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

**Katedra farmakologie a toxikologie**

# STUDIUM MEMBRÁNOVÉHO TRANSPORTU ALBUMINU V LEDVINÁCH IN VITRO

**(rigorózní práce)**

**Konzultant:** **Doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.**

**Hradec Králové 2010** **Mgr. Martin Suchan**

# Abstrakt

*Cíl:* Práce byla zaměřena na studium transportu albuminu in vitro pomocí akumulačních buněčných studií a s využitím dvou typů albuminu - albuminu značeného techneciem-99m a FITC-albuminu značeného fluorescenční sondou. Součástí práce bylo ověření optimální přípravy a hodnocení kvality $^{99m}$Tc-albuminu. Cílem bylo porovnat akumulaci obou typů albuminu v ledvinných buňkách, zjistit vliv vybraných faktorů na akumulaci albuminu, stanovit typ mechanismu transmembránového transportu albuminu a zpracovat získané výsledky do formy odborného vědeckého sdělení.

*Metody:* Ke značení albuminu techneciem-99 bylo použito optimalizovaného postupu za použití nízkého pH, vysoké koncentrace albuminu a optimální koncentrace cínatých iontů. Radiochemická čistota $^{99m}$Tc-albuminu byla ověřována chromatografií na papíře. Jako buněčné in vitro modely byly použity izolované nativní ledvinné buňky potkana a standardní linie ledvinných tubulárních buněk prasete LLC-PK1. V akumulačních studiích byl sledován uptake albuminu v závislosti na teplotě, čase, složení inkubační směsi, přítomnosti inhibitoru transportu a byl hodnocen vliv experimentálního modelu. U LLC-PK1 buněk byl též testován vliv stáří buněk na míru akumulace albuminu.

*Výsledky:* Kvalita preparátu značeného $^{99m}$Tc-albuminu byla po přípravě velmi vysoká, avšak stabilitní studie ukázala významný pokles čistoty během několika hodin. Akumulace albuminu ledvinnými buňkami byla úměrná počtu buněk. Akumulační parametry $^{99m}$Tc-albuminu a FITC-albuminu v ledvinných buňkách potkana byly podobné. Míra akumulace albuminu mladými LLC-PK1 buňkami byla oproti buňkám starším několikanásobně menší. Experimenty s potkaními buňkami ukázaly přibližně 3x vyšší uptake $^{99m}$Tc-albuminu než u buněk prasečích. Při inkubační teplotě 2 °C klesl uptake obou typů albuminu potkaními buňkami přibližně na 20 – 25% ve srovnání s inkubací při 37 °C.

*Závěr:* Výsledky akumulačních studií dosažené s oběma typy albuminů jsou srovnatelné a pro studium transportu albuminu in vitro jsou využitelné oba typy. Při použití buněčných linií je třeba brát v úvahu jako faktor ovlivňující transport stáří buněk a typ použitého modelu. Aktivní transportní systémy nemusí být u mladých buněk ještě adekvátně vyvinuty. Nativní buňky mohou vykazovat vyšší aktivitu transportního systému pro proteiny. Výsledky potvrzují, že uptake albuminu v ledvinných buňkách je z velké části zajišťován aktivním transportem.

# Abstract

*Objectives:* This thesis was aimed at studying an albumin transport in vitro using a series of accumulative cell studies with two types of albumin - albumin labelled with the mentioned radioisotope – technetium-99m and fluorescent labelled FITC-albumin. Our task was to verify appropriate procedure of albumin labelling and radiochemical purity. The tasks were also to compare accumulation of FITC-albumin and $^{99m}$Tc-albumin in kidney cells, analyze the impact of selected factors on albumin accumulation and determine albumin transmembrane transport mechanisms. Next objective was to cast the results in the form of a scientific statement.

*Methods:* A low pH, high concentration of albumin and optimum ratio of $Sn^{2+}$ ions. The radiochemical purity of labelled albumin was verified by paper chromatography. Isolated kidney rat cells and standard line of kidney tubular pig cells were used as cell in vitro models. Effects of time, temperature, composition of incubation medium and transport inhibitors were studied in accumulation experiments. Connection between age of cells and albumin accumulation rate was studied in LCC-PK1 cells experiments.

*Results:* Very pure labelled $^{99m}$Tc-albumin was prepared with decreasing radiochemical stability after a few hours. The accumulation of albumin by kidney cells was directly proportional to the number of cells. Accumulation parameters of $^{99m}$Tc-albumin and FITC-albumin were similar in rat kidney cells experiments. Albumin accumulation rate in young LLC-PK1 cells is compared to older cells severalfold lower. Approximately 3× higher uptake of $^{99m}$Tc-albumin was observed during rat cells experiments compared to pig cells. Accumulations of both albumin types were decreased to 20-25% after incubation at 2°C in kidney cells compared to 37°C incubation.

*Conclusions:* FITC-albumin and $^{99m}$Tc-albumin accumulation studies results are almost equal and both albumin types are acceptable for albumin transport study in vitro. Because of transport interference it is important to look at cells age and type of selected model in cell-line experiments. Active transport mechanisms of young cells do not appear to be appropriately developed. Native cells may have more active protein transport system. The results confirm that large component of albumin uptake in kidney cells has an active character.

Děkuji Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc. za asistenci při experimentech, za poskytnuté materiály, cenné rady a pomoc při zpracovávání práce. Dále děkuji paní laborantce Ivaně Filipové za pomoc při experimentech a Mgr. Janě Mandíkové za přípravu buněčného materiálu pro mé studie. Děkuji také všem ostatním pracovníkům a postgraduálním studentům na Oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použitých zdrojů a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne 4. 6. 2010 Podpis: ……..……..

# Obsah

**1. ÚVOD ..... 8**

**2. CÍL PRÁCE ..... 10**

**3. TEORETICKÁ ČÁST ..... 12**

3. 1 OSUD ALBUMINU V TĚLE, JEHO FUNKCE A VÝZNAM ..... 13
*3. 1. 1 Struktura albuminu ..... 13*
*3. 1. 2 Metabolizmus albuminu ..... 15*
3. 1. 2. 1 Distribuce albuminu v těle ..... 15
3. 1. 2. 2 Syntéza albuminu v těle ..... 17
3. 1. 2. 3 Degradace albuminu ..... 18
3. 1. 2. 4 Metabolizmus albuminu při závažném patologickém stavu ..... 19
*3. 1. 3 Proteinurie jako marker poškození ledvin ..... 20*
*3. 1. 4 Funkce albuminu ..... 21*
3. 1. 4. 1 Onkotický tlak ..... 21
3. 1. 4. 2 Vazba a transport látek ..... 21
3. 1. 4. 3 Metabolické funkce albuminu ..... 23
3. 1. 4. 4 Acidobazické funkce albuminu ..... 23
3. 1. 4. 5 Antioxidační vlastnosti albuminu ..... 23
3. 1. 4. 6 Udržování mikrovaskulární integrity ..... 24
3. 1. 4. 7 Antikoagulační účinky albuminu ..... 24
*3. 1. 5 Diagnostický a terapeutický přínos albuminu ..... 25*
3. 2 TRANSMEMBRÁNOVÝ TRANSPORT ALBUMINU POMOCÍ MEGALINU A CUBILINU ..... 27
*3. 2. 1 Historické aspekty ..... 27*
*3. 2. 2 Struktura receptorů ..... 28*
*3. 2. 3 Vazba ligandů na receptory ..... 30*
*3. 2. 4 Orgánová a genová exprese receptorů ..... 32*
*3. 2. 5 Role megalinu a cubilinu při endocytóze ..... 33*

**4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ..... 35**

4. 1 MATERIÁL A POMŮCKY ..... 36
*4. 1. 1 Biologický materiál ..... 36*
*4. 1. 2 Chemikálie ..... 36*
*4. 1. 3 Přístrojové vybavení ..... 36*
*4. 1. 4 Laboratorní pomůcky ..... 37*
4. 2 PRACOVNÍ POSTUP ..... 38
*4. 2. 1 Příprava albuminu značeného techneciem $^{99m}$Tc ..... 38*
*4. 2. 2 Stabilitní studie $^{99m}$Tc-albuminu ..... 39*
*4. 2. 3 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana ..... 40*
*4. 2. 4 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných prasečích buňkách ..... 43*
4. 2. 4. 2 Vlastní akumulační studie ..... 43
*4. 2. 5 Akumulace FITC-albuminu v ledvinných buňkách potkana ..... 44*
4. 2. 5. 1 Příprava roztoku FITC-albuminu ..... 44
4. 2. 5. 2 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na době inkubace ..... 44
4. 2. 5. 3 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na teplotě ..... 45
4. 2. 5. 4 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na přídavku koncentrovaného neznačeného albuminu ..... 46

4. 3. VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ ..... 47

**5. VÝSLEDKY ..... 48**

5. 1 PŘÍPRAVA $^{99M}$TC-ALBUMINU ..... 49
5. 2 STABILITNÍ STUDIE $^{99M}$TC-ALBUMINU ..... 51
5. 3 AKUMULACE $^{99M}$TC-ALBUMINU V LEDVINNÝCH BUŇKÁCH POTKANA ..... 57
*5. 3. 1 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na množství buněk ..... 57*
*5. 3. 2 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na koncentraci ..... 59*
*5. 3. 3. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na čase ..... 62*
*5. 3. 4 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na inkubační teplotě ..... 64*
5. 4 AKUMULACE $^{99M}$TC-ALBUMINU V LEDVINNÝCH BUŇKÁCH PRASETE ..... 66
5. 5 AKUMULACE FITC-ALBUMINU V LEDVINNÝCH BUŇKÁCH POTKANA ..... 70
*5. 5. 1 Akumulace FITC-albuminu v závislosti na době inkubace ..... 70*
*5. 5. 2 Porovnání akumulace FITC-albuminu a $^{99m}$Tc-albuminu ..... 71*
*5. 5. 3 Akumulace FITC-albuminu v závislosti na teplotě ..... 72*
*5. 5. 4 Ovlivnění akumulace FITC-albuminu přídavkem neznačeného albuminu 74*

**6. DISKUZE ..... 76**

**7. ZÁVĚR ..... 81**

**8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... 83**

# 1. ÚVOD

Albumin je vhodným ligandem pro studium některých membránových transportních procesů v tubulárních buňkách ledvin a může být referenční látkou pro zkoumání transportu jiných látek využívajících k transmembránovému přenosu do tubulárních buněk ledvin stejných mechanismů. Metod značení sérového albuminu za účelem jeho citlivé detekce v biologických vzorcích a možnosti zpracování naměřených dat je několik. Avšak pro nedostupnost chemikálií či adekvátního detekčního zařízení nebo pro malou citlivost stanovení při práci s nízkými koncentracemi není vždy možné použít pro experimentální studie jakýkoliv typ značeného albuminu. Z tohoto důvodu bylo předmětem této rigorózní práce provést buněčné akumulační studie in vitro za použití dvou různě značených albuminů - a to fluorescenčně značeného a albuminu značeného radioaktivně pomocí technecia-99m a porovnat na základě získaných výsledků jejich využitelnost při studiu transportních mechanismů.

V rámci rigorózní práce byla tedy provedena řada experimentů studujících vliv různých faktorů, jako jsou např. různé inkubační parametry (teplota, doba inkubace, vliv inhibitorů aj.), na míru a charakter transportu albuminu do tubulárních ledvinných buněk in vitro. Přestože v odborné literatuře již byly publikovány výsledky různých akumulačních studií, nebyly dosud uveřejněny žádné studie porovnávající endocytární transport albuminu v tubulárních ledvinných buňkách u různých živočišných druhů a buněk různého stáří. Tato skutečnost byla jedním z podnětů pro provedení experimentů zaměřených na stanovení uptake albuminu v mladých a starších ledvinných buňkách a na srovnání vychytávání albuminu v buňkách potkaních a prasečích. Navíc byla součástí práce příprava a kontrola kvality přípravy radioaktivně značeného albuminu vyšetřením radiochemické čistoty, protože tento parametr je zásadní pro použití připraveného radiopreparátu v biologických experimentech.

# 2. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo studovat ledvinný membránový transport albuminu a provést akumulační studie in vitro s využitím fluorescenčního FITC-albuminu a albuminu značeného vybraným radionuklidem – techneciem-99m a s pomocí dvou experimentálních modelů - nativních potkaních ledvinných buněk a standardní buněčné linie ledvinných prasečích buněk LLC-PK1. Předpokladem k tomuto vytyčenému cíli bylo připravit kvalitní preparát albuminu značeného techneciem-99m a ověřit jeho radiochemickou čistotu.

Cílem rigorózní práce bylo dále vyhodnotit provedené experimenty a porovnat navzájem transportní mechanizmy FITC-albuminu a $^{99m}$Tc-albuminu za různých inkubačních podmínek a zpracovat tyto výsledky do formy odborného vědeckého sdělení. Úkolem bylo rovněž vyhodnotit akumulační studie s prasečími buňkami a s potkaními buňkami s cílem posoudit mezidruhové rozdíly a také posoudit vliv stáří buněk na míru akumulace albuminu.

Důležitou součástí rigorózní práce bylo rovněž shrnutí dosud publikovaných informací o struktuře albuminu, jeho osudu v těle, funkcích v organismu a významu pro diagnostiku a terapii. Cílem práce bylo také vypracovat přehled známých údajů o tubulárním membránovém endocytárním systému, který je odpovědný za uptake proteinů v ledvinách.

# 3. TEORETICKÁ ČÁST

## 3. 1 Osud albuminu v těle, jeho funkce a význam

Albumin je v krevní plazmě nejvíce zastoupeným proteinem (u člověka 55 – 60%). Je syntetizován játry a v těle je mu přisuzována řada rozličných a velmi podstatných funkcí. Albumin plní například významnou funkci jako nosič, zodpovědný za transport mnoha rozmanitých látek jako jsou metabolity, léčiva, hormony, vitamíny, mastné kyseliny, bilirubin či některé ionty např. $Ca^{2+}$ nebo $Mg^{2+}$. Rovněž stojí za připomenutí udržování onkotického tlaku a krevního objemu či jeho acidobazická pufrační a antioxidační aktivita. Následující kapitoly by měly přiblížit osud albuminu v těle od jeho syntézy, přes metabolizmus až k degradaci tohoto proteinu. Jsou zde sumarizovány všechny důležité funkce albuminu i možné klinické využití sérového albuminu v praxi a jeho význam pro diagnostiku a léčbu nejen renálních onemocnění (Birn a Christensen, 2006).

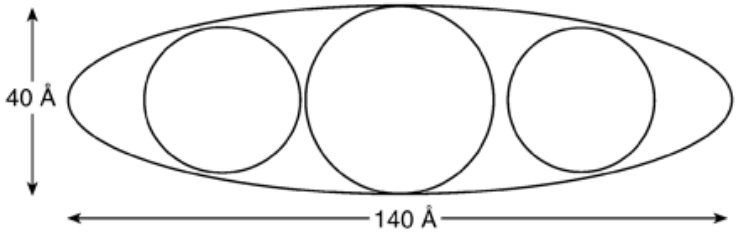
### *3. 1. 1 Struktura albuminu*

Lidský sérový albumin (dále jen HSA) je tvořen jediným polypeptidovým řetězcem o délce 585 aminokyselin a molekulové hmotnosti 66 500 Da. Jedná se o záporně nabitou flexibilní molekulu, jejíž řetězec obsahuje hodně nabitých residuí – lysinu, argininu či kyseliny glutamové. Na druhou stranu je v řetězci jen malé množství tryptofanových a methioninových zbytků (Peters[2], 1996).

Molekula albuminu (obr. 1) je uspořádána do série několika šroubovic (α-helixů) a je uspořádána v prostoru a udržována ve svém tvaru pomocí 17 disulfidických můstků. Prostorové uspořádání vytváří subdomény po třech sousedících, paralelně uspořádaných šroubovicích. Pár protilehlých subdomén vytváří pak doménu. Výsledkem je pak cylindrická struktura molekuly s hydrofobním jádrem a polárními okraji (Doweiko a Nompleggi, 1991)

*Obr. 1. Struktura molekuly albuminu. Můžeme na ni rozlišit 3 hlavní domény, které jsou dále rozčleněny do subdomén A a B Části molekuly, které se vyskytují běžně v uspořádání α-helixu, jsou znázorněny tmavě šedě. Disulfidické můstky jsou vyznačeny světle šedou barvou (Carter a Ho, 1994).*

Terciární struktura HSA byla zjištěna pomocí rentgenové krystalografie – jedná se o srdcovitou molekulu o rozměrech 80 x 30 Å (tzn. 8 x 3 nm). Jednotlivé domény molekuly jsou uspořádány do elipsovitého tvaru (obr. 2), který zajišťuje nízkou viskozitu molekuly. Molekula je velmi flexibilní a pružná a může měnit tvar v závislosti na okolním prostředí a na vazbě ligandů, disulfidické můstky jí na druhou stranu poskytují dostatečnou pevnost. K denaturaci molekuly proto dochází pouze za drastických nefyziologických podmínek - při změně pH, teploty či vlivu chemikálií či iontů (Carter a Ho, 1994).



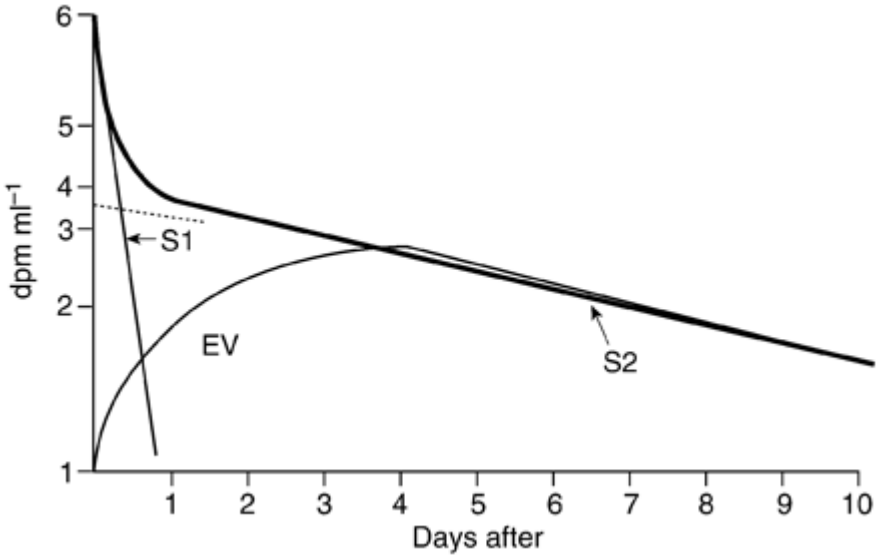

*Obr. 2. Elipsovité uspořádání domén v prostoru v molekule albuminu*

### *3. 1. 2 Metabolizmus albuminu*

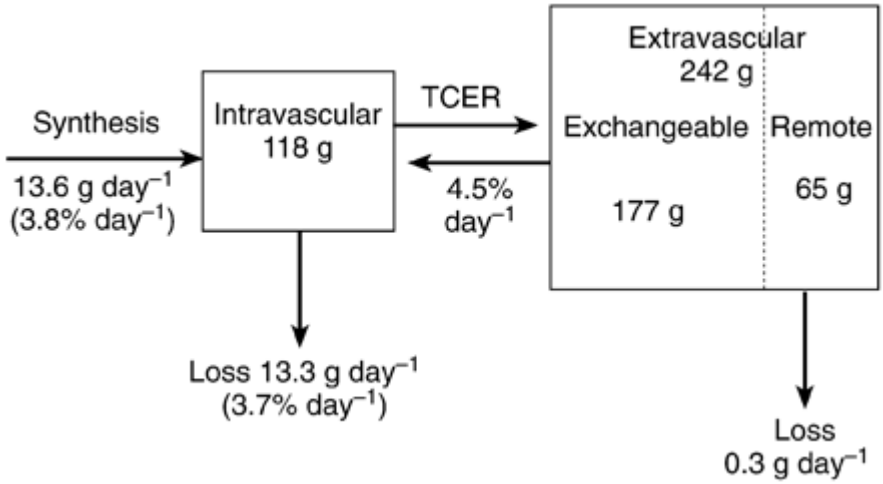
Koncentrace HSA je dána poměrem syntézy a degradace albuminu a také jeho transportem intravaskulárním a extravaskulárním prostorem. Zdravý člověk má 3,5 – 5,0 g albuminu na kilogram tělesné hmotnosti. V plazmě je obsaženo asi 42% z celkového množství. Část albuminu je vázána v tkáních a je nedostupná pro krevní oběh. Poměrně velké množství albuminu (120 – 145 g / den) je vylučováno do extravaskulárních prostor a přechází zpět do krevního řečiště lymfatickou drenáží. Část albuminu je také vylučována do gastrointestinálního traktu (dále jen GIT), kde je rozkládán na peptidy a aminokyseliny, které jsou následně opět vstřebávány (Nicholson et al., 2000).

