají významnou roli při absorpci, distribuci, metabolismu, exkreci a toxicitě léčiv. ABC transportéry limitují příjem látek s vysokou permeabilitou pasivním transportem a usnadňují exkreci sloučenin s malou schopností prostupovat pasivně (Jani et al. 2014). Mnoho ABC proteinů jsou efluxní transportéry. Za jedny z nejdůležitějších transportérů jsou z hlediska interakce s léčivy v současné době pokládány p-glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1) a BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2) (Mao a Unadkat 2015).

### **P-glykoprotein (P-gp)**

P-gp je efluxní transportér umístěný v plazmatické membráně, který přenáší substráty z buňky ven. Tímto mechanismem významně přispívá k rozvoji lékové rezistence,

která byla prvotně identifikována u nádorové chemoterapie. P-gp je u lidí kódován dvěma geny, a to MDR1 (ABCB1) a MDR3 (ABCB4), ačkoliv ve většině tkání bylo nalezeno více mRNA pro MDR1 (Lincke et al. 1991). Strukturu P-gp tvoří dvě identické části, skládající se z 6 transmembránových domén a jedné domény pro vazbu a hydrolýzu nukleotidu (Aller et al. 2009).

P-gp je fyziologicky exprimován v apikální membráně epitelálních buněk tenkého a tlustého střeva, v membráně buněk jaterních kanálků, v apikální membráně epitelálních buněk proximálního tubulu ledvin, luminální membráně endotelálních buněk tvořících hematoencefalickou bariéru a hematotestikulární bariéru, dále v apikální membráně buněk syncytiotrofoblastu a lymfocytech (Marquez a Van Bambeke 2011). Na všech těchto místech je jeho úkolem chránit citlivou tkáň před toxickými účinky endogenních a exogenních látek. Velmi významná je však jeho exprese řadou typů nádorových buněk (Abdallah et al. 2015).

Jako substráty tohoto transportéru bylo identifikováno mnoho strukturně velice odlišných léčiv. Pozornost zasluhuje i to, že většina substrátů P-gp jsou také substráty CYP3A4, (Wacher et al. 1995). P-gp a CYP3A4 jsou ve vysoké míře exprimovány v tenkém střevě a játrech, což jsou nejdůležitější orgány určující biologickou dostupnost léčiv. Úkolem těchto systémů je zamezit vstupu xenobiotik do organismu a pomoci je eliminovat z těla (Ayrton a Morgan 2001). Na exkreci xenobiotik se díky přítomnosti P-gp v proximálních tubulech mohou podílet i ledviny (Launay-Vacher et al. 2006). Příklady substrátů P-gp ze skupiny léčiv i dalších látek uvádí tab. 8. Ačkoliv peptidy nepatří mezi běžné substráty P-gp, bylo s pomocí *in vitro* studií s izolovanými proximálními tubuly ryb potvrzeno, že fluorescenčně značený derivát oktreotidu je substrátem tohoto transportéru (Gutmann et al. 2000). Mezi P-gp inhibitory patří opět řada léčiv z různých farmakoterapeutických skupin, ale i jiné sloučeniny (tab. 8) (Silva et al. 2014).

**Tab. 8.** Příklady substrátů a inhibitorů P-gp (modifikováno z Silva et al. 2014).

<b>Třída léčiv</b>	<b>Substráty</b>	<b>Inhibitory</b>
Alkylující látky	Chlorambucil, cisplatina	
Analgetika	Morphin, pentazocin, fentanyl	Meperidin, pentazocin
Antagonisté H2	Cimetidin, ranitidin	
Antibiotika	Antracykliny (doxorubicin, daunorubicin), aktinomyciny (aktinomycin D), mytomycin C, mitoxantron	Cefoperazon, ceftriaxon, salinomycin, nigericin, erytromycin, azitromycin, brefeldin A, bafilomycin, klaritromycin, valinomycin
Antidepresiva	Amitriptilin, nortriptilin, doxepin	
Antidiarhoika	Loperamid, oktreotid	
Antiemetika	Ondasetron, domperidon	
Antiepileptika	Topiramát, fenytoin, karbamazepin, fenobarbital	
Antihistaminika	Terfenadin, foxfenadin	Benzquinamid, azelastin, tescmilifen, astemizol, terfenadin
Antihypertensiva	Reserpin, debrisoquin, celiprol, losartan, talinalol, prazosin	Rezerpin, prazosin, doxazosin, carvedilol
Antimetaboly	Metotrexát, cytarabin, 5-fluorouracil, hydroxyurea	
Antimikrobní látky	Erytromycin, doxycyklin, itraconazol, ketokonazol, levofloxacin, rifampicin, sparfloxacin, tetracyklin, grepafloxacin, klaritromycin, gramicidin A, valinomycin	
Antivirotika	Nelfinavir, ritonavir, saquinavir, amprenavir, indinavir	Konkanamycin A, ritonavir, nelfinavir, saquinavir
Ca blokátory	Nifedipin, diltiazem, verapamil, azidopin, nikardipin	Verapamil, emopamil, nifedipin, nicardipine, niguldipin, nitrendipin, nimodipin, felodipin, isradipin, lomerizin, tetrandrin, mibefradil, diltiazem, bepridil
Cyklické peptidy	Valspodar, beauvericin	
Fluorescenční barviva	Rhodamin 123, hoechst 33342, kalcein AM	



Hypolipidemika	Lovastatin, simvastatin	Atorvastatin
Kamptoteciny	Topotekan, irinotekan	
Kardioaktivní glykosidy	Digoxin, digitoxin	
Antiuratika	Kolchicin	
Lineární peptidy	N-acetyl-L-leucyl-L-leucylnorleucinal, leupeptin, pepstatin A	
Myorelaxancia	Vekuronium	
Neuroleptika	Chlorpromazin, fenothiazin	Trans-flupentixol, perphenazin, prochlorperazin, chlorpromazin, trifluoperazin, perospiron, haloperidol
Pesticidy	Metylparatoin, endosulfan, paraquat	
Přírodní látky	Flavonoidy, kurkuminoidy	Flavonoidy, alkaloidy, kumariny, kanabinoidy, terpeny, ginsenosidy
Steroidní hormony	Aldosteron, kortikosteron, dexametazon, kortizol, metylprednizolon	
Taxany	Paklitaxel, docetaxel	
Tyrosin-kinázové inhibitory	Imatinib mesylát	
Vinca alkaloidy	Vinblastin, vinkristin	

## BCRP

BCRP (breast cancer resistance protein), patřící do G rodiny ABC transportérů je kódovaný jedním genem a to ABCG2. Na rozdíl od P-gp jeho strukturu tvoří pouze jedna doména vázající nukleotid a jedna doména membránová (Jani et al. 2014).

BCRP je u člověka fyziologicky exprimován v placentárním syncytiotrofoblastu, apikální membráně buněk epitelu tenkého a tlustého střeva, jaterních kanálcích, apikální membráně proximálních tubulárních buněk, na lumenální straně endoteliálních buněk mozkových kapilár, endoteliálních buňkách sítnice, hematotestikulární a mozkomíšní bariéry (Mao a Unadkat 2015). Z nefyziologického hlediska byl identifikován u mnoha hematologických malignit a solidních tumorů. Nadměrná exprese BCRP je spojována s vyšší rezistencí k cytostatické chemoterapii antracykliny, mitoxantronem či kamptoteciny, která je způsobena zvýšeným efluxem těchto léčiv z buněk (Mao a Unadkat

2005). Stejně jako P-gp, má BCRP velice širokou substrátovou a inhibiční specifitu, která se v mnoha směrech překrývá s P-gp a MRP1 (tab. 9).

**Tab. 9.** Příklady substrátů a inhibitorů BCRP (modifikováno z Jani et al. 2014).

<b>Třída léčiv</b>	<b>Substráty</b>	<b>Inhibitory</b>
Hypolipidemika	Cerivastatin, pravastatin, pitavastatin, rosuvastatin	
Antibiotika	Antracykliny (daunorubicin, doxorubicin), fluorochinolony (ciprofloxacin, danofloxacin, grepafloxacin, norfloxacin, ofloxacin), mitoxantron, nitrofurantoin	
Antineoplastika	Irinotekan, topotekan, daunorubicin, mitoxantron	
Antivirotika	Abakavir, lamivudin, zidovudin, acyklovir	Ritonavir
Imunomodulátory	Metotrexát, leflunomid, teriflunomid	Cyklosporin
Analgetika	Diklofenak	
Diuretika	Chlorothiazid	
H <sub>2</sub> blokátory	Cimetidin	
Fluorescenční barviva	Hoechst 33342, luciferová žluť	
Endogenní substráty	Potravní flavonoidy, porfyriny, estron-3-sulfát	Estron
Kamptoteciny	Topotekan, irinotekan	
Tyrozín-kinázové inhibitory	Imatinib	Imatinib mesylát
Antihypertensiva	Prazosin	
Inhibitory protonové pumpy	Pantoprazol	Omeprazol
Hypolipidemika	Lovastatin, simvastatin, rosuvastatin	

### 3. Cíle práce

- S využitím *in vitro* metod posoudit roli několika transportních mechanismů, které se mohou potenciálně podílet na uptake receptorově specifických radiopeptidů v ledvinných buňkách. Pomocí buněčných modelů zjistit úlohu aktivní endocytózy megalinovým systémem, fluidní endocytózy a významných ledvinných SLC transportérů hOAT1 a hOCT2 na transportu vybraných radiopeptidů ze skupiny analogů SST, gastrinu a bombesinu značených <sup>177</sup>Lu.
- Provést *in vitro* studii zaměřenou na transport studovaných radiopeptidů efluxními transportéry P-gp a BCRP.
- Zjistit možnou účast studovaných transportních mechanismů na transmembránovém transportu vybraných radiometabolitů receptorově specifických peptidů a porovnat transportní mechanismy radiometabolitů s nálezy u intaktních radiopeptidů.
- Posoudit vztah mechanismu/ů transportu radiometabolitů k jejich ledvinnému uptake a farmakokinetice *in vivo* v kontextu s příslušnými intaktními radiopeptidy.
- Zavést či optimalizovat metody potřebné ke studiu transportu vybranými transportními systémy *in vitro* a metody pro značení radiopeptidů a jejich metabolitů vybraným radionuklidem.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Použité přístroje a vybavení

Pro buněčnou kultivaci bylo použito následujícího materiálu: 6, 24, 96jamkové destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), jednorázové plastové pipety, 2, 5, 10, 25 ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), kultivační lahve 25, 75 a 150 cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) a polykarbonátové membránové inzerty, velikost pórů 0,4 μm (Corning Life Science, New York, USA). Membránový potenciál a rezistence epiteliálních buněk byla měřena Micro ohmmetrem Millicell ERS (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Pasážování a další manipulace s buněčnými liniemi byly prováděny v laminárním boxu (Micrological safety cabinet TOP - SAVE 1.8, Bioair instruments, Miláno, Itálie). Pro kultivaci buněčných linií a inkubaci při transportních studiích byl použit standardní inkubátor s atmosférou CO<sub>2</sub> (Shel Lab, Cornelius, USA). Konfluence buněk a jejich stav byl kontrolován pomocí inverzního mikroskopu OPTIKA Microscopes, XDS – 1R (OPTIKA Microscopes, Ponteranica, Itálie).

Pro měření aktivity  $\gamma$ -zářičů a  $\beta$ -zářičů ve vzorcích bylo použito automatického gama-spektrometru 2480 Wizard2 (PerkinElmer, USA) a beta spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Shelton, USA). Stanovení radiochemické čistoty připravených radiopeptidů metodou HPLC bylo prováděno s pomocí systému skládajícího se ze sestavy Agilent 1100 HPLC Value System (Agilent Technologies, Böblingen, Německo), kolony LiChroCART 250-3 HPLC Cartridge LiChrospher 100RP, 5μm (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) a radiodetektoru POLON URL-2 (Polon-Alfa Bydgoszcz, Polsko). Radiochemická čistota radiopreparátů peptidů byla ověřována také na TLC skeneru Rita Star (Raytest, Německo). Odečty absorbance a fluorescence vzorků na kultivačních destičkách byly prováděny s pomocí destičkového analyzátoru (TECAN, Infinite M200, Männedor, Švýcarsko). Pro Western blotting bylo použito zařízení pro elektroforézu Power Pac HC (Bio Rad, Velká Británie).

#### 4.1.2. Použité chemikálie

Studované peptidy DOTA-NOC, DOTA-TATE, DOTA-DPhe a DOTA-DGlu-Ala-Tyr byly dodány firmou piCHEM (Graz, Rakousko), DOTA-sargastrin firmou ABX (Radeberg, Německo). DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin, DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesin and PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin byly poskytnuty Ing. Milošem Beranem (Institut nukleární fyziky,

Akademie věd ČR, Praha, Česká republika). MAG3 (merkaptacetiltryglycin) a DMSA (dimerkaptosukcinát) byly dodány firmou Lacomed (Řež, Česká republika). Standardní substrát hOAT1 transportéru ( $^3\text{H}$ )*p*-aminohippurová kyselina ( $^3\text{H}$ )PAH; specifická radioaktivita 4,56 Ci/mmol) a  $^{177}\text{LuCl}_3$  používané pro značení peptidů byly získány od Perkin Elmer (Waltham, USA).  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  pro značení bylo získáno elucí z  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generátoru (Mallinckrodt Medical, Dublin, Irsko). Standardní substrát OCT2 transportéru ( $^3\text{H}$ )methyl-4-fenylpyridinium acetát ( $^3\text{H}$ )MPP<sup>+</sup> specifická radioaktivita 80 Ci/mmol) byl dodán firmou American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, USA).

Substrát pro efluxní transportéry Hoechst 33342 a specifický inhibitor transportéru BCRP KO143 byly získány ze Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Specifický inhibitor transportéru P-gp LY335979 byl dodán firmou Karl Schmid (Mnichov, Německo). Specifický inhibitor megalinu RAP byl získán z PROGEN Biotechnik (Heidelberg, Německo). Ostatní chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Pro kultivace buněk bylo použito kultivační médium Eagle's minimum essential medium nebo Dulbecco's modified Eagle's medium, L-glutamin, neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a fetální sérum (PAA, Pasching, Rakousko). DMSO (dimethylsulfoxid > 99,9 %) a trypsin (0,25 %, Trypsin - EDTA Solution) pocházely od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Chemikálie na přípravu fosfátového pufru (PBS) NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, byly získány od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika).

Expresní plazmid pro lidský OAT1 (SLC22A6) transkripční varianta 2, expresní plazmid pro lidský OCT2 (SLC22A2) a prázdný vektor pCMV6-Entry byly získány od firmy OriGene Technologies (Rockville, USA) a následně amplifikovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika).

Pro Western blotting byla použita polyvinilidenová (PVDF) membrána (Sigma-Aldrich). Primární králičí protilátka proti megalinu byla darována prof. D. Biemesderferem (Yale University, USA). Sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou byla dodána firmou Sigma Aldrich. K detekci proteinu byl použit chemiluminiscenční reagent (Thermo Scientific, USA).

## 4.2. Buněčné linie

K experimentům byla použita buněčná linie lidských epiteliálních buněk z nádoru děložního hrdla (HeLa buňky), ledvinné buňky vačice (OK buňky), buňky proximálního tubulu ledvin prasete (LLC-PK1 buňky), lidské placentární buňky (JEG-3 buňky) a

Madin-Darbyho psí ledvinné buňky (MDCKII buňky). Tyto standardní buněčné linie byly získány z European Collection of Cell Cultures (ECAAC, Salisbury, UK). MDCKII buněčné linie se stabilně vysokou expresí transportéru P-gp či BCRP byly laskavě poskytnuty prof. P. Pávkem z Katedry farmakologie a toxikologie, FaF UK (Hradec Králové, Česká republika). Všechny buněčné linie byly pasážovány každé čtyři dny, či při konfluentním pokrytí kultivační lahve dle potřeby. Buňky byly kultivovány v inkubátoru v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> při 37°C. Kultivační médium bylo zvoleno dle doporučení dodavatele buněčné linie.

Při pasážování buněčné linie bylo nejprve odstraněno přítomné kultivační médium, buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrům a následně byl přidán 0,25% roztok trypsin/EDTA. Po částečném uvolnění buněk bylo médium s trypsinem odsáto a buňky byly suspendovány v čerstvém mediu. Část suspenze byla vložena do nové kultivační lahve a část použita na experimenty.

### **4.3. Použité metody**

#### **4.3.1. Transfekce**

Pro tranzientní transfekci příslušným plazmidem byla vybrána buněčná linie, která dle literárních údajů exprimuje daný transportér ve velmi nízké či zanedbatelné míře. Tato skutečnost byla potvrzena nízkou akumulací typického substrátu příslušného transportéru v mateřských buňkách. Výběr optimálního buněčného modelu pro přechodnou transfekci byl proveden vždy alespoň ze 4 potenciálně vhodných buněčných linií. Z těchto linií byla k následujícím experimentům vybrána ta, u které jsme po transfekci příslušným transportérem pozorovali nejvyšší nárůst akumulace typického substrátu vůči kontrole. Pro přechodnou transfekci plazmidem hOAT1 se jevila jako nejvhodnější linie HeLa, pro transfekci plazmidem hOCT2 byla optimální linie MDCKII.

Při rutinní transfekci byly buňky vysety na 24jamkovou destičku (7 x 10<sup>4</sup> HeLa buněk, 2 x 10<sup>5</sup> MDCKII buněk/jamka) a následující den byl k buňkám přidán plazmid kódující studovaný transportér v transfekčním roztoku Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) dle pokynů výrobce. Jako kontrola byla použita přechodná transfekce mateřských buněk prázdným vektorem (pCMV6-Entry). Množství DNA, které bylo zjištěno jako optimální pro rutinní transfekci, bylo 0,4 µg na jamku. Optimální poměr transfekčního roztoku, který byl přidáván při transfekci byl 1 : 2,5 pro hOAT1 a 1 : 2 pro hOCT2. Kontrolní buňky byly transfekovány prázdným vektorem a inkubovány za podmínek shodných jako buňky transfekované hOAT1 či hOCT2. Transportní experimenty byly prováděny 24 h po

transfekci u buněk MDCKII transfekovaných hOCT2 a 48 h u buněk HeLa transfekovaných hOAT1.

Zvýšení exprese studovaného transportéru bylo ověřeno metodou Western blotting a pomocí funkčních akumulčních testů využívajících radioaktivně značený substrát příslušného transportéru (viz kapitola 4.3.2).

Experimenty s geneticky modifikovanými mikroorganismy byly prováděny v souladu s právními předpisy z oblasti nakládání s geneticky modifikovanými organismy a jejich produkty.

### 4.3.2. Western blotting

Součástí předkládané disertační práce bylo ověření exprese megalinového transportéru ve vybraných buněčných modelech. Stanovení bylo provedeno u tří buněčných linií – OK, LLC-PK1 a JEG-3, u kterých byla exprese megalinu prokázána jinými autory (Nagai et al. 2011; Nielsen et al. 2001; Liu et al. 1998). Jako porovnávací vzorky byly použity nativní izolované ledvinné potkaní buňky a nativní ledvinná tkáň prasete a potkana. Ověření exprese transportéru hOAT1 po přechodné transfekci HeLa buněk a hOCT2 po přechodné transfekci MDCKII metodou Western blotting je uvedeno v dizertační práci Mgr. Jany Mandíkové (Mandíková 2015).

Pro přípravu vzorků proteinů byly studované buněčné kultury lyzovány v kultivační lahvi lyzačním roztokem obsahujícím Tris-HCl (10 mM), sacharózu (250 mM), EDTA (1 mM) a směs inhibitorů (0,5 µg/ml leupeptinu, 2 µg/ml aprotininu, 50 µg/ml benzamidinu a 40 µg/ml fenylmethylsulfonyl fluoridu) (Sigma-Aldrich). Vyjmuté prasečí a potkaní ledviny byly homogenizovány pomocí homogenizátoru (Ultra Turrax Tube Drive, IKA, SRN) a poté byly preparáty lyzovány shodným způsobem jako buněčné kultury. Po homogenizaci byla suspenze za chlazení (4 °C) centrifugována 10 min při 10 000 g. V proteinovém extraktu přítomném v supernatantu buněčného lyzátu buněk bylo metodou BCA změřeno množství proteinu.

Elektroforéza probíhala na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným, pro separační gel byla po optimalizaci zvolena koncentrace 6,25%. Na každou jamku gelu bylo nanášeno 9 µg proteinu ze získaného proteinového extraktu. Proteiny z gelu byly následně přeneseny na polyvinilidenovou membránu. Následovala 16 hodinová inkubace membrány s primární protilátkou rozpuštěnou v roztoku TBS (Tris 2,42 g, NaCl 9,0 g, 1 M HCl 3,8 ml, destilovaná voda do objemu 1l) s 5 % nízkotučného sušeného mléka (Bio Rad, USA) a

0,05 % Tweenu (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemí). Ředění primární antimegalinové protilátky bylo optimalizováno na 1:8000. Kontrola nanášky vzorku byla provedena protilátkou proti  $\beta$ -aktinu, v ředění 1:5000. Po promytí membrány byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou a to v ředění 1:2000 pro membránu určenou k detekci megalinu a 1:8000 pro membránu s detekcí  $\beta$ -aktinu. Po dalším promytí byly membrány rovnoměrně překryty chemiluminiscenčním roztokem SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, Rockford USA a obrazy byly zachyceny na X-ray film.

### 4.3.3. Značení peptidů $^{177}\text{Lu}$

Značení studovaných peptidů bylo prováděno modifikovaným postupem vycházejícím z již dříve vyvinutých metod, zahrnujících zahřátí reakční směsi, při kterém dochází ke konformačním změnám umožňujícím chelataci (Breeman et al. 2003; Koumarianou et al. 2009). Peptidy byly rozpuštěny v destilované vodě v koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a následně byly smíseny 3  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku s 30  $\mu\text{l}$  0,4 M acetátového pufru a 1,25 mCi  $^{177}\text{LuCl}_3$ . Pro značení DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu, PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu a gastrinových peptidů byl použit acetátový pufr o pH 4,5; pro značení SST peptidů, DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesinu, DOTA-DPhe a DOTA-DGlu-Ala-Tyr měl pufr pH 5,0. Reakční směsi s DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinem a PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinem byly inkubovány při 42 °C 40 min, reakce pro značení DOTA-sargastrinu probíhala 25 min při 80 °C. V případě DOTA-NOC, DOTA-TATE, DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesinu, DOTA-DPhe a DOTA-DGlu-Ala-Tyr bylo zahřívání prováděno 30 min při 92 °C. Po ukončení reakčního intervalu byla směs pomalu zchlazena. Předběžnými experimenty bylo zjištěno, že optimální čas chladnutí je pro všechny peptidy 30-40 min při teplotě místnosti. Značené peptidy byly připravovány v množství potřebném pro provedení experimentů v daném dni.

Radiochemická čistota připraveného peptidu byla ihned po přípravě před použitím v experimentech ověřována pomocí dvou analytických metod – instantní tenkovrstvé chromatografie na silikagelu (ITLC-SG) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), dle postupů již dříve popsanych (Trejtnar et al. 2008). Radiochemická čistota radiopeptidů použitých k experimentální práci byla vždy vyšší než 95 %.



### **Stanovení radiochemické čistoty pomocí ITLC**

K vyšetření radiochemické čistoty preparátů radiopeptidů bylo 0,5  $\mu$ l vzorku nanášeno na chromatografické proužky tvořené skleněnými mikrovláknými potaženými silikagelem (Varian, USA). Tyto desky byly vyvíjeny ve fázi připravené z 0,1 M octanu amonného s 10 mM EDTA. V této soustavě zůstává nerozpustný značený peptid na startu, zatímco volný radionuklid putuje s čelem vyvíjecí fáze. Druhá vyvíjecí fáze byla tvořena vodným roztokem 10% hydroxidu amonného ve směsi s metanolem v poměru 1:1. Radioaktivně značený peptid zde putuje s čelem vyvíjecího činidla a nenavázaný radiokov zůstává na startu chromatogramu. Distribuce radioaktivity na vyvinutých chromatogramech byla hodnocena s pomocí TLC skeneru.

### **Stanovení radiochemické čistoty pomocí HPLC**

Radiochemická čistota byla dále ověřována pomocí HPLC. Na kolonu byl nanášen nástřík tvořený 1  $\mu$ l značeného peptidu smíseným s mobilní fází. Pro HPLC stanovení byla využita gradientová eluce s dvěma fázemi: mobilní fáze A obsahovala 0,1 % trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodě, mobilní fáze B byla tvořena stejným množstvím TFA v acetonitrilu. Gradientová eluce probíhala v následujícím uspořádání: 0-6 min 0 % B, 6-15 min 0-80 % B, 15-20 min 80 % B, 25-35 min 80-0 % B. Průtok mobilní fáze byl během eluce nastaven na 1 ml/min.

## **4.3.4. Transportní studie *in vitro***

### **4.3.4.1. Posouzení podílu aktivních a pasivních transportních procesů na buněčné kumulaci radiopeptidů**

Pro posouzení celkového příspěvku aktivních a pasivních transportních procesů k buněčné kumulaci byla testována akumulace radioaktivně značených peptidů v ledvinných buňkách při teplotě 37 °C a při nízké teplotě, inhibující energeticky závislé aktivní transportní procesy. K experimentům byly použity LLC-PK1 buňky ( $4 \times 10^4$  buněk/jamka) v intervalu 24 h po vysetí na 24jamkovou destičku. Buňky byly opláchnuty transportním médiem obsahujícím 122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,5 mM glukózy a 10 mM HEPES o pH 7,4. Poté bylo k buňkám přidáno 250  $\mu$ l/jamku tohoto roztoku s přidáním radiopeptidem (0,02  $\mu$ g peptidu s aktivitou  $\approx 0,4$   $\mu$ Ci). Buňky byly s peptidem inkubovány 0, 30, 60 a 120 min při teplotě 37 °C a 4 °C. Po uplynutí inkubačního intervalu bylo médium odstraněno a buňky šestkrát opláchnuty vychlazeným STOP roztokem (0,137 M

NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4). Následně byly buňky inkubovány 15 min při teplotě 37 °C s lyzačním roztokem (0,5% Triton X-100 v 0,1 M NaOH). Z každé jamky byl odebrán vzorek pro stanovení proteinu a zbylý obsah jamky byl kvantitativně přenesen do zkumavky. Radioaktivita v těchto vzorcích byla měřena na gama-spektrometru a výsledky byly vyjádřeny jako % akumulované dávky vůči obsahu proteinu. Experimenty byly prováděny v triplicátu ve dvou nezávislých experimentech.

#### **4.3.4.2. Transport radiopeptidů SLC transportéry**

Experimenty byly prováděny na 24jamkových deskách s buňkami HeLa přechodně transfekovanými hOAT1 a buňkami MDCKII přechodně transfekovanými hOCT2. Uptake radiopeptidů v těchto buňkách byl porovnáván s kumulací radiopeptidů v kontrolních parentních buňkách (HeLa a MDCKII transfekovaných prázdným vektorem. K experimentům byly použity buňky při 90% konfluenci. HeLa buňky byly na desky vysety v množství  $18 \times 10^4$  buněk/jamka, MDCKII v množství  $4 \times 10^5$  buněk/jamka. Inkubace s radiopeptidy probíhala při 37 °C v intervalech 0, 30, 60 a 120 min. Po skončení inkubace byly buňky opláchnuty vychlazeným STOP roztokem a byla provedena jejich lyzace přidáním lyzačního roztoku. Po přidání scintilačního roztoku k získaným vzorkům (Ultima Gold, Sigma Aldrich) byla měřena jejich radioaktivita pomocí gama-spektrometru. K ověření účinnosti transfekce HeLa buněk hOAT1 byl použit standardní substrát OAT ( $^3\text{H}$ )PAH o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  a aktivitě 1  $\mu\text{Ci/ml}$  a substrát  $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG3}$  připravený dle návodu dodavatele. Pro ověření efektivity transfekce MDCKII buněk hOCT2 jsme použili ( $^3\text{H}$ )MPP<sup>+</sup> o stejné aktivitě i koncentraci. Látky byly rozpuštěny ve stejném transportním médiu jako testované peptidy a jejich inkubace s testovanou linií trvala 15 min při 37 °C. Po oplachu a lýze buněk a přidání scintilačního roztoku ke vzorkům (Ultima Gold, 1 ml) byla měřena radioaktivita v buňkách kumulovaného substrátu pomocí beta-spektrometru.

#### **4.3.4.3. Transport radiopeptidů megalinem**

Pro transportní studie zkoumající úlohu megalinového endocytárního receptoru při uptake radiopeptidů byly na základě stanovení exprese megalinu ve vybraných buněčných liniích Western blottingem (výsledky viz kapitola 5.1.2) vybrány LLC-PK1 buňky. Buňky byly vysety na 24jamkovou desku ( $8 \times 10^4$  buněk/jamka) a 24 h poté použity pro transportní experimenty. Pro testování role endocytózy zprostředkované megalinem jsme použili

inhibiční studii se specifickým inhibitorem megalinu – RAP v koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Tato koncentrace je dle dostupných literárních zdrojů dostačující k výrazné inhibici zmíněného transportního systému (Sengul et al. 2013). Buňky byly s RAP preinkubovány 15 min při 37 °C a následně byl přidán testovaný radiopeptid v množství 0,02  $\mu\text{g}$  na jamku. Inkubace pokračovala 60 min za stejné teploty a byla ukončena stejným způsobem jako v experimentech zaměřených na uptake radiopeptidů SLC transportéry (část 4.3.4.2). Zpracování vzorků a měření kumulovaného množství radiopeptidu probíhalo též shodným postupem.

V další inhibiční studii byl použit jako inhibitor megalinového transportu albumin. LLC-PK1 buňky byly preinkubovány 10 min s vybranými koncentracemi albuminu (0-100 mg/ml), následně byl přidán zkoumaný radiopeptid a po inkubaci 60 min při 37 °C bylo shodným postupem jako v předcházejících studiích, zjištěno kumulované množství radiopeptidů v buňkách.

#### **4.3.4.4. Transport radiopeptidů fluidní endocytózou**

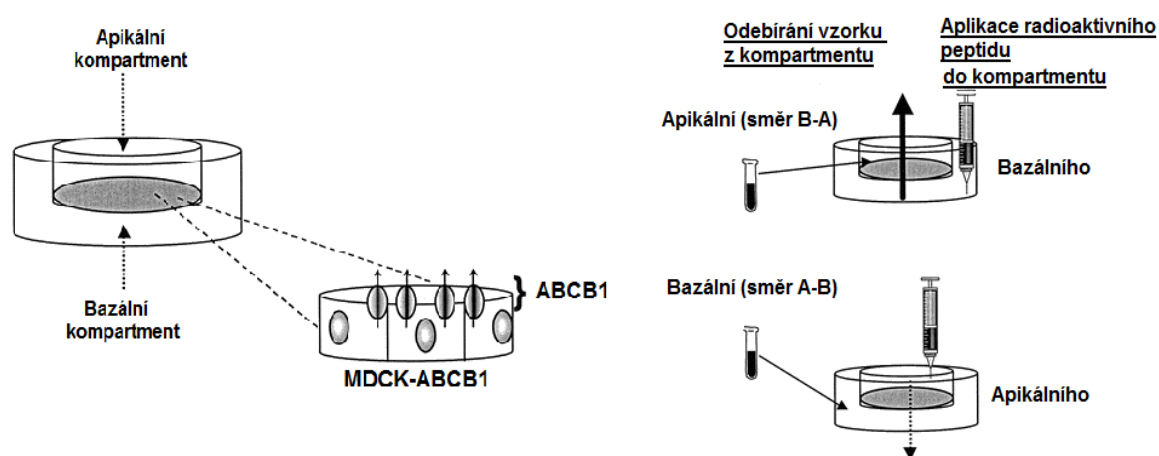
K posouzení možného příspěvku fluidní endocytózy k transportu radiopeptidů do buněk byla provedena inhibiční studie se specifickým inhibitorem tohoto mechanismu – rottlerinem (Sarkar et al. 2005) v koncentracích 0-5  $\mu\text{M}$ . LLC-PK1 buňky byly s tímto inhibitorem preinkubovány 45 min při 37 °C a následně byl přidán radiopeptid (0,02  $\mu\text{g}$ /jamka) v roztoku transportního média a inkubace pokračovala dalších 60 min při 37 °C.

#### **4.3.4.5. Transport radiopeptidů ABC transportéry**

Pro zjištění interakce radiopeptidů a radiometabolitů byl proveden pilotní pokus pomocí membránových inzertů. MDCKII buňky se zvýšenou expresí P-gp (MDCKII<sup>P-gp</sup>) nebo BCRP (MDCKII<sup>BCRP</sup>) a kontrolní parentní MDCKII buňky byly vysety na polykarbonátové membránové inzerty o velikosti pórů 0,4  $\mu\text{m}$  v 6jamkové desce ( $1,5 \times 10^6$  buněk/inzert). Čtvrtý den po vysetí buněk na inzerty, pokud byla detekována nepropustnost buněčné vrstvy ohmmetrem, byly tyto buňky použity k experimentům. Schématické znázornění buněčného inzertu je patrné na obr. 19.

Jednu hodinu před započítím experimentu bylo kultivační médium vyměněno za transportní médium (1,5 ml do apikálního (A) i bazolaterálního (B) kompartmentu). Zkoumaný radiopeptid byl přidáván v množství 60  $\mu\text{l}$ /inzert (0,06  $\mu\text{g}$ /inzert) do horního nebo do dolního kompartmentu (v závislosti na typu experimentu). Poté probíhala inkubace při

37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. V intervalech 30 min, 1 h, 2 h a 3 h po přidání peptidu byl z opačného kompartmentu odebrán vzorek média (50 µl). Po uplynutí intervalu 3 h byl proveden odběr vzorků média z obou kompartmentů. Po důkladném oplachu membrány vychlazeným STOP roztokem (složení viz kap. 4.3.4.1) byly membrány vyříznuty a vloženy do zkumavky s 1 ml lyzačního roztoku. Po inkubaci 15 min při 37 °C byl obsah důkladně promíchán a byl odebrán vzorek 50 µl pro stanovení obsahu proteinu. Následně byla měřena radioaktivita membrán a odebraných vzorků média gama-spektrometrem. Pro stanovení možné interakce radiopeptidů se zkoumanými transportéry bylo porovnáno množství radioaktivity prošlé ve směru A→B a B→A. Na základě těchto dat byl posouzen příspěvek transportérů k transportu radiopeptidů.



**Obr. 19.** Schematické znázornění buněčného inzertu a způsobů aplikace testované látky.

### 4.3.5. Farmakokinetické studie *in vivo*

#### 4.3.5.1. Stanovení biodistribuce radiopeptidů

Samci potkana rodu Wistar (Biotest, Konárovice, Česká republika) vážící 260–320 g byli použiti pro experimenty s <sup>177</sup>Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr a <sup>177</sup>Lu-DOTA-MG11. Samci vážící 310–365 g byli použiti pro experimenty s <sup>177</sup>Lu-DOTA-DPhe a <sup>177</sup>Lu-DOTA-NOC. Zvířatům byla den před experimentem odebrána strava, ale byl jim ponechán volný přístup k vodě.

Radiopeptidy byly aplikovány do ocasní žíly v dávce 1 µg peptidu/kg o aktivitě 0,5-1 MBq/kg. Bylo použito 5 skupin potkanů, u kterých byl prováděn odběr orgánů ve vybraných časových intervalech - 5 min, 1 h, 2 h, 24 h nebo 48 h po aplikaci. V anestezii byla zvířatům přestřížena krční tepna, odebrány vzorky krve, jednotlivé orgány byly vyjmuty, zváženy a změřena radioaktivita automatickým gama-spektrometrem. Radioaktivita

kumulovaná v jednotlivých orgánech a tkáních byla vztažena na hmotnost orgánu a vyjádřena jako podíl z celkové aplikované dávky.

Experimenty se zvířaty byly prováděny v souladu s platným zněním zákona o ochraně zvířat a byly schváleny odbornou komisí Farmaceutické fakulty Karlovy univerzity v Praze a MŠMT ČR.

#### **4.3.5.2. Stanovení eliminace radiopeptidů *in vivo***

Testované radiopeptidy byly aplikovány shodným způsobem a v totožné dávce jako v případě biodistribučních studií (část 4.3.5.1). Zvířata byla po aplikaci radiopeptidu umístěna do skleněných metabolických klecí, jejichž konstrukce umožňuje separaci moče a trusu. Během pobytu v kleci měla zvířata volný přístup k pitné vodě a standardní potravě. Po 2 hod od aplikace byla zvířata imobilizací přinucena vyprázdnit svůj močový měchýř a moč byla přenesena do lahvičky a zvířata vrácena zpět do klecí. Exkreta byly sbírány dalších 24 h a po odběru ještě dalších 24 h. Na základě měření radioaktivity ve vzorcích moče a trusu bylo stanoveno množství radiopeptidu exkretované za odběrový interval ve vztahu k aplikované dávce a byla vypočtena kumulativní exkrece radioaktivity močí a trusem.

### **4.4. Statistická analýza**

Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot byla hodnocena nepárovým t-testem a two – way ANOVA testem. Statistická významnost rozdílů mezi experimentálními skupinami byla ověřována na hladině významnosti  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,001$  (\*\*\*)

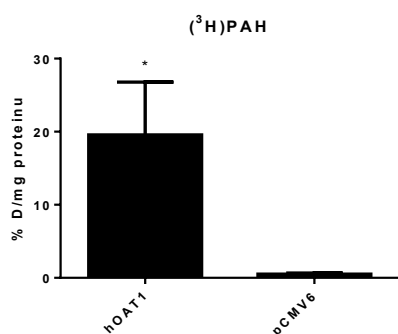
## 5. Výsledky

### 5.1. Validace buněčných modelů

#### 5.1.1. Ověření účinnosti tranzientní transfekce hOAT1 a hOCT2

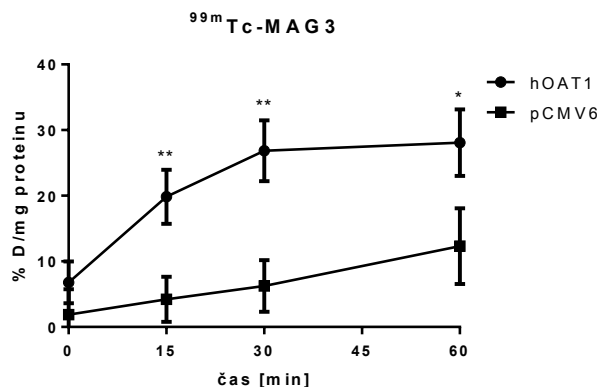
Účinnost transfekce byla během experimentální práce ověřována průběžně v každé sadě experimentů funkčním testem, založeným na porovnání uptake standardního substrátu daných transportérů v preparátech buněk, transfekovaných transportérem nebo prázdným vektorem.

Jako nejvhodnější pro transfekci studovaného transportéru hOAT1 se v optimalizačních studiích se substrátem ( $^3\text{H}$ )PAH ukázala být linie HeLa buněk. Ta v parentní formě kumuluje daný substrát jen v minimálním množství, zatímco 48 h po přechodné transfekci expresním vektorem pro hOAT1 se množství ( $^3\text{H}$ )PAH akumulované uvnitř buněk signifikantně zněkolikanásobí (obr. 20).

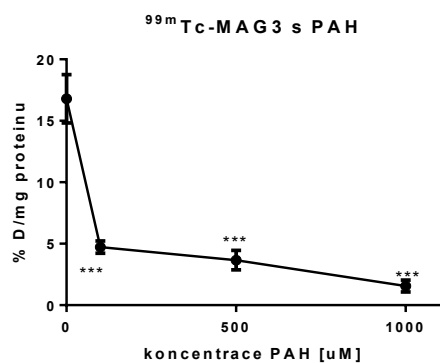


**Obr. 20.** Reprezentativní příklad kumulace ( $^3\text{H}$ )PAH v buňkách HeLa přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 a prázdným vektorem pCMV6 po 15 minutové inkubaci. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD množství akumulovaného radioaktivního substrátu ( $n=3$ ). \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ .

Účinnost transfekce byla také ověřena na úrovni exprese proteinu metodou Western blotting (Mandíková 2014). Autorka této disertační práce dále ověřila funkčnost transfekovaného modelu použitím substrátu hOAT1 ze skupiny peptidů –  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3. Tento experiment ukázal signifikantně vyšší kumulaci  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 v HeLa buňkách transfekovaných hOAT1 oproti obsahu této látky v HeLa buňkách transfekovaných prázdným expresním vektorem (obr. 21). Akumulace  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 byla účinně inhibována PAH (obr. 22). Tento substrát hOAT1 signifikantně inhiboval akumulaci  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 již v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .



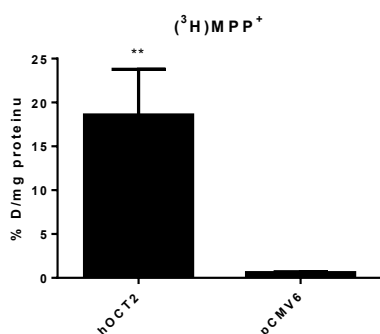
**Obr. 21.** Kumulace <sup>99m</sup>Tc-MAG3 v buňkách HeLa přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 a prázdným vektorem pCMV6. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulovaného radioaktivního substrátu (n=3). \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Obr. 22.** Inhibice kumulace <sup>99m</sup>Tc-MAG3 v buňkách HeLa přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 standardním substrátem PAH. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulovaného radioaktivního substrátu (n=3). \*\*\* označují statistickou významnost na hladině  $p < 0,001$ .

V optimalizačních studiích bylo nejvyšší účinnosti přechodné transfekce expresním vektorem pro hOCT2 dosaženo u buněčné linie MDCKII. Linií HeLa se nepodařilo tímto transportérem účinně transfekovat ani při použití jiných transfekčních činidel a metod (jetPEI, TransFectin Lipid Reagent, K2 Transfection System, Neon Transfection System). Ověření účinnosti transfekce bylo prováděno při každém experimentu funkčním testem, který spočíval v inkubaci MDCKII buněk transfekovaných hOCT2 nebo prázdným vektorem pCMV6 se standardním substrátem hOCT2 – (<sup>3</sup>H)MPP<sup>+</sup>. Transfekce vedla k násobnému zvýšení akumulace (<sup>3</sup>H)MPP<sup>+</sup> v MDCKII buňkách transfekovaných hOCT2 transportérem, což

dokumentovalo přítomnost funkčního transportéru. Reprezentativní příklad ukazující zvýšení akumulace standardního substrátu hOCT2 je uveden na obr. 23.

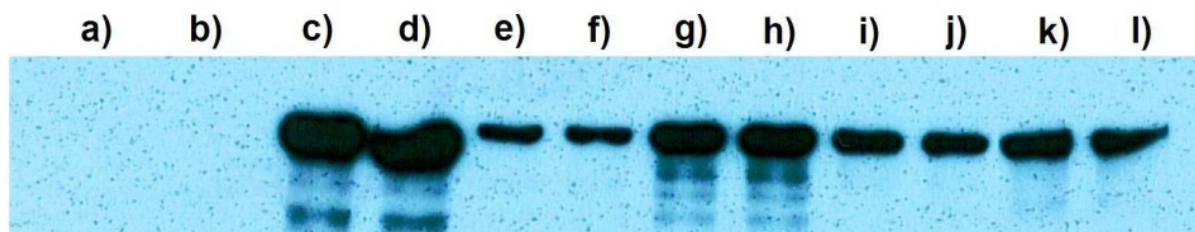


**Obr. 23.** Kumulace  $(^3\text{H})\text{MPP}^+$  v buňkách MDCKII přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOCT2 a prázdným vektorem pCMV6 po inkubaci 15 min. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD množství akumulovaného radioaktivního substrátu (n=3). \*\* označují statistickou významnost na hladině  $p < 0,01$ .

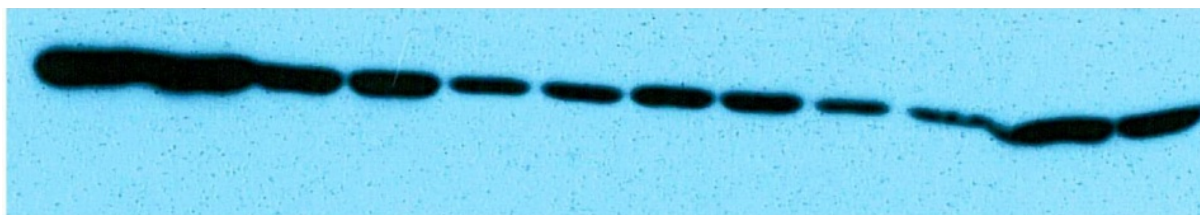
### 5.1.2. Ověření exprese megalinu v buněčných modelech

Pro výběr vhodného buněčného modelu se signifikantní expresí megalinu, bylo provedeno porovnání exprese megalinu v dostupných liniích s jeho deklarovanou expresí, metodou Western blotting. Expese megalinu byla ověřena u tří buněčných linií - OK, LLC-PK1 a JEG-3 a jako porovnávací vzorky byly použity vzorky nativních tkání - izolované ledvinné potkaní buňky a intaktní ledvinná tkáň potkana a prasete (obr. 24). Kontrola nanášky vzorku byla provedena protilátkou  $\beta$ -aktinem (obr. 25). Pomocí této metody jsme potvrdili významnou expresi sledovaného megalinového endocytárního receptoru v buněčných liniích LLC-PK1 a JEG-3. V buněčné linii OK nebyla expese megalinu s pomocí metody Western blotting potvrzena. Srovnávací vzorky potkaních buněk a prasečích ledvin vykazovaly též výraznou expresi megalinu (obr. 24).





**Obr. 24.** Exprese megalinu v buněčných liniích OK (a, b) LLC-PK1 (c, d) a JEG-3 (k, l). Jako srovnávací vzorky byly použity izolované buňky potkana (g, h), nativní ledvinná tkáň potkana (i, j) a prasete (e, f).