#### *3. 1. 2. 1 Distribuce albuminu v těle*

Distribuci albuminu v kompartmentech organizmu lze detailně zkoumat a popsat pomocí injekčně podaného radioaktivně značeného albuminu. Graf závislosti koncentrace albuminu v plazmě na čase (obr. 3) demonstruje výrazný pokles koncentrace albuminu po injekčním podání (křivka S1) – to je dáno transkapilárním přechodem albuminu (TCER) rychlostí 4,5% za hodinu s distribučním poločasem 15 hodin. Křivka EV značí nárůst extravaskulárního albuminu. Na grafu je patrná ještě třetí, méně strmá exponenciální křivka (křivka S2), vyjadřující částečné odbourávání albuminu rychlostí 3,7% za den s distribučním poločasem 19 dní, které jde ruku v ruce s mírou vlastní syntézy albuminu (3,8 % za den). Obr. 4 ukazuje přehledně distribuci albuminu u zdravého 70 kg muže. Z obrázku je také patrné, že pouze 60% extravaskulárního albuminu tvoří albumin, který může zpět přecházet do cévního řečiště. Zbytek tvoří výše zmíněný nedostupný albumin v tkáních (Peters[1], 1996).




*Obr. 3. Eliminace albuminu po i.v. aplikaci*




*Obr. 4. Distribuce albuminu u zdravého muže*

Mechanizmus průchodu albuminu do extravaskulárního prostoru přes kapiláry se těšil v posledních letech nemalému zájmu z hlediska výzkumu. Starlingova teorie říká, že míra průniku albuminu přes kapilární stěnu závisí na permeabilitě stěny a na hydrostatickém a onkotickém tlaku na obou stranách kapilární stěny (Ganong, 1995).

Zdá se, že polovina albuminu prochází fenestrovanými kapilárami (tenké střevo, pankreas, nadledviny…), polovina prochází defenestrovanými kapilárami

a to pravděpodobně aktivním transportem. Albumin se váže na povrchový receptor zvaný albondin, který je ve značném počtu přítomen na povrchu kapilár s výjimkou mozku. Míra transportu může být zvýšena vazbou mastných kyselin s dlouhými řetězci na albumin, jeho kationizací nebo glykosylací. Následující tabulka ukazuje míru distribuce extravaskulárního albuminu do jednotlivých částí těla (Peters[1], 1996).

| Orgán | Podíl tělesné hmotnosti (%) | Podíl celkového extravaskulárního albuminu (%) |
|---|---|---|
| Kůže | 18.0 | 41 |
| Svaly | 45.5 | 40 |
| Střeva | 2.8 | 7 |
| Játra | 4.1 | 3 |
| Podkoží, atd. | 8 | 9 |

*Tab. 1. Distribuce extravaskulárního albuminu v organizmu*

### *3. 1. 2. 2 Syntéza albuminu v těle*

Syntéza albuminu probíhá u lidí výhradně v játrech a ihned po syntéze je albumin vyplaven do krevního řečiště. Míra produkce albuminu závisí na výživě a zdraví konkrétního jedince a pohybuje se v rozmezí 12 – 25 g $den^{-1}$. Dle potřeby může být syntéza zvýšena 2 – 2,7 násobně (Miller et al., 1951).

Albumin může být syntetizován za vhodných nutričních, hormonálních a především osmotických podmínek. Právě koloidní osmotický tlak intersticiální tekutiny obklopující hepatocyty je nejdůležitějším regulátorem syntézy albuminu. Dalším faktorem je dostatečná koncentrace mRNA. Nemoc nebo snížená genová transkripce zapříčiněná proteiny akutní fáze, především interleukinem-6 (IL-6) a tumor nekrotizujícím faktorem- α (TNF- α), snižuje koncentraci mRNA. Sníženou transkripci může také vyvolat poškození hepatocytů tetrachlormethanem. Rovněž hormonální prostředí má vliv na koncentraci mRNA např. inzulin je nezbytný pro správnou syntézu albuminu. Diabetici mají sníženou tvorbu albuminu, která se zlepšuje podáním inzulinu.

Na druhou stranu růstový hormon a steroidní hormony podané in vitro (konkrétně např. kortikosteroidy) zvyšují syntézu stimulací genové transkripce. Tento efekt je ještě umocněn v kombinaci s inzulinem nebo aminokyselinami (Nicholson et al., 2000).

Z hlediska nutričního je nezbytný příjem proteinů. Jejich malnutrice vyúsťuje ve výrazný pokles syntézy albuminu (až o 50 – 60%) způsobený disagregací polyzomů. Po opětovném příjmu proteinů či aminokyselin se polyzomy opět reagregují (De Feo at al., 1992). Je však zajímavé, že dochází k opětovné reagregaci polyzomů také při samotném příjmu glukózy, což může mít spojitost s příjmem energie, která může mít v reagregaci polyzomů mnohem větší význam než příjem samotných bílkovin. Reagregaci mohou způsobit také samotné aminokyseliny tryptofan a zejména pak ornitin, produkt močovinového cyklu, který se na rozdíl od tryptofanu nezačleňuje do struktury albuminu. To ukazuje na skutečnost, že ornitinový cyklus může hrát v syntéze proteinů poměrně výraznou roli (Oratz et al., 1983). Tab. 2 shrnuje nejpodstatnější faktory snižující syntézu albuminu.

| | |
|---|---|
| **Snížení genové transkripce** | Trauma, sepse (cytokininy)<br>Diabetes<br>Snížená hladina růstového hormonu<br>Snížená hladina kortikosteroidních hormonů (in vitro) |
| **Disagregace ribozomů** | Půst, především deplece proteinů |

*Tab. 2. Faktory snižující syntézu albuminu*

### *3. 1. 2. 3 Degradace albuminu*

U dospělého jedince se odbourá v průměru 14 g za den, což je 5% celkového denního albuminu. Albumin je degradován ve většině orgánů, nejvíce pak ve svalech a v kůži (40 – 60%). Játra rozloží méně než 15 %, ledvinami a žaludkem se vyloučí kolem 10% celkového denního albuminu (Yedgar et al., 1983).

Mechanizmus degradace spočívá ve vazbě albuminu na scavengerové receptory endotelu označované jako gp 18 a gp 30, v proniknutí do buněk ve formě endocytárního váčku a splynutí s lyzozomy. Tyto receptory vážou především pozměněný či denaturovaný albumin – takováto modifikace je signálem pro receptory zprostředkovanou lyzozomovou degradaci. Určitá modifikace však může albumin od degradace chránit. Děje se tak především u vazby s mastnými kyselinami s dlouhými řetězci (Schnitzer a Bravo, 1993).

*3. 1. 2. 4 Metabolizmus albuminu při závažném patologickém stavu*

Patologický stav snižuje distribuci mezi intra- a extravaskulárním kompartmentem, rovněž je ovlivněna syntéza a degradace proteinů. Koncentrace albuminu v séru se snižuje a mění se i kinetika albuminu ve srovnání se zdravými jedinci. Změny v distribuci jsou způsobeny dysfunkcí endoteliární bariéry, která vede ke ztrátám proteinů a tekutin kapilárami do intersticia. Po operacích srdce může být průnik albuminu kapilárami zvýšen až o 100%, u septického šoku až o 300%. K mediátorům tohoto prosakování patří zejména (Nicholson et al., 2000):

• endotoxiny gramnegativních bakterií

• cytokiny – TNF –α, IL-6

• metabolity kyseliny arachidonové – leukotrieny a prostaglandiny

• komplementové komponenty C3a, C5a

• ostatní vasoaktivní peptidy - bradykinin, histamin

• chemokiny – makrofágový protein zánětu 1 α

Transkripce albuminové mRNA a syntéza albuminu je při patologickém stavu (konkrétně při odpovědi na trauma, zánět či sepsi) snížena na úkor zvýšení transkripce a syntézy proteinů akutní fáze, jako jsou C-reaktivní protein (Moshage et al., 1987).

Degradace se při patologických stavech také snižuje, neboť se jedná o proces úměrný celkovému množství albuminu. V některých případech však byl zaznamenán při zvýšeném transkapilárním úniku albuminu nárůst jeho degradace. Je velmi pravděpodobné, že kapilární endotel má velký vliv na degradaci albuminu. Experimenty na zvířatech bylo také prokázáno, že ve tkáních, které jsou nejvíce zapojeny

do degradace albuminu, jsou fenestrované kapiláry nebo kapiláry s nepravidelnou endoteliární stěnou (Yedgar et al., 1983).

### *3. 1. 3 Proteinurie jako marker poškození ledvin*

Hladiny albuminy v plazmě i v moči jsou důležitými prognostickými ukazateli nejen z hlediska renálního onemocnění. Výsledná koncentrace albuminu v moči je výsledkem glomerulární filtrace a následné tubulární reabsorbce. U zdravého člověka není za den vyloučeno více než 20 mg albuminu ze 70 kg, které denně projdou ledvinami (Nicholson et al, 2000). Dysfunkce glomerulární filtrace a následné tubulární reabsorbce může vyústit ve zvýšenou exkreci albuminu a jak poškození glomerulu, tak narušená reabsorbce patří mezi závažné problémy vedoucí k proteinurii. Vysoká tubulární koncentrace albuminu (i jiných proteinů) indukuje zvýšenou expresi vazoaktivních peptidů a látek podporujících vznik zánětu a fibrózy (Pollock a Poronnik, 2007).

Albuminurie je důležitým rizikovým symptomem a ukazuje na možnou renální či kardiovaskulární poruchu. V posledních 10 letech se také potvrdily domněnky o tom, že zvýšená koncentrace albuminu v ledvinách může sama o sobě zhoršovat progresi onemocnění. Studie ukazují, že albumin indukuje expresi fibrinogenních a zánětlivých mediátorů v ledvinách. Také se zdá, že zvýšená glomerulární filtrace způsobuje nadměrnou tubulární reabsorbci a to vede k rozvoji zánětu a fibrózy, případně až k renálnímu selhání. Vypadá to, že zvýšená přítomnost fragmentů albuminu koreluje s degradací tubulů a že tubulární reabsorbce má hlavní roli ve vztahu mezi albuminem a jeho možným patologickým vlivem na strukturu a funkci ledvin. Mnoho studií také dosvědčuje skutečnost, že jakmile dosáhne renální poškození určitého stupně, přestává být míra poškození renálních funkcí závislá na faktoru, který toto poškození vyvolal. Z těchto mnoha závažných důvodů je proto prevence, případně samotná kompenzace proteinurie (či konkrétně albuminurie), důležitým faktorem z hlediska zabránění zhoršování ledvinných funkcí (Birn a Christensen, 2006).

### *3. 1. 4 Funkce albuminu*

V této kapitole jsou zmíněny nejdůležitější funkce a význam albuminu pro organizmus. Stále se objevují nové studie dokládající jeho význam u mnoha poruch či onemocnění. Nejnovější výzkumy prokazují zlepšení neurologických funkcí a snížení rozsahu infarktu myokardu a mozkového edému po i.v. přívodu albuminu. Již dříve bylo potvrzeno použití albuminu v léčbě vážně nemocných a pacientů v pooperačním stavu či se sepsí. Předmětem výzkumu také zůstává cytoprotektivní přínos albuminu zvyšováním shlukování protektinů z dokosahexaenové kyseliny (DHA) a asi i jiných polynenasycených kyselin (Das, 2008).

#### *3. 1. 4. 1 Onkotický tlak*

U zdravých jedinců přispívá albumin 80% k udržení normálního onkotického tlaku cca 25 mmHg. Je to zejména jeho vysokou molekulovou hmotností a jeho koncentrací v plazmě. Přestože je molekulová hmotnost albuminu (66,5 kDa) o více než polovinu menší než průměrná hmotnost globulinů (cca 147 kDa), přesto je jeho přínos nejvyšší. 60% onkotického působení je dáno přímo jeho hmotností a koncentrací, zbylých 40% je výsledkem jeho záporného náboje, který přitahuje a intravaskulárně zadržuje rozpuštěné, pozitivně nabité částice (Gibbs-Donnanův efekt). Vzhledem k velkému distribučnímu objemu albuminu, jeho rozpustnosti ve vodě a negativnímu náboji, hraje také významnou roli při transportu tkáňových tekutin (Nicholson et al., 2000).

Vážně nemocní pacienti mají snížený onkotický tlak (často okolo 19 mmHg), který je spojen s vyšší morbiditou a mortalitou. U pacientů s onkotickým tlakem 15 mmHg může být mortalita až 50% (Tonnesen et al., 1977). Podávání albuminu takto nemocným zvýší onkotický tlak krve a může předejít potencionálním fatálním komplikacím, jako jsou plicní edém ve spojitosti s vývojem respiračního selhání. Objevují se však i důkazy u kriticky nemocných pacientů se sepsí, u nichž je plicní dysfunkce nezávislá na hodnotě onkotického tlaku (Kohler et al., 1981).

#### *3. 1. 4. 2 Vazba a transport látek*

Molekula albuminu velmi flexibilní, a proto umožňuje vazbu mnoha různých sloučenin, které mohou být včleněny do struktury. Pevněji jsou k albuminu vázány středně velké hydrofobní organické anionty včetně mastných kyselin s dlouhými řetězci, bilirubinem a hematinem. Méně hydrofobní a menší sloučeniny jako kyselina askorbová nebo

tryptofan jsou vázány specificky, ale s menší afinitou. Podstatná pro vazbu může být také chiralita sloučenin (např. L-tryptofan je vázán silněji než D-tryptofan). Jednomocné kationty se na albumin nevážou, zato dvojmocné jako $Ca^{2+}$ a $Mg^{2+}$ ano. Albumin má silně negativní náboj a váže především bazická léčiva. Nedá se to však říci jednoznačně, protože některá léčiva se na albumin váží i přes svoji aciditu. K albuminu se váží i jiné tělu vlastní sloučeniny jako žlučové kyseliny, eikosanoidy, měď, zinek, folát či kobalamin. Albumin je také přenašečem látek, které mají jiné specifické proteinové přenašeče např. steroidy. Ty mají sice nízkou vazebnou afinitu k albuminu, která umožňuje jejich snadné vyvázání z vazby, ale vzhledem k vysoké sérové koncentraci albuminu, mají velkou vazebnou kapacitu. Je však nutné si uvědomit, že většina experimentů prokazujících vazbu látek k albuminu byla prováděna in vitro a je tudíž obtížné dělat z těchto pozorování závěry na vaznost in vivo. Teprve v posledních letech se začali prosazovat nové moderní experimentální techniky jako DNA sekvenování, fluorescentní emise či rentgenová difrakce (Peters, 1996).

Vazba léčiv na albumin ovlivňuje jejich distribuci do tkání, farmakologickou aktivitu, jejich metabolizmus a eliminaci. Dá se říci, že mírou této vazby ovlivňuje albumin osud léčiv v těle. Reverzibilně vázaná léčiva slouží jako rezervoáry, z kterých se léčivo uvolňuje, jestliže hladina volného léčiva klesne vlivem metabolismu a vylučování. Takto je prodlouženo působení léčiva v organizmu, ale snižuje se jeho maximální účinek (Sellers a Koch-Weser, 1977). Síla interakce mezi albuminem a léčivem závisí na jejich koncentraci v plazmě, přítomnosti jiných léčiv v plazmě (kompetice o vazebné místo) a také se mění během patologických stavů. Dalšími faktory ovlivňujícími míru této vazby jsou věk (vazba na bílkoviny klesá), teplota, pH a iontové prostředí, které ovlivňuje počet vazebných míst in vitro (Sellers a Koch-Weser, 1976).

Molekula albuminu obsahuje mnoho vazebných míst. Sudlow (Sudlow et al., 1975) rozdělil léčiva do dvou skupin podle dvou vazebných míst, na která se vážou. Vazebné místo I se má nalézat v dlouhé smyčce subdomény IIa a má zasahovat až ke smyčce krátké. Zdá se, že se na toto místo váže velké množství léčiv, jako jsou salicyláty, warfarin, fenylbutazon, indometacin, digoxin, furosemid, fenytoin a některé peniciliny. Rovněž se na toto místo váží endogenní látky jako bilirubin a různá barviva. Vazebné místo II je tvořeno hydrofobními zbytky a je lokalizováno v subdoméně IIIa. Mohou se zde vázat některé látky, které se váží rovněž na vazebné místo I (thyroxin,

L-tryptofan), dále pak mastné kyseliny se středně dlouhými řetězci, 2,3-benzodiazepiny (např. diazepam), NSAID s ionizovanými karboxylovými skupinami (naproxen, ibuprofen) nebo klofibrát (Nicholson et al., 2000).

### *3. 1. 4. 3 Metabolické funkce albuminu*

Albumin má schopnost inaktivovat některé sloučeniny jako např. disulfiram. Také antibiotika s penemovým cyklem se váží na albumin ireverzibilně acetylací lyzinové skupiny vazebného místa I. To může mít velký klinický význam stejně jako u penicilinové alergie, která je vysvětlována spojováním penicilinových zbytků s těmito lyzinovými skupinami. Toto spojování vyúsťuje v "bisalbuminémii" s následnou tvorbou antipenicilinových protilátek - protilátek proti komplexu léčiva s albuminem (Lafaye a Lapresle, 1988).

Albumin také zasahuje do metabolismu některých tělu vlastních látek např. lipidů nebo eikosanoidů, které mají velkou vazebnost k albuminu. Aktivita lipoproteinové lipázy v tukové tkáni může tak být stimulována vazbou mastných kyselin uvolněných z tukových zásob a vázajících se na volný albumin. Albumin také může stabilizovat některé eikosanoidy (prostaglandin $I_2$, thromboxan $A_2$) a vypadá to, že může preferovat aktivitu lipooxygenázy před aktivitou cyklooxygenázy (Peters[1], 1996).

### *3. 1. 4. 4 Acidobazické funkce albuminu*

Díky přítomnosti velkého množství nabitých residuí v molekule albuminu a také vzhledem k poměrně vysoké koncentraci albuminu v plazmě, můžeme albumin považovat za velmi efektivní pufr. Při fyziologickém pH je albumin zodpovědný asi za polovinu aniontového potenciálu a při snížení jeho koncentrace v plazmě nastává metabolická alkalóza (Doweiko a Nompleggi, 1991).