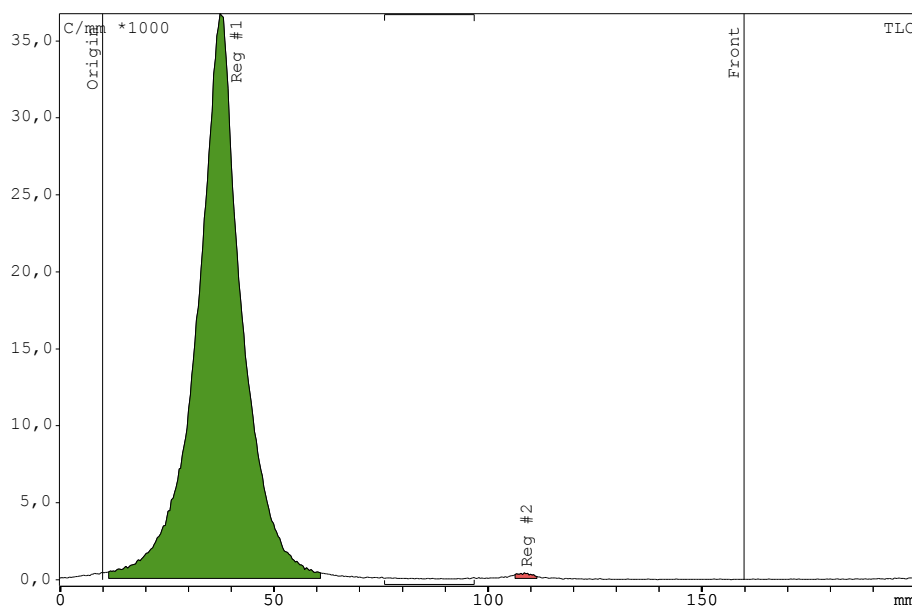


**Obr. 25.** Kontrola nanášky vzorku pomocí protilátky  $\beta$ -aktin ve vzorcích nanesených ve stejném pořadí jako obr. 24.

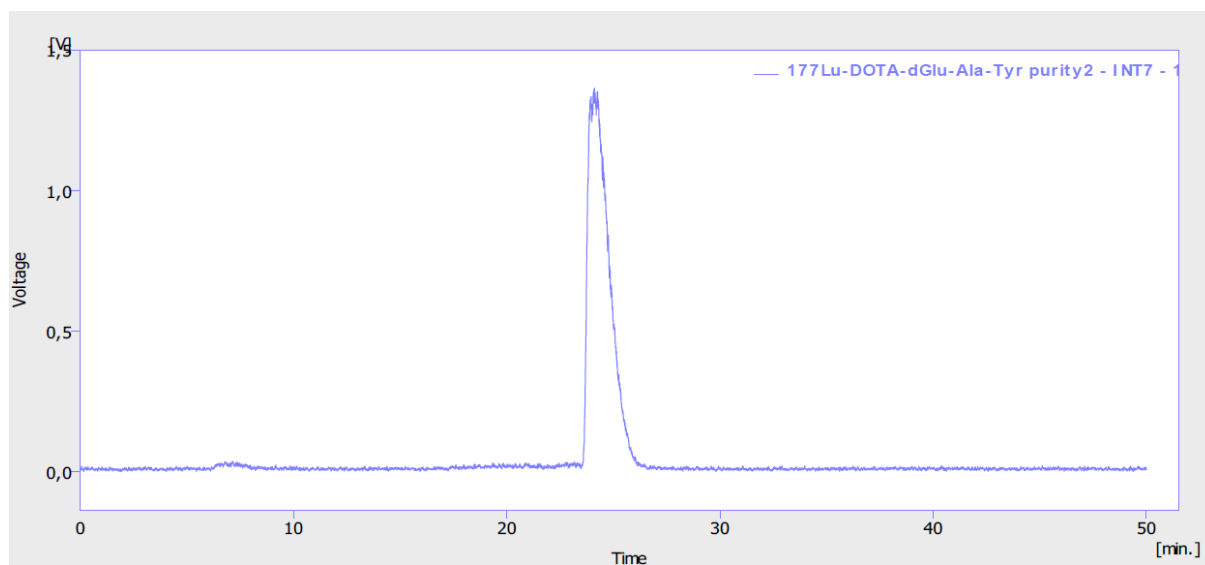
## 5.2. Příprava a kontrola radioaktivně značených peptidů

Značení parentních peptidů vycházelo z dříve vyvinutých metod, ale značení metabolitů bylo třeba optimalizovat. Tento optimalizovaný postup je popsán v metodické části v kap. 4.3.3. V případě, že čistota radiopreparátu peptidu byla nevyhovující, byla doba inkubace peptidu s radionuklidem za teploty místnosti prodloužena.

Radiochemická čistota všech značených peptidů byla stanovena ihned po značení peptidu metodou ITLC a následně byla ověřena HPLC systémem. Získaná radiochemická čistota k biologickým experimentům použitých radiopreparátů přesahovala 95 %. Pro ilustraci je uveden ITLC a HPLC chromatografický profil  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr na obr. 26 a 27.



**Obr. 26.** Příklad radiochemické analýzy metodou ITLC. Pík mezi 10–60 mm chromatogramu reprezentuje  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, malý pík v oblasti 110 mm pak volné nenavázané  $^{177}\text{Lu}$ .

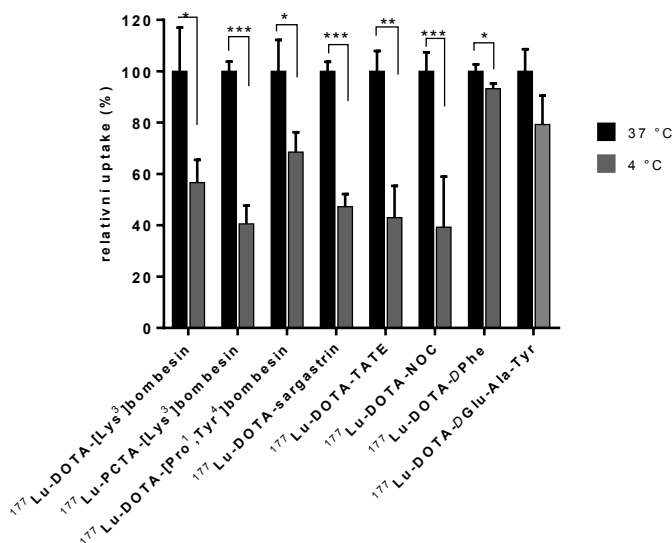


**Obr. 27.** Příklad analýzy radiochemické čistoty radiopeptidu metodou HPLC. Pík s retenčním časem 7 min reprezentuje volné  $^{177}\text{Lu}$ , které se nenavázalo na peptid. Větší pík s elučním časem kolem 25 min reprezentuje  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr.

### 5.3. Transmembránový transport radiopeptidů *in vitro*

#### 5.3.1. Posouzení podílu aktivního a pasivního transportu na buněčné kumulaci radiopeptidů

Pro základní posouzení příspěvku pasivních a aktivních transportních mechanismů k uptake studovaných radioaktivně značených látek, byla testována jejich akumulace v buňkách při standardní inkubační teplotě 37 °C a snížené teplotě 4 °C, inhibující energeticky závislé procesy. Tyto experimenty provedené s LLC-PK1 buňkami ukázaly signifikantní snížení kumulace všech radioaktivně značených peptidů, kromě tripeptidu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, vlivem teploty 4 °C (obr. 28). Efekt snížené teploty byl nejvýraznější po 2 h inkubace u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC a  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu, kde akumulace peptidu při 4 °C představovala 39,3 ± 19,7 % ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC) a 40,5 ± 7,2 % ( $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin) kumulace peptidu při 37 °C. Minimální inhibiční efekt nízké teploty byl naopak pozorován u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, kde kumulované množství radioaktivity při teplotě 4 °C představovalo 93,2 ± 2,0 % množství kumulovaného při 37 °C.

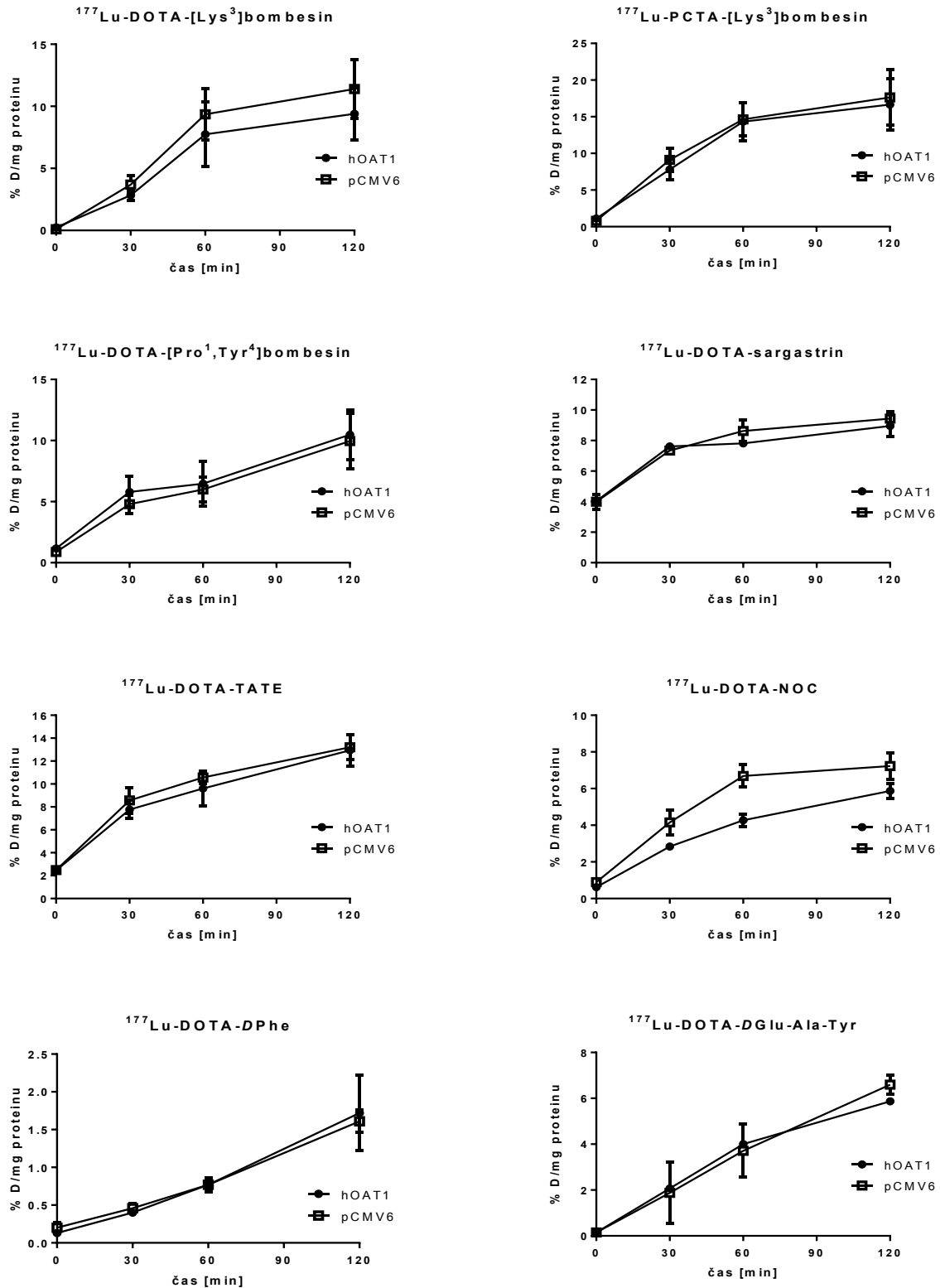


**Obr. 28.** Porovnání akumulace radiopeptidů a radiometabolitů v LLC-PK1 buňkách při inkubační teplotě 37 °C a 4 °C. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulovaného radioaktivního substrátu (n=3), přičemž akumulace při 37 °C představuje 100 %. Symbol \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ , symbol \*\* na hladině  $p < 0,01$  symbol \*\*\* na hladině  $p < 0,001$ .

### **5.3.2. Transport radiopeptidů SLC transportéry**

#### **5.3.2.1. Transport zprostředkovaný hOAT1**

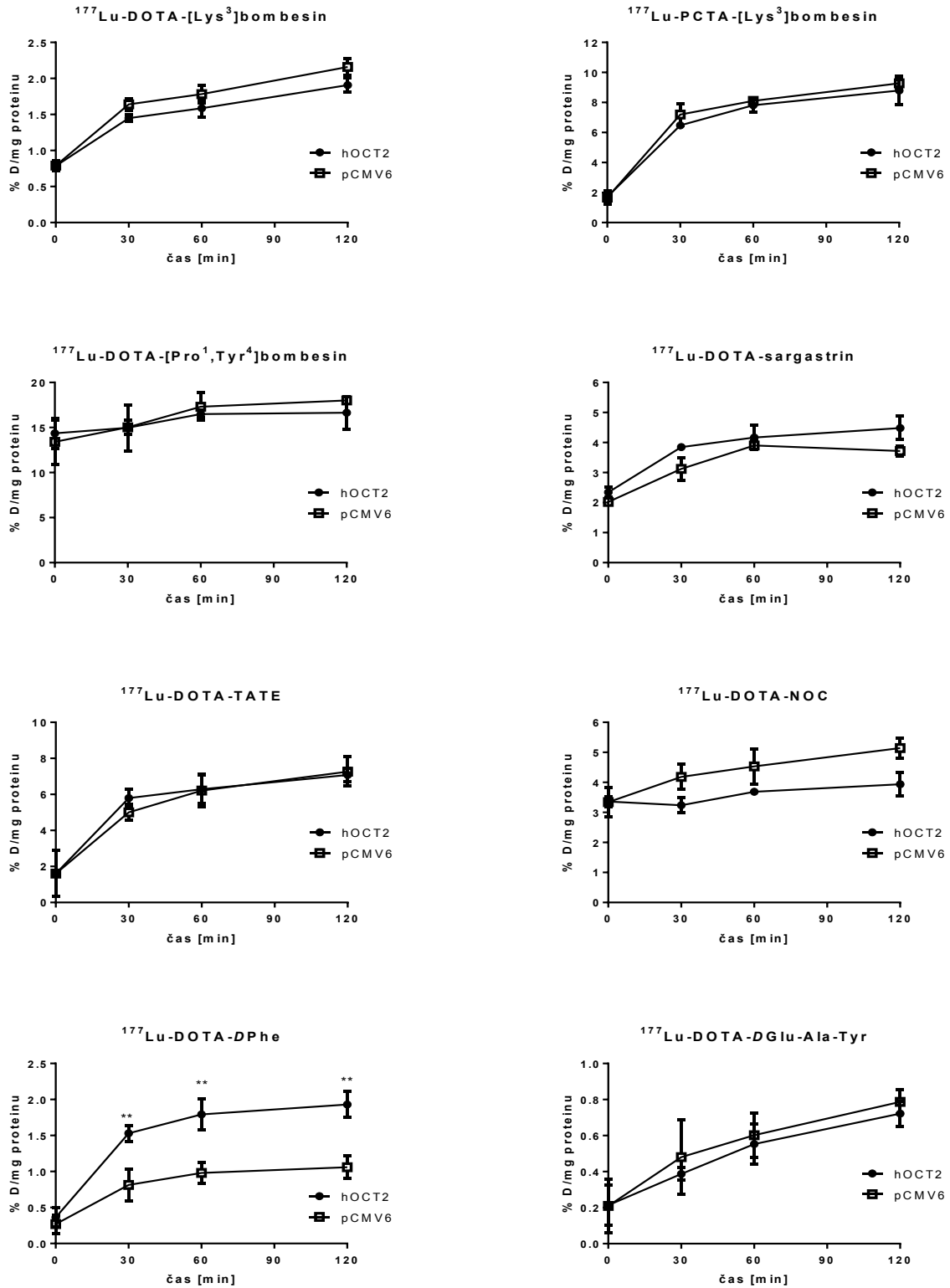
Pro zjištění, zda jsou námi testované radiopeptidy a radiometabolity substráty hOAT1 transportéru, jsme použili přechodně transfekované HeLa buňky. Množství akumulovaného substrátu v buňkách transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 bylo porovnáno s množstvím substrátu akumulovaného v buňkách transfekovaných prázdným vektorem. Zjištěná míra akumulace všech testovaných radiopeptidů a radiometabolitů byla při porovnání buněk HeLa-hOAT1 a HeLa-pCMV6 během intervalu 120 min obdobná (obr. 29). Ani v jednom případě nebylo detekováno žádné statisticky významné zvýšení kumulace studovaných látek v buňkách transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 a kontrolními buňkami.



**Obr. 29.** Porovnání akumulace studovaných radiopeptidů a radiometabolitů v HeLa buňkách přechodně transfekovanými expresním vektorem pro hOAT1 (●) a prázdným vektorem pCMV6 (□). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulované radioaktivity (n=3).

### 5.3.2.2. Transport zprostředkovaný hOCT2

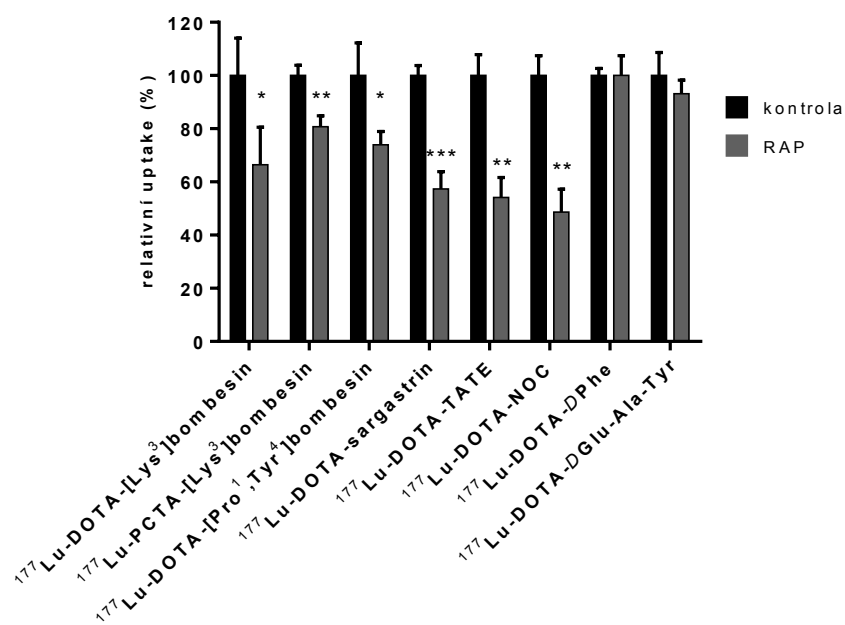
Pro zjištění potenciální účasti hOCT2 na přenosu radiopeptidů a radiometabolitů jsme použili přechodně transfekované MDCKII buňky. Množství akumulovaného substrátu v buňkách transfekovaných expresním vektorem pro hOCT2 bylo porovnáno s množstvím substrátu akumulovaného v buňkách transfekovaných prázdným vektorem-pCMV6. Akumulace metabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe v MDCKII buňkách přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOCT2 byla signifikantně vyšší ( $182,3 \pm 5,7$  % kontroly) než kumulace v buňkách transfekovaných prázdným vektorem (obr. 30). Zvýšení bylo signifikantní již po 30 minutách inkubace s peptidem. U ostatních látek nebyl statisticky významný rozdíl mezi akumulací v buňkách transfekovaných expresním vektorem pro hOCT2 a v kontrolních buňkách v žádném časovém intervalu detekován (obr. 30).



**Obr. 30.** Porovnání akumulace studovaných radiopeptidů a radiometabolitů v MDCKII buňkách přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOCT2 (●) a prázdným vektorem pCMV6 (□). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD množství akumulované radioaktivity (n=3). Symbol \*\* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,01$ .

### 5.3.2.3. Transport zprostředkovaný megalinem

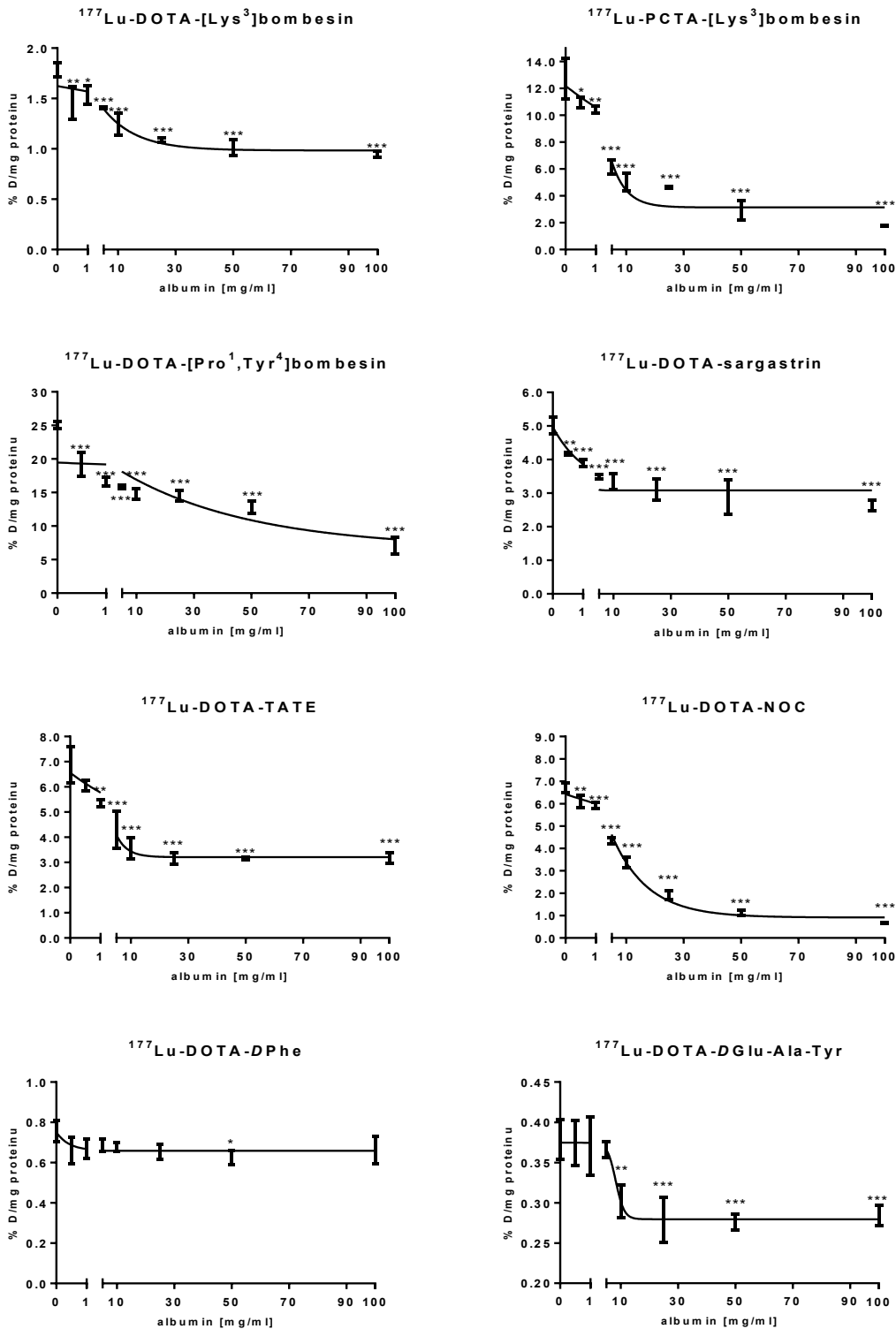
Pro testování účasti aktivní endocytózy zprostředkované megalinem na buněčném uptake radiopeptidů a radiometabolitů jsme použili specifický inhibitor megalinu – RAP v účinné inhibiční koncentraci. Preinkubace RAP s testovanými látkami snížila akumulaci všech studovaných radiopeptidů, ne však zkoumaných radiometabolitů  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr (obr. 31). Výsledky jsou vyjádřeny jako poměrné snížení kumulace radioaktivity po preinkubaci RAP oproti kontrole bez inhibitoru. Nejvýraznější inhibice transportu byla pozorována u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC (pokles akumulace na  $51,4 \pm 18,7$  % kontroly). Peptidy  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-sargastrin a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin vykazovaly podobnou hodnotu redukce akumulace v přítomnosti RAP (pokles na  $45,9 \pm 11,7$  %,  $42,7 \pm 8,4$  %,  $33,6 \pm 9,8$  % kontroly). Nejnižší inhibiční efekt RAP byl pozorován u obou zkoumaných metabolitů  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, u kterých ovlivnění buněčného uptake inhibitorem nebylo statisticky významné.



**Obr. 31.** Porovnání kumulace  $^{177}\text{Lu}$  značených radiopeptidů a radiometabolitů v LLC-PK1 buňkách bez přítomnosti RAP (kontrola) a při inkubaci s RAP. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD množství akumulované radioaktivity ( $n=3$ ), přičemž akumulace v kontrolních buňkách bez přítomnosti RAP představuje 100 %. Symbol \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ , symbol \*\* na hladině  $p < 0,01$ , symbol \*\*\* na hladině  $p < 0,001$ .



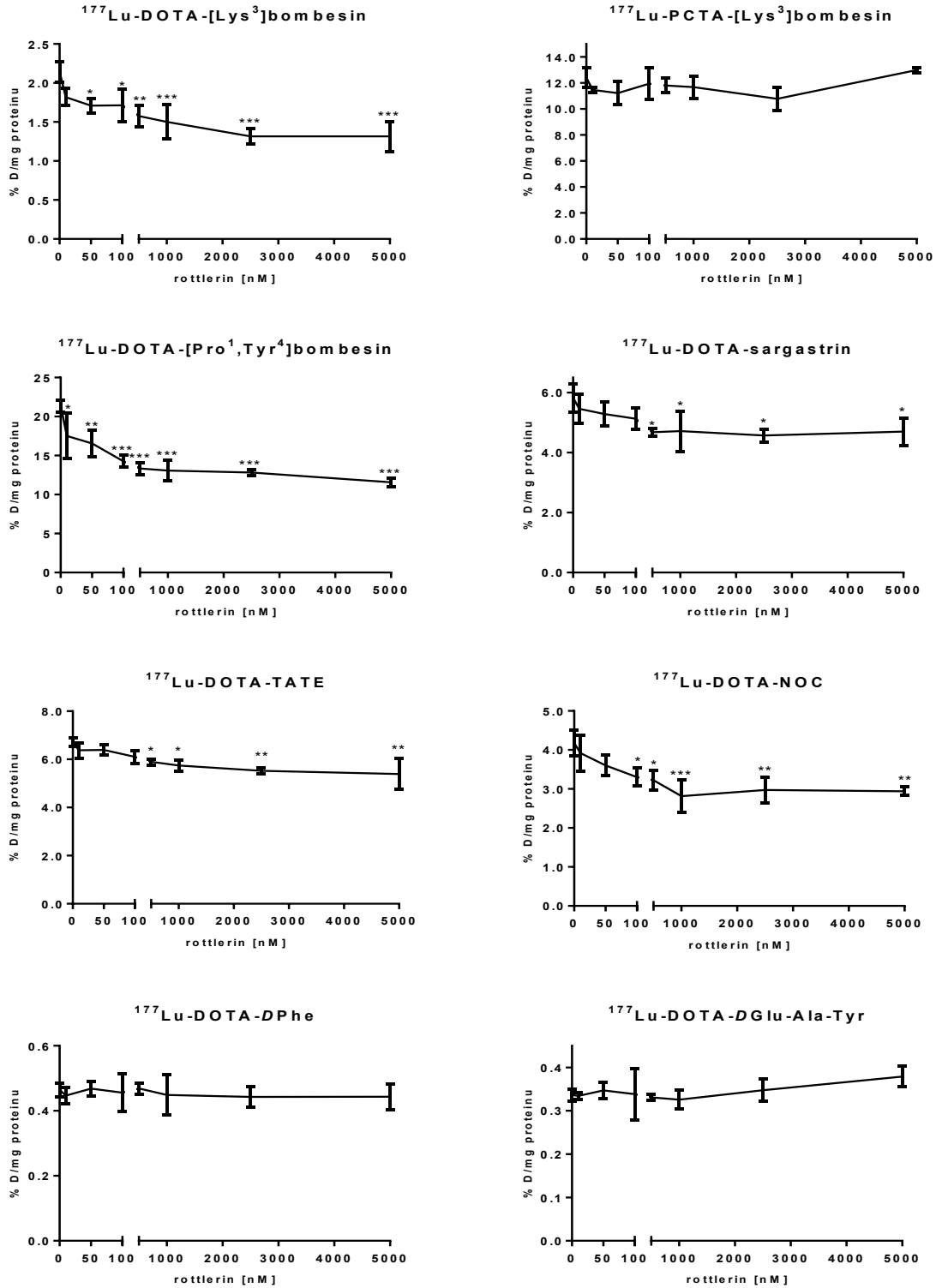
Mechanismus transportu zkoumaných látek byl dále ověřován kompetitivní studií se známým substrátem tohoto transportního mechanismu – albuminem. Signifikantní redukce endocytózy radiokonjugátů bylo dosaženo požitím albuminu v koncentraci 0,5 mg/ml a vyšších u všech radiopeptidů kromě metabolitu a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* (obr. 32). Koncentrace 100 mg/ml albuminu snížila buněčný uptake nejvýraznějším způsobem u peptidu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC (o  $90,0 \pm 3,1$  %) a u  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA[Lys<sup>3</sup>]bombesinu (o  $86,0 \pm 2,1$  %). Snížení uptake v případě  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesinu bylo o  $71,5 \pm 12,4$  % a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE s  $54,0 \pm 14,2$  %. Nižší vliv albuminu na uptake byl pozorován v případě  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-sargastrinu, u kterého došlo ke snížení při uvedené koncentraci kompetitoru k poklesu o  $47,6 \pm 3,7$  %, a u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu, u kterého bylo pozorován pokles akumulace o  $46,8 \pm 1,6$  % (obr. 32).



**Obr. 32.** Vliv albuminu na akumulaci testovaných radiopeptidů a radiometabolitů v buněčné linii LCC-PK1. 10-minutová preinkubace s albuminem předcházela hodinové inkubaci s testovanou látkou. Symbol \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ , symbol \*\* na hladině  $p < 0,01$ , symbol \*\*\* na hladině  $p < 0,001$ .

#### 5.3.2.4. Transport zprostředkovaný fluidní endocytózou

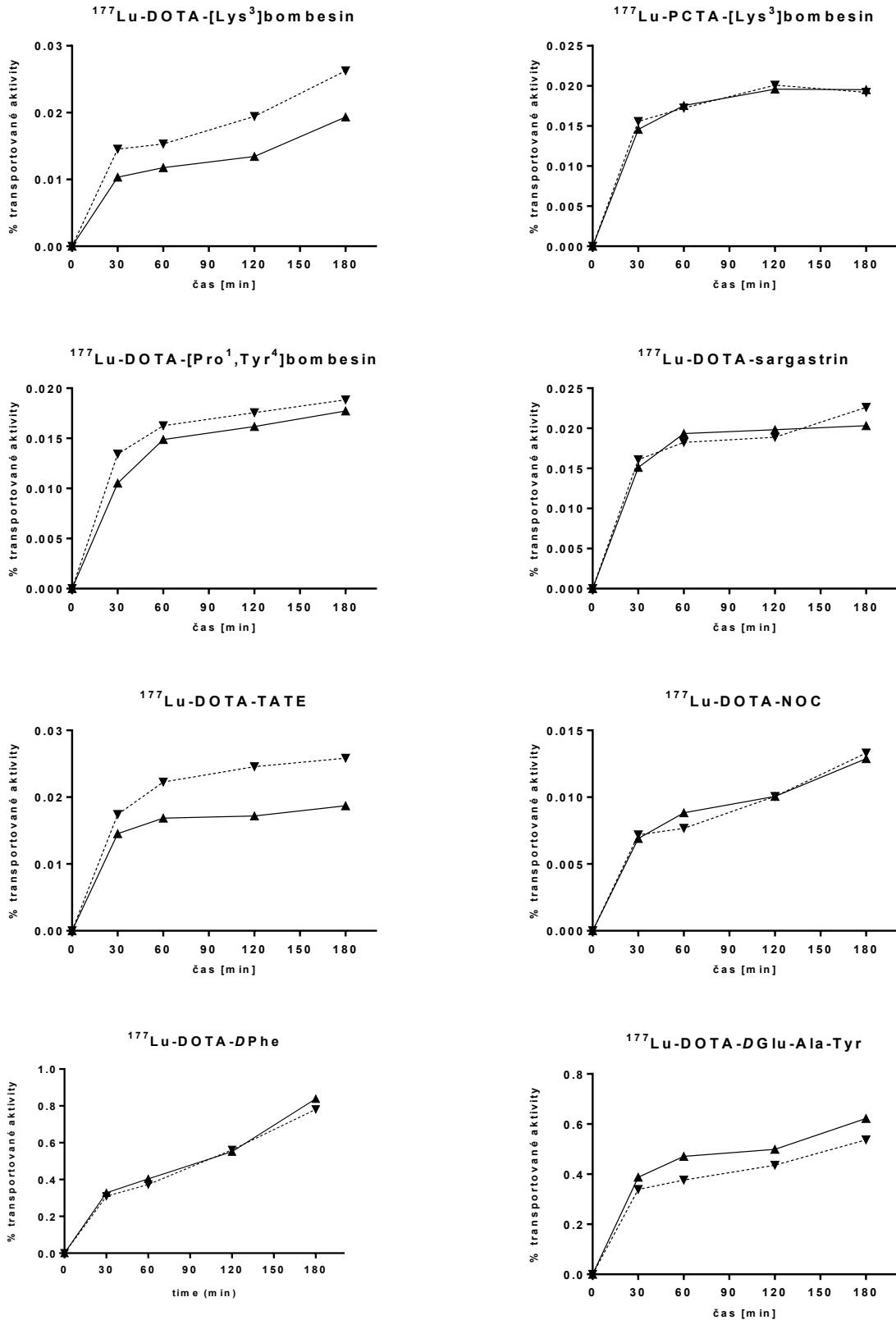
Přítomnost selektivního inhibitoru fluidní endocytózy rottlerinu v inkubačním médiu vyústila v dávkově závislou inhibici uptake všech peptidů konjugovaných s DOTA (obr. 33). Inhibice endocytózy byla signifikantní již při koncentraci rottlerinu 0,5  $\mu\text{M}$ . Akumulace  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu nebyla inhibitorem ovlivněna. Stejný nález jsme pozorovali při stanovení vlivu rottlerinu na akumulaci dvou studovaných radiometabolitů  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr, u kterých nebylo též nalezeno signifikantní ovlivnění transportu (obr. 33).



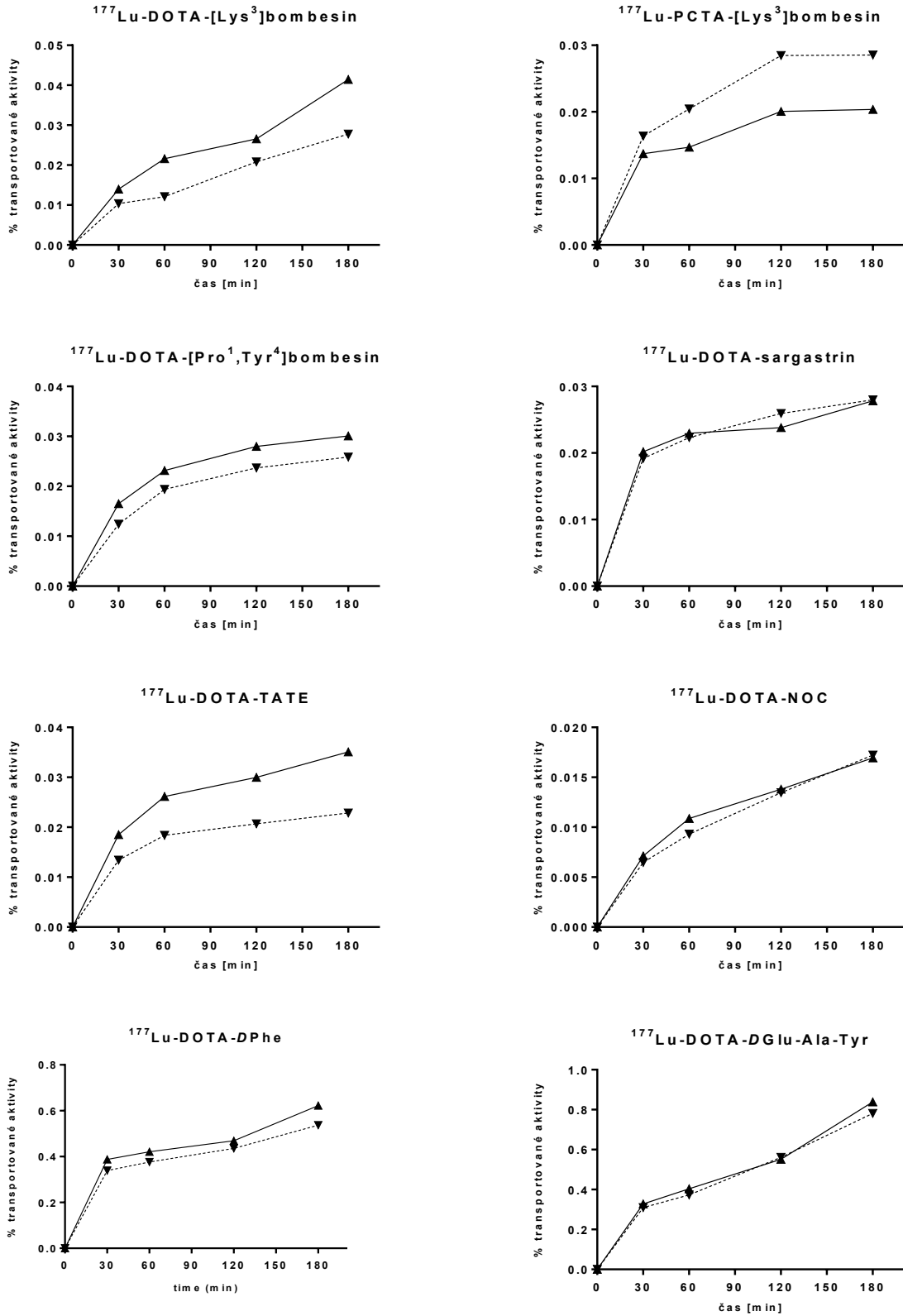
**Obr. 33.** Vliv rottlerinu na uptake testovaných radiopeptidů a radiometabolitů v LLC-PK1 buňkách. 45-minutová preinkubace s 0-5  $\mu$ M rottlerinem předcházela hodinové inkubaci s testovaným peptidem. Symbol \* označuje statistickou významnost na hladině  $p < 0,05$ , symbol \*\* na hladině  $p < 0,01$ , symbol \*\*\* na hladině  $p < 0,001$ .

### 5.3.2.5. Transport radiopeptidů ABC transportéry

Ke stanovení vlivu transportérů P-gp a BCRP na transport radioaktivně značených peptidů a radiometabolitů byla provedena transportní studie s využitím insertů, které umožňují aplikaci zkoumané látky vždy na jednu stranu a sledování přestupu v jednom či v druhém směru. Inzerty byly konfluentně porostlé MDCKII buňkami parentními či stabilně transfekovanými P-gp nebo BCRP, nepropustnost buněčné vrstvy byla potvrzena ohmmetrem. Ve stanovených časech byl odebrán vzorek z protilehlého kompartmentu a byl porovnán rozdíl transportu ve směru apikální (A) → basolaterální (B) a B → A. Výsledky jsou prezentovány jako % transportované radioaktivity vztažené k dávce značeného peptidu vložené do protilehlého kompartmentu (obr. 34 a 35).



**Obr. 34.** Transport studovaných radiopeptidů a radiometabolitů v buňkách MDCKII-P-gp. Symbol ▲ označuje transport ve směru A→B, ▼ transport ve směru opačném (B→A).



**Obr. 35.** Transport studovaných radiopeptidů a radiometabolitů v buňkách MDCKII-BCRP. Symbol ▲ označuje transport ve směru A→B, ▼ transport ve směru opačném (B→A).

Porovnáním zjištěných transportních charakteristik po 180 min inkubace bylo zjištěno, že mírný vliv na eflux peptidů z MDCKII buněk může mít BCRP transportér pouze v případě peptidu konjugovaného s chelatační skupinou PCTA. Poměr transportu u  $^{177}\text{Lu-PCTA-[Lys}^3\text{]bombesinu}$  ve směru  $A \rightarrow B$  a  $B \rightarrow A$  činil 2 : 3.

## 5.4. Farmakokinetické studie *in vivo*

### 5.4.1. Biodistribuce radiopeptidů a radiometabolitů u potkanů

V rámci této studie byla porovnána orgánová distribuce dvou radiometabolitů s distribucí jejich potenciálních parentních peptidů u potkana. Distribuce radioaktivity po i.v. podání studovaných radiometabolitů  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  a  $^{177}\text{Lu-DOTA-DPhe}$  ve vybraných orgánech potkanů 5 min, 1, 2, 24 a 48 h po i.v. aplikaci je zobrazena v tab. 10 a 11. Zjištěné hodnoty radioaktivity v orgánech a tkáních po i.v. podání intaktních radiopeptidů  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  a  $^{177}\text{Lu-DOTA-NOC}$  shrnují tabulky 8 a 9. Hodnoty jsou ve všech případech uváděny jako procento aplikované dávky na gram hmotnosti orgánu či tkáně.

Eliminace  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  z krve byla poměrně rychlá a již 120 min po aplikaci byla v krvi detekována jen velice nízká radioaktivita ve srovnání s množstvím detekovaným bezprostředně po aplikaci (tab. 10). Radiometabolit byl detekován v žaludku již 5 min po aplikaci a radioaktivita přetrvávala 60 min po aplikaci. V delších intervalech od aplikace byl patrný rychlý pokles aktivity v tomto orgánu. Zatímco v kratších časových intervalech byla radioaktivita detekovaná v tenkém střevě, v tlustém střevu se objevuje s časovým odstupem (tab. 10). Nejvyšší míra uptake a retence radioaktivity po podání  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  byla pozorována v ledvinách experimentálních zvířat. Radioaktivita v ledvinné tkáni přetrvávala i v nejdelších časových intervalech (tab. 10). Na druhou stranu, aktivita nalezená ve slinivce a nadledvinách byla již v krátkých časových intervalech po aplikaci zanedbatelná. 24 h a 48 h po aplikaci byla významná aktivita detekována pouze v tlustém střevě a ledvinách (tab. 10).

Druhý zkoumaný radiometabolit  $^{177}\text{Lu-DOTA-DPhe}$  vykazoval rychlý pokles koncentrace v krvi a nízkou míru uptake ve většině orgánů kromě ledvin a GIT (tab. 11). V tenkém střevě byla radioaktivita detekována v kratších časových intervalech po podání, v tlustém střevě se významnější množství objevuje až po 24 hodinách od podání látky. Za 24 h a 48 h od aplikace byla radioaktivita nalezena pouze v tlustém střevě a ledvinách (tab. 11).



Hladiny radioaktivity v krvi pokusných zvířat po podání  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MG11 vykazovaly opět poměrně rychlý pokles, neboť hodnoty 120 min po aplikaci byly téměř o dva řády nižší než v prvním odběrovém intervalu (tab. 12). Nejvýraznějším rysem distribuce této látky byl výrazný uptake a retence v ledvinách srovnatelná s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr. Významné množství radioaktivity bylo také nalezeno jak v tenkém, tak v tlustém střevě zvířat.

Biodistribuce  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC byla charakterizována také poměrně strmým poklesem hladin v krvi, vysokým zachytem radioaktivity v nadledvinách, slinivce a ledvinách (tab. 13). Vysoký orgánový uptake v těchto orgánech byl doprovázen dlouhodobou retencí radioaktivity. Ještě 48 h po aplikaci bylo množství detekované radioaktivity v nadledvinách a slinivce nesrovnatelně vyšší než u tří výše uvedených sloučenin.

**Tab. 10.** Distribuce radioaktivity po i.v. aplikaci  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr ve vybraných orgánech potkana (% ID/g). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD (n= 3).

<i>Orgán</i>	Doba po podání				
	5 min	60 min	120 min	24 h	48 h
Krev	14.00 $\pm$ 1.56	1.21 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Játra	1.49 $\pm$ 0.16	0.24 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
Slinivka	0.12 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Nadledviny	0.02 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ledviny	16.51 $\pm$ 6.96	1.18 $\pm$ 0.24	1.30 $\pm$ 0.65	0.57 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.08
Plíce	0.93 $\pm$ 0.14	0.09 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Žaludek	0.68 $\pm$ 0.16	0.60 $\pm$ 0.70	0.05 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tenké střevo	1.78 $\pm$ 0.31	0.79 $\pm$ 0.26	2.06 $\pm$ 2.45	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.05
Tlusté střevo	1.02 $\pm$ 0.15	0.13 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.05	2.33 $\pm$ 1.23	1.46 $\pm$ 1.33

**Tab. 11.** Distribuce radioaktivity po aplikaci  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe ve vybraných orgánech potkana (% ID/g). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD (n=3).

<i>Orgán</i>	Doba po podání				
	5 min	60 min	120 min	24 h	48 h
Krev	1.99 $\pm$ 0.17	0.23 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Játra	0.19 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Slinivka	0.18 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Nadledviny	0.21 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ledviny	6.02 $\pm$ 3.95	0.74 $\pm$ 0.27	0.36 $\pm$ 0.16	0.21 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.16
Plíce	0.45 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Žaludek	0.25 $\pm$ 0.17	0.15 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.08	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tenké střevo	0.43 $\pm$ 0.46	0.27 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tlusté střevo	0.09 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.04

**Tab. 12.** Distribuce radioaktivity po aplikaci  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-MG11 ve vybraných orgánech potkana (% ID/g). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD (n=3).

<i>Orgán</i>	Doba po podání				
	5 min	60 min	120 min	24 h	48 h
Krev	12.54 $\pm$ 1.09	1.22 $\pm$ 0.21	0.16 $\pm$ 0.06	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Játra	1.33 $\pm$ 0.12	0.25 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01
Slinivka	0.13 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Nadledviny	0.02 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ledviny	17.60 $\pm$ 1.09	3.69 $\pm$ 0.42	0.44 $\pm$ 0.30	0.50 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.17
Plíce	0.91 $\pm$ 0.18	0.11 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Žaludek	1.11 $\pm$ 0.39	0.45 $\pm$ 0.25	0.47 $\pm$ 0.26	0.17 $\pm$ 0.09	0.05 $\pm$ 0.01
Tenké střevo	1.94 $\pm$ 0.29	2.77 $\pm$ 0.40	2.35 $\pm$ 2.38	0.11 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.06
Tlusté střevo	1.02 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.05	1.79 $\pm$ 0.84	0.45 $\pm$ 0.29

**Tab. 13.** Distribuce radioaktivity po aplikaci  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC ve vybraných orgánech potkana (% ID/g). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD (n=3).