### *3. 1. 4. 5 Antioxidační vlastnosti albuminu*

Za fyziologických podmínek má albumin značný antioxidační potenciál. Je dán především tím, že vychytává volné kyslíkové radikály, které mají vliv nejen na patogenezi zánětlivých stavů. Byl prokázán inhibiční vliv albuminu na tvorbu volných kyslíkových radikálů. Tento účinek může být způsoben hojným počtem SH - skupin v molekule albuminu, které tyto sloučeniny vychytávají. To vysvětluje fakt, že u pacientů s hypoalbuminémií je snížený potenciál pro vychytávání volných

kyslíkových radikálů. Další „zhášeče“ volných kyslíkových radikálů, jako je kyselina močová a askorbová, jsou důležité především pro svou aktivitu v extracelulární tekutině, kde je koncentrace albuminu nižší (Nicholson et al., 2000).

### *3. 1. 4. 6 Udržování mikrovaskulární integrity*

Je možné, že albumin hraje roli v omezování průsaku kapilárami při zvýšené propustnosti kapilární membrány vyvolané např. septickým či pooperačním stresem. Mechanizmus tohoto účinku není ještě přesně znám. Albumin může mít pravděpodobně vliv na vznik a distribuci glykoproteinů v membránách endotelových buněk, což může stabilizovat propustnost membrán. Také může v membránách buněk přispívat svým záporným nábojem k odpuzování jiných, záporně nabitých molekul nebo může svou velikostí snižovat velikost kanálů. Je pravděpodobné, že pro tento účinek stačí pouze malé množství albuminu. Největší protektivní vlastnosti albuminu, konkrétně prevence apoptózy, byly pozorovány u endotelových buněk při fyziologických koncentracích albuminu in vitro (Kellner et al., 1996).

Albumin je nejvýznamnějším zdrojem –SH skupin v oběhu. Oxid dusnatý se váže na tyto skupiny za vzniku S-nitrosothiolové skupiny a je tak chráněn před rychlou degradací. Účinky albuminu na vasodilatační vlastnosti oxidu dusnatého byly prokázány in vitro. V experimentech se prokázal efekt albuminu na zpomalení nástupu účinku a snížení maximální intenzity vasodilatační odpovědi k oxidu dusnatému (Kaufmann et al., 1995).

### *3. 1. 4. 7 Antikoagulační účinky albuminu*

Albumin vykazuje antikoagulační efekt podobný efektu heparinu. Může to být způsobeno podobnou strukturou těchto molekul – heparin se váže svými negativně nabitými sulfátovými skupinami na kladně nabité skupiny antitrombinu III. Albumin má mnoho negativně nabitých skupin a zdá se, že může působit podobnou cestou, tedy neutralizací faktoru Xa antitrombinem III. Hyperkoagulační stavy nejen u nefrotického syndromu mohou být někdy vysvětleny přidruženou hypoalbuminémií a nedostatečným inhibičním účinkem albuminu na agregaci trombocytů (Jorgensen a Stoffersen, 1979).

### *3. 1. 5 Diagnostický a terapeutický přínos albuminu*

Vypadá to, že sérový albumin je klinicky významným indikátorem nejen zvýšeného rizika morbidity, mortality a závažnějších komplikací, ale u starších pacientů rovněž důležitým ukazatelem subklinického onemocnění. Význam sledování jeho hladiny v séru je nezanedbatelný zejména u kriticky nemocných pacientů (Nicholson et al., 2000).

Terapie za použití albuminu má v praxi své indikace, ale použití albuminu při hypovolémii u kriticky nemocných pacientů nepřináší žádné benefity ve srovnání s jinými koloidy. Z výzkumů (Stockwell et al., 1992) vyplývá, že klinický přínos je v tomto případě překvapivě minimální, efekt zvýšení sérového albuminu je krátkodobý a vyhlídky takto léčených pacientů se nikterak nemění. Nesnižuje se ani výskyt plicního edému nebo akutního renálního selhání ani mortalita pacientů. Z toho je možné vyvodit závěr, že stabilizace hladiny albuminu v krvi nemá pro pacienty žádné výhody.

U pacientů na jednotce intenzivní péče s kardiorespiračními a oběhovými komplikacemi nebyl zjištěn žádný rozdíl v hemodynamice mezi pacienty léčenými albuminem a pacienty léčenými hydroxyethylškrobem (HES). Dlouhodobá terapie HES navíc v porovnání s albuminem zlepšovala hemodynamiku a dýchání (Boldt et al., 1996). Při porovnání ukazatelů zánětu u stejných skupin pacientů byly u pacientů léčených albuminem hodnoty zvýšené a septický proces se nezlepšoval nebo dokonce zhoršoval, zatímco stav pacientů s HES se zlepšoval, pravděpodobně z důvodu zlepšené mikrocirkulační hemodynamiky. Hodnoty mediátorů zánětu byly nezměněny nebo dokonce sníženy (Boldt et al.[1], 1996).

U popálených pacientů je prvních 24 hodin značně zvýšená propustnost kapilár a transkapilární tok tekutin. Diskutuje se, že infúze koloidů je v této situaci neodůvodněná, protože nesnižuje únik tekutin a může přispět k opožděnému plicnímu edému. Albumin je však po 24 hodinách oprávněně užíván u pacientů s výraznou hypoalbuminémií, jelikož přispívá k reabsorbci edému. Užití albuminu není však nutné u popálenin pokrývajících méně než 15% povrchu těla, ale je nezbytný už od začátku léčby u pacientů s popáleninami na více než 50% těla (Manelli, 1996).

Další skupina pacientů, u kterých byl dokázán terapeutický přínos, jsou pacienti s cirhózou vyžadující paracentézu. Cirkulační porucha charakterizovaná zvýšenou reninovou aktivitou v plazmě šestý den po tomto zákroku je spojena se zvýšenou

morbiditou a mortalitou. U tohoto stavu byl albumin stanoven jako efektivnější v prevenci komplikací než dextran či polygelin – Haemaccel (Gines et al., 1996).

Stejně jako ostatní terapie má i terapie albuminem své vedlejší účinky. Neuvážené použití může vést k hypervolémii, protože objem plazmy stoupá úměrně s příjmem albuminu. Může to způsobit depresi myokardu, která může souviset s vazbou kalciových iontů. Případy alergických reakcí jsou vzácné, ale mohou se vyskytnout, nejčastěji na kontaminanty infuzních roztoků. Také se mohou vyskytnout reakce přecitlivělosti, které jsou způsobeny kovalentní vazbou léčiva k albuminu např. již zmíněné poutání penicilinových zbytků (Doweiko a Nompleggi[1], 1991). Nevýhodou terapeutického využití albuminu je také jeho poměrně velká cena, která může být až desetkrát vyšší než cena jiných expandérů plazmy.

## 3. 2 Transmembránový transport albuminu pomocí megalinu a cubilinu

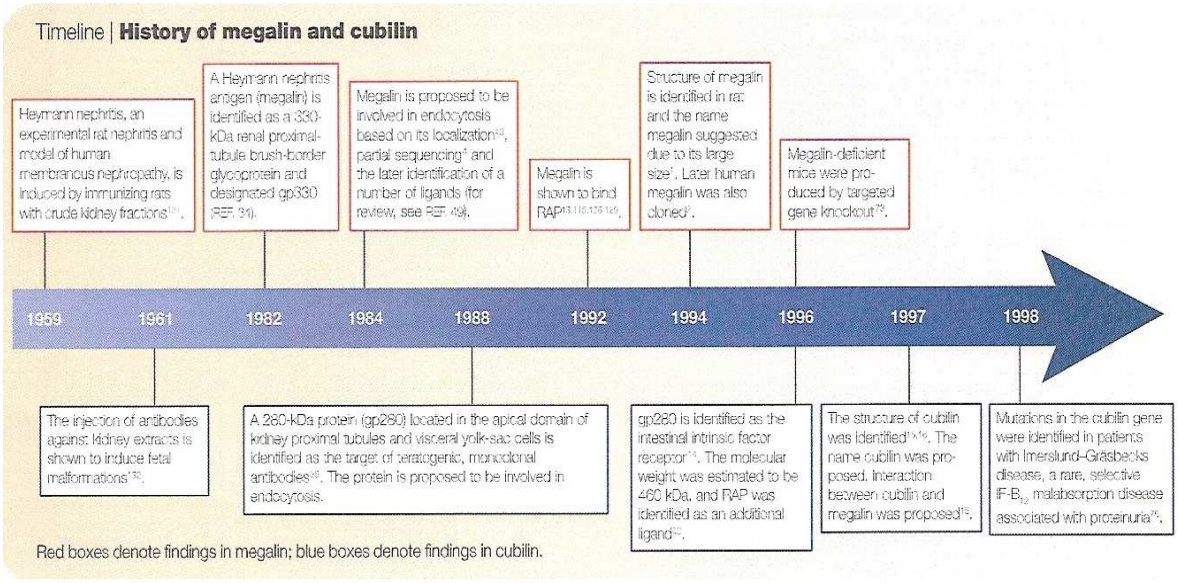
Megalin a cubilin jsou multiligandové, synergicky působící, endocytární receptory navzájem odlišné struktury, jejichž úkolem je selektivní transport látek z jednoho kompartmentu do druhého. Receptory zprostředkovaná endocytóza je nepostradatelným buněčným mechanizmem, který je charakterizovaný specifickou vazbou látky na receptor, po níž dochází k obalení komplexu membránou a vtažení do buňky. Tento mechanizmus buňkám zabezpečuje přívod nejen důležitých živin, vitamínů a dalších faktorů, ale má také význam metabolický či regulační. Tento druh transportu se také podílí na odvodu odpadních metabolických produktů, hormonů, enzymů, lipoproteinů atd. a jejich degradaci či metabolické přeměně. Receptory zprostředkovaná endocytóza je rovněž zapojena do signálních či řídících funkcí nejen degradací hormonů, ale také přímou aktivací signálních kaskád. Megalin a cubilin jsou ale nepostradatelné receptory především z hlediska zpětné tubulární reabsorbce proteinů (včetně albuminu) v ledvinném proximálním tubulu (Birn a Christensen, 2006).

### *3. 2. 1 Historické aspekty*

Megalin byl poprvé popsán jako antigen u potkanů s Heymannovou nefritidou. V 80. letech minulého století byl vyextrahován z kartáčového lemu potkaních ledvin a dle tehdy předpokládané hmotnosti 330 kDa, zjištěné pohyblivostí během gelové elektroforézy, byl pojmenován jako *gp330*. Později byl megalin lokalizován v proximálním tubulu i v glomerulu. Na základě jeho umístění, studia jeho struktury a postupným objevováním stále dalších a dalších ligandů, se začalo uvažovat o jeho potenciální endocytární funkci. V roce 1994 byla popsána struktura tohoto receptoru u potkana a jeho hmotnost byla s konečnou platností určena jako 600 kDa. Nedlouho po tomto objevu byl naklonován rovněž lidský megalin. Jméno bylo navrhnuto vzhledem k jeho velké velikosti. Posledním významným krokem ve výzkumu tohoto receptoru bylo vytvoření megalin-deficientní myši cílovou genovou manipulací v roce 1996, což přineslo další informace o důležitosti tohoto receptoru (Christensen a Birn, 2001).

Cubilin byl zprvu identifikován jako cíl králičích teratogenních monoklonálních protilátek po injekčním podání vzorku ledvinných buněk kartáčového

lemu králíkovi. Byl pojmenován jako *gp280*, tedy obdobně jako megalin podle tehdy specifikované hmotnosti 280 kDa. Stejně jako megalinovému receptoru byla i cubilinu v 80. letech přisuzována funkce endocytárního ledvinného transportu. Až v roce 1996 se ukázalo, že je cubilin identický s vnitřním faktorem (intestinal intrinsic factor), nutným pro resorpci vitaminu B 12. Ukázalo se, že jeho hmotnost je ve skutečnosti 460 kDa. V následujících několika letech byla přesně popsána struktura cubilinu a byly objeveny nejen jeho interakce s megalinovým receptorem, ale rovněž byly objeveny další jeho ligandy. Vývoj těchto dvou receptorů nastiňuje obr. 5 (Christensen a Birn, 2002).



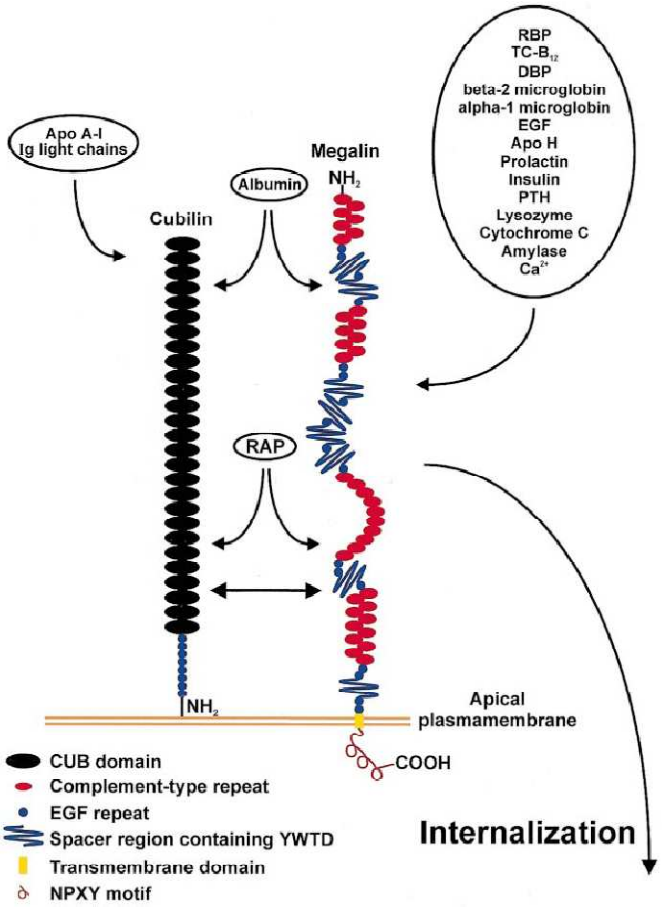

*Obr. 5. Časová osa vývoje poznatků o megalinu a cubilinu*

### *3. 2. 2 Struktura receptorů*

Oba receptory jsou strukturně dosti odlišné (obr. 6). Megalin má velikost 519 kDa (600 kDa po glykosylaci). Jde o transmembránový protein o délce 4655 aminokyselin, který tvoří velká extracelulární doména zakončená aminoskupinou (4398 aminokyselin), jednoduchá transmembránová doména a krátký cytoplazmatický konec s karboxyskupinou. Tento konec by měl být odpovědný za signální funkce – vazbu na adaptérové proteiny a za tvorbu obalených váčků (vezikul). U megalinu byla identifikována rovněž signální peptidová sekvence – sekvence o délce 25 aminokyselin zakončená aminoskupinou, která receptor v tomto případě směřuje

k endoplazmatickému retikulu. Gen pro lidský megalin byl lokalizován na chromozomu 2q24-q31. Lidský a potkaní megalinový receptor se shodují z 77%. Megalin patří do skupiny receptorů lipoproteinů o nízké hustotě – LDL-receptorů, spolu s LDL receptorem, VLDL receptorem či receptorem 2 pro apolipoprotein E. Extracelulární doména receptoru obsahuje 36 opakujících se segmentů komplementového typu bohatých na cysteinová residua uspořádaných do 4 segmentů nezbytných pro vazbu ligandů. Tyto úseky jsou od sebe odděleny 16 opakujícími se segmenty typu EGF (epidermal growth factor – epidermální růstový faktor) a 8 segmenty typu YWTD důležitými pro uvolňování ligandů v endozomálním kompartmentu v závislosti na hodnotě pH (Christensen et al., 2009).

Cubilin je protein o délce cca 3600 aminokyselin a hmotnosti 400 kDa (460 kDa po glykosylaci). Postrádá transmembránovou doménu a podobá se více jiným známým endocytárním receptorům. Skládá se z 27 CUB domén, které umožňují vazbu ligandů na receptor a podle kterých byl receptor pojmenován. Na tyto domény navazuje řetězec 110 aminokyselin a dále 8 úseků typu EGF. Právě tyto úseky mají i jiné endocytární receptory (např. z VLDL rodiny). U tohoto glykoproteinu nebyl identifikován žádný transmembránový segment. Pro ukotvení receptoru v membráně se však zdá být nezbytná terminální sekvence zakončená aminoskupinou. Šroubovicové uspořádání typu α-helix tohoto úseku ukazuje na amfifilní strukturu podobnou vazebným místům pro lipidy u apolipoproteinů. Na ukotvení se pravděpodobně také podílí palmitoylová skupina nacházející se rovněž v terminální sekvenci zakončené aminoskupinou. Gen pro lidský cubilin byl nalezen na chromozomu 10p12.33-p13. Kompletní sekvence byla určena u lidského, potkaního a psího cubilinu. Potkaní cubilin se s lidským shoduje z 69%, psí cubilin z 83% (Christensen a Birn, 2002).




*Obr. 6. Struktura megalinu a cubilinu a vazba jejich ligandů*

### *3. 2. 3 Vazba ligandů na receptory*

Mezi potenciální ligandy megalinu a cubilinu patří všechny látky krevního séra s molekulovou hmotností menší, než je limit pro glomerulární filtraci (60 kDa). To však není definitivní, protože některé větší proteiny např. transferin (81 kDa) jsou přesto filtrovány a mohou se tak rovněž stát potenciálními ligandy těchto receptorů (Christensen et al., 2009).