<i>Orgán</i>	Doba po podání				
	5 min	60 min	120 min	24 h	48 h
Krev	2.33 $\pm$ 0.36	0.43 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Játra	0.46 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.02
Slinivka	6.80 $\pm$ 0.77	11.04 $\pm$ 1.91	9.76 $\pm$ 1.97	5.48 $\pm$ 1.22	4.87 $\pm$ 0.64
Nadledviny	10.76 $\pm$ 2.01	21.47 $\pm$ 6.55	19.48 $\pm$ 4.40	16.49 $\pm$ 1.97	17.17 $\pm$ 3.13
Ledviny	6.83 $\pm$ 0.95	2.24 $\pm$ 0.31	2.01 $\pm$ 0.13	1.99 $\pm$ 0.39	1.80 $\pm$ 0.37
Plíce	0.83 $\pm$ 0.17	0.23 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01
Žaludek	0.86 $\pm$ 0.22	1.23 $\pm$ 0.28	0.99 $\pm$ 0.28	1.06 $\pm$ 0.22	0.98 $\pm$ 0.15
Tenké střevo	0.49 $\pm$ 0.13	0.54 $\pm$ 0.23	0.53 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.03
Tlusté střevo	0.27 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.24

### 5.4.2. Eliminace radiopeptidů a radiometabolitů u potkanů

Výsledky kumulativní exkrece radioaktivity v moči a výkalech potkanů během 48 h, jež trvala eliminační studie, jsou zobrazeny pro všechny studované látky v tab. 14. Vylučování do moči bylo převládající eliminační cestou obou radiometabolitů i radiopeptidů. Většina radioaktivity byla vyloučena během prvních dvou hodin po i.v. aplikaci.

**Tab. 14.** Kumulativní exkrece radioaktivity (% ID) moči a výkaly po i.v. aplikaci studovaných radiometabolitů a radiopeptidů potkanům. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  SD (n=3).

Látka	2h		24 h		48 h	
	Moč	Výkaly	Moč	Výkaly	Moč	Výkaly
<sup>177</sup> Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr	53.64 $\pm$ 40.82	-	83.13 $\pm$ 13.26	5.33 $\pm$ 4.09	85.07 $\pm$ 11.67	7.52 $\pm$ 6.01
<sup>177</sup> Lu-DOTA-MG11	70.35 $\pm$ 12.91	-	83.53 $\pm$ 10.90	4.68 $\pm$ 2.53	85.53 $\pm$ 8.98	7.83 $\pm$ 6.56
<sup>177</sup> Lu-DOTA-DPhe	65.73 $\pm$ 26.89	-	88.63 $\pm$ 16.61	7.98 $\pm$ 4.25	90.31 $\pm$ 15.99	9.58 $\pm$ 5.46
<sup>177</sup> Lu-DOTA-NOC	53.99 $\pm$ 13.94	-	68.97 $\pm$ 6.89	7.07 $\pm$ 4.67	72.44 $\pm$ 6.70	11.94 $\pm$ 5.47

## 6. Diskuze

Při použití radioaktivně značených peptidových analogů pro účely PRRT je významným limitujícím faktorem nefrotoxicita těchto radiofarmak způsobená kumulací a retencí radioaktivity v ledvinné tkáni, která vede k lokálnímu ozáření (Melis et al. 2012; Vegt et al. 2011). Farmakokinetika většiny radioaktivně značených peptidů je charakteristická rychlou eliminací z krve a vysokou močovou exkrecí (Kopecky et al. 2005; Fani et al. 2012). Příčinami těchto vlastností je obecně nízká vazebnost radiopeptidů na plazmatické proteiny a molekulová hmotnost do 12 kDa, což umožňuje efektivní odstraňování peptidů glomerulární filtrací v ledvinách. Radioaktivita je sice z velké míry následně vyloučena močí, avšak část dávky je dle současných znalostí resorbovaná buňkami proximálního tubulu. Po transportu přes buněčnou membránu dochází k přesunu do lysozomů, kde může docházet k metabolizaci a vzniku radiometabolitů, které jsou zde retenovány a mohou ozařovat přilehlou tkáň (Barone et al. 2005; Rolleman et al. 2003). Zásadním prvkem tohoto procesu je tedy transport radiopeptidů do ledvinných buněk. Objasnění mechanismů, které se podílejí na buněčném uptake, může být využitelné při hledání způsobů, jak nežádoucí ledvinné akumulaci radiopeptidů zabránit či jak formulovat nové sloučeniny postrádající tuto nežádoucí vlastnost.

Přestože se zdá, že významným faktorem odpovědným za uptake je aktivní endocytóza pomocí megalinového systému (de Jong et al. 2005a), otázkou stále zůstává, zda se na akumulaci v ledvinných buňkách mohou podílet další transportní mechanismy (Melis et al. 2007). Detailnější poznání mechanismů transmembránového transportu radiopeptidů zároveň může přispět k dalšímu prohloubení znalostí uptake radiopeptidů v dalších tkáních včetně cílové nádorové tkáně. Zatímco u intaktních radiopeptidů z námi zkoumaných strukturních skupin je biodistribuce a eliminace většinou preklinickými studiemi dobře popsána (Cihlo et al. 2008; Laznicek et al. 2002a; Ocak et al. 2011; Wild et al. 2003), tak otevřenou otázkou, která zatím nebyla relevantně zkoumána, je celkový osud radiometabolitů v organismu a případná účast extrarenálně formovaných metabolitů na nežádoucí ledvinné akumulaci radioaktivity. Údaje o mechanismech jejich transportu do buněk a o rozdílech v těchto mechanismech mezi intaktními radiopeptidy a jejich radiometabolity zatím byly zcela nedostupné.

Počet relevantních experimentálních studií zaměřených na ledvinný transport gastrinových, bombesinových a SST radiopeptidů je do současné doby poměrně omezený. Studium této problematiky totiž vyžaduje komplexní přístup, který zahrnuje metody značení radionuklidy, analytický aparát pro stanovení kvality radiopreparátů a pokročilé

farmakologické a molekulárně-biologické metody. V dosud provedených studiích zaměřených na ledvinné chování radiopeptidů experimentátoři obvykle použili *in vivo* a *ex vivo* modely, které sice umožňují popsat distribuci radiofarmak v organismu a v ledvinné tkáni, avšak obtížněji se získávají informace o molekulárních mechanismech, které farmakokinetiku radiopeptidů determinují. Jako ideální přístup se jeví kombinovat *in vivo* experimenty s modely *in vitro*, které doplňují celkový obraz chování látek v organismu detailními informacemi o mechanismech. Tato práce si kladla za cíl lépe porozumět mechanismům ledvinové akumulace radiopeptidů, se zaměřením na hodnocení možné účasti vybraných transportních membránových procesů a to především pomocí *in vitro* testování buněčných linií. Současně jsme se vedle transportních mechanismů intaktních radiopeptidů determinujících jejich farmakokinetiku, zaměřili na transportní mechanismy odpovědné za transmembránový transport vybraných metabolitů radiopeptidů, které vznikají v organismu. V tomto případě bylo nutné ovšem studii doplnit o experimenty zkoumající farmakokinetiku *in vivo*, protože na rozdíl od intaktních radiopeptidů u radiometabolitů relevantní údaje o osudu *in vivo* obecně chybí.

Při značení studovaných peptidových analogů vybraným radionuklidem autorka navazovala na výzkumné práce prováděné na pracovišti v předchozím období a vycházela proto při vývoji metod značení z těchto zkušeností. Pro vývoj značení jednotlivých peptidů bylo třeba vždy provést optimalizaci značení a ověření kvality. Technika radioaktivního značení je náročná především z hlediska zachování čistoty a preciznosti, avšak výsledky ověření kvality radiopreparátů ukazují, že se podařilo dosáhnout vysokého standardu. Pro značení peptidů byl použit terapeutický radionuklid  $^{177}\text{Lu}$ , který je klinicky relevantní z hlediska případného radiotoxického poškození tkání, neboť emituje relativně biologicky účinné záření (Kaltsas et al. 2005). Dalším důležitým faktorem při výběru radionuklidu je aktuálnost jeho aplikace a využívání v klinickém výzkumu a praxi. V tomto směru je  $^{177}\text{Lu}$  moderním a perspektivním radionuklidem především pro cílenou léčbu menších nádorových lézí vybraných nádorů (Bison et al. 2014b). Z praktického pohledu má vybraný radionuklid velice vhodné fyzikální parametry, jako je dostatečně dlouhý poločas radioaktivní přeměny, což vytváří potřebný časový rámec pro provádění experimentálních prací po dodání radionuklidu. Dalším důležitou vlastností  $^{177}\text{Lu}$  je, že je velmi dobře chelátováno standardními typy chelátorů jako je DOTA (Koumariou et al. 2009), které se používají v dnes dostupných preparátech receptorově specifických peptidových analogů. Stejně jako  $^{111}\text{In}$ , které bylo využito v minulosti ke značení biomolekul na pracovišti v řadě případů, je i  $^{177}\text{Lu}$  trojvazné, což umožňuje stejnou stechiometrii vazby na chelátor a využití analogických

postupů pro značení. Autorka tedy postupně zvládla a zavedla značení bombesinových, gastrinových a SST analogů  $^{177}\text{Lu}$  a v další fázi použila obdobné techniky pro vývoj metod k stabilnímu značení vybraných metabolitů receptorově specifických peptidů. Radiochemické parametry, které byly pomocí použitých analytických metod stanoveny, svědčí o tom, že ve všech případech se radiopreparáty podařilo připravit v odpovídající kvalitě.

Pro ověření účinnosti značení a kontrolu čistoty připraveného radioaktivně značeného peptidu byly použity dvě analytické metody, které se v radiofarmacii a při vývoji radiofarmak k tomuto účelu standardně používají. Výhodou metody ITLC je rychlost provedení, což dovoluje kontrolu čistoty v průběhu značení, a velmi nízké množství radiopreparátu potřebného pro analýzu. Výsledky jsou však založeny pouze na radiometrické detekci. Pro ověření výsledků byla proto použita ještě kontrola čistoty preparátů s využitím metody HPLC, která je náročnější jak časově, tak přístrojově. Tato metoda ovšem umožňuje měřit kvalitu preparátu na základě radiometrických a současně fotometrických parametrů. Metody byly kombinovány tak, že ITLC byla použita okamžitě po ukončení značení ke kontrole dosažené čistoty. Pokud vzorek radiochemicky nevyhovoval, byl prodloužen interval značení, dokud nebylo další analýzou prokázáno, že preparát dosahuje požadované radiochemické čistoty. Následně byl okamžitě použit pro biologické experimenty. Paralelně se zahájením experimentů byla provedena kontrola pomocí HPLC k sekundárnímu potvrzení čistoty preparátu. Stabilita značení peptidů bylo ověřena znovu HPLC metodou 4 hodiny po označení peptidu. Údaje o dlouhodobé stabilitě (24 hodin) radiopeptidů byly publikovány v předchozích výzkumných sděleních pracoviště (Petřík 2008; Korec 2009).

Receptorově specifické peptidy jsou tvořené peptidovým řetězcem, který obsahuje doménu pro vazbu na receptor a chelátující strukturu, která váže radiokov. Stejně jako ostatní peptidy, jsou pravděpodobně v organismu degradovány peptidázami za štěpení peptidového řetězce. Ačkoliv je metabolická stabilita mnoha receptorově specifických peptidů mnohem vyšší v porovnání s přirozenými peptidy (Akizawa et al. 1998; Behr et al. 1999), i u nich dochází v určité míře k degradaci. Ke štěpení dochází v oblasti peptidového řetězce, a tak vzniká jako finální metabolit chelátor nesoucí radiokov a aminokyselinový řetězec různé délky. Řetězec je štěpen na více místech a výsledným metabolitem může být až chelátor s jednou připojenou aminokyselinou (Ocak et al. 2011; Akizawa et al. 2008). Mezi místa zodpovědná za degradaci radiopeptidů a tvorbu metabolitů v organismu patří játra, ledviny, plazma nebo nádorová tkáň (Bass et al. 1998; Ocak et al. 2011), ale předpokládá se i přispění dalších orgánů a tkání. Vzniklé metabolity pak mohou být navíc distribuovány do dalších

částí těla. Ledviny jsou tak jednak místem vzniku těchto radiometabolitů (Akizawa et al. 2008; Ocak et al. 2011), tak i možným místem působení radiometabolitů uvolněných z jater či z léčbou destruovaných nádorových buněk. Proto je důležité zjistit, jak mohou být metabolity radiopeptidů transportovány z krve nebo moči do tkání.

Pro možnost určitého zobecnění či naopak určení specifických rysů chování studovaných peptidů a jejich metabolitů, byly vybráni zástupci peptidů z různých strukturních skupin. Analogy SST jsou zatím klinicky nejvyužívanější skupinou peptidů, neboť sem patří důležitý peptid používaný pro scintigrafické zobrazování -  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid (Krenning et al. 1992). Pro testování v rámci této práce byli vybráni dva zástupci SST derivátů – DOTA-TATE a DOTA-NOC. Obě látky značené  $^{177}\text{Lu}$  byly již testovány v klinických studiích (Van Essen et al. 2007; Wehrmann et al. 2007). O jejich metabolismu jsou zatím jen omezené údaje, ale pravděpodobnými finálními metabolity SST peptidů značených kovovými radionuklidy jsou konjugáty poslední aminokyseliny s navázanou chelatující skupinou a chelatovaným radiokovem (Akizawa et al. 2001).  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe představuje finální metabolický produkt, který může být potenciálně tvořen během metabolismu SST analogů (Akizawa et al. 2008). Vzhledem ke své rozdílné velikosti existoval předpoklad, že takový metabolit může interagovat s jinými transportními systémy, než s kterými interagují větší peptidy, a jeho farmakokinetické chování v organismu by se mohlo od parentních peptidů lišit.

DOTA-MG11 a sargastrin jsou zástupci gastrinových analogů, skupiny původně vyvinuté k zobrazování a léčbě metastazujícího karcinomu štítné žlázy (Brans et al. 2006). Skupina CCK/gastrinových analogů se vyznačuje relativně menší *in vivo* stabilitou. Proteolytickým štěpením DOTA-MG11 vzniká více produktů, jedním z nich je tripeptidový metabolit DOTA-DGlu-Ala-Tyr (Ocak et al. 2011). Větší molekulová hmotnost tohoto metabolitu než vykazuje studovaný výše uvedený SST metabolit byla využitelným parametrem pro porovnání vlivu velikosti molekuly radiometabolitu na farmakokinetické parametry a na interakci s membránovými transportéry.

Poslední skupinu studovaných peptidů tvořily látky odvozené od bombesinu. V rámci této skupiny bylo možné posoudit i případný vliv typu chelatující struktury na sledované parametry, neboť identický peptid byl konjugován buď s chelátorem DOTA nebo PCTA. Zároveň bylo možné porovnat dva peptidy, lišící se aminokyselinami ve třech pozicích peptidového řetězce.

Experimentálním modelem, který byl důležitý pro získání informací o transmembránovém transportu zkoumaných radiopeptidů a radiometabolitů, byly v této práci přechodně transfekované buněčné linie. Metoda přechodné indukce exprese vybraného transportéru sice patří obecně k standardně používaným metodám v oblasti studia transportních mechanismů, avšak její použití vždy vyžaduje poměrně rozsáhlou optimalizaci, která zahrnuje především výběr vhodné buněčné linie a nastavení transfekční metody. Výběr buněčné linie byl založen na experimentálních a literárních údajích o nízké míře exprese studovaných transportérů. Malá nebo žádná exprese v původních buňkách je předpokladem pro dosažení co nejvyššího rozdílu v expresi daného transportéru mezi parentními a transfekovanými buňkami. Výrazný rozdíl v expresi pak umožňuje detekovat případnou interakci zkoumané látky s transportérem s vysokou signifikancí. Pro oba testované transportéry ze skupiny SLC přenašečů bylo testováno více buněčných linií, mezi nimi i dvě k těmto účelům nejčastěji používané buněčné linie - HeLa a MDCKII. V první fázi byla optimalizována metoda přechodné transfekce expresním vektorem pro hOAT1 (Mandíková 2014). Tyto testy ukázaly, že při porovnání všech zvolených buněčných linií vykazuje minimální akumulaci standardního substrátu OAT linie HeLa buněk, což dokazuje nízkou přirozenou expresi tohoto transportéru. V souladu s tímto nálezem je i nízká exprese OAT1 v HeLa buňkách, která byla dokumentována i jinými autory (Ahlin et al. 2009). Na rozdíl od HeLa buněk, optimalizační studie s linií MDCKII ukázala, že transfekce hOAT1 u této linie nevede k dostatečnému zvýšení funkční exprese hOAT1 (Mandíková 2014). S cílem využít pro transfekci stejnou linii jako v případě hOAT1, byla provedena optimalizační studie zaměřená na přechodnou transfekci linie HeLa expresním vektorem pro hOCT2. Ani po rozsáhlých obměnách transfekčních podmínek se ovšem nepodařilo dosáhnout efektivní indukce exprese transportéru. Naopak, v případě linie MDCKII transfekce transportérem hOCT2 vedla k efektivní indukci jeho exprese. Z těchto důvodů byla jako *in vitro* buněčný model pro každý transportér použita jiná buněčná linie. Ovšem z literárních údajů je známo, že MDCKII exprimují OCT2 transportér minimálně nebo vůbec (Quan et al. 2012). A tak i v tomto případě mohlo být dosaženo pro experimenty žádoucího velkého rozdílu v expresi mezi původními a transfekovanými buňkami. Použití rozdílných linií pro různé transportéry ovšem nijak neovlivnilo výsledky transportních *in vitro* studií, protože akumulace studovaných radiopeptidů byla vždy vztahována k příslušným kontrolním buňkám transfekovaným prázdným vektorem. Vliv případných rozdílů v přirozené expresi transportérů mezi danými buněčnými liniemi byl tímto eliminován.



Pro testování vlivu aktivních transportních mechanismů při přenosu peptidů byla vybrána linie prasečích ledvinných buněk – LLC-PK1, které jsou v odborné literatuře popisovány jako vhodný model ke studiu reabsorpce proteinů ledvinovým proximálním tubulem (Takakura et al. 1995). Zásadní byla jinými autory popsána přítomnost megalinového transportního systému u této linie (Nielsen et al. 1998), neboť ten je považován za významný transportní mechanismus pro uptake radiopeptidů (de Jong et al. 2005a). Pro ekonomickou nedostupnost nebylo možné při studiu megalinem zprostředkovaného transportu použít metody tranzientní transfekce transportérem, podobně jako u zkoumaných SLC transportérů. Pokusili jsme se ovšem využít dalších dostupných molekulárně-biologických metod, které by umožnily identifikovat úlohu megalinu při transportu studovaných látek. Přistoupili jsme k testování využitelnosti genové inhibice siRNA, avšak funkční testy neukázaly významnou inhibici funkce megalinu při tomto postupu i přes použití několika komerčně dostupných druhů siRNA, které se lišily výrobcem či sekvencí, a to i přes rozsáhlou optimalizaci s pomocí různých transfekčních metod. Protože je siRNA ve své podstatě velice křehká, a po přestupu do cytoplazmy je rychle degradována, je zapotřebí relativně vysokých dávek k dosažení výsledku. Vyzkoušeli jsme proto ještě inhibici exprese megalinu pomocí shRNA. Ani v tomto případě však nebylo dosaženo uspokojivého výsledku. Tyto metodické studie nejsou v disertační práci prezentovány. Neúspěch uvedených metod může být vysvětlen velikostí transportéru. Inhibovat expresi molekuly o hmotnosti 600 kDa pravděpodobně vyžaduje zablokování procesu na více místech, než umožňovaly dostupné přípravky. Možnou cestou, jak prokázat transport radiopeptidů a radiometabolitů megalinem a jeho specificitu, se ukázalo použití inhibičních studií s LLC-PK1 buňkami exprimujícími megalin přirozeně s pomocí specifického inhibitoru - RAP (Sengul et al. 2013).

V první fázi transportních experimentů bylo ověřováno, zda se na transmebránovém transportu zkoumaných peptidů a metabolitů v modelu ledvinných buněk podílejí aktivní transportní mechanismy. Inhibicí transportních procesů závislých na přísunu energie snížením teploty, jsme docílili signifikantní inhibici uptake všech radiopeptidů ve studii (obr. 28). Přestože teplotně závislé snížení akumulace radiopeptidů v renálních buňkách bylo ve všech případech pouze částečné, i tak tento nálezn dokládá významný podíl aktivních transportních procesů na tomto ději. Výsledky prokázaly roli jak aktivních, tak pasivních transportních mechanismů u všech studovaných peptidů. Spoluúčast aktivních a pasivních transportních mechanismů při buněčném uptake radiopeptidů ukázaly i práce zahrnující jiné peptidy ze skupiny SST či gastrinových derivátů, ve kterých byl využit experimentální buněčný model založený na nativních ledvinných buňkách potkana (Trejtnar et al. 2008). Vzhledem k těmto

uvedeným studiím a tomu, že do naší studie bylo zahrnuto poměrně široké spektrum radiopeptidů, můžeme konstatovat, že přispění jak aktivních, tak pasivních mechanismů může být obecným znakem transportu radiopeptidů do ledvinných buněk minimálně u látek ze studovaných strukturních skupin.

Jako předpokládaný transportní mechanismus pro uptake radiopeptidů a radiometabolitů v ledvinných buňkách byla studována megalinovým receptorem zprostředkovaná aktivní endocytóza, která zajišťuje transport řady peptidů a proteinů aktivní endocytózou. Tento multiligandový endocytární receptorový komplex hraje významnou transportní roli i u námi testovaných radiopeptidů. Použitím známého inhibitoru megalinu RAP (Sengul et al. 2013) došlo ke snížení kumulace SST, gastrinových i bombesinových analogů v LLC-PK1 buňkách (obr. 31), což potvrzuje aktivní roli receptory zprostředkované endocytózy i u těchto radiopeptidů. Úroveň inhibice akumulace pomocí RAP nebyla u všech peptidů stejná. U  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-sargastrinu,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>]bombesinu došlo ke snížení v míře téměř srovnatelné s vlivem snížené inkubační teploty. Tento nálezh by mohl naznačovat, že transport megalinem je rozhodujícím aktivním transportním mechanismem odpovědným za uptake studovaných radiopeptidů v ledvinných buňkách. Zda tento závěr lze vztáhnout i na jiné typy ledvinných linií a nativních ledvinných buněk je třeba potvrdit v dalších experimentech.

Na rozdíl od uvedených peptidů, buněčná akumulace  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu byla inhibována pomocí RAP výrazně méně než u ostatních peptidů. Tato různá úroveň inhibice akumulace peptidů pomocí RAP může být vysvětlena různou mírou vazby radiopeptidů na vazebná místa megalinu. Megalinový receptor má celkem 4 negativně nabitě vazebné domény (Orlando et al. 1998), avšak RAP se váže pouze na 1 až 2 vazebná místa (Schmitz et al. 2002). Peptid může tedy obsadit vyšší počet míst, než jsou místa účinně blokovatelná použitou koncentrací RAP. Vyšší míra vazby k megalinu u  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu může být způsobena i nižším počtem negativně nabitých skupin v molekule PCTA ve srovnání s peptidy konjugovanými s DOTA.

Role megalinového systému byla dále testována s použitím přirozeného substrátu – albuminu v kompetitivní studii. V experimentech s buňkami exprimujícími megalin byla pozorována inhibice akumulace všech 6 radiopeptidů albuminem již v koncentraci 0,5 mg/ml (obr. 32). Toto zjištění potvrzuje výsledky experimentů dosažených s inhibitorem RAP, že megalin hraje významnou roli v buněčné akumulaci těchto látek. Tyto výsledky získané

*in vitro* jsou v souladu s nálezy studií *in vivo* s jinými příbuznými radiopeptidy u myši s deficiencí megalinu, u kterých byla snižená ledvinná akumulace  $^{111}\text{In}$  značených peptidů oktreotidu, oktreotátu, minigastrinu, exendinu a neurotensinu (Melis et al. 2007). Redukce uptake nebyla ani v tomto případě absolutní a dosahovala u jednotlivých peptidů od 22 % ( $^{111}\text{In}$ -oktreotid) k 65 % ( $^{111}\text{In}$ -exendin) v poměru ke kumulaci u kontrolních myši. Částečně přetrvávající ledvinný uptake u knockoutovaných myši lze vysvětlit reziduální expresí megalinu, či přispěním dalšího mechanismu či mechanismů, které se mohou na ledvinném uptake radiopeptidů též podílet. Účast megalinu na uptake radiopeptidů byla prokázána i *in vitro* studii s jinými peptidy a jinými buněčnými ledvinnými modely - buňkami vačice (OK buňky) (Barone et al. 2005) či nativními ledvinnými buňkami potkana (Trejtnar et al. 2008). Ve studii s OK buňkami kompetitivní inhibice různými megalinovými ligandy, či neznačeným oktreotidem vyústila pouze v poloviční snížení uptake  $^{111}\text{In}$ -DTPA-*D*Phe-oktreotidu v buňkách (Barone et al. 2005), což v souladu s *in vivo* studii opět naznačuje účast další transportní cesty při buněčném uptake radiopeptidů.

V kontrastu k intaktním radiopeptidům nebylo u testovaných radiometabolitů dosaženo signifikantní inhibice akumulace vlivem albuminu, jen při vysokých koncentracích kompetitoru (obr. 32). Protože byla pozorována i velice nízká kumulace radiopeptidu v LLC-PK1 buňkách i bez přidání albuminu, nelze výsledky považovat za zcela validní a transport radiometabolitů megalinovým systémem nebyl přesvědčivě potvrzen. Toto zjištění také znamená, že na rozdíl od větších radiopeptidů, ledvinný uptake radiometabolitů pozorovaný v biodistribučních studiích není pravděpodobně spojen s aktivní endocytózou megalinem. Byla však pozorována inhibice transportu obou radiometabolitů do LLC-PK1 buněk při snížené teplotě, což může ukazovat na účast dalšího aktivního procesu zprostředkovávajícího vstup radiometabolitů do buněk. Ovšem buněčná kumulace metabolitů byla na rozdíl od intaktních látek inhibovatelná nízkou inkubační teplotou jen velmi omezeně (obr. 28), což ukazuje, že tyto látky se do buněk dostávají i přes částečnou účast aktivního mechanismu v převážné míře pasivním transportem.

Další cestou uptake proteinů a peptidů do buněk v ledvinách může být kromě receptory zprostředkované endocytózy i fluidní endocytóza. Howes et al. (2010) ukázali, že endocytóza nezávislá na klathrinu má vysokou kapacitu pro internalizaci membrán a tekutin, protože tímto mechanismem se do buňky dostane až 70 % tekutiny. Tento mechanismus však dosud nebyl jako cesta pro radioaktivně značené peptidy testován, přestože někteří autoři o jeho účasti spekulovali (Barone et al. 2005). K průkazu role fluidní endocytózy při

transmembránovém přenosu radiopeptidů jsme použili inhibitor rottlerin. Tato látka je velmi vhodným nástrojem pro experimentální studie, protože působí velice rychle, ireverzibilně a selektivně do koncentrace 3  $\mu\text{M}$  (Sarkar et al. 2005). Použitý experimentální model LLC-PK1 buněk je pro tyto účely vhodný, protože tyto buňky mají prokázanou schopnost fluidní endocytózy (Nielsen et al. 1998). Nižší akumulace všech testovaných peptidů, kromě  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu, v přítomnosti rottlerinu tak může být způsobena inhibicí fluidní endocytózy. Toto snížení buněčného uptake bylo jednoznačné již po použití rottlerinu v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  a se zvyšující se koncentrací se prohlubovalo (obr. 34). Proto můžeme říci, že fluidní endocytóza může přispívat k akumulaci radiopeptidů v buňkách společně s megalinem zprostředkovanou endocytózou. Na rozdíl od transportu parentních radiopeptidů, *in vitro* testy účast fluidní endocytózy na buněčném uptake nepotvrdily ani u jednoho ze dvou testovaných radiometabolitů.

Mnoho sloučenin je aktivně transportováno z krve do buněk proximálních tubulů procesem peritubulární absorpce a dále do moči prostřednictvím tubulární sekrece. Tyto procesy jsou zajišťovány řadou membránových transportérů. Významné jsou především SLC transportéry, které se podílejí na influxu velké řady látek do ledvinných buněk (Klaassen a Aleksunes 2010). Pro ledvinou exkreci, akumulaci a toxicitu řady látek hrají důležitou roli transportéry pro organické ionty ze skupin OAT a OCT. V této práci jsme studovali transport radiopeptidů a jejich metabolitů transportéry hOAT1 a hOCT2, které byly vybrány proto, že úroveň jejich exprese patří v ledvinách k nejvyšším (Nishimura a Naito 2005) a jejich substrátová specifita je poměrně široká (Klaassen a Aleksunes 2010).

Účast transportéru pro organické anionty na transportu některých radiopeptidů byla již dříve naznačena ve studii *in vivo*, ve které bylo ukázáno, že aplikace standardního inhibitoru OAT probenecidu vyvolává snížení ledvinného uptake SST derivátu  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TOC u potkanů téměř o 30 % (Stahl et al. 2007). Jiná *in vivo* studie ukazovala na účast OAT transportéru na ledvinné akumulaci  $^{111}\text{In}$  značeného MG0 (Sarkar et al. 2005). Ovšem vliv OAT na ledvinou kumulaci radiopeptidů byl hodnocen jako méně významný ve srovnání s úlohou megalinového endocytárního systému (Stahl et al. 2007). Jasný důkaz transportu receptorově specifických radiopeptidů pomocí OAT však nebyl zatím k dispozici.

Námi provedené *in vitro* akumulační studie porovnávaly akumulaci testovaných SST, gastrinových a bombesinových analogů značených  $^{177}\text{Lu}$ . Výsledky nepotvrdily žádný významný příspěvek hOAT1 k buněčné kumulaci (obr. 29). Tento nálezný je podpořen *in vivo* studií u potkanů, kde autoři nepozorovali signifikantní vliv substrátu/inhibitoru OAT

transportérů PAH na vychytávání oktreotidu v játrech (Yamada et al. 1997). Rozdílný závěr oproti studii provedené s použitím probenecidu může být vysvětlen skutečností, že se v nativních potkaních ledvinách vyskytuje více transportérů přenášejících organické anionty, které jsou inhibovatelné probenecidem (např. OAT3, OAT4, OAT-K1, OAT-K2, OATP) (Enomoto et al. 2002; Feng et al. 2013). Přesto, že jejich exprese je ve většině případů mnohem nižší než námi testovaného hOAT1, jejich úloha v přenosu radiopeptidů by měla být dále ověřena. Ovšem vzhledem k tomu, že specifita OAT transportérů pro transport vhodných substrátů není obecně příliš vysoká, může naznačovat absenci interakce radiopeptidů s hOAT1, že i interakce s dalšími subtypy OAT může být pravděpodobně velmi omezená či nevýznamná.

Faktorem, který by mohl být příčinou chybění interakce studovaných peptidů s hOAT1 transportérem by mohla být velikost testovaných látek. hOAT1 transportuje především malé molekuly do 500 Da (Srimaroeng et al. 2008). Přestože velikost molekuly ani náboj nejsou striktně omezeny (VanWert et al. 2010), bylo možné očekávat, že menší sloučeniny jako jsou metabolity radiopeptidů, by mohly mít vyšší potenciál pro interakci s OAT. I nález vysoké renální exkrece  $^{99m}\text{Tc}$  značených tetrapeptidů, zahrnující intenzivní tubulární sekreci (Trejtnar et al. 2008), která by u těchto záporně nabitých látek mohla být způsobena interakcí s OAT, naznačovala, že menší radiopeptidy by mohly být substráty tohoto transportéru. Shikano et al. (2004) navíc *in vitro* potvrdil, že i tripeptidový komplex  $^{99m}\text{Tc-MAG3}$  je transportován potkaním OAT1.

Vyšší pravděpodobnost interakce bylo možné očekávat u radiometabolitů s nižší molekulovou hmotností, neboť obsahovaly ve struktuře pouze jednu, resp. tři aminokyseliny. Avšak naše experimenty neprokázaly žádný vliv hOAT1 na transport obou těchto nízkomolekulárních metabolitů (obr. 29), přestože  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  obsahuje negativně nabitou karboxylovou skupinu glutamátu. V tomto případě se zdá být rozhodujícím již zmíněné pravidlo, že substrát OAT má mít hmotnost do 500 Da (Srimaroeng et al. 2008). DOTA-DGlu-Ala-Tyr má i bez radiokovu molekulovou hmotnost téměř 800, což znamená, že nespĺňuje uvedená velikostní kritéria. Molekulová hmotnost samotného DOTA-DPhe leží na hranici limitu a s radiokovem dosahuje více než 700 Da, proto také nepředstavuje optimálního kandidáta pro transport pomocí hOAT1. Pro interakci s hOAT1 se nejeví jako příznivé ani prostorové uspořádání  $^{177}\text{Lu-DOTA-DPhe}$ , protože atom Lu má podstatně větší velikost ve srovnání s techneciem, které je navázáno v  $^{99m}\text{Tc-MAG3}$  tripeptidu s výraznou interakcí s OAT1.

Transportér OCT2 preferuje dle současných znalostí především malé a při fyziologickém pH kladně nabitě substráty (Cano-Soldado a Pastor-Anglada 2012). Podmínky molekulové hmotnosti neodpovídají testované peptidy, a tak absence signifikantního transportu je v souladu s uvedenými skutečnostmi. Výsledky našich studií ale prokázaly, že u metabolitů tomu může již být jinak. Zatímco  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr také není substrátem hOCT2, u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe byl transport tímto přenašečem v použitém buněčném modelu potvrzen (obr. 30). Radiometabolit interaguje s hOCT2 přesto, že nese volnou karboxylovou skupinu a nemá žádnou skupinu bazickou. Bylo ale potvrzeno, že OCT neinteraguje výhradně s kationickými substráty, ale i s neutrálními a dokonce anionickými sloučeninami (Fujita et al. 2006). Podobně překvapující výsledky však přinesla i jiná studie, která se zabývala interakcí SST radiopeptidu  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TOC s OAT a OCT *in vivo*. Na rozdíl od prokázané inhibice ledvinné akumulace tohoto radiopeptidu použitím OAT inhibitoru probenecidu nebyla překvapivě pozorována inhibice pomocí OCT inhibitoru cimetidinu. Tento výsledek nebyl v souladu s předpoklady autorů, protože molekula  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TOC má při fyziologickém pH kationický charakter (Stahl et al. 2007). Jaká je role  $^{177}\text{Lu}$  v interakci s hOCT2 je obtížné odhadnout, neboť další údaje týkající se interakce tohoto přenašeče se sloučeninami obsahujícími chelátované atomy nejsou k dispozici.

Vedle influxních mechanismů, které jsou odpovědné za buněčný uptake, se na determinaci výsledné intracelulární koncentrace mohou podílet efluxní transportéry. Téměř žádné údaje o studiu interakce radiopeptidů a jejich metabolitů nejsou k dispozici, a proto jsme provedli pilotní *in vitro* studii zaměřenou na ověření transportu studovaných látek P-gp a transportérem BCRP. Ačkoliv peptidy nepatří mezi běžné substráty P-gp, bylo v *in vitro* studii s izolovaným proximálními tubuly ryb potvrzeno, že fluorescenčně značený derivátu oktreotidu je substrátem tohoto transportéru (Gutmann et al. 2000). Data získaná v transportních studiích s buňkami s vysokou expresí P-gp či BCRP neukázaly s jedinou výjimkou signifikantní míru transportu testovanými transportéry. Určitá míra transportu byla pozorována jen v případě transportéru BCRP a peptidu obsahujícího chelátor PCTA -  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu. Přesto že tato interakce je pouze mírná (poměr transportu ve směru A-B a B-A činil 2:3), může mít na kumulaci peptidů vliv. U analogu tohoto bombesinového derivátu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesinu jsme zapojení BCRP nepozorovali. Pokud by další experimenty toto zjištění potvrdily, tak by to mohlo naznačovat, že typ chelátoru v daném radiopeptidu je pro tuto interakci důležitý.

Významnou částí práce bylo posouzení vztahu mezi transportními mechanismy radiopeptidů a jejich metabolitů a jejich chováním v organismu, především jejich ledvinnou kumulací a retencí. Biodistribuční profil u potkanů byl u parentního peptidu  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  a jeho metabolitu  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  téměř shodný. Obě sloučeniny vykazovaly rychlý pokles koncentrace v krvi a receptorově negativních orgánech kromě ledvin (tab. 10, tab. 12). Jediným pozorovaným rozdílem mezi mateřským radiopeptidem a metabolitem byla detekce značně vyšší radioaktivity  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  v žaludku, což je pravděpodobně způsobeno vazbou intaktního minigastrinu na CCK receptory, které jsou právě v žaludku typicky exprimovány (Behr et al. 1999). Protože za vazbu na receptory je odpovědná čtyřpeptidová koncová sekvence Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> nemůže se metabolit postrádající tuto sekvenci na dané receptory specificky vázat. Velice podobná farmakokinetika radiometabolitu a parentního peptidu nepřímo potvrzuje rychlý metabolismus  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  (Ocak et al. 2011). Tvorba endogenního  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  je zřejmě natolik rychlá, že odpovídá farmakokinetice externě podaného metabolitu. Ačkoliv bylo publikováno, že při metabolizaci  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  dochází k tvorbě třech metabolitů (Ocak et al. 2011), prakticky shodná farmakokinetika  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  a  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  potvrzuje, že testovaný metabolit představuje rozhodující formu peptidu v organismu. Nemůžeme ale vyloučit, že i další radiometabolity formované z  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  *in vivo* mohou mít podobné farmakokinetické chování jako  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$  a uplatňují se na celkovém pohybu radioaktivity v organismu spolu s ním. Výsledky eliminačních studií u potkanů jsou v souladu s vysokou distribucí obou radiopeptidů do ledvin, protože močová exkrece byla identifikována u potkanů jako hlavní exkreční cesta jak u  $^{177}\text{Lu-DOTA-DGlu-Ala-Tyr}$ , tak u  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  a to s velmi blízkými kvantitativními poměry (tab. 14). Biodistribuce  $^{177}\text{Lu-DOTA-MG11}$  vykazovala podobné rysy jako biodistribuce DOTA-MG11 značeného  $^{111}\text{In}$  u potkanů (Melicharova et al. 2013) a myší (Laverman et al. 2011). Toto zjištění dokládá, že existuje pouze malá nebo žádná závislost mezi distribucí, druhem zvířete a typem radioaktivního prvku použitého ke značení.

Výsledky biodistribučních experimentů s  $^{177}\text{Lu-DOTA-DPhe}$  a  $^{177}\text{Lu-DOTA-NOC}$  u potkanů přinesly v některých aspektech podobné výsledky jako u předcházející dvojice peptid-metabolit v orgánové distribuci intaktního peptidu a metabolitu. I v tomto případě byla pozorována vysoká a dlouhotrvající akumulace intaktního peptidu  $^{177}\text{Lu-DOTA-NOC}$  v orgánech, vyznačujících se vysokou expresí SSTR, jako jsou ledviny nebo slinivka (Bison et al. 2014a), zatímco uptake metabolitu  $^{177}\text{Lu-DOTA-DPhe}$  v těchto orgánech byl zřetelně

nižší (tab. 11, tab. 13). Přesto, že nejvyšší radioaktivita na gram tkáně byla po aplikaci  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* detekována v ledvinách, byl ledvinný uptake tohoto metabolitu výrazně nižší ve srovnání s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC. Z tohoto důvodu lze uvažovat, že za vyšší ledvinný uptake  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC není odpovědná chelatující část molekuly, ale rozhodující komponentou je charakter peptidového řetězce. Rozdíly nalezené v distribuci *in vivo* mohou být pokládány za celkem očekávatelné, protože struktura  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* je již poměrně významně vzdálená od struktury peptidu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC. Molekula metabolitu také neobsahuje příslušnou aminokyselinovou sekvenci, která zajišťuje vazbu na cílové SSTR, což zapříčiňuje pozorovaný nižší uptake v receptorově pozitivních tkáních ve srovnání s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC. Distribuce radioaktivity a její retence v jednotlivých orgánech a tkáních peptidu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC je v souladu s výsledky publikovanými u potkanů jinými autory pro tento peptid značený  $^{111}\text{In}$  (Cihlo et al. 2008; Wild et al. 2003). Peptid  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC lze pokládat z pohledu jeho ledvinné farmakokinetiky za reprezentativního zástupce skupiny receptorově specifických SST analogů, protože zadrž v ledvinách je v intervalech 24 h a 48 h srovnatelná s DOTA-[Tyr<sup>3</sup>]oktreotátem značeným  $^{111}\text{In}$  či  $^{177}\text{Lu}$ , s  $^{111}\text{In}$ -DOTA-oktreotátem,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-oktreotidem či  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidem. Např. radioaktivita retenovaná v ledvinách v intervalu 24 h po aplikaci je u všech těchto peptidů v rozmezí 1,5-2,5 % ID/g (Cihlo et al. 2008; de Jong et al. 2001; Laznicek a Laznickova 2012; Laznicek et al. 2012; Laznicek et al. 2002b). Podobně je i míra močové exkrece zjištěná v eliminačních studiích u potkanů srovnatelná s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC, neboť u  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidu či  $^{111}\text{In}$ -DOTA-oktreotátu je za 48 h vyloučeno močí přibližně 70-80 % ID (Cihlo et al. 2008; Laznicek et al. 2002). Závěry plynoucí ze srovnání  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC s potenciálním metabolitem SST peptidů konjugovaných s DOTA –  $^{111}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* lze tedy s poměrně vysokou relevancí vztahovat i k dalším důležitým radiopeptidům z této skupiny.

Zjištění, že  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* je transportován do buněk transportérem hOCT2, které bylo prokázáno v experimentech *in vitro*, by mohlo vysvětlovat jeho vyšší exkreci v porovnání s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC v prvních dvou hodinách po aplikaci v eliminační studii u potkanů (tab. 14) Transportéry OCT se podílejí na sekreci xenobiotik a mohou tak proces močové exkrece výrazně zintenzivnit. Výraznější pokles radioaktivity v ledvinách pozorovaný v biodistribučních studiích v intervalu 60 min po podání u  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* (tab. 11) by mohl být podobně vysvětlen rychlejší močovou exkrecí  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-*DPhe* s účastí transportéru/ů pro organické kationty. Tento nálezn relativně rychlého vylučování radiometabolitu je však poněkud v rozporu s tendencí radiometabolitů radiopeptidů dlouho přetrvávat v ledvinných buňkách (Barone et al. 2005; Akizawa et al. 2008). Vysvětlením



mohou být rozdíly v intracelulární dispozici radiometabolitů vstupujících do buněk a tvořených intracelulárně.

## 7. Závěr

Výsledky uvedené v této práci přináší nové údaje o transportních mechanismech vývojových radiopeptidů ze skupin SST, gastrinových a bombesinových analogů radioaktivně značených radionuklidem  $^{177}\text{Lu}$ . Práce přináší poznatky o roli několika transportních systémů, které se mohou podílet na transmembránovém transportu radiopeptidů a mohou tak ovlivnit výsledný stupeň kumulace těchto látek v ledvinné tkáni. Zároveň byly získány zcela nové poznatky o transportních mechanismech modelových radiometabolitů a jejich osudu v organismu a posouzen jejich možný příspěvek k nežádoucí ledvinné akumulaci při aplikaci radiopeptidů.

Metodickým přínosem práce je optimalizace nebo charakterizace několika buněčných modelů pro testování transportu látek přes membrány buněk. Zároveň se podařilo úspěšně označit sérii peptidů a metabolitů  $^{177}\text{Lu}$  s adekvátní radiochemickou čistotou. Tyto postupy mohou být dále uplatňovány při experimentální práci na pracovišti.

Pomocí transportních studií byla potvrzena úloha aktivní endocytózy megalinovým systémem u všech šesti studovaných peptidů. Pouze s jednou výjimkou vedla inkubace s inhibitorem fluidní endocytózy ke snížení buněčné kumulace. Vzhledem k tomu, že testovaná analoga patří do různých skupin peptidů, můžeme obecně říci, že tyto dva mechanismy se reálně mohou podílet na uptake radiopeptidů v ledvinách.

V kontrastu k endocytárním mechanismům, buněčné studie neprokázaly vliv významných ledvinných SLC transportérů - hOAT1 a hOCT2 na uptake intaktních peptidů. Podařilo se nám ovšem přinést první *in vitro* dokumentaci o schopnosti transportéru hOCT2 přenášet metabolit SST analoga  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe do buněk. Pilotní testy ukázaly, že  $^{177}\text{Lu}$ -PCTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin slabě interaguje s BCRP transportérem, peptidy značené chelátorem DOTA však žádnou významnou interakci s efluxními transportéry nevykazovaly.

Uptake zkoumaných radiometabolitů *in vivo* v tkáních pozitivních na příslušné receptory byl nižší než u intaktních peptidů, což potvrdilo ztrátu specifické vazebné schopnosti peptidu v důsledku chybní specifické vazebné sekvence. Oba zkoumané metabolity byly rychle eliminovány z krve a organismu s převažující ledvinnou exkrecí. Ledvinná kumulace radiometabolitu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DGlu-Ala-Tyr byla srovnatelná s parentním peptidem. Kumulace  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-DPhe byla výrazně nižší jak ve srovnání se zjištěnými údaji pro intaktní SST peptid  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-NOC, tak v konfrontaci s daty z jiných studií s příbuznými radioaktivně značenými SST analogy. Námi získaná data by mohla

naznačovat negativní korelaci mezi stupněm degradace peptidového řetězce původních peptidů a ledvinnou retencí radiometabolitů.

Uvedená zjištění týkající se transportních mechanismů radiopeptidů a jejich radiometabolitů mohou být přínosem pro prohloubení znalostí o mechanismech determinujících farmakokinetiku a toxicitu receptorově specifických peptidů. Při dalším rozšíření by mohla získaná data přispět k poznání obecnějších zákonitostí chování radiopeptidů a jejich metabolitů v organismu a uplatnit se při hledání postupů pro snížení ledvinné toxicity radiopeptidů, či při formulaci nových látek s výhodnějšími vlastnostmi.