U megalinu byla většina jeho ligandů popsána (obr. 7). Bylo zjištěno, že ligandy jako např. aprotinin, laktoferin, apolipoprotein E či lipoproteinová lipáza se váží na region mezi aminokyselinami 1111-1210, ale některé ligandy jako RAP mají pravděpodobně více než 1 vazebné místo. Kromě vazby rozličných proteinů váže rovněž megalin molekuly $Ca^{2+}$, které jsou nezbytné pro vazbu dalších ligandů stejně tak, jako pro jiné zástupce ze skupiny LDLR. U cubilinu je dán potenciál vázat velké množství ligandů přítomností mnoha CUB domén. Patří mezi ně albumin, hemoglobin,

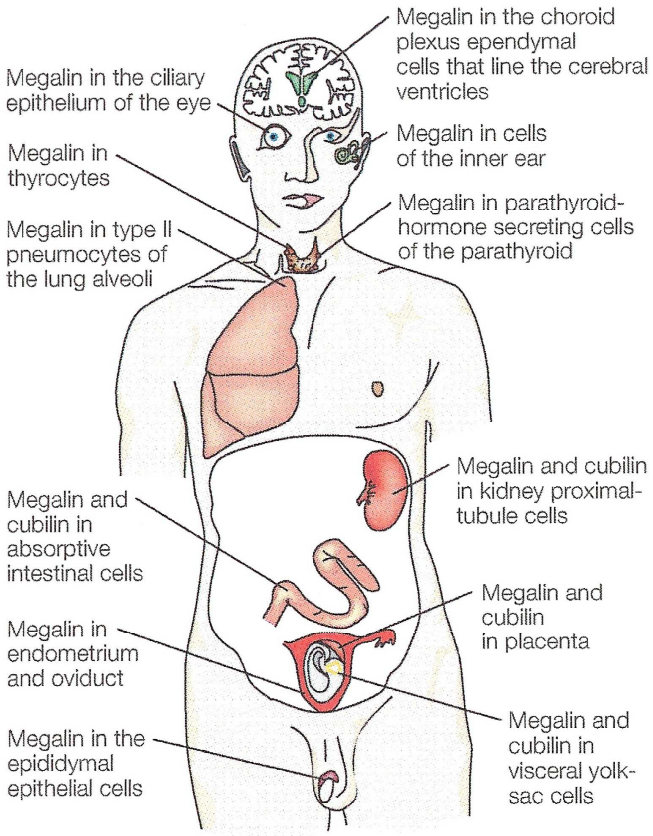
transferin, komplex vnitřního faktoru s vitaminem B12 (IF-B12), RAP atd. Vazebná místa pro IF-B12 a albumin se liší od vazebných míst pro např. RAP a byla nalezena na terminálním aminokyselinovém řetězci zahrnujícím EGF segmenty i CUB domény 6 až 8. Přestože vazba IF-B12 snižuje vazbu albuminu ke cubilinu, nejsou vazebná místa pro tyto látky identická - to platí s jistotou v oblasti terminálního regionu. Významná je rovněž vazba megalinu ke cubilinu, do které jsou zapojeny CUB domény 1 a 2. Tato vazba byla popsána jako vysoce afinitní a závislá na $Ca^{2+}$. Také může být inhibována pomocí RAP. Megalin pomocí těchto interakcí způsobuje začleňování cubilinu a pravděpodobně také jeho recyklaci (Christensen a Birn, 2002).

| Megalin | Cubilin |
|---|---|
| ***Vitamin-binding proteins*** | |
| Transcobalamin–vitamin $B_{12}$ | Intrinsic factor–vitamin $B_{12}$ |
| Vitamin-D-binding protein | Vitamin-D-binding protein |
| Retinol-binding protein | |
| ***Other carrier proteins*** | |
| Albumin | Albumin |
| Lactoferrin | Transferrin |
| Haemoglobin | Haemoglobin |
| Odorant-binding protein | |
| Transthyretin | |
| ***Lipoproteins*** | |
| Apolipoprotein B | Apolipoprotein A-I |
| Apolipoprotein E | High-density lipoprotein |
| Apolipoprotein J/clusterin | |
| Apolipoprotein H | |
| ***Hormones and hormone precursors*** | |
| Parathyroid hormone | |
| Insulin | |
| Epidermal growth factor | |
| Prolactin | |
| Thyroglobulin | |
| ***Drugs and toxins*** | |
| Aminoglycosides | |
| Polymyxin B | |
| Aprotinin | |
| Trichosanthin | |
| ***Enzymes and enzyme inhibitors*** | |
| PAI-1 | |
| PAI-1–urokinase | |
| PAI-1–tPA | |
| Pro-urokinase | |
| Lipoprotein lipase | |
| Plasminogen | |
| β-amylase | |
| $\beta_1$-microglobulin | |
| Lysozyme | |
| ***Immune- and stress-response-related proteins*** | |
| Immunoglobulin light chains | Immunoglobulin light chains |
| PAP-1 | Clara cell secretory protein |
| $\beta_2$-microglobulin | |
| ***Others*** | |
| RAP | RAP |
| $Ca^{2+}$ | |
| Cytochrome *c* | |

*Obr. 7. Ligandy vázající se na megalin a cubilin*

### *3. 2. 4 Orgánová a genová exprese receptorů*

Megalin a cubilin jsou zakomponovávány do plazmatické membrány a endocytárního aparátu epitelových buněk. Nacházejí se však i v různých absorpčních epitelech jako v tenkém střevu, viscerálním žloutkovém váčku či v cytotrophoblastu placenty. Megalin je však v těle sám o sobě mnohem více zastoupen než cubilin. Megalin a cubilin jsou v mnoha orgánech exprimovány společně, v některých byl dosud nalezen jen megalin (obr. 8). Byl identifikován např. v choroidálním plexu, glomerulárních podocytech, endometriu, ciliárním epitelu nebo u buněk tvořících hormony v příštítných tělíscích.




*Obr. 8. Orgánová exprese megalinu a cubilinu.*

V proximálním tubulu a viscerálním žloutkovém váčku jsou megalin a cubilin lokalizovány vedle sebe v celém endocytárním aparátu – tzn. v kartáčovém lemu, v transportních i endocytárních váčcích i v apikálních tubulech, které zajišťují znovuzabudovávání do cytoplazmatické membrány a její recyklaci (obr. 9). Menší množství megalinových i cubilinových receptorů bylo také potvrzeno v lysozomech.

Důležitou úlohu během exprese megalinu má RAP. Tento protein o hmotnosti 39 kDa je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a ihned po translaci megalinu se na něj s vysokou afinitou váže. RAP se váže ke všem členům LDLR rodiny a funguje jako chaperon – chrání nově syntetizované receptory před vazbami na ligandy, které se rovněž mohou tvořit uvnitř buňky. Tyto vazby by mohly způsobit agregaci a retenci receptorů i ligandů v buňce. Chybění RAP tak vede ke snížené expresi megalinu a k jeho špatné distribuci.

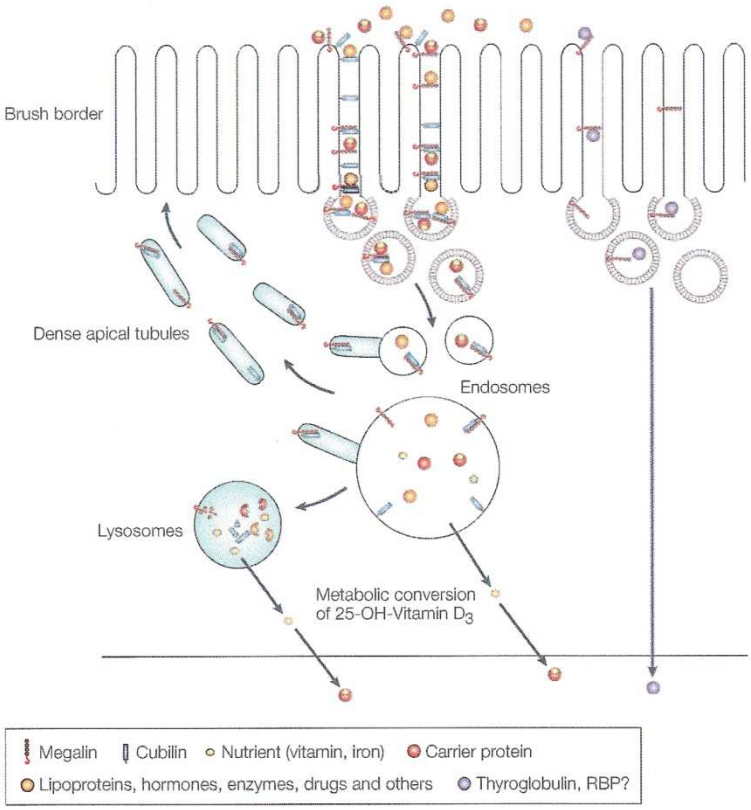
Zvýšenou genovou expresi je možné vyvolat in vitro např. pomocí kyseliny retinové nebo vitaminu D. Snížená exprese byla pozorována u ledvin s Heymannovou nefritidou. Jedná se o experimentální glomerulární poruchu spojenou s tvorbou protilátek proti megalinu. Snížená exprese byla rovněž pozorována u neuronů postižených Alzheimerovou nemocí, které ve zvýšené míře akumulují apolipoprotein E. Snížená exprese megalinu byla rovněž pozorována u některých onemocnění charakterizovaných proteinurií a poškozenou zpětnou resorpcí filtrovaných proteinů. Patří sem např. Dentova choroba, která je způsobena mutací ledvinného chloridového kanálu CIC-5. Tato mutace narušuje endocytózu v proximálním tubulu a snižuje expresi megalinového receptoru. Fanconiho syndrom je zase způsoben mutací v genu pro samotný megalin. Mutace genu pro cubilin nebo pro transmembránový protein AMN (“amnionless“), na kterém je závislá normální exprese cubilinu, se projevuje silnou proteinurií. Tato poruch byla nazvána jako Imerslund-Graesbeckova choroba (Christensen a Birn, 2002).

### *3. 2. 5 Role megalinu a cubilinu při endocytóze*

Obr. 9 ukazuje schéma receptory zprostředkované endocytózy a následného intracelulárního transportu. Po vazbě ligandu na receptor a vazbě megalinu na cubilin, která je nezbytná k vlastní endocytóze cubilinu, dochází k transportu do buňky. Je jisté, že transport do buňky zprostředkovaný cubilinem, je závislý na přítomnosti megalinu. Může tak být do transportu zapojen přímo jako receptor nebo nepřímo ovlivňováním exprese a endocytární funkce cubilinu. Ligandy jsou následně v endozomech z vazby na receptor uvolněny působením kyselého pH. Receptory jsou recyklovány a začleněny zpět pomocí apikálních tubulů do plazmatické membrány. Proteinové nosiče ligandů jsou degradovány a samotné látky jsou transportovány přes epitelovou buňku dále nebo mohou být v buňce využity. Transcelulární transportní mechanizmy řady těchto látek

zůstávají stále ještě neprozkoumány. Byl však popsán transcelulární transport některých proteinů (např. thyreoglobulinu) přes celé epitelové buňky zprostředkovaný megalinem (Christensen a Birn, 2002).

V posledních letech byl naznačen výrazný transmembránový transport albuminu zprostředkovávaný vysoce kapacitním systémem s nízkou afinitou, mechanizmem odlišným od transportu zprostředkovaného pomocí megalinu a cubilinu (Comper et al., 2008). Žádné studie však následně tento transportní systém v izolovaných tubulárních buňkách nepotvrdily. Rovněž u potkanů nejsou po tomto transportu žádné stopy. Ani během experimentů na megalin-deficientních potkanech nebyly nalezeny žádné známky transportu, který by nebyl zprostředkován megalinem. Kromě megalin-cubilinového systému tak není v proximálním tubulu žádný výrazný transmembránový mechanizmus transportu proteinů (Christensen et al., 2009).




*Obr. 9. Endocytóza a transcelulární transport látek pomocí megalin / cubilinového systému.*

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4. 1 Materiál a pomůcky

Během experimentů, které byly prováděny v rámci této rigorózní práce, byl použit biologický materiál, chemikálie, přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky Oddělení radiofarmak Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

### *4. 1. 1 Biologický materiál*

- Izolované nativní potkaní ledvinné buňky (připraveno spolupracovníky)
- Ledvinné tubulární buňky prasete LCC-PK1 – pasáž 23-24 (Health Protection Agency culture collections – ECACC, Salisbury, VB) (připraveno spolupracovníky)

### *4. 1. 2 Chemikálie*

- Hovězí albumin - Albumin bovine, Fraction V (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, SRN)
- FITC-albumin – Albumin, Fluorescein Isothiocyanate Conjugate Bovine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, SRN)
- $SnCl_2$ (Lachema, Brno, ČR)
- HCl konc. (Penta, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, SRN)
- Fyziologický roztok (připravený v laboratoři)
- Superčistá voda (dostupná na pracovišti)
- Destilovaná voda (dostupná na pracovišti)

### *4. 1. 3 Přístrojové vybavení*

- Generátor $[^{99m}Tc]^-$ technecistanu DRYTEC (GE Healthcare, USA)
- TLC-radioanalyzátor Rita Star-Analyser (Raytest, Straubenhardt, SRN)
- Analyzátor Tecan – Infinite M200 (Tecan, Rakousko)
- Laboratorní třepačka KS-15 Control EB, s inkubačním nástavcem TH 15 (Johanna Otto GmbH, Hechingen, SRN)

- Gama-spektrometr 1480 Wizard$^{TM}$ 3´´ (Wallac, Turku, Finsko)
- pH metr Orion 3 Star (Thermo, Beverly, USA)
- Elektromagnetická míchačka MM7 (Lavat, Chotutice, ČR)
- Analytické váhy (Sartorius, Gottingen, SRN)
- Měřič radioaktivity Bqmetr 4 (BQM, ČR)

### *4. 1. 4 Laboratorní pomůcky*

- Skleněné vyvíjecí komory pro vzestupnou papírovou chromatografii
- Polypropylénové zkumavky o objemu 10 ml

## 4. 2 Pracovní postup

### *4. 2. 1 Příprava albuminu značeného techneciem $^{99m}Tc$*

Před vlastním značením bylo vždy eluováno do sterilní lahvičky z generátoru $^{99m}Tc$ 10 ml roztoku $[^{99m}Tc]^-$ technecistanu sodného pomocí fyziologického roztoku s následným změřením radioaktivity celého eluátu.

Značený $^{99m}Tc$-albumin byl před příslušnou akumulační studií připraven vždy čerstvý. Albumin byl značen postupem vycházejícím z optimalizované metody značení uvedené v diplomové práci (Suchan, 2009):

1. Byl připraven zásobní roztok BSA o koncentraci 250 mg/ml rozpuštěním 1,25 g BSA v 5 ml fyziologického roztoku. Po kompletním rozpuštění albuminu vyžadujícím důkladné protřepávání na laboratorní třepačce, byl zásobní roztok albuminu skladován při teplotě 4 - 6°C.
2. Byl připraven zásobní roztok $SnCl_2.2H_2O$ o koncentraci 40 mg/ml rozpuštěním 530 mg $SnCl_2.2H_2O$ v 13,25 ml koncentrované HCl. Tento zásobní roztok byl následně uložen při teplotě -15°C. Těsně před použitím byl tento zásobní roztok vždy naředěn 10× superčistou vodou čerstvě přečištěnou dusíkem na koncentraci 4 mg/ml.
3. Do mikrozkumavky s magnetickým míchadélkem byl mikropipetou odměřen 1 ml připraveného zásobního roztoku albuminu o koncentraci 250 mg/ml. Zkumavka byla následně umístěna na elektromagnetickou míchačku a během dalších operací byl neustále míchán.
4. K roztoku albuminu bylo přidáno 250 µl čerstvě naředěného roztoku $SnCl_2.2H_2O$ o koncentraci 4 mg/ml (viz bod 2).
5. Do roztoku byl přidán 1 ml čerstvě eluovaného roztoku $[^{99m}Tc]^-$ technecistanu.
6. Roztok byl míchán přibližně po dobu jedné minuty.
7. Do chromatografické komory byl nalit fyziologický roztok tak, aby hladina roztoku byla asi 1 cm od dna.

8. Na proužek chromatografického papíru o rozměrech 1,5×15 cm bylo naneseno přibližně 10 µl roztoku značeného albuminu tak, aby skvrna nebyla v průměru větší než 1 cm.
9. Proužek byl následně vyvíjen v připravené chromatografické komoře. Po ukončení vyvíjení byl proužek usušen a distribuce radioaktivity byla stanovena pomocí TLC-radioanalyzátoru.

Pro kontrolu byl simultánně s albuminem, označeným postupem popsaným v předchozích bodech, připraven $^{99m}$Tc-albumin dle výchozí neoptimalizované metody (Suchan, 2009). Tento postup se liší od postupu předchozího ředěním zásobního roztoku před vlastním značením pomocí destilované vody místo vody superčisté, která byla čerstvě přečištěna dusíkem. Roztoku $SnCl_2.2H_2O$ se v tomto případě dává do reakční směsi dvojnásobné množství (500 µl) o poloviční koncentraci (2 mg/ml).

### *4. 2. 2 Stabilitní studie $^{99m}$Tc-albuminu*

Stabilitní studie byla provedena ihned po přípravě $^{99m}$Tc-albuminu optimalizovanou metodou. Byla sledována radiochemická čistota v čase 0, 1, 3, 6, 12 a 24 hod.

1. Po přípravě $^{99m}$Tc-albuminu byla mikrozkumavka opatřena víčkem a umístěna do inkubátoru temperovaného na teplotu 37°C.
2. V čase 1, 3, 6, 12 a 24 hod bylo na proužek chromatografického papíru naneseno určité množství inkubovaného $^{99m}$Tc-albuminu (v čase 1 hod - 1 µl vzorku, v čase 3 hod - 3 µl, v čase 6 hod - 5 µl, v čase 12 hod - 10 µl a v čase 24 hod - 20 µl). Vzorek byl nanášen tak, aby skvrna nebyla v průměru nikdy větší než 1 cm.
3. Postup vyvíjení a detekce byl stejný jako během přípravy $^{99m}$Tc-albuminu (viz kap. 4.2.1).

### *4. 2. 3 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana*

Ke studii byl použit albumin označený techneciem $^{99m}$Tc dle optimalizovaného postupu uvedeného v kapitole 4.2.1. Koncentrace označeného albuminu v roztoku byla 50 mg/ml nebo 100 mg/ml. Akumulace byla sledována v časovém intervalu 30 min při inkubaci 37°C.

*4. 2. 3. 1 Příprava buněčného materiálu – izolovaných nativních potkaních ledvinných buněk*

(příprava buněčného materiálu byla provedena Doc. PharmDr. Františkem Trejtnarem, CSc. a paní laborantkou I. Filipovou z Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy)

Suspenze izolovaných nativních buněk byla připravena před začátkem každé akumulační studie. Buňky byly vždy čerstvě připraveny krátce před započetím vlastní akumulační studie a byly uchovávány při teplotě 4°C.

1. Aparatura byla naplněna roztoky Hanks I, Hanks II, kolagenázou a byla následně temperována.
2. Z potkana byly vypreparovány ledviny a po opláchnutí teplým fyziologickým roztokem byly umístěny do připravené aparatury.
3. Po rozvolnění kolagenního pletiva buněk ledvin byly tyto buňky přeneseny do kádinky obsahující 50 ml Krebs-Henseleitova pufru s albuminem a kolagenázou.
4. V tomto pufru bylo provedeno úplné rozvolnění tkáně ledvin za pomoci pinzety a elektromagnetické míchačky.
5. Získaná suspenze ledvinných buněk byla přefiltrovaná přes gázu a silonové síto.
6. Byl stanoven počet buněk v suspenzi pomocí trypanové modři.
7. Suspenze buněk byla naředěna Krebs-Henseleitovým pufrem tak, aby byly v 1 ml suspenze přibližně 2 miliony buněk.

Podrobný popis přípravy aparatury pro separaci ledvinných buněk, preparace ledvin a izolace buněk je uveden v rigorózní práci (Vaňková, 2007).

#### *4. 2. 3. 2 Sledování závislosti akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na množství buněk*

1. Do první čtveřice reakčních zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml suspenze buněk, do druhé čtveřice 0,5 ml buněk a do poslední sady po 1,0 ml buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.
3. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku značeného $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml.
4. Zkumavky byly inkubovány za stálého třepání 30 min při teplotě 37°C.
5. Jako standardy byly připraveny 3 měřící lahvičky každá s 10 µl připraveného $^{99m}$Tc-albuminu a 5 ml destilované vody.
6. Po skončení požadované doby inkubace byly do zkumavek přidány 4 ml ledového Krebs-Henseleitova pufru a zkumavky byly centrifugovány 1 min při 80 g a 4°C.
7. Ze zkumavek bylo odebráno 0,5 ml supernatantu jako vzorek inkubačního média.
8. Zbytek supernatantu byl následně kvantitativně odsát, buňky byly resuspendovány přidáním dalších 4 ml pufru. Pak byly zkumavky opět centrifugovány za stejných podmínek jako v bodě 6. Postup popsaný v tomto bodě byl ještě dvakrát opakován.
9. Po poslední centrifugaci a odsátí supernatantu byly buňky ze zkumavek kvantitativně převedeny do měřících lahviček opakovaným výplachem pomocí pufru.
10. Byla změřena radioaktivita všech vzorků a standardů na γ-spektrometru.

#### *4. 2. 3. 3 Sledování závislosti akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na koncentraci látky*

1. Do reakčních zkumavek bylo odměřeno po 1,0 ml suspenze buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.

3. Do prvních 4 reakčních zkumavek bylo přidáno po 1 µl roztoku značeného $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml, do dalších 4 zkumavek bylo přidáno 10 µl roztoku albuminu a do zbývajících zkumavek 100 µl roztoku albuminu.
4. Následující postup je totožný s postupem u předchozího experimentu uvedeným v bodech 4 až 10 (viz kap. 4.2.3.2).

*4. 2. 3. 4 Sledování závislosti akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na čase*

1. Do reakčních zkumavek bylo odměřeno po 1,0 ml suspenze buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.
3. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku značeného $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 50 mg/ml.
4. Zkumavky byly inkubovány za stálého třepání při teplotě 37°C. Některé vzorky byly inkubovány po dobu 5, 15 a 30 min.
5. Následující postup je totožný s postupem u předchozího experimentu uvedeným v bodech 5 až 10 (viz kap. 4.2.3.2).

*4. 2. 3. 5 Sledování závislosti akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na inkubační teplotě*

1. Do reakčních zkumavek bylo odměřeno po 1,0 ml suspenze buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C a v ledové tříšti při 2°C na inkubační teplotu.
3. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 50 mg/ml.
4. Polovina zkumavek se vzorky byla inkubována za stálého třepání při teplotě 37°C, polovina v ledové tříšti při 2°C.
5. Další postup je totožný s postupem u předchozího experimentu uvedeným v bodech 5 až 11 (viz kap. 4.2.3.2).

### *4. 2. 4 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných prasečích buňkách*

Ke studii byl použit albumin označený techneciem $^{99m}$Tc dle optimalizovaného postupu uvedeného v kap. 4.2.1. Koncentrace označeného albuminu v roztoku byla 100 mg/ml. Akumulace byla sledována v časových intervalech 5, 15 a 30 min při inkubaci 37°C.

#### *4. 2. 4. 1 Příprava buněčného materiálu – suspenze ledvinných buněk prasete*

(příprava buněčného materiálu byla provedena Mgr. Janou Mandíkovou z Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy)

K experimentům byla použita ledvinná linie prasečích buněk LCC - PK1. Tyto buňky byly kultivovány buď 1 den („mladé“ buňky) nebo 4 dny („staré“ buňky) a poté rozvolněny pomocí trypsinizace. Suspenze mladých nebo starších ledvinných tubulárních buněk prasete byla připravena před započetím příslušné akumulační studie. Suspenze buněk byla naředěna tak, aby byly v 1 ml suspenze přibližně 2 miliony buněk a byla uchovávána při teplotě 4°C.

#### *4. 2. 4. 2 Vlastní akumulační studie*

6. Do reakčních zkumavek bylo odměřeno po 1,0 ml suspenze mladých nebo starších LCC - PK1 buněk v závislosti na prováděné studii.
7. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.
8. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku značeného $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml.
9. Zkumavky byly inkubovány za stálého třepání při teplotě 37°C. Některé vzorky byly inkubovány po dobu 5, 15 a 30 min.
10. Následující postup je totožný s postupem u předchozího experimentu uvedeným v bodech 5 až 10 (viz kap. 4.2.3.2).

### *4. 2. 5 Akumulace FITC-albuminu v ledvinných buňkách potkana*

Ke studiím byly použity nativní izolované ledvinné buňky potkana (příprava viz kap. 4.2.3.1). Buňky byly připraveny vždy čerstvé krátce před začátkem vlastní akumulační studie a byly uchovávány v chladničce.

#### *4. 2. 5. 1 Příprava roztoku FITC-albuminu*

1. Byly připraveny zásobní roztoky FITC-albuminu o koncentracích 100 mg/ml a 5 mg/ml. Koncentrovanější roztok byl připraven navážením 40 mg suroviny a smísením s 400 µl fyziologického roztoku. Méně koncentrovaný roztok byl připraven přidáním 400 µl fyziologického roztoku ke 2 mg navážené suroviny.
2. Roztoky byly důkladně promíchány na laboratorní míchačce, aby se surovina kompletně rozpustila.
3. Po kompletním rozpuštění albuminu byly zásobní roztoky albuminu uloženy do lednice.

Tímto způsobem připravený zásobní roztok albuminu byl použit k experimentům maximálně po dobu 24 hodin, poté byl připraven zásobní roztok nový.

#### *4. 2. 5. 2 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na době inkubace*

K experimentu byl použit FITC-albumin (viz kap. 4.2.5.1) o koncentraci 100 mg/ml. Inkubační koncentrace FITC-albuminu byla 1 mg/ml. Akumulace byla sledována v časových intervalech 2, 15 a 30 min při inkubaci 37°C.

1. Do reakčních zkumavek byl napipetován 1 ml suspenze nativních potkaních buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.
3. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml.
4. Zkumavky byly inkubovány za stálého třepání při teplotě 37°C. Některé vzorky byly inkubovány po dobu 2, 15 a 30 min.

5. Jako standardy byly připraveny 3 zkumavky a do každé bylo napipetováno 10 µl FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml a přidáno 1 ml fyziologického roztoku.
6. Po skončení požadované doby inkubace byly do zkumavek přidány 4 ml ledového Krebs-Henseleitova pufru a zkumavky byly centrifugovány 1 min při 80 g a 4°C.
7. Ze zkumavek bylo odebráno 0,5 ml supernatantu jako vzorek inkubačního média.
8. Zbytek supernatantu byl následně kvantitativně odsát, buňky byly resuspendovány přidáním dalších 4 ml pufru. Pak byly zkumavky opět centrifugovány za stejných podmínek jako v bodě 6. Postup popsaný v tomto bodě byl ještě dvakrát opakován.
9. Po poslední centrifugaci a odsátí supernatantu byly do všech zkumavek včetně standardů přidány 3 ml 1% lyzačního roztoku SDS.
10. Na měřící destičku bylo napipetováno po 100 µl roztoku ze všech zkumavek.
11. Byla změřena fluorescence všech vzorků a standardů na měřící destičce pomocí analyzátoru Tecan při vlnové délce 495 nm.

*4. 2. 5. 3 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na teplotě*

K akumulační studii byl opět použit FITC-albumin (viz kap. 4.2.5.1) o koncentraci 100 mg/ml. Inkubační koncentrace FITC-albuminu byla 1 mg/ml. Akumulace byla sledována v časovém intervalu 30 min po inkubaci při 2°C a 37°C.

1. Do reakčních zkumavek byl napipetován 1 ml suspenze nativních potkaních buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C a v ledové tříšti při 2°C na inkubační teplotu.
3. Do reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml.
4. Polovina zkumavek se vzorky byla inkubována za stálého třepání při teplotě 37°C, polovina v ledové tříšti při 2°C.

5. Další postup je totožný s postupem u předchozího experimentu uvedeným v bodech 5 až 11 (viz kap. 4.2.5.2).

*4. 2. 5. 4 Sledování závislosti akumulace FITC-albuminu na přídavku koncentrovaného neznačeného albuminu*

K experimentu byl použit FITC-albumin (viz kap. 4.2.5.1) o koncentraci 100 mg/ml a 5 mg/ml. Inkubační koncentrace FITC-albuminu u prvních 2 sad vzorků byla 42 µg/ml, u třetí sady vzorků byla 50 µg/ml. Inkubační koncentrace neznačeného albuminu byla u první čtveřice vzorků 100 mg/ml. Akumulace byla sledována v časovém intervalu 30 min po inkubaci při 37°C.

Před vlastní studií byl připraven zásobní roztok sérového albuminu o koncentraci 500 mg/ml navážením 1 g suroviny do mikrozkumavky na analytických vahách a přidáním 2 ml fyziologického roztoku. Po důkladném rozpuštění za použití laboratorní třepačky byl roztok uložen do chladničky.

1. Do zkumavek byl napipetován 1 ml suspenze nativních potkaních buněk.
2. Buňky byly 5 min temperovány v inkubátoru při 37°C na inkubační teplotu.
3. Do první čtveřice zkumavek bylo odměřeno 200 µl neznačeného albuminu o koncentraci 500 mg/ml. Zkumavky byly inkubovány po dobu 5 min při teplotě 37°C.
4. Do druhé sady zkumavek bylo přidáno po 200 µl fyziologického roztoku.
5. Do všech reakčních zkumavek bylo přidáno po 10 µl roztoku FITC-albuminu o koncentraci 5 mg/ml.
6. Zkumavky byly inkubovány za stálého třepání 30 min při teplotě 37°C.
7. Jako standardy byly připraveny 2 sady po 3 zkumavkách. Do první sady bylo odměřeno po 1 ml fyziologického roztoku a 200 µl neznačeného albuminu o koncentraci 500 mg/m. Do druhé sady bylo odměřeno po 1,2 ml fyziologického roztoku. Do všech zkumavek standardů bylo napipetováno 10 µl FITC-albuminu o koncentraci 5 mg/ml.
8. Další postup je totožný s postupem uvedeným v bodech 6 až 11 (viz kap. 4.2.5.2).

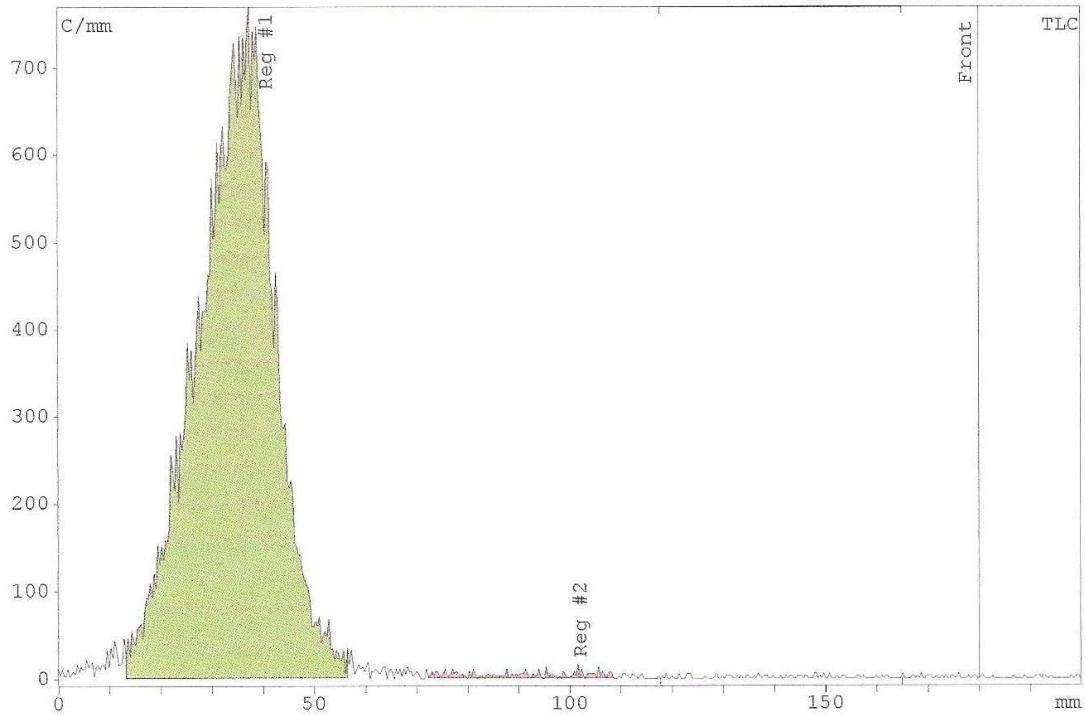
## 4. 3. Vyjadřování výsledků

Hodnoty radioaktivity ve výsledkové části jsou vyjadřovány v počtu impulzů za minutu (cpm). Radioaktivita buněčné frakce byla vždy vztažena na $1.10^6$ buněk a vyjádřena jako procenta z vložené dávky radioaktivity. Pro danou skupinu vzorků byl z jednotlivých experimentálních údajů vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka průměru. Dávka vložené radioaktivity byla zjišťována měřením radioaktivity tripletu vzorků obsahujících stejné množství radiopeptidu jako bylo pipetováno do experimentálních vzorků („standard“).

# 5. VÝSLEDKY

## 5. 1 Příprava $^{99m}$Tc-albuminu

Obr. 10 a 11 ukazují radiochemickou čistotu $^{99m}$Tc-albuminu připraveného optimalizovanou metodou (Suchan, 2009). Papírovou chromatografií ve fyziologickém roztoku bylo vyvíjeno 10 µl roztoku čerstvě připraveného albuminu. Chromatogram byl analyzován pomocí TLC-radioanalyzátoru.

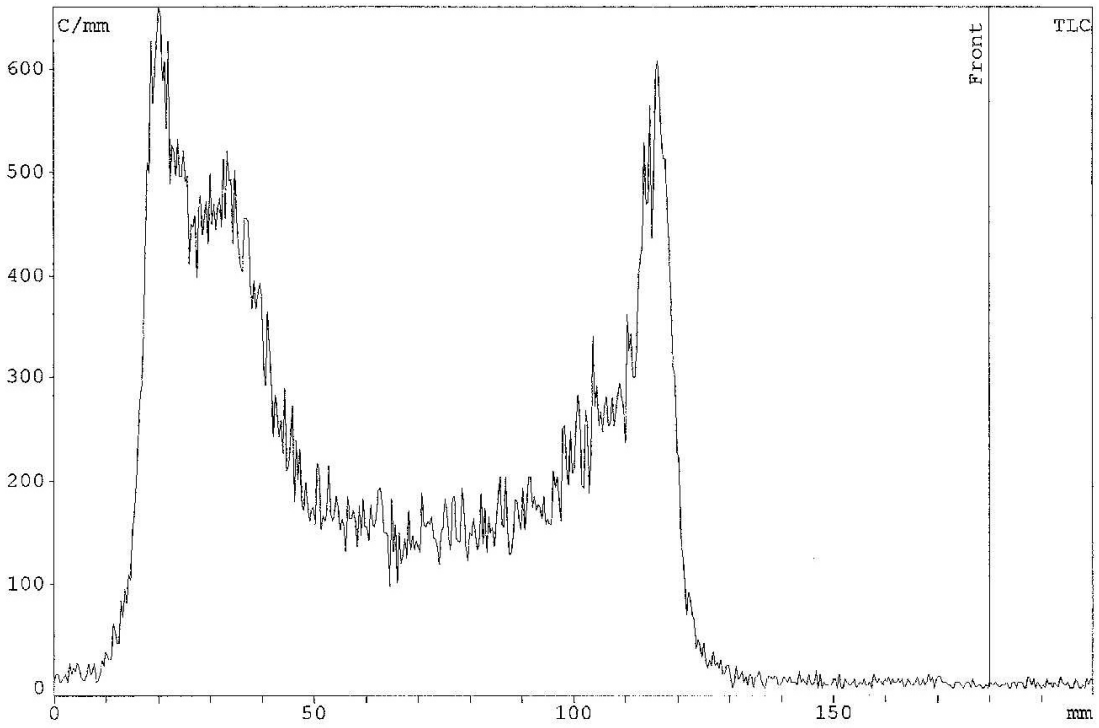



*Obr. 10. Reprezentativní chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu připraveného optimalizovaným postupem*

| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,212 | 96,83 | DD | 13096,20 | 99,13 |
| Reg #2 | 0,564 | 0,85 | DD | 115,19 | 0,87 |
| | | | | | |
| Sum in ROI | | | | 13211,39 | |
| Total area | | | | 13524,29 | |
| Area RF | | | | 13535,82 | |
| BKG1 | | | | 1,290 | |
| Remainder RF | | | | 324,43 | 2,40 |
| Remainder (Tot) | | | | 312,90 | 2,31 |

*Obr. 11. Radiochemická čistota připraveného $^{99m}$Tc-albuminu*

Obr. 12 přibližuje radiochemickou čistotu $^{99m}$Tc-albuminu připraveného výchozí metodou bez úpravy pH v reakční směsi (Suchan, 2009). Papírovou chromatografií ve fyziologickém roztoku bylo vyvíjeno přibližně 10 µl roztoku navázaného albuminu.

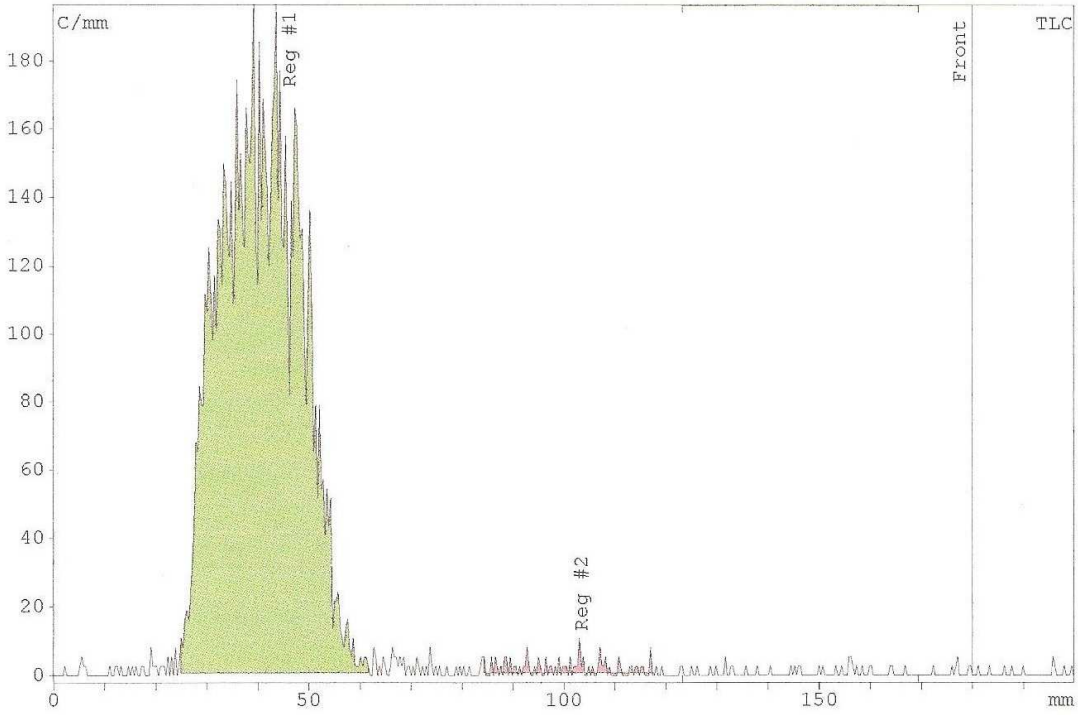



*Obr. 12. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu připraveného neoptimalizovanou metodou*

## 5. 2 Stabilitní studie $^{99m}$Tc-albuminu

(výsledky studie byly přejaty z diplomové práce (Suchan, 2009))

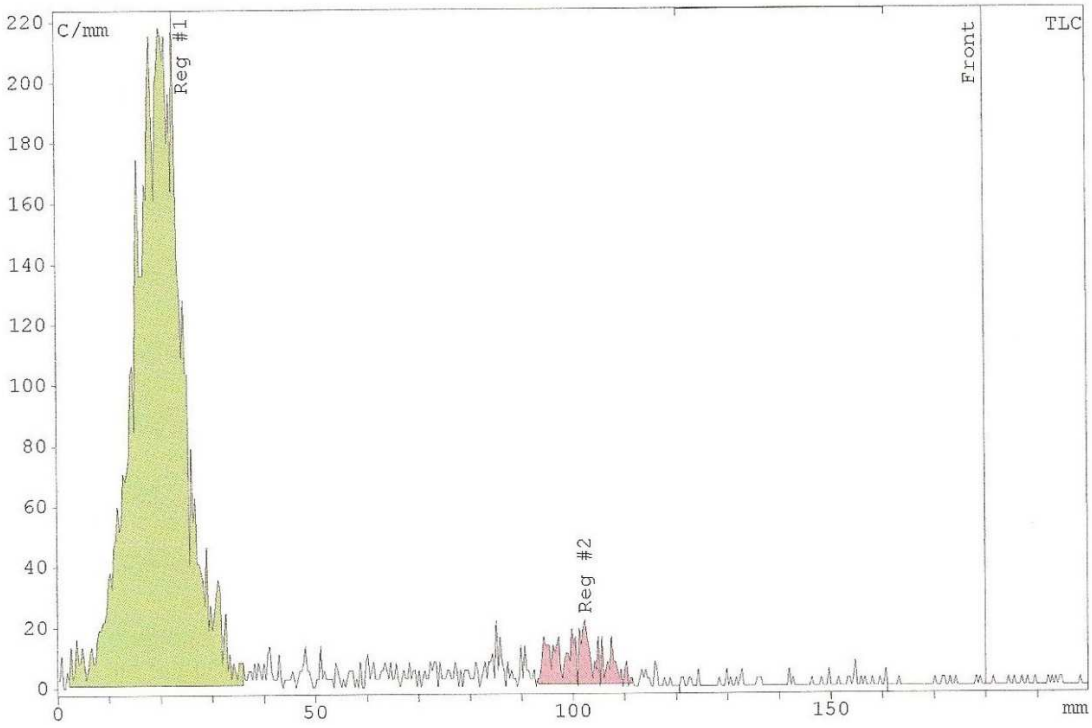
Následující obrázky ukazují distribuci radioaktivity chromatogramů s $^{99m}$Tc-albuminem po inkubaci 1, 3, 6, 12 a 24 hod při 37°C. Papírovou chromatografií v 85 % metanolu bylo vyvíjeno přibližně 10 µl roztoku navázaného albuminu. Radiochemickou čistotu v čase 0 ukazují obr. 9 a 10.




*Obr. 13. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu po 1 hod inkubace*

*Obr. 14. Radiochemická čistota po 1 hod inkubace*

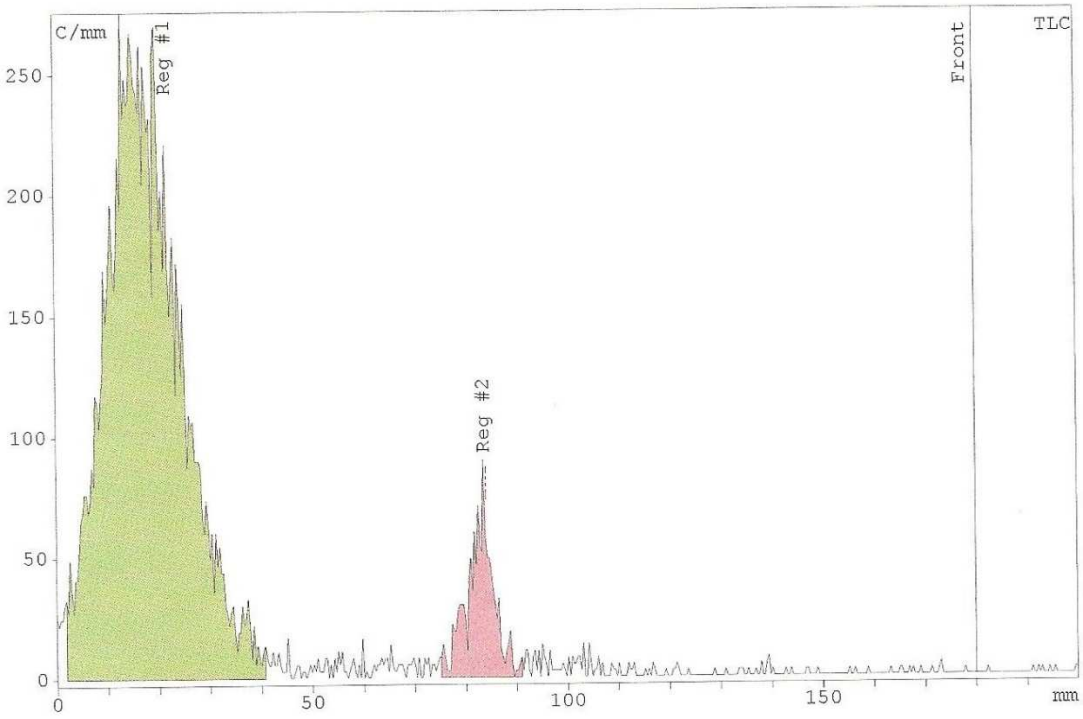
| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,242 | 97,42 | DD | 3355,603 | 98,56 |
| Reg #2 | 0,572 | 1,42 | DD | 48,889 | 1,44 |
| | | | | | |
| Sum in ROI | | | | 3404,492 | |
| Total area | | | | 3444,587 | |
| Area RF | | | | 3448,302 | |
| BKG1 | | | | 0,6926 | |
| Remainder RF | | | | 43,81 | 1,27 |
| Remainder (Tot) | | | | 40,10 | 1,16 |




*Obr. 15. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu po 3 hod inkubace*

*Obr. 16. Radiochemická čistota po 3 hod inkubace*

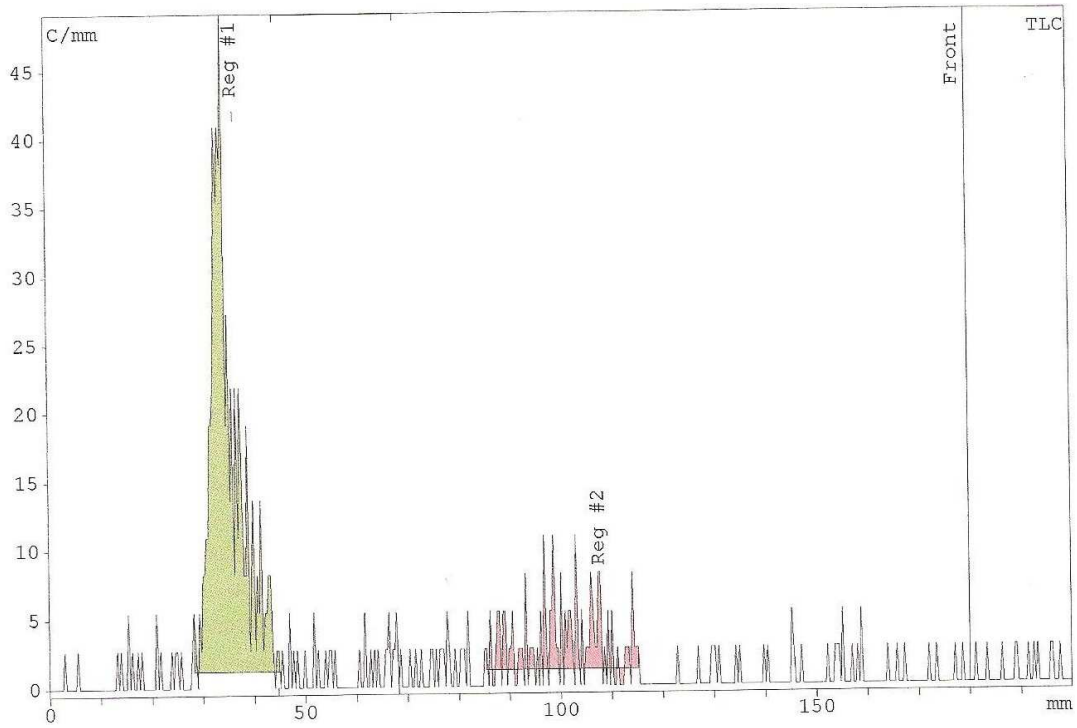
| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,114 | 86,82 | DD | 2421,055 | 93,94 |
| Reg #2 | 0,566 | 5,60 | DD | 156,182 | 6,06 |
| | | | | | |
| Sum in ROI | | | | 2577,236 | |
| Total area | | | | 2788,682 | |
| Area RF | | | | 2794,845 | |
| BKG1 | | | | 0,9174 | |
| Remainder RF | | | | 217,61 | 7,79 |
| Remainder (Tot) | | | | 211,45 | 7,58 |




*Obr. 17. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu po 6 hod inkubace*

*Obr. 18. Radiochemická čistota po 6 hod inkubace*

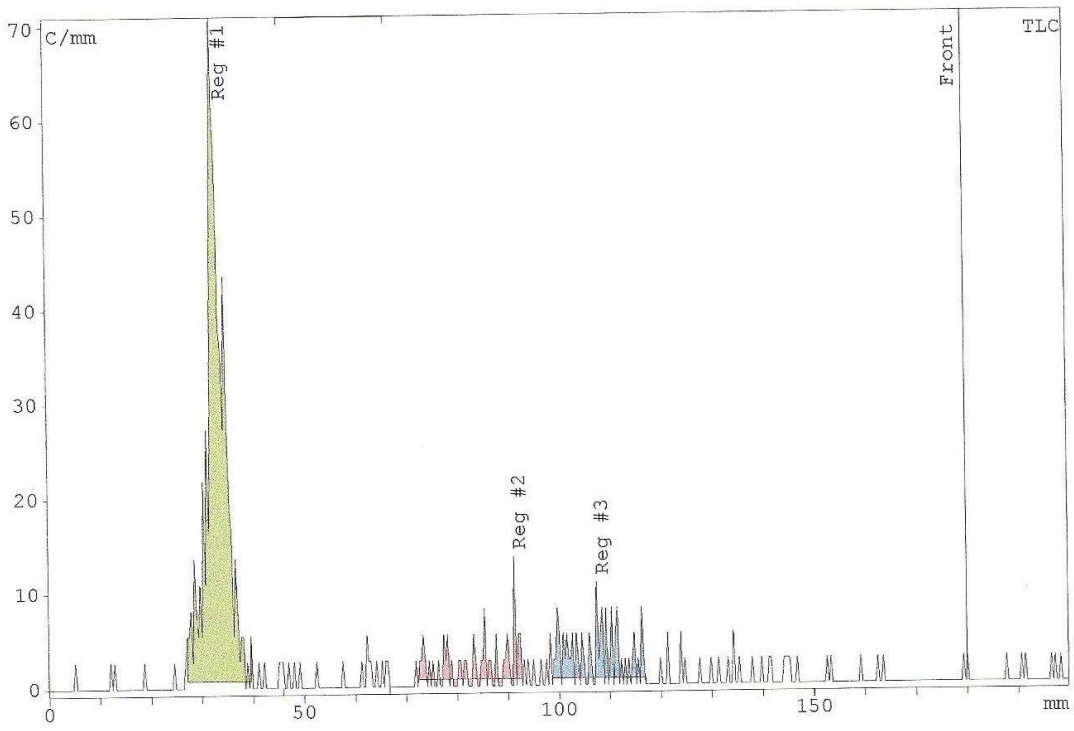
| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,086 | 85,07 | DD | 4460,000 | 91,32 |
| Reg #2 | 0,462 | 8,09 | DD | 424,000 | 8,68 |
| Sum in ROI | | | | 4884,000 | |
| Total area | | | | 5243,000 | |
| Area RF | | | | 5236,000 | |




*Obr. 19. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu po 12 hod inkubace*

*Obr. 20. Radiochemická čistota po 12 hod inkubace*

| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,187 | 110,49 | DD | 213,8750 | 79,38 |
| Reg #2 | 0,595 | 28,71 | DD | 55,5625 | 20,62 |
| | | | | | |
| Sum in ROI | | | | 269,4375 | |
| Total area | | | | 193,5625 | |
| Area RF | | | | 206,1875 | |
| BKG1 | | | | 1,19318 | |
| Remainder RF | | | | -63,25 | -30,68 |
| Remainder (Tot) | | | | -75,88 | -39,20 |

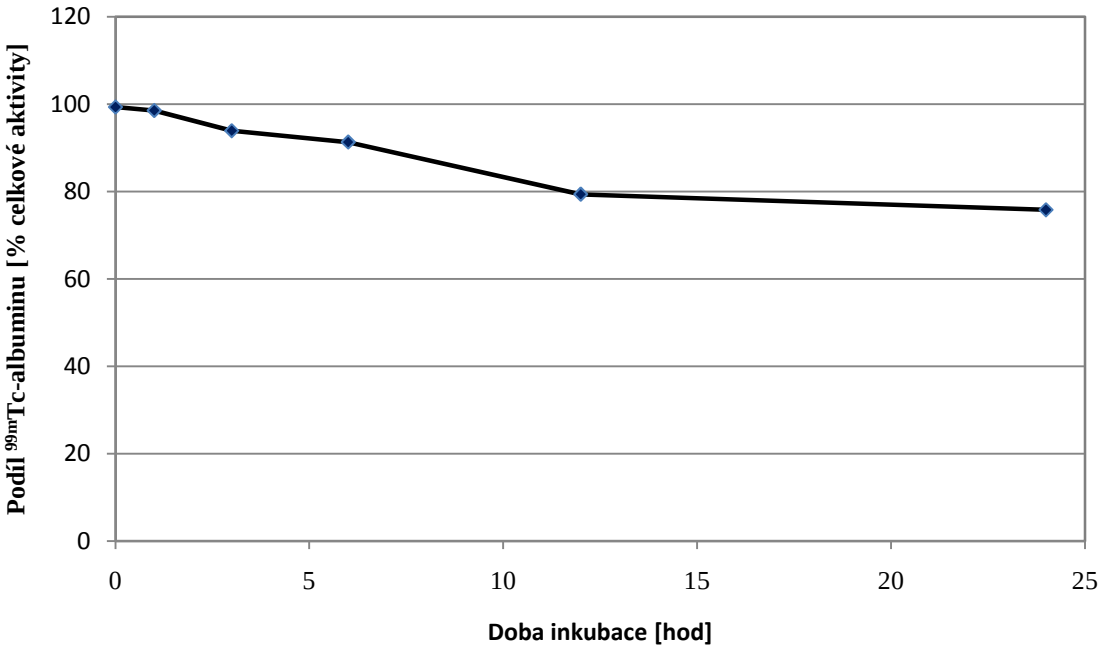



*Obr. 21. Chromatogram $^{99m}$Tc-albuminu po 24 hod inkubace*

*Obr. 22. Radiochemická čistota po 24 hod inkubace*

| Substance | R/F | %Total | Type | Area | %Area |
|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | Counts | % |
| Reg #1 | 0,183 | 86,13 | DD | 233,0526 | 75,81 |
| Reg #2 | 0,511 | 10,91 | DD | 29,5263 | 9,60 |
| Reg #3 | 0,601 | 16,57 | DD | 44,8421 | 14,59 |
| | | | | | |
| Sum in ROI | | | | 307,4211 | |
| Total area | | | | 270,5789 | |
| Area RF | | | | 277,7895 | |
| BKG1 | | | | 0,71770 | |
| Remainder RF | | | | -29,63 | -10,67 |
| Remainder (Tot) | | | | -36,84 | -13,62 |

Graf 1 ukazuje stabilitu $^{99m}$Tc-albuminu během inkubace při 37°C.

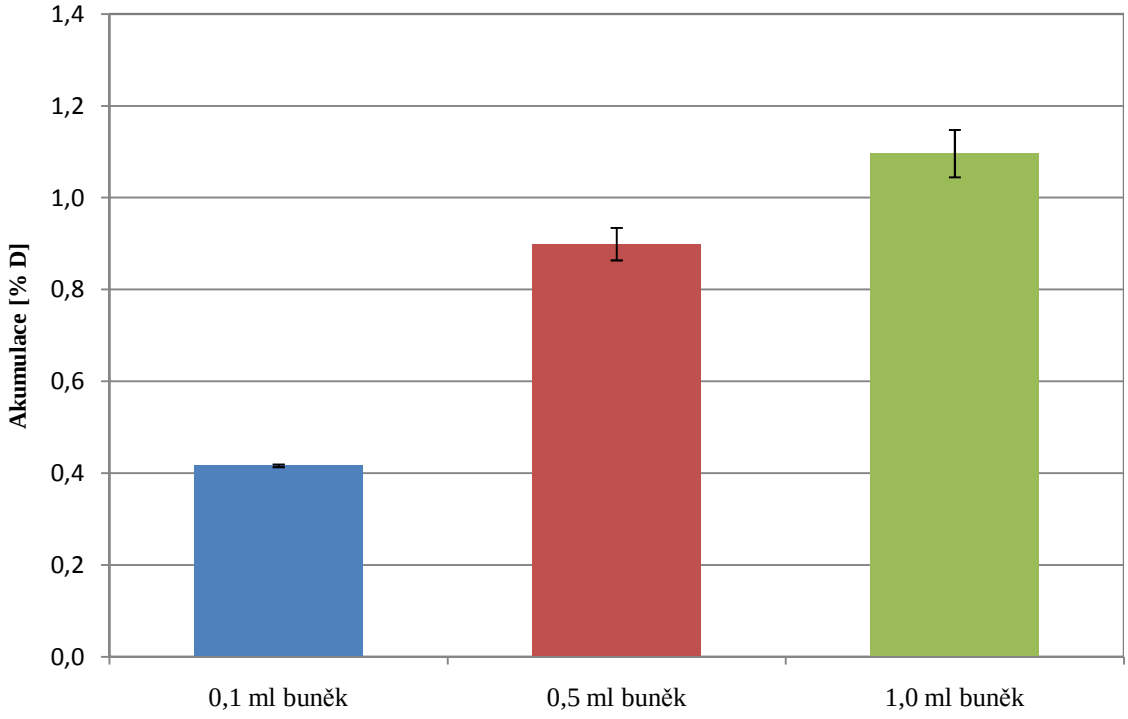



*Graf 1. Stabilita $^{99m}$Tc-albuminu při 37°C*

## 5. 3 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana

### *5. 3. 1 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na množství buněk*

Graf 2 a tab. 3 znázorňují radioaktivitu buněčné frakce a akumulaci $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana po 30 min inkubace při 37°C. U vzorků bylo použito 0,1 ml, 0,5 ml a 1,0 ml suspenze izolovaných buněk o koncentraci $2.10^6$/ml a k buňkám bylo přidáno 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml.




*Graf 2. Závislost akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na množství buněk*

*Tab. 3. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu při různém množství buněk*

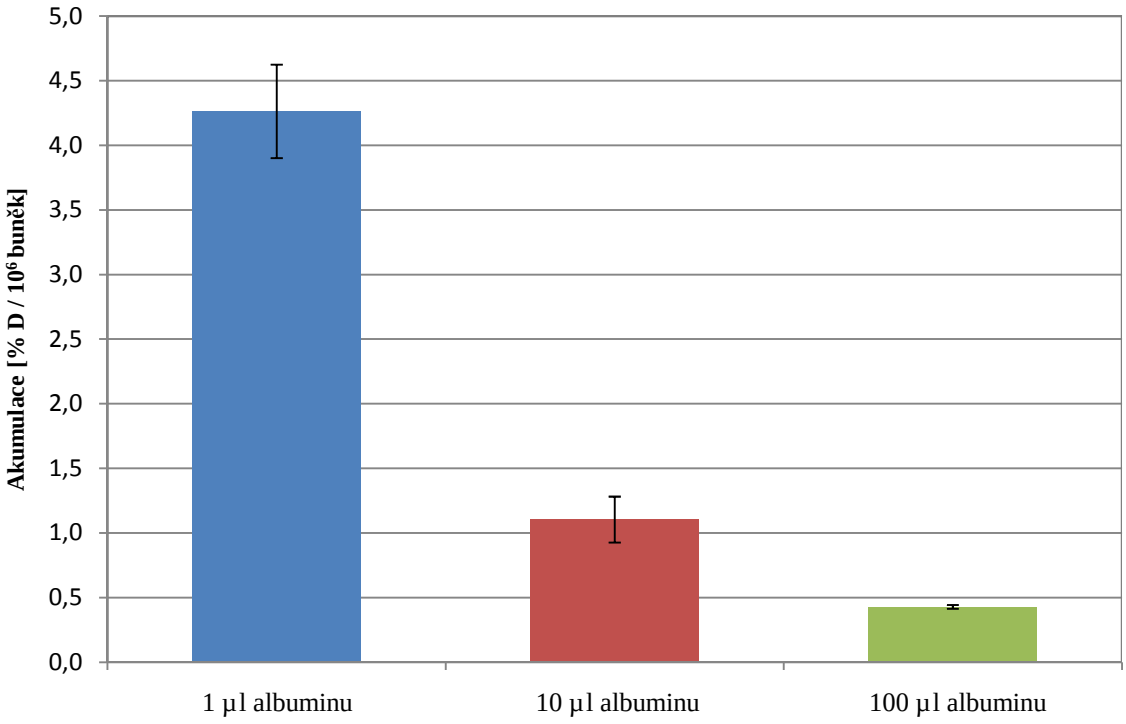
| **Množství buněčné frakce (ml)** | **Počet buněk ($\times 10^6$)** | **Radioaktivita v buněčné frakci ($cpm \times 10^3$)** | **Přidaná dávka ($cpm \times 10^4$)** | **Akumulace (% D)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 0,1 | 0,2 | 9,66 | 114,63 | 0,421 | 0,417 ± 0,003 |
| | | 9,49 | | 0,414 | |
| | | 9,49 | | 0,414 | |
| | | 9,55 | | 0,417 | |
| 0,5 | 1,0 | 20,64 | 114,63 | 0,900 | 0,899 ± 0,036 |
| | | 21,94 | | 0,957 | |
| | | 19,80 | | 0,864 | |
| | | 20,09 | | 0,877 | |
| 1,0 | 2,0 | 24,92 | 114,63 | 1,087 | 1,097 ± 0,051 |
| | | 25,71 | | 1,122 | |
| | | 23,35 | | 1,019 | |
| | | 26,55 | | 1,158 | |

### *5. 3. 2 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na koncentraci*

Tab. 4 a graf 3 znázorňují radioaktivitu ledvinných buněk a akumulaci $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana po 30 min inkubace při 37°C. K 1 ml suspenze izolovaných buněk bylo o koncentraci $2.10^6$/ml přidáno 1 µl, 10 µl a 100 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích tak byly 0,1 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml.

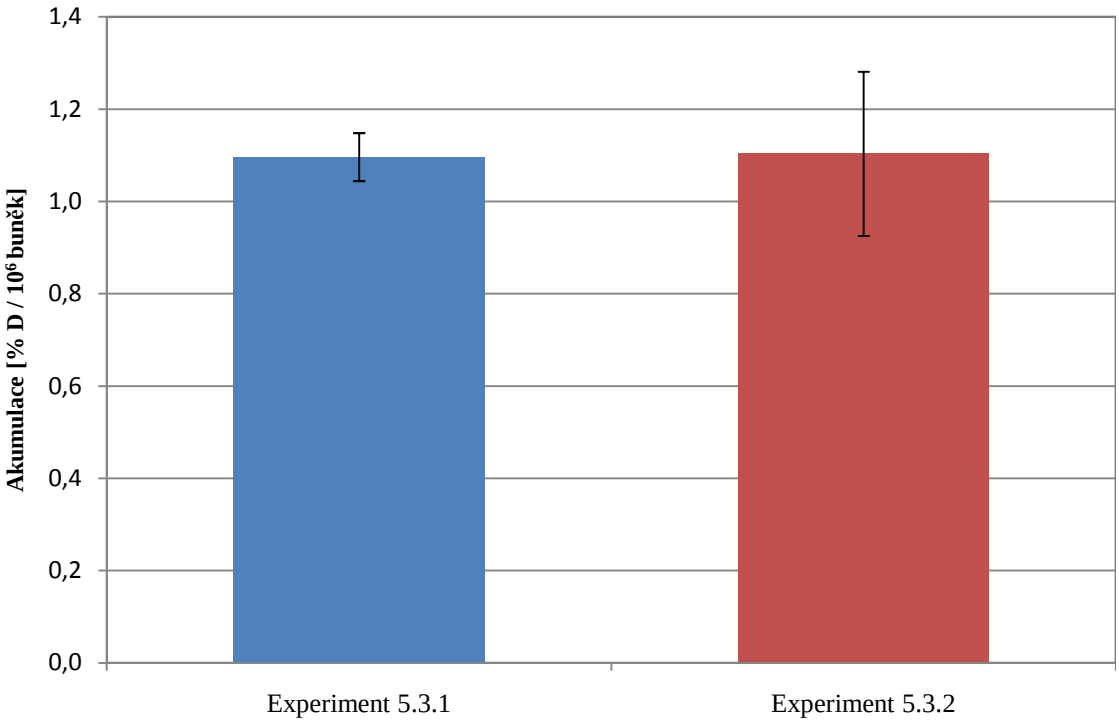
*Tab. 4. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na koncentraci*

| **Množství přidaného albuminu (µl)** | **Radioaktivita v buněčné frakci (cpm×$10^3$)** | **Přidaná dávka (cpm×$10^4$)** | **Akumulace (% D / $10^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 1,0 | 9,63 | 11,46 | 4,202 | 4,263 ± 0,362 |
| | 10,85 | | 4,734 | |
| | 8,83 | | 3,853 | |
| 10 | 21,08 | 114,63 | 0,920 | 1,104 ± 0,178 |
| | 32,05 | | 1,398 | |
| | 24,19 | | 1,055 | |
| | 23,87 | | 1,042 | |
| 100 | 93,57 | 1146,3 | 0,408 | 0,428 ± 0,015 |
| | 95,97 | | 0,419 | |
| | 101,40 | | 0,442 | |
| | 101,82 | | 0,444 | |




*Graf 3. Závislost akumulace $^{99m}$Tc-albuminu na koncentraci*

Graf 4 ukazuje kontrolní srovnání akumulace $^{99m}$Tc-albuminu u vzorků z předchozích dvou experimentů (viz část 5.3.1 a 5.3.2) o stejné inkubační koncentraci 1 mg/ml. Oba vzorky byly připraveny přidáním 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml k 1 ml suspenze izolovaných buněk. Vzorky byly inkubovány 30 min při teplotě 37°C.




*Graf 4. Srovnání akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v různých experimentech*

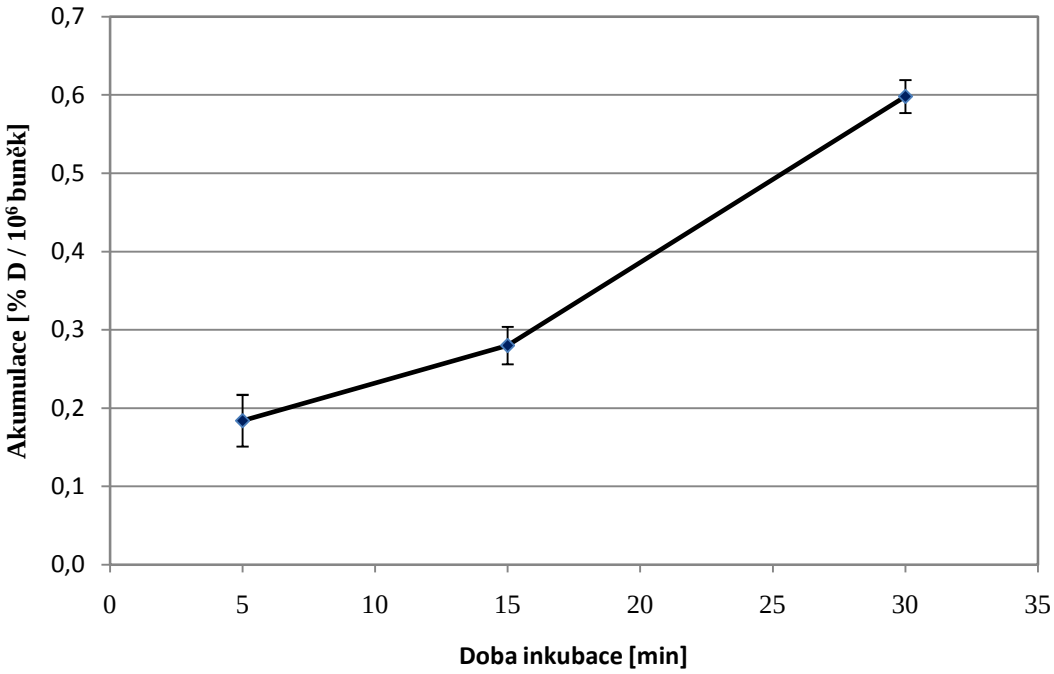
### *5. 3. 3. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na čase*

(výsledky experimentu byly přejaty z diplomové práce (Suchan, 2009))

Tab. 5 a graf 5 znázorňují nárůst akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách potkana v závislosti na vzrůstající době inkubace vzorků při 37°C. Je vyhodnocena akumulace po 5, 15 a 30 min inkubace. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích byla 0,5 mg/ml.

*Tab. 5. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu po 5, 15 a 30 min při 37 °C*

| **Doba inkubace (min)** | **Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)** | **Přidaná dávka (cpm×10$^3$)** | **Akumulace (% D / 10$^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 5 | 1367,6 | 398,80 | 0,170 | 0,184 ± 0,033 |
| | 1534,4 | | 0,195 | |
| | 1104,3 | | 0,140 | |
| | 1812,7 | | 0,230 | |
| 15 | 2307,6 | 398,80 | 0,290 | 0,280 ± 0,024 |
| | 1925,2 | | 0,240 | |
| | 2324,5 | | 0,290 | |
| | 2385,2 | | 0,300 | |
| 30 | 4956,3 | 398,80 | 0,620 | 0,598 ± 0,021 |
| | 4524,6 | | 0,570 | |
| | 4842,4 | | 0,605 | |




*Graf 5. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách v závislosti na čase*

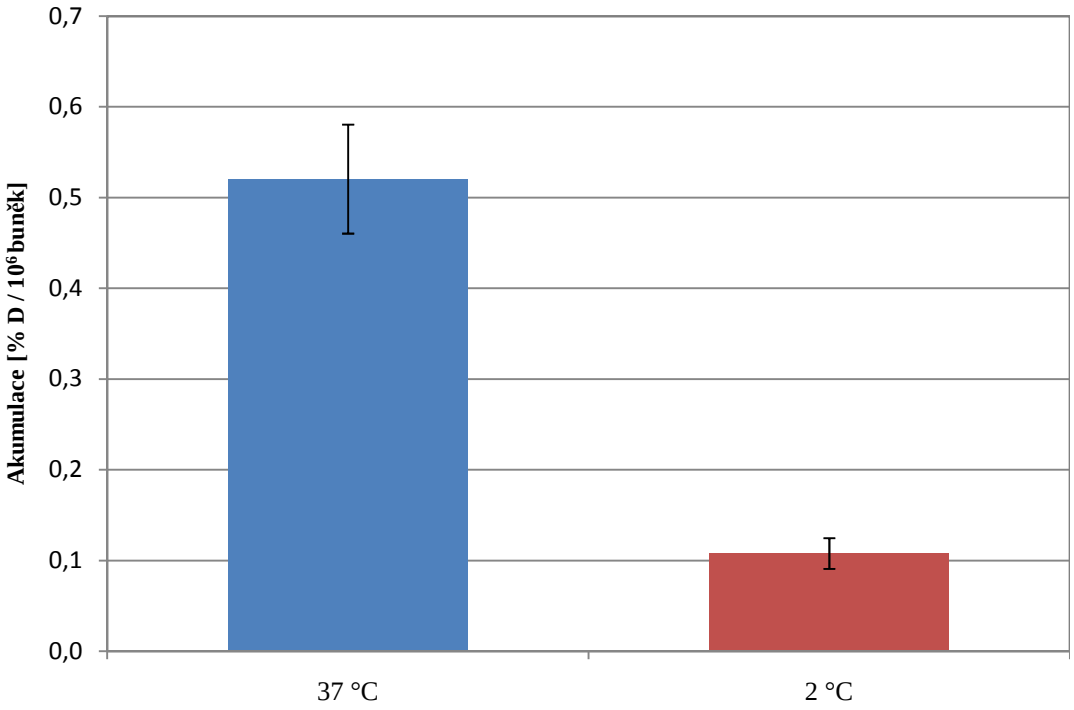
### *5. 3. 4 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v závislosti na inkubační teplotě*

(výsledky experimentu byly přejaty z diplomové práce (Suchan, 2009))

Tab. 6 a graf 6 vyhodnocují radioaktivitu ledvinných buněk a akumulaci $^{99m}$Tc-albuminu v potkaních ledvinných buňkách po 30 min inkubace při 37°C a 2°C. K buňkám bylo přidáno 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 50 mg/ml.

*Tab. 6. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu při 37 °C a 2 °C*

| **Podmínky inkubace** | **Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)** | **Přidaná dávka (cpm×10$^3$)** | **Akumulace (% D / 10$^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 37°C | 3499,1 | 357,79 | 0,454 | 0,503 ± 0,060 |
| | 3487,6 | | 0,454 | |
| | 4307,3 | | 0,600 | |
| | 3601,4 | | 0,505 | |
| 2°C | 869,3 | 357,79 | 0,120 | 0,108 ± 0,017 |
| | 844,2 | | 0,120 | |
| | 599,1 | | 0,085 | |




*Graf 6. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu při 37°C a 2°C*

## 5. 4 Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v ledvinných buňkách prasete

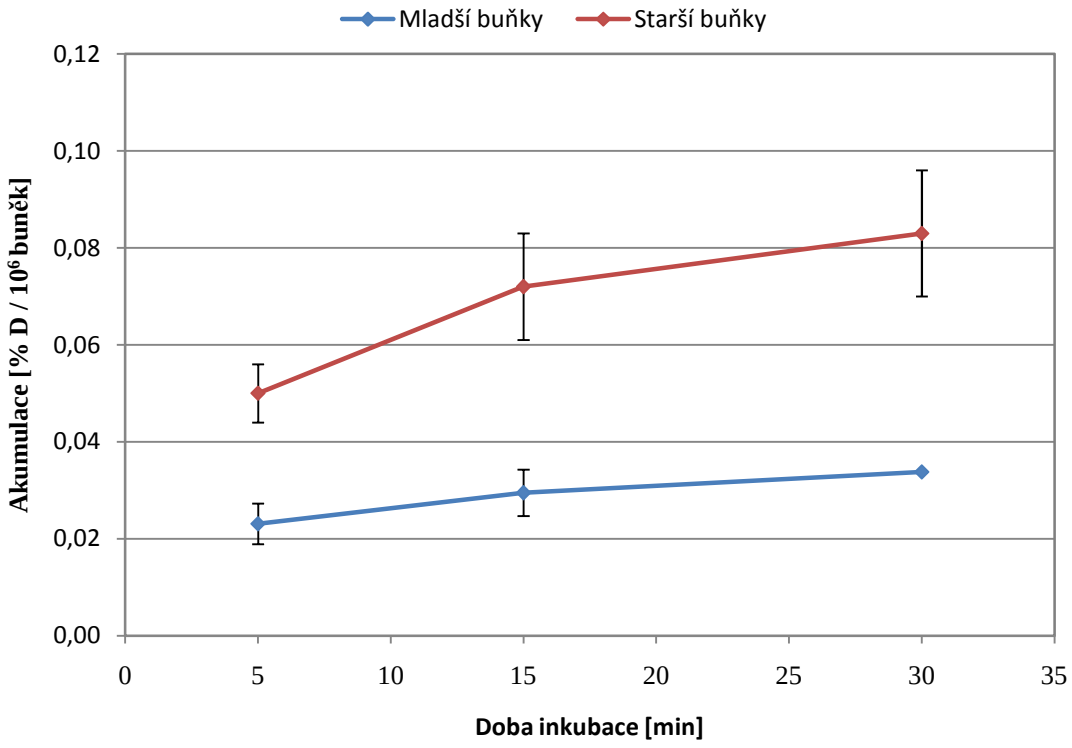
Tab. 7 a 8 a graf 7 vystihují a porovnávají radioaktivitu a akumulaci $^{99m}$Tc-albuminu v mladých a starších ledvinných buňkách prasete po 5, 15 a 30 min inkubace při 37°C. K 1 ml suspenze izolovaných buněk bylo přidáno vždy 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích byla 1 mg/ml.

*Tab. 7. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v mladých prasečích buňkách*

| **Doba inkubace (min)** | **Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)** | **Přidaná dávka (cpm×10$^4$)** | **Akumulace (% D / 10$^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 5 | 603,8 | 114,26 | 0,027 | 0,023 ± 0,004 |
| | 417,3 | | 0,019 | |
| | 642,6 | | 0,028 | |
| | 443,6 | | 0,020 | |
| 15 | 520,5 | 114,26 | 0,023 | 0,030 ± 0,005 |
| | 770,6 | | 0,031 | |
| | 784,2 | | 0,035 | |
| 30 | 768,3 | 114,26 | 0,034 | 0,034 ± 0,0002 |
| | 779,9 | | 0,034 | |
| | 771,1 | | 0,034 | |

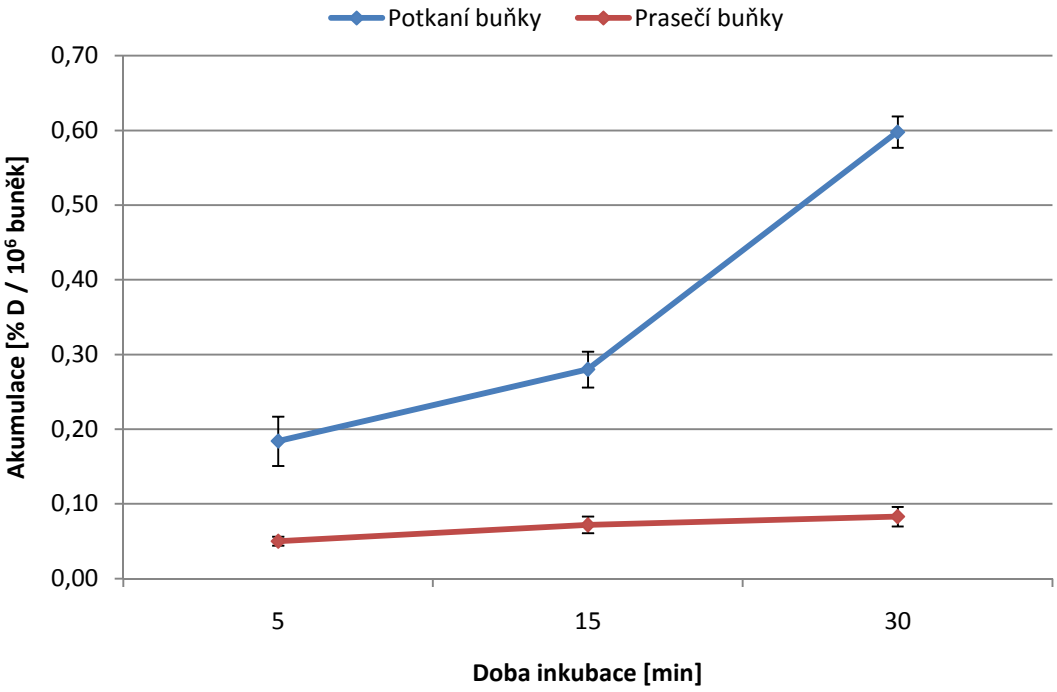
*Tab. 8. Akumulace $^{99m}$Tc-albuminu ve starších prasečích buňkách*

| **Doba inkubace (min)** | **Radioaktivita v buněčné frakci (cpm)** | **Přidaná dávka (cpm×10$^4$)** | **Akumulace (% D / 10$^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 5 | 1082,4 | 102,27 | 0,053 | 0,050 ± 0,006 |
| | 850,2 | | 0,042 | |
| | 1128,3 | | 0,055 | |
| 15 | 1775,2 | 102,27 | 0,087 | 0,072 ± 0,011 |
| | 1402,0 | | 0,068 | |
| | 1252,0 | | 0,061 | |
| 30 | 1906,7 | 102,27 | 0,093 | 0,083 ± 0,013 |
| | 1535,1 | | 0,075 | |
| | 1313,6 | | 0,065 | |
| | 1985,0 | | 0,097 | |




*Graf 7. Srovnání míry akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v mladých a starších prasečích buňkách*

Graf 8 uvádí srovnání akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v potkaních (viz část 5.3.3) a prasečích buňkách po 5, 15 a 30 min inkubace při 37°C. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích 1 mg/ml byla dosažena přidáním 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu o koncentraci 100 mg/ml k 1 ml suspenze daných izolovaných buněk.




*Graf 8. Srovnání akumulace $^{99m}$Tc-albuminu v prasečích a potkaních buňkách*

## 5. 5 Akumulace FITC-albuminu v ledvinných buňkách potkana

### *5. 5. 1 Akumulace FITC-albuminu v závislosti na době inkubace*

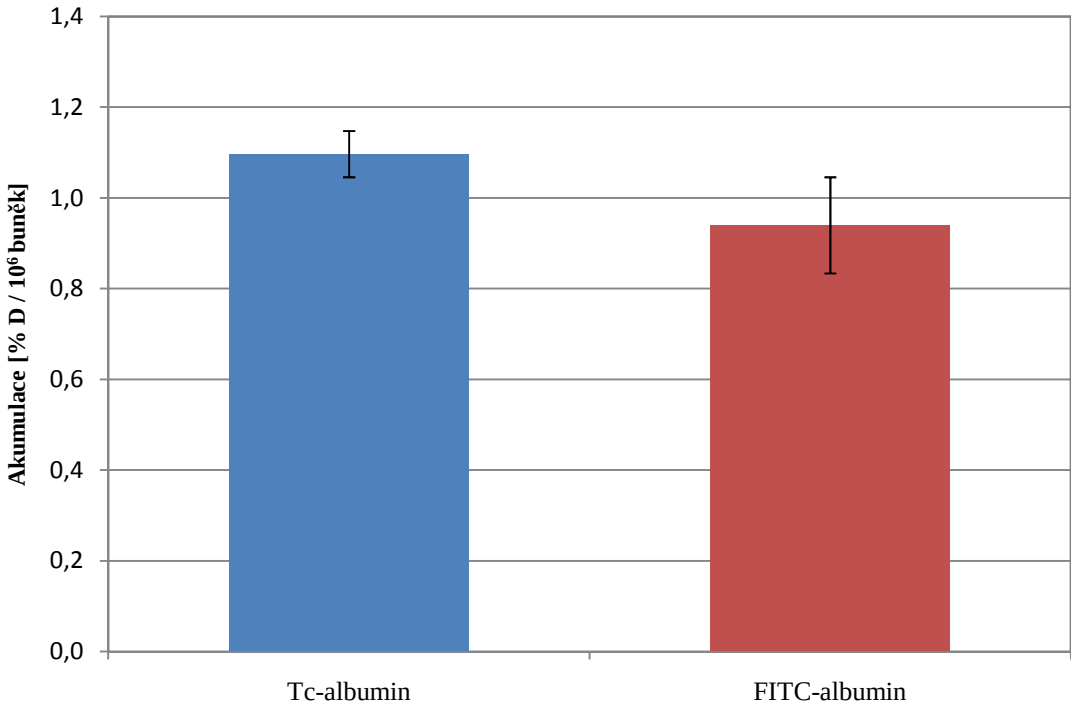
Tab. 9 uvádí fluorescenci a akumulaci FITC-albuminu v potkaních buňkách po 2, 15 a 30 min inkubace při 37°C. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích byla 1 mg/ml. K 1 ml suspenze izolovaných buněk o koncentraci $2.10^6$/ml bylo přidáno 10 µl FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml. Hodnoty akumulace jsou uvedeny v procentech fluorescence standardu a vztaženy na 1 milion buněk.

*Tab. 9. Akumulace FITC-albuminu v potkaních buňkách*

| **Doba inkubace (min)** | **Fluorescence** | **Akumulace (% D / $10^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|
| | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 2 | 276,53 | 0,369 | 0,302 ± 0,072 |
| | 152,19 | 0,203 | |
| | 250,53 | 0,334 | |
| 15 | 342,97 | 0,458 | 0,551 ± 0,084 |
| | 515,64 | 0,688 | |
| | 399,31 | 0,533 | |
| | 392,42 | 0,524 | |
| 30 | 784,52 | 1,047 | 0,940 ± 0,106 |
| | 596,36 | 0,796 | |
| | 775,90 | 1,035 | |
| | 660,83 | 0,882 | |

### *5. 5. 2 Porovnání akumulace FITC-albuminu a $^{99m}$Tc-albuminu*

Graf 9 porovnává akumulaci $^{99m}$Tc-albuminu (viz část 5.3.3) a FITC-albuminu v potkaních buňkách po 30 min inkubace při 37°C. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích 1 mg/ml byla dosažena smísením 10 µl $^{99m}$Tc-albuminu či FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml a 1 ml suspenze buněk.



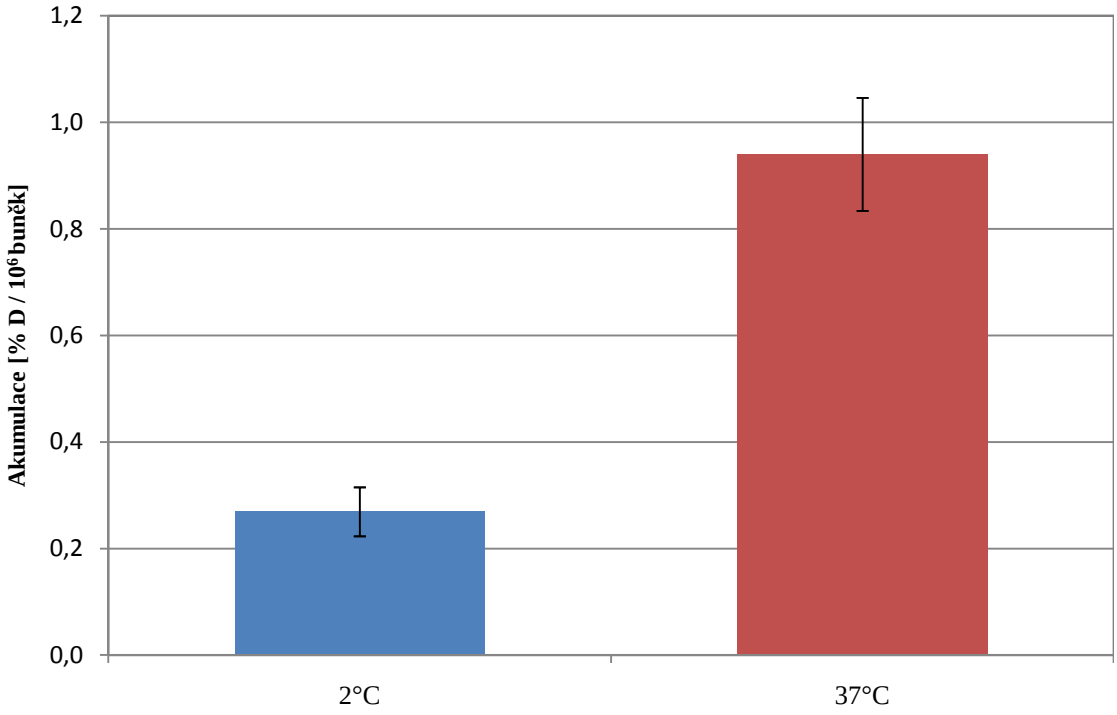

*Graf 9. Porovnání akumulace FITC-albuminu a $^{99m}$Tc-albuminu v potkaních buňkách při 37°C (inkubace 30 min)*

### *5. 5. 3 Akumulace FITC-albuminu v závislosti na teplotě*

Tab. 10 a graf 10 znázorňují akumulaci FITC-albuminu v potkaních buňkách po 30 min inkubace při teplotě 2°C a 37°C. Inkubační koncentrace albuminu ve vzorcích byla 1 mg/ml. K 1 ml suspenze izolovaných buněk bylo přidáno 10 µl FITC-albuminu o koncentraci 100 mg/ml. V relativním srovnání došlo při inkubační teplotě 2°C ke snížení uptake na 28,6% uptake zjištěného při 37°C.

*Tab. 10. Akumulace FITC-albuminu při 2°C a 37°C*

| **Inkubační teplota** | **Fluorescence** | **Akumulace (% D / $10^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|
| | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| 2°C | 158,83 | 0,212 | 0,269 ± 0,046 |
| | 232,31 | 0,310 | |
| | 176,64 | 0,236 | |
| | 237,97 | 0,318 | |
| 37°C | 784,52 | 1,047 | 0,940 ± 0,106 |
| | 596,36 | 0,796 | |
| | 775,90 | 1,035 | |
| | 660,83 | 0,882 | |



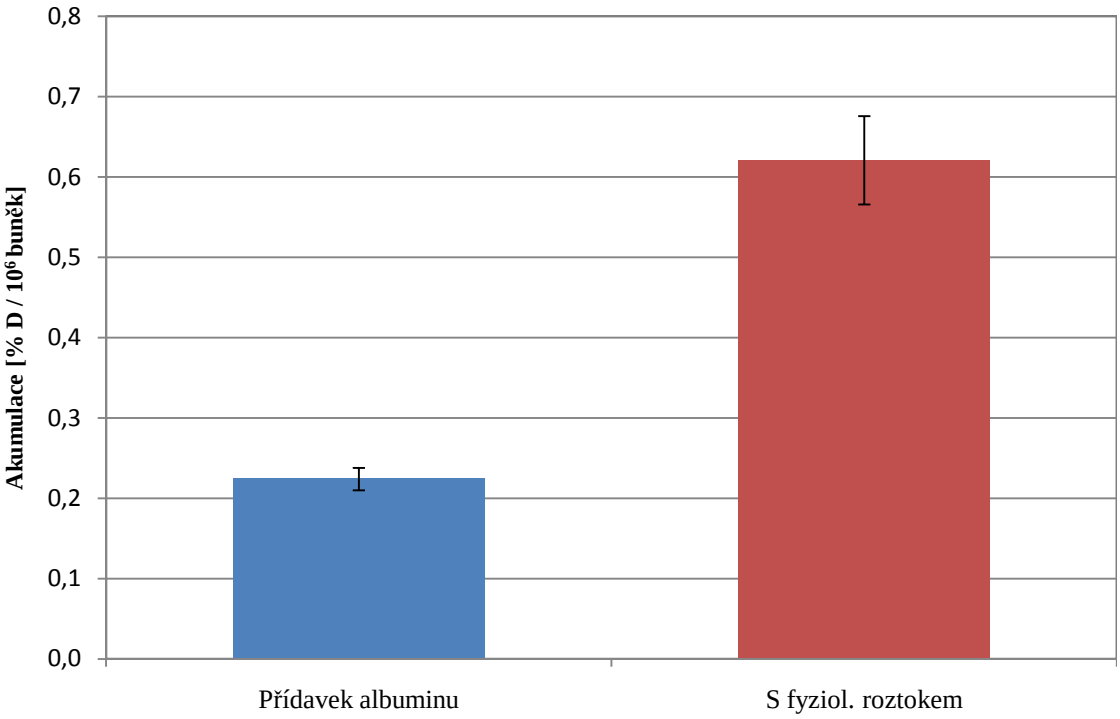

*Graf 10. Akumulace FITC-albuminu při 2°C a 37°C*

### *5. 5. 4 Ovlivnění akumulace FITC-albuminu přídavkem neznačeného albuminu*

Tab. 11 a graf 11 ukazují vliv přídavku albuminu na akumulaci FITC-albuminu v ledvinných buňkách potkana. U vzorků bylo k 1 ml suspenze izolovaných buněk o koncentraci $2.10^6$/ml přidáno 10 µl FITC-albuminu o koncentraci 5 mg/ml. K první sadě vzorků bylo navíc přidáno 200 µl neznačeného albuminu o koncentraci 250 mg/ml, k druhé čtveřici vzorků bylo přidáno 200 µl fyziologického roztoku. Inkubační koncentrace FITC-albuminu byla 42 µg/ml. Inkubační koncentrace neznačeného albuminu byla u první čtveřice vzorků 50 mg/ml. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37°C.

*Tab. 11. Vliv koncentrovanějšího albuminu na transport FITC-albuminu do buněk*

| **Přidaná látka** | **Fluorescence** | **Akumulace (% D / $10^6$ buněk)** | |
|---|---|---|---|
| | | **Hodnoty** | **Průměr ± SD** |
| Neznačený albumin | 121,39 | 0,241 | 0,224 ± 0,014 |
| | 104,84 | 0,208 | |
| | 112,50 | 0,224 | |
| Fyziologický roztok | 273,68 | 0,544 | 0,621 ± 0,055 |
| | 330,98 | 0,657 | |
| | 333,18 | 0,662 | |




*Graf 11. Inhibice akumulace FITC-albuminu neznačeným albuminem*

# 6. DISKUZE

Studiu tubulárního transportu látek v ledvinných buňkách, konkrétně např. proteinů a sérového albuminu je věnována stále větší pozornost, protože je v dnešní době na základě vědeckých studií již jisté, že zvýšená glomerulární filtrace spolu s nedostatečnou patologicky sníženou zpětnou tubulární resorpcí souvisí s kardiovaskulárními příhodami a selháním ledvin. Dokonce i na první pohled zcela nepodstatná mikroalbuminurie zvyšuje jak u populace s komorbiditami, tak ale i u zdravé populace riziko kardiovaskulárních onemocnění a poškození ledvin (Pollock a Poronnik, 2007). Otázkou však stále zůstává, do jaké míry se na těchto onemocněních podílí průnik glomeruly a do jaké míry snížená tubulární resorpce. Albumin je také vhodnou modelovou látkou, která může sloužit jako komparátor pro charakterizaci transportních mechanizmů jiných látek v tubulárních buňkách ledvin.

Metod značení sérového albuminu pro použití v biologických experimentech za účelem jeho citlivé detekce může být několik. Jednou z nich je značení vhodným radionuklidem jako je např. technecium-99m, které umožnuje rychlou detekci látky bez nutnosti náročných analytických postupů a měření velmi nízkých koncentrací albuminu v biologických vzorcích. Nevýhodou je radioaktivní materiál, ne vždy je dostupný generátor technecia či potřebné detekční zařízení pro vyhodnocení experimentů s $^{99m}$Tc-albuminem. Další často používanou možností je použití albuminu značeného pomocí vhodné fluorescenční sondy jako je např. fluorescein-isothiokyanát (Verhulst et al., 2004; Sidaway et al., 2004). Výhody fluorescenčního albuminu (FITC-albuminu) jsou, že je dodáván jako hotová surovina a je možné ho okamžitě připravit dle potřeby, nenese žádnou radioaktivní zátěž pro okolí a je v čase stabilnější než radioaktivně značené látky, což dává např. možnost opakovat experiment za stejných podmínek a bez nutnosti přípravy nového zásobního vzorku. Jako žádoucí se tedy jevilo použít fluorescenčně značený FITC-albumin a otestovat jeho chování v buněčných experimentech ve srovnání s $^{99m}$Tc-albuminem.

Pro adekvátní použití albuminu v experimentálních studiích bylo důležité ověřit správný postup značení albuminu $^{99m}$Tc. Při značení jsme vycházeli z optimalizovaného postupu vhodného pro naše podmínky (Suchan, 2009), který upravuje přípravu při nízkém pH a vysoké koncentraci albuminu popsanou v Eckelmanově studii (Eckelman et al., 1971) tak, aby bylo možné docílit optimálních výsledků značení v krátkém čase. Uvedenou metodou byl ve srovnání s neoptimalizovaným postupem připraven kvalitní preparát $^{99m}$Tc-albuminu, který bylo možné použít k akumulačním studiím s buněčnými

vzorky. Výsledek značení byl po přípravě ověřován stanovením radiochemické čistoty připraveného preparátu $^{99m}$Tc-albuminu. Z experimentů vyplynulo, že preparát, který nebyl po označení přečištěn gelovou permeační chromatografií, má dostatečnou radiochemickou čistotu a je možné ho použít v buněčných studiích bez rizika nepřesnosti výsledků vlivem nečistot. Tato skutečnost byla potvrzena kontrolami radiochemické čistoty nepřečišťovaných preparátů $^{99m}$Tc-albuminu (Suchan, 2009). Testy stability ovšem ukázaly, že během několika hodin při teplotě 37°C radiochemická čistota preparátu klesá a po 6 hod se pohybuje kolem 90%. Z hlediska stability je tedy třeba se značeným albuminem pracovat bezprostředně po přípravě. Potvrdilo se tak, že čistota námi připraveného preparátu je po přípravě naprosto vyhovující, avšak použití preparátu bez dalšího čištění je časově limitováno.

Pro in vitro studium transmembránového transportu látek v ledvinách mohou být použity různé experimentální modely. Vedle fragmentů membrán ledvinných kortikálních buněk či primárních ledvinných buněk jsou nejčastěji používány standardní buněčné linie odvozené od ledvinných buněk, především od epiteliálních buněk proximálních tubulů. Jedná se např. o ledvinné buňky vačice (OK buňky), ledvinné buňky prasete (LLC-PK1 buňky) nebo linie lidských ledvinných buněk (HK-2, HKC-8 či Caki-1 buňky). V naši práci byla použita jedna z těchto linií – LLC-PK1 buňky z ledvin prasete a na druhé straně primární, čerstvě izolované buňky z ledvin potkana. Na základě některých literárních údajů se jako jejich výhoda jeví skutečnost, že nativní ledvinné buňky se vyznačují vyšší mírou zachování přítomnosti a funkce membránových transportérů. Na rozdíl od dostupných standardních linií ledvinných buněk, v kterých je míra exprese membránových transportních proteinů zpravidla poněkud odchylná a nižší ve srovnání s nativními buňkami (Brown et al., 2008; Hilgendorf et al., 2007; Racusen et al., 1997), mohou být buňky přímo izolované z ledvin zvířete velmi blízkým in vitro modelem srovnatelným s podmínkami in vivo. Nevýhodou je v případě tohoto modelu omezená životnost buněk, které tak nejsou použitelné pro dlouhotrvající mnohahodinové experimentální studie. Vyšší je též náročnost jejich