## 8. Zdroje literary

- Abdallah, H. M., A. M. Al-Abd, R. S. El-Dine, a A. M. El-Halawany. 2015. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *J Adv Res* 6 (1):45-62.
- Abdulhussein, A. A., a H. M. Wallace. 2014. Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids* 46 (3):655-660.
- Ahlin, G., C. Hilgendorf, J. Karlsson, C. A. Szigyarto, M. Uhlen, a P. Artursson. 2009. Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs. *Drug Metab Dispos* 37 (12):2275-2283.
- Ahn, S. Y., S. A. Eraly, I. Tsigelny, a S. K. Nigam. 2009. Interaction of organic cations with organic anion transporters. *J Biol Chem* 284 (45):31422-31430.
- Akizawa, H., Y. Arano, M. Mifune, A. Iwado, Y. Saito, T. Uehara, M. Ono, Y. Fujioka, K. Ogawa, Y. Kiso, a H. Saji. 2001. Significance of (111)In-DTPA chelate in renal radioactivity levels of (111)In-DTPA-conjugated peptides. *Nucl Med Biol* 28 (4):459-468.
- Akizawa, H., Y. Arano, T. Uezono, M. Ono, Y. Fujioka, T. Uehara, A. Yokoyama, K. Akaji, Y. Kiso, M. Koizumi, a H. Saji. 1998. Renal metabolism of 111In-DTPA-D-Phe1-octreotide in vivo. *Bioconjug Chem* 9 (6):662-670.
- Akizawa, H., T. Uehara, a Y. Arano. 2008. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 60 (12):1319-1328.
- Aller, S. G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, a G. Chang. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323 (5922):1718-1722.
- Ambrosini, V., M. Fani, S. Fanti, F. Forrer, a H. R. Maecke. 2011. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J Nucl Med* 52 Suppl 2:42S-55S.
- Anderson, C. J., a R. Ferdani. 2009. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 24 (4):379-393.
- Antunes, P., M. Ginj, M. A. Walter, J. Chen, J. C. Reubi, a H. R. Maecke. 2007. Influence of different spacers on the biological profile of a DOTA-somatostatin analogue. *Bioconjug Chem* 18 (1):84-92.
- Arnold, R., M. E. Trautmann, W. Creutzfeldt, R. Benning, M. Benning, C. Neuhaus, R. Jurgensen, K. Stein, H. Schafer, C. Bruns, a H. J. Drenner. 1996. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut* 38 (3):430-438.
- Asti, M., G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, a D. Salvo. 2008. Validation of (68)Ge/(68)Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of (68)Ga-DOTATOC. *Nucl Med Biol* 35 (6):721-724.
- Ayrton, A., a P. Morgan. 2001. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31 (8-9):469-497.
- Barone, R., P. Van Der Smissen, O. Devuyst, V. Beaujean, S. Pauwels, P. J. Courtoy, a F. Jamar. 2005. Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney (OK) cell line. *Kidney Int* 67 (3):969-976.
- Bass, L. A., M. V. Lanahan, J. R. Duncan, J. L. Erion, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, a C. J. Anderson. 1998. Identification of the soluble in vivo metabolites of indium-111-

- diethylenetriaminepentaacetic acid-D-Phe1-octreotide. *Bioconjug Chem* 9 (2):192-200.
- Behe, M., G. Kluge, W. Becker, M. Gotthardt, a T. M. Behr. 2005. Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *J Nucl Med* 46 (6):1012-1015.
- Behr, T. M., a M. P. Behe. 2002. Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin Nucl Med* 32 (2):97-109.
- Behr, T. M., D. M. Goldenberg, a W. Becker. 1998. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med* 25 (2):201-212.
- Behr, T. M., M. Gotthardt, A. Barth, a M. Behe. 2001. Imaging tumors with peptide-based radioligands. *Q J Nucl Med* 45 (2):189-200.
- Behr, T. M., N. Jenner, M. Behe, C. Angerstein, S. Gratz, F. Raue, a W. Becker. 1999. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med* 40 (6):1029-1044.
- Bison, S. M., M. W. Konijnenberg, M. Melis, S. E. Pool, M. R. Bernsen, J. J. Teunissen, D. J. Kwekkeboom, a M. de Jong. 2014a. Peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments. *Clin Transl Imaging* 2:55-66.
- Bison, S. M., S. E. Pool, S. J. Koelewijn, L. M. van der Graaf, H. C. Groen, M. Melis, a M. de Jong. 2014b. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) with [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotate in combination with RAD001 treatment: further investigations on tumor metastasis and response in the rat pancreatic CA20948 tumor model. *EJNMMI Res* 4:21.
- Bodei, L., M. Cremonesi, M. Ferrari, M. Pacifici, C. M. Grana, M. Bartolomei, S. M. Baio, M. Sansovini, a G. Paganelli. 2008. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATATE: the role of associated risk factors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (10):1847-1856.
- Bodei, L., M. Cremonesi, a G. Paganelli. 2014. Yttrium-based therapy for neuroendocrine tumors. *PET Clin* 9 (1):71-82.
- Brans, B., O. Linden, F. Giammarile, J. Tennvall, a C. Punt. 2006. Clinical applications of newer radionuclide therapies. *Eur J Cancer* 42 (8):994-1003.
- Breeman, W. A., M. de Jong, J. L. Erion, J. E. Bugaj, A. Srinivasan, B. F. Bernard, D. J. Kwekkeboom, T. J. Visser, a E. P. Krenning. 2002. Preclinical comparison of (111)In-labeled DTPA- or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med* 43 (12):1650-1656.
- Breeman, W. A., M. De Jong, T. J. Visser, J. L. Erion, a E. P. Krenning. 2003. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with 90Y, 111In and 177Lu at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30 (6):917-920.
- Breeman, W. A., a A. M. Verbruggen. 2007. The 68Ge/ 68Ga generator has high potential, but when can we use 68Ga-labelled tracers in clinical routine? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (7):978-981.
- Brogstetter, C., K. Zophel, H. Hartmann, M. Schottelius, H. J. Wester, a J. Kotzerke. 2014. Twins in spirit part II: DOTATATE and high-affinity DOTATATE--the clinical experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41 (6):1158-1165.
- Burckhardt, G. 2012. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther* 136 (1):106-130.
- Busch, A. E., U. Karbach, D. Miska, V. Gorboulev, A. Akhoundova, C. Volk, P. Arndt, J. C. Ulzheimer, M. S. Sonders, C. Baumann, S. Waldegger, F. Lang, a H. Koepsell. 1998.

- Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol* 54 (2):342-352.
- Cano-Soldado, P., a M. Pastor-Anglada. 2012. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev* 32 (2):428-457.
- Cihlo, J., L. Melicharova, M. Petrik, A. Laznickova, a M. Laznicek. 2008. Comparison of <sup>111</sup>In-DOTA-NOC and <sup>111</sup>In-DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: conflicting results in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 28 (4B):2189-2195.
- Cremonesi, M., F. Botta, A. Di Dia, M. Ferrari, L. Bodei, C. De Cicco, A. Rossi, M. Bartolomei, R. Mei, S. Severi, M. Salvatori, G. Pedroli, a G. Paganelli. 2010. Dosimetry for treatment with radiolabelled somatostatin analogues. A review. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 54 (1):37-51.
- Cwikla, J. B., A. Sankowski, N. Seklecka, J. R. Buscombe, A. Nasierowska-Guttmejer, K. G. Jeziorski, R. Mikolajczak, D. Pawlak, K. Stepien, a J. Walecki. 2010. Efficacy of radionuclide treatment DOTATATE Y-90 in patients with progressive metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NETs): a phase II study. *Ann Oncol* 21 (4):787-794.
- Dapp, S., C. Muller, E. G. Garayoa, P. Blauenstein, V. Maes, L. Brans, D. A. Tourwe, a R. Schibli. 2012. PEGylation, increasing specific activity and multiple dosing as strategies to improve the risk-benefit profile of targeted radionuclide therapy with <sup>177</sup>Lu-DOTA-bombesin analogues. *EJNMMI Res* 2 (1):24.
- de Araujo, E. B., J. S. Caldeira Filho, L. T. Nagamati, E. Muramoto, M. T. Colturato, R. M. Couto, P. B. Pujatti, J. Mengatti, a C. P. Silva. 2009. A comparative study of <sup>131</sup>I and <sup>177</sup>Lu labeled somatostatin analogues for therapy of neuroendocrine tumours. *Appl Radiat Isot* 67 (2):227-233.
- de Jong, M., R. Barone, E. Krenning, B. Bernard, M. Melis, T. Visser, M. Gekle, T. E. Willnow, S. Walrand, F. Jamar, a S. Pauwels. 2005a. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (<sup>111</sup>In-DTPA-octreotide. *J Nucl Med* 46 (10):1696-1700.
- de Jong, M., W. A. Breeman, B. F. Bernard, W. H. Bakker, M. Schaar, A. van Gameren, J. E. Bugaj, J. Erion, M. Schmidt, A. Srinivasan, a E. P. Krenning. 2001. [<sup>177</sup>Lu-DOTA(0),Tyr3] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer* 92 (5):628-633.
- de Jong, M., W. A. Breeman, R. Valkema, B. F. Bernard, a E. P. Krenning. 2005b. Combination radionuclide therapy using <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* 46 Suppl 1:13S-17S.
- de Jong, M., E. J. Rolleman, B. F. Bernard, T. J. Visser, W. H. Bakker, W. A. Breeman, a E. P. Krenning. 1996. Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J Nucl Med* 37 (8):1388-1392.
- DeGorter, M. K., C. Q. Xia, J. J. Yang, a R. B. Kim. 2012. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:249-273.
- Deshayes, S., M. C. Morris, G. Divita, a F. Heitz. 2005. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 62 (16):1839-1849.
- Dijkgraaf, I., O. C. Boerman, W. J. Oyen, F. H. Corstens, a M. Gotthardt. 2007. Development and application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med Chem* 7 (5):543-551.
- Enomoto, A., M. Takeda, M. Shimoda, S. Narikawa, Y. Kobayashi, Y. Kobayashi, T. Yamamoto, T. Sekine, S. H. Cha, T. Niwa, a H. Endou. 2002. Interaction of human

- organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 301 (3):797-802.
- Fani, M., H. R. Maecke, a S. M. Okarvi. 2012. Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* 2 (5):481-501.
- Feng, B., S. Hurst, Y. Lu, M. V. Varma, C. J. Rotter, A. El-Kattan, P. Lockwood, a B. Corrigan. 2013. Quantitative prediction of renal transporter-mediated clinical drug-drug interactions. *Mol Pharm* 10 (11):4207-4215.
- Feng, B., J. L. LaPerle, G. Chang, a M. V. Varma. 2010. Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6 (8):939-952.
- Ferreira, C. L., E. Lamsa, M. Woods, Y. Duan, P. Fernando, C. Bensimon, M. Kordos, K. Guenther, P. Jurek, a G. E. Kiefer. 2010. Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 21 (3):531-536.
- Froberg, A. C., M. de Jong, B. A. Nock, W. A. Breeman, J. L. Erion, T. Maina, M. Verdijseldonck, W. W. de Herder, A. van der Lugt, P. P. Kooij, a E. P. Krenning. 2009. Comparison of three radiolabelled peptide analogues for CCK-2 receptor scintigraphy in medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36 (8):1265-1272.
- Fujita, T., T. J. Urban, M. K. Leabman, K. Fujita, a K. M. Giacomini. 2006. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. *J Pharm Sci* 95 (1):25-36.
- Gabriel, M., C. Decristoforo, D. Kendler, G. Dobrozemsky, D. Heute, C. Uprimny, P. Kovacs, E. Von Guggenberg, R. Bale, a I. J. Virgolini. 2007. <sup>68</sup>Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J Nucl Med* 48 (4):508-518.
- Gambini, J. P., A. Quagliata, R. Finozzi, P. Serra, G. Lago, J. Gaudio, H. Engler, a O. Alonso. 2011. Tc-99m- and Ga-68-labeled somatostatin analogues in the evaluation of Hurthle cell thyroid cancer. *Clin Nucl Med* 36 (9):803-804.
- Garcia de la Torre, N., J. A. Wass, a H. E. Turner. 2002. Antiangiogenic effects of somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57 (4):425-441.
- Genestreti, G., A. Bongiovanni, M. A. Burgio, S. L. Burgio, A. Musto, A. Rossi, M. Monti, E. Scarpì, P. Ulivi, S. Bravaccini, A. Dubini, F. Matteucci, a G. Gavelli. 2014. <sup>111</sup>In-Pentetreotide (OctreoScan) scintigraphy in the staging of small-cell lung cancer: its accuracy and prognostic significance. *Nucl Med Commun.* 36(2):135-42.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski, a L. Zhang. 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9 (3):215-236.
- Gonzalez, N., T. W. Moody, H. Igarashi, T. Ito, a R. T. Jensen. 2008. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15 (1):58-64.
- Good, S., M. A. Walter, B. Waser, X. Wang, J. Muller-Brand, M. P. Behe, J. C. Reubi, a H. R. Maecke. 2008. Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (10):1868-1877.
- Gopal, E., Y. J. Fei, M. Sugawara, S. Miyauchi, L. Zhuang, P. Martin, S. B. Smith, P. D. Prasad, a V. Ganapathy. 2004. Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J Biol Chem* 279 (43):44522-44532.

- Gorboulev, V., J. C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A. E. Busch, a H. Koepsell. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16 (7):871-881.
- Gotthardt, M., J. van Eerd-Vismale, W. J. Oyen, M. de Jong, H. Zhang, E. Rolleman, H. R. Maecke, M. Behe, a O. Boerman. 2007. Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. *J Nucl Med* 48 (4):596-601.
- Gutmann, H., D. S. Miller, A. Droulle, J. Drewe, A. Fahr, a G. Fricker. 2000. P-glycoprotein- and mrp2-mediated octreotide transport in renal proximal tubule. *Br J Pharmacol* 129 (2):251-256.
- He, L., K. Vasilidou, a D. W. Nebert. 2009. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* 3 (2):195-206.
- Hofmann, M., H. Maecke, R. Borner, E. Weckesser, P. Schoffski, L. Oei, J. Schumacher, M. Henze, A. Heppeler, J. Meyer, a H. Knapp. 2001. Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand (68)Ga-DOTATOC: preliminary data. *Eur J Nucl Med* 28 (12):1751-1757.
- Homan, K. T., a J. J. Tesmer. 2014. Structural insights into G protein-coupled receptor kinase function. *Curr Opin Cell Biol* 27:25-31.
- Howes, M. T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P. J. Walser, F. Simpson, M. M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M. R. Lindsay, D. J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P. J. Robinson, J. F. Hancock, S. Mayor, a R. G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol* 190 (4):675-691.
- Charrier, N., A. Deveze, N. Fakhry, F. Sebag, I. Morange, B. Gaborit, A. Barlier, E. Carmona, C. De Micco, S. Garcia, J. Mancini, F. F. Palazzo, J. P. Lavieille, M. Zanaret, J. F. Henry, O. Mundler, a D. Taieb. 2011. Comparison of [(1)(1)(1)In]pentetretotide-SPECT and [(1)(8)F]FDOPA-PET in the localization of extra-adrenal paragangliomas: the case for a patient-tailored use of nuclear imaging modalities. *Clin Endocrinol (Oxf)* 74 (1):21-29.
- Choudhuri, S., N. J. Cherrington, N. Li, a C. D. Klaassen. 2003. Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metab Dispos* 31 (11):1337-1345.
- Christensen, E. I., a H. Birn. 2002. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (4):256-266.
- Christensen, E. I., H. Birn, T. Storm, K. Weyer, a R. Nielsen. 2012. Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)* 27 (4):223-236.
- Christensen, E. I., a J. Gburek. 2004. Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr Nephrol* 19 (7):714-721.
- Jani, M., C. Ambrus, R. Magnan, K. T. Jakab, E. Beery, J. K. Zolnerciks, a P. Krajcsi. 2014. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch Toxicol* 88 (6):1205-1248.
- Jones, A. T. 2007. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 11 (4):670-684.
- Jonker, J. W., a A. H. Schinkel. 2004. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 308 (1):2-9.
- Kaltsas, G. A., D. Papadogias, P. Makras, a A. B. Grossman. 2005. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocr Relat Cancer* 12 (4):683-699.



- Karbach, U., J. Kricke, F. Meyer-Wentrup, V. Gorboulev, C. Volk, D. Loffing-Cueni, B. Kaissling, S. Bachmann, a H. Koepsell. 2000. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 (4):F679-687.
- Kerr, M. C., a R. D. Teasdale. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic* 10 (4):364-371.
- Kim, W. D., G. E. Kiefer, F. Maton, K. McMillan, R. N. Muller, a A. D. Sherry. 1995. Relaxometry, luminiscence measurements, electrophoresis, and animal biodistribution of lanthanide(III) complexes of some polyaza macrocyclic acetates containing pyridine. *Inorg.Chem.* 34 (8):2233-2243.
- Klaassen, C. D., a L. M. Aleksunes. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 62 (1):1-96.
- Koepsell, H. 2004. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 25 (7):375-381.
- . 2013. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34 (2-3):413-435.
- Konkoy, C. S., a T. P. Davis. 1996. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. *Trends Pharmacol Sci* 17 (8):288-294.
- Kopecky, M., F. Trejtnar, M. Laznicek, A. Laznickova, V. Semecky, T. Maina, a B. Nock. 2005. 99mTc demotate 1: biodistribution and elimination characteristics in rats. *Nucl Med Commun* 26 (6):549-554.
- Korec, D. 2009. Studium stability monoklonální protilátky nimotuzumab modifikované chelátorem DTPA radioaktivně značené luteciem-177 ([177Lu]Lu-hR3(p-SCN-Bn)DTPA). Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta.
- Koumarianou, E., R. Mikolajczak, D. Pawlak, X. Zikos, P. Bouziotis, P. Garnuszek, U. Karczmarczyk, M. Maurin, a S. C. Archimandritis. 2009. Comparative study on DOTA-derivatized bombesin analog labeled with 90Y and 177Lu: in vitro and in vivo evaluation. *Nucl Med Biol* 36 (6):591-603.
- Kozyraki, R., J. Fyfe, P. J. Verroust, C. Jacobsen, A. Dautry-Varsat, J. Gburek, T. E. Willnow, E. I. Christensen, a S. K. Moestrup. 2001. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (22):12491-12496.
- Krenning, E. P., W. H. Bakker, P. P. Kooij, W. A. Breeman, H. Y. Oei, M. de Jong, J. C. Reubi, T. J. Visser, C. Bruns, D. J. Kwkkeboom, a et al. 1992. Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide. *J Nucl Med* 33 (5):652-658.
- Krtolica, A., a J. W. Ludlow. 1996. Hypoxia arrests ovarian carcinoma cell cycle progression, but invasion is unaffected. *Cancer Res* 56 (5):1168-1173.
- Kulkarni, H. R., a R. P. Baum. 2014. Patient selection for personalized peptide receptor radionuclide therapy using Ga-68 somatostatin receptor PET/CT. *PET Clin* 9 (1):83-90.
- Kunikowska, J., L. Krolicki, A. Hubalewska-Dydejczyk, R. Mikolajczak, A. Sowa-Staszczak, a D. Pawlak. 2011. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38 (10):1788-1797.
- Kwkkeboom, D., E. P. Krenning, a M. de Jong. 2000. Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med* 41 (10):1704-1713.
- Kwkkeboom, D. J., J. J. Teunissen, W. H. Bakker, P. P. Kooij, W. W. de Herder, R. A. Feelders, C. H. van Eijck, J. P. Esser, B. L. Kam, a E. P. Krenning. 2005.

- Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J Clin Oncol* 23 (12):2754-2762.
- Langer, M., a A. G. Beck-Sickinger. 2001. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 1 (1):71-93.
- Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. 2006. *Nephron Physiol.* 103(3):97-106.
- Laverman, P., M. Behe, W. J. Oyen, P. H. Willems, F. H. Corstens, T. M. Behr, a O. C. Boerman. 2004. Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjug Chem* 15 (3):561-568.
- Laverman, P., L. Joosten, A. Eek, S. Roosenburg, P. K. Peitl, T. Maina, H. Macke, L. Aloj, E. von Guggenberg, J. K. Sosabowski, M. de Jong, J. C. Reubi, W. J. Oyen, a O. C. Boerman. 2011. Comparative biodistribution of 12 (1)(1)(1)In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38 (8):1410-1416.
- Laznicek, M., a A. Laznickova. 2012. Different radioactivity uptake between somatostatin analogues labelled with (1)(1)(1)In and (9)(0)/(8)(8)Y in rat kidney. *Anticancer Res* 32 (3):815-822.
- Laznicek, M., A. Laznickova, H. R. Macke, K. Eisenwiener, J. C. Reubi, a S. Wenger. 2002a. Octreotide and octreotate derivatives radiolabeled with yttrium: pharmacokinetics in rats. *Cancer Biother Radiopharm* 17 (5):527-533.
- Laznicek, M., A. Laznickova, a H. R. Maecke. 2012. Receptor affinity and preclinical biodistribution of radiolabeled somatostatin analogs. *Anticancer Res* 32 (3):761-766.
- Laznicek, M., A. Laznickova, F. Trejtnar, P. Lorenc, A. Varvarigou, P. Bouziotis, a S. Archimandritis. 2002b. Lanreotide labeled with 99mTc: preparation, preclinical testing and comparison with (111)In-DTPA-octreotide. *Anticancer Res* 22 (4):2125-2130.
- Lears, K. A., R. Ferdani, K. Liang, A. Zheleznyak, R. Andrews, C. D. Sherman, S. Achilefu, C. J. Anderson, a B. E. Rogers. 2011. In vitro and in vivo evaluation of 64Cu-labeled SarAr-bombesin analogs in gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer. *J Nucl Med* 52 (3):470-477.
- Lin, K. S., A. Luu, K. E. Baidoo, H. Hashemzadeh-Gargari, M. K. Chen, K. Brennehan, R. Pili, M. Pomper, M. A. Carducci, a H. N. Wagner, Jr. 2005. A new high affinity technetium-99m-bombesin analogue with low abdominal accumulation. *Bioconjug Chem* 16 (1):43-50.
- Lincke, C. R., J. J. Smit, T. van der Velde-Koerts, a P. Borst. 1991. Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus. *J Biol Chem* 266 (8):5303-5310.
- Liu, S., a D. S. Edwards. 2001. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 12 (1):7-34.
- Liu, W., W. R. Yu, T. Carling, C. Juhlin, J. Rastad, P. Ridefelt, G. Akerstrom, a P. Hellman. 1998. Regulation of gp330/megalín expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 28 (2):100-107.
- Lundberg, M., S. Wikstrom, a M. Johansson. 2003. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* 8 (1):143-150.
- Lundgren, S., T. Carling, G. Hjalrn, C. Juhlin, J. Rastad, U. Pihlgren, L. Rask, G. Akerstrom, a P. Hellman. 1997. Tissue distribution of human gp330/megalín, a putative Ca(2+)-sensing protein. *J Histochem Cytochem* 45 (3):383-392.
- Madani, F., S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, a A. Graslund. 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011:414729.
- Maddalena, M. E., J. Fox, J. Chen, W. Feng, A. Cagnolín, K. E. Linder, M. F. Tweedle, A. D. Nunn, a L. E. Lantry. 2009. 177Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic

- efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *J Nucl Med* 50 (12):2017-2024.
- Mankoff, D. A., J. M. Link, H. M. Linden, L. Sundararajan, a K. A. Krohn. 2008. Tumor receptor imaging. *J Nucl Med* 49 Suppl 2:149S-163S.
- Mao, Q., a J. D. Unadkat. 2005. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 7 (1):E118-133.
- . 2015. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J* 17 (1):65-82.
- Marquez, B., a F. Van Bambeke. 2011. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Curr Drug Targets* 12 (5):600-620.
- Marzolo, M. P., a P. Farfan. 2011. New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol Res* 44 (1):89-105.
- Melicharova, L., A. Laznickova, a M. Laznickek. 2013. Preclinical evaluation of gastrin derivatives labelled with In: Radiolabelling, affinity profile and pharmacokinetics in rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*
- Melis, M., M. Bijster, M. de Visser, M. W. Konijnenberg, J. de Swart, E. J. Rolleman, O. C. Boerman, E. P. Krenning, a M. de Jong. 2009. Dose-response effect of Gelofusine on renal uptake and retention of radiolabelled octreotate in rats with CA20948 tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36 (12):1968-1976.
- Melis, M., E. P. Krenning, B. F. Bernard, R. Barone, T. J. Visser, a M. de Jong. 2005. Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (10):1136-1143.
- Melis, M., E. P. Krenning, B. F. Bernard, M. de Visser, E. Rolleman, a M. de Jong. 2007. Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nucl Med Biol* 34 (6):633-641.
- Melis, M., R. Valkema, E. P. Krenning, a M. de Jong. 2012. Reduction of renal uptake of radiolabeled octreotate by amifostine coadministration. *J Nucl Med* 53 (5):749-753.
- Merlo, A., O. Hausmann, M. Wasner, P. Steiner, A. Otte, E. Jermann, P. Freitag, J. C. Reubi, J. Muller-Brand, O. Gratzl, a H. R. Macke. 1999. Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue 90Y-labeled DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas. *Clin Cancer Res* 5 (5):1025-1033.
- Mezi, S., F. Primi, E. Orsi, F. Capocchetti, F. Scopinaro, a O. Schillaci. 2005. Somatostatin receptor scintigraphy in metastatic breast cancer patients. *Oncol Rep* 13 (1):31-35.
- Miederer, M., G. Henriksen, A. Alke, I. Mossbrugger, L. Quintanilla-Martinez, R. Senekowitsch-Schmidtke, a M. Essler. 2008. Preclinical evaluation of the alpha-particle generator nuclide <sup>225</sup>Ac for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 14 (11):3555-3561.
- Motohashi, H., Y. Sakurai, H. Saito, S. Masuda, Y. Urakami, M. Goto, A. Fukatsu, O. Ogawa, a K. Inui. 2002. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 13 (4):866-874.
- Nagai, J., K. Sato, R. Yumoto, a M. Takano. 2011. Megalin/cubilin-mediated uptake of FITC-labeled IgG by OK kidney epithelial cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 26 (5):474-485.
- Nielsen, R., H. Birn, S. K. Moestrup, M. Nielsen, P. Verroust, a E. I. Christensen. 1998. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol* 9 (10):1767-1776.

- Nielsen, R., B. S. Sorensen, H. Birn, E. I. Christensen, a E. Nexø. 2001. Transcellular transport of vitamin B(12) in LLC-PK1 renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 12 (6):1099-1106.
- Nishimura, M., a S. Naito. 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 (6):452-477.
- Nock, B., A. Nikolopoulou, E. Chiotellis, G. Loudos, D. Maintas, J. C. Reubi, a T. Maina. 2003. [<sup>99m</sup>Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30 (2):247-258.
- Nock, B. A., A. Nikolopoulou, A. Galanis, P. Cordopatis, B. Waser, J. C. Reubi, a T. Maina. 2005. Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with <sup>99m</sup>Tc: a preclinical study. *J Med Chem* 48 (1):100-110.
- O'Donoghue, J. A., M. Bardies, a T. E. Wheldon. 1995. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J Nucl Med* 36 (10):1902-1909.
- Oberg, K., a D. Castellano. 2011. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 30 Suppl 1:3-7.
- Ocak, M., A. Helbok, C. Rangger, P. K. Peitl, B. A. Nock, G. Morelli, A. Eek, J. K. Sosabowski, W. A. Breeman, J. C. Reubi, a C. Decristoforo. 2011. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38 (8):1426-1435.
- Ohki-Hamazaki, H., M. Iwabuchi, a F. Maekawa. 2005. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol* 49 (2-3):293-300.
- Okarvi, S. M. 2001. Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* 28 (7):929-938.
- . 2004. Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases. *Med Res Rev* 24 (3):357-397.
- . 2008. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev* 34 (1):13-26.
- Orlando, R. A., K. Rader, F. Authier, H. Yamazaki, B. I. Posner, J. J. Bergeron, a M. G. Farquhar. 1998. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol* 9 (10):1759-1766.
- Pajor, A. M. 2006. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451 (5):597-605.
- Pansky, A., A. De Weerth, E. Fasler-Kan, J. L. Boulay, M. Schulz, S. Ketterer, C. Selck, C. Beglinger, T. Von Schrenck, a P. Hildebrand. 2000. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 11 (8):1409-1418.
- Park, H. M. 2002. <sup>123</sup>I: almost a designer radioiodine for thyroid scanning. *J Nucl Med* 43 (1):77-78.
- Pauwels, S., T. Najdovski, R. Dimaline, C. M. Lee, a M. Deschodt-Lanckman. 1989. Degradation of human gastrin and CCK by endopeptidase 24.11: differential behaviour of the sulphated and unsulphated peptides. *Biochim Biophys Acta* 996 (1-2):82-88.
- Petřík, M. 2008. Příprava a analýza radioaktivně značených biologicky aktivních látek. Disertační práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta.

- Pool, S. E., E. P. Krenning, G. A. Koning, C. H. van Eijck, J. J. Teunissen, B. Kam, R. Valkema, D. J. Kwekkeboom, a M. de Jong. 2010. Preclinical and clinical studies of peptide receptor radionuclide therapy. *Semin Nucl Med* 40 (3):209-218.
- Prabakaran, T., R. Nielsen, J. V. Larsen, S. S. Sorensen, U. Feldt-Rasmussen, M. A. Saleem, C. M. Petersen, P. J. Verroust, a E. I. Christensen. 2011. Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease. *PLoS One* 6 (9):e25065.
- Price, E. W., a C. Orvig. 2014. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 43 (1):260-290.
- Pujatti, P. B., J. S. Santos, R. M. Couto, L. T. Melero, M. F. Suzuki, C. R. Soares, S. R. Grallert, J. Mengatti, a E. B. De Araujo. 2011. Novel series of (177)Lu-labeled bombesin derivatives with amino acidic spacers for selective targeting of human PC-3 prostate tumor cells. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 55 (3):310-323.
- Quan, Y., Y. Jin, T. N. Faria, C. A. Tilford, A. He, D. A. Wall, R. L. Smith, a B. S. Vig. 2012. Expression Profile of Drug and Nutrient Absorption Related Genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells Grown under Differentiation Conditions. *Pharmaceutics* 4 (2):314-333.
- Reubi, J. C. 2003. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24 (4):389-427.
- Reubi, J. C., M. Gugger, a B. Waser. 2002. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting *Eur J Nucl Med* 29 (7):855-862.
- Reubi, J. C., M. Korner, B. Waser, L. Mazzucchelli, a L. Guillou. 2004. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (6):803-810.
- Reubi, J. C., E. Krenning, S. W. Lamberts, a L. Kvols. 1990. Somatostatin receptors in malignant tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37 (6):1073-1077.
- Reubi, J. C., H. R. Macke, a E. P. Krenning. 2005. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* 46 Suppl 1:67S-75S.
- Reubi, J. C., J. C. Schar, B. Waser, S. Wenger, A. Heppeler, J. S. Schmitt, a H. R. Macke. 2000. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 27 (3):273-282.
- Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, a B. Lebleu. 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278 (1):585-590.
- Rinke, A., H. H. Muller, C. Schade-Brittinger, K. J. Klose, P. Barth, M. Wied, C. Mayer, B. Aminossadati, U. F. Pape, M. Blaker, J. Harder, C. Arnold, T. Gress, R. Arnold, a P. S. Group. 2009. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol* 27 (28):4656-4663.
- Rizwan, A. N., a G. Burckhardt. 2007. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 24 (3):450-470.
- Rolleman, E. J., B. F. Bernard, W. A. Breeman, F. Forrer, E. de Blois, J. Hoppin, M. Gotthardt, O. C. Boerman, E. P. Krenning, a M. de Jong. 2008. Molecular imaging of reduced renal uptake of radiolabelled [DOTA0,Tyr3]octreotate by the combination of lysine and Gelofusine in rats. *Nuklearmedizin* 47 (3):110-115.

- Rolleman, E. J., R. Valkema, M. de Jong, P. P. Kooij, a E. P. Krenning. 2003. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30 (1):9-15.
- Rossi, R. E., S. Massironi, D. Conte, a M. Peracchi. 2014. Therapy for metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Ann Transl Med* 2 (1):8.
- Russo, L. M., R. M. Sandoval, M. McKee, T. M. Osicka, A. B. Collins, D. Brown, B. A. Molitoris, a W. D. Comper. 2007. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* 71 (6):504-513.
- Sainz-Esteban, A., R. Olmos, M. Gonzalez-Sagrado, M. L. Gonzalez, M. A. Ruiz, P. Garcia-Talavera, C. Gamazo, J. G. Villanueva, A. Cobo, a D. de Luis. 2014. Contribution of <sup>111</sup>In-pentetreotide SPECT/CT imaging to conventional somatostatin receptor scintigraphy in the detection of neuroendocrine tumours. *Nucl Med Commun*.36:251-9
- Sandvig, K., S. Pust, T. Skotland, a B. van Deurs. 2011. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* 23 (4):413-420.
- Sancho, V., A. Di Florio, T. W. Moody, a R. T. Jensen. 2011. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr Drug Deliv* 8 (1):79-134.
- Santini, C., J. Kuil, S. E. Pool, A. Bunchoten, M. R. Bernsen, F. W. B. van Leeuwen, a M. de jong. 2014. SPECT/CT based evaluation of a hybrid Octreotate probe in the H69 neuroendocrine tumor model. *ECR 2014 Scientific Exhibit C-2007*:1.
- Sarkar, K., M. J. Kruhlak, S. L. Erlandsen, a S. Shaw. 2005. Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 116 (4):513-524.
- Sengul, S., S. Erturk, A. M. Khan, a V. Batuman. 2013. Receptor-associated protein blocks internalization and cytotoxicity of myeloma light chain in cultured human proximal tubular cells. *PLoS One* 8 (7):e70276.
- Seregni, E., M. Maccauro, C. Chiesa, L. Mariani, C. Pascali, V. Mazzaferro, F. De Braud, R. Buzzoni, M. Milione, A. Lorenzoni, A. Bogni, A. Coliva, S. Lo Vullo, a E. Bombardieri. 2014. Treatment with tandem [<sup>90</sup>Y]DOTA-TATE and [<sup>177</sup>Lu]DOTA-TATE of neuroendocrine tumours refractory to conventional therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41 (2):223-230.
- Shikano, N., Y. Kanai, K. Kawai, N. Ishikawa, a H. Endou. 2004. Transport of <sup>99m</sup>Tc-MAG3 via rat renal organic anion transporter 1. *J Nucl Med* 45 (1):80-85.
- Schlessinger, A., N. Khuri, K. M. Giacomini, a A. Sali. 2013. Molecular modeling and ligand docking for solute carrier (SLC) transporters. *Curr Top Med Chem* 13 (7):843-856.
- Schmitz, C., J. Hilpert, C. Jacobsen, C. Boensch, E. I. Christensen, F. C. Luft, a T. E. Willnow. 2002. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem* 277 (1):618-622.
- Schwegler, J. S., B. Heppelmann, S. Mildenerger, a S. Silbernagl. 1991. Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Pflugers Arch* 418 (4):383-392.
- Silva, R., V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos, a F. Remiao. 2014. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*.149:1-123.
- Smith, C. J., H. Gali, G. L. Sieckman, D. L. Hayes, N. K. Owen, D. G. Mazuru, W. A. Volkert, a T. J. Hoffman. 2003. Radiochemical investigations of <sup>177</sup>Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH<sub>2</sub>: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. *Nucl Med Biol* 30 (2):101-109.

- Srimaroeng, C., J. L. Perry, a J. B. Pritchard. 2008. Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 38 (7-8):889-935.
- Stahl, A. R., B. Wagner, T. Poethko, M. Perutka, H. J. Wester, M. Essler, U. Heemann, M. Schwaiger, a J. Lutz. 2007. Renal accumulation of [<sup>111</sup>In]DOTATOC in rats: influence of inhibitors of the organic ion transport and diuretics. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (12):2129-2134.
- Susini, C., a L. Buscail. 2006. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol* 17 (12):1733-1742.
- Takakura, Y., T. Morita, M. Fujikawa, M. Hayashi, H. Sezaki, M. Hashida, a R. T. Borchardt. 1995. Characterization of LLC-PK1 kidney epithelial cells as an in vitro model for studying renal tubular reabsorption of protein drugs. *Pharm Res* 12 (12):1968-1972.
- Taniyama, Y., T. Suzuki, Y. Mikami, T. Moriya, S. Satomi, a H. Sasano. 2005. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J* 52 (5):605-611.
- Terada, T., a K. Inui. 2007. Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney. *Biochem Pharmacol* 73 (3):440-449.
- Trejtner, F., M. Laznicek, A. Laznickova, a S. J. Mather. 2000. Pharmacokinetics and renal handling of <sup>99m</sup>Tc-labeled peptides. *J Nucl Med* 41 (1):177-182.
- Trejtner, F., Z. Novy, M. Petrik, A. Laznickova, L. Melicharova, M. Vankova, a M. Laznicek. 2008. In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111. *Ann Nucl Med* 22 (10):859-867.
- Urakami, Y., M. Okuda, S. Masuda, H. Saito, a K. I. Inui. 1998. Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 287 (2):800-805.
- Urakami, Y., M. Okuda, H. Saito, a K. Inui. 2000. Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett* 473 (2):173-176.
- Valkema, R., M. De Jong, W. H. Bakker, W. A. Breeman, P. P. Kooij, P. J. Lugtenburg, F. H. De Jong, A. Christiansen, B. L. Kam, W. W. De Herder, M. Stridsberg, J. Lindemans, G. Ensing, a E. P. Krenning. 2002. Phase I study of peptide receptor radionuclide therapy with [In-DTPA]octreotide: the Rotterdam experience. *Semin Nucl Med* 32 (2):110-122.
- Valkema, R., S. A. Pauwels, L. K. Kvols, D. J. Kwekkeboom, F. Jamar, M. de Jong, R. Barone, S. Walrand, P. P. Kooij, W. H. Bakker, J. Lasher, a E. P. Krenning. 2005. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with (<sup>90</sup>Y-DOTA(0),Tyr(3)-octreotide and (<sup>177</sup>Lu-DOTA(0), Tyr(3)-octreotate. *J Nucl Med* 46 Suppl 1:83S-91S.
- Van Essen, M., E. P. Krenning, M. De Jong, R. Valkema, a D. J. Kwekkeboom. 2007. Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. *Acta Oncol* 46 (6):723-734.
- VanWert, A. L., M. R. Gionfriddo, a D. H. Sweet. 2010. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm Drug Dispos* 31 (1):1-71.
- Vegt, E., M. de Jong, J. F. Wetzels, R. Masereeuw, M. Melis, W. J. Oyen, M. Gotthardt, a O. C. Boerman. 2010a. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med* 51 (7):1049-1058.
- Vegt, E., A. Eek, W. J. Oyen, M. de Jong, M. Gotthardt, a O. C. Boerman. 2010b. Albumin-derived peptides efficiently reduce renal uptake of radiolabelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37 (2):226-234.

- Vegt, E., M. Melis, A. Eek, M. de Visser, M. Brom, W. J. Oyen, M. Gotthardt, M. de Jong, a O. C. Boerman. 2011. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38 (4):623-632.
- Vegt, E., J. E. van Eerd, A. Eek, W. J. Oyen, J. F. Wetzels, M. de Jong, F. G. Russel, R. Masereeuw, M. Gotthardt, a O. C. Boerman. 2008. Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments. *J Nucl Med* 49 (9):1506-1511.
- Vegt, E., J. F. Wetzels, F. G. Russel, R. Masereeuw, O. C. Boerman, J. E. van Eerd, F. H. Corstens, a W. J. Oyen. 2006. Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin. *J Nucl Med* 47 (3):432-436.
- Villard, L., A. Romer, N. Marincek, P. Brunner, M. T. Koller, C. Schindler, Q. K. Ng, H. R. Macke, J. Muller-Brand, C. Rochlitz, M. Briel, a M. A. Walter. 2012. Cohort study of somatostatin-based radiopeptide therapy with [(90)Y-DOTA]-TOC versus [(90)Y-DOTA]-TOC plus [(177)Lu-DOTA]-TOC in neuroendocrine cancers. *J Clin Oncol* 30 (10):1100-1106.
- von Guggenberg, E., C. Rangger, J. Sosabowski, P. Laverman, J. C. Reubi, I. J. Virgolini, a C. Decristoforo. 2012. Preclinical evaluation of radiolabeled DOTA-derivatized cyclic minigastrin analogs for targeting cholecystokinin receptor expressing malignancies. *Mol Imaging Biol* 14 (3):366-375.
- Wacher, V. J., C. Y. Wu, a L. Z. Benet. 1995. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 13 (3):129-134.
- Wang, L., a D. H. Sweet. 2013. Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease. *AAPS J* 15 (1):53-69.
- Wehrmann, C., S. Senfleben, C. Zachert, D. Muller, a R. P. Baum. 2007. Results of individual patient dosimetry in peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu DOTA-TATE and 177Lu DOTA-NOC. *Cancer Biother Radiopharm* 22 (3):406-416.
- Wild, D., J. S. Schmitt, M. Ginj, H. R. Macke, B. F. Bernard, E. Krenning, M. De Jong, S. Wenger, a J. C. Reubi. 2003. DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30 (10):1338-1347.
- Yamada, T., K. Niinuma, M. Lemaire, T. Terasaki, a Y. Sugiyama. 1997. Carrier-mediated hepatic uptake of the cationic cyclopeptide, octreotide, in rats. Comparison between in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos* 25 (5):536-543.
- Yao, J. C., M. Hassan, A. Phan, C. Dagohoy, C. Leary, J. E. Mares, E. K. Abdalla, J. B. Fleming, J. N. Vauthey, A. Rashid, a D. B. Evans. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 26 (18):3063-3072.
- Zhang, H., J. Chen, C. Waldherr, K. Hinni, B. Waser, J. C. Reubi, a H. R. Maecke. 2004. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. *Cancer Res* 64 (18):6707-6715.
- Zhang, H., J. Schuhmacher, B. Waser, D. Wild, M. Eisenhut, J. C. Reubi, a H. R. Maecke. 2007. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (8):1198-1208.



## 9. Seznam publikovaných vědeckých prací

### 9.1 Práce související s disertační prací

**Volková M**, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Bárta P, Trejtnar F. 2015. The involvement of selected membrane transport mechanisms in the cellular uptake of <sup>177</sup>Lu-labeled bombesin, somatostatin and gastrin analogues. *Nucl Med Biol* 42(1):1-7. (IF = 2,41)

**Volková M**, Mandíková J, Bárta P, Navrátilová L, Lázníčková A, Trejtnar F. 2015. The *in vivo* disposition and *in vitro* transmembrane transport of two model radiometabolites of DOTA-conjugated receptor-specific peptides labelled with <sup>177</sup>Lu. *J. Labelled Comp Radiopharm* ; přijato (IF = 1,27)

### 9.2 Seznam publikovaných vědeckých prací

Trejtnar F, Mandíková J, Kočíncová J, **Volková M**. 2014. The renal handling of amphotericin B and amphotericin B/deoxycholate and potential renal drug-drug interactions with selected antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 58(10):5650-7. (IF = 4,57)

Bárta F, **Volková M**, Dascalu A, Spiegelberg D, Trejtnar F, Andersson K. 2014. Determination of receptor protein binding site specificity and relative binding strength using a time-resolved competition assay. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 70(2):145-51. (IF = 2,15)

Krátký M, **Volková M**, Novotná E, Trejtnar F, Stolaříková J, Vinšová J. 2014. Synthesis and biological activity of new salicylanilide N,N-disubstituted carbamates and thiocarbamates. *Bioorg Med Chem*. 22(15):4073-82. (IF = 2,79)

**Volková M**, Forstová-Křížová V, Skálová L, Trejtnar F. 2013. Modulatory Effects of Quercetin and Rutin on the Activity, Expression and Inducibility of CYP1A1 in Intestinal HCT-8 Cells. *Phytother.Res* 27:1889–1893. (IF 2,07)

Mandíková J, **Volková M**, Pávek P, Česnek M, Janeba Z, Kubíček V, Trejtnar F. 2013. Interactions with selected drug renal transporters and transporter-mediated cytotoxicity in antiviral agents from the group of acyclic nucleoside phosphonates. *Toxicology* 311(3):135–46. (IF = 4,02)

- Kozic J, Novotná E, **Volková M**, Stolaříková J, Trejtnar F, Vinšová J. 2012. Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activity of 2-methoxybenzanilides and their thioxo analogues. *Eur J Med Chem* 56:387-395. (IF 3,50)
- Krátký M, Vinšová J, **Volková M**, Buchta V, Trejtnar F, Stolaříková J. 2012. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur J Med Chem* 50:433–440. (IF 3,50)
- Kozic J, Novotná E, **Volková M**, Stolaříková J, Trejtnar F, Wsól V, Vinšová J. 2012. Synthesis and *in vitro* antimycobacterial and isocitrate lyase inhibition properties of novel 2-methoxy-2'-hydroxybenzanilides, their thioxo analogues and benzoxazoles. *Eur J Med Chem* 56:108-119. (IF 3,50)

## 10. Výstupy na odborných konferencích

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Mechanisms contributing to the undesirable accumulation of bombesin analogues in renal cells. Meet the experts Transporter conference 2014, Budapešť, Maďarsko, 2014 (poster).

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study of renal transmembrane transport of peptides using cellular renal models. 4. Postgraduální konference FaF UK, Hradec Králové, ČR, 2014 (přednáška).

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study on interactions of radiolabeled bombesin analogues with selected renal transporters using cellular models. 14. Annual Congress of the European Association of Nuclear medicine, Lyon, Francie, 2013 (přednáška).

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study of renal clathrin-independent endocytosis of radiolabeled receptor-specific bombesin analogues. 63. Czech and Slovak Pharmacological Days, Olomouc, ČR, 2013 (poster).

Volková M, Mandíková J, Pávek P, Česnek M, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of acyclic nucleoside phosphonates with selected renal SLC and ABC transporters. 3. Postgraduální konference FaF UK, Hradec Králové, ČR, 2013 (přednáška).

Volková M, Mandíková J, Pávek P, Trejtnar F. Vliv steviosidu a steviolu na cytotoxicitu vybraných antivirotik a souvislost s interakcemi oat1 a efluxními transportéry. XXVII. Xenobiochemické sympozium, Pavlov, ČR, 2013 (poster).

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study of renal transmembrane transport of somatostatin and gastrin analogues using cellular renal models. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Španělsko, 2012 (poster).

Volková M, Mandíková J, Trejtnar F. Receptor mediated endocytosis of albumin in different epithelial kidney cell lines compared to cervical cancer cell line. 62. česko-slovenské farmakologické dni, Košice, Slovensko, 2012 (poster).

Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study of transmembrane transport of radiolabeled somatostatin and gastrin analogues *in vitro*. 2. Postgraduální konference FaF UK, Hradec Králové, ČR, 2012 (přednáška).

Volková M, Mandíková J, Nový Z, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtnar F. Study of renal transmembrane transport of somatostatin analogues *in vitro*. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno, ČR (poster).

Volková M, Křížová V, Skálová L. Modulační účinky quercetinu a rutinu na aktivitu a expresi cytochromu P4501A ve střevních buňkách. Studentská vědecká konference, FaF UK, Hradec Králové, ČR, 2010 (přednáška oceněná 3. místem v sekci biologických věd).

## **11. Přílohy**

**Recenzované odborné články publikované v časopisech s impakt faktorem a související s tématem disertační práce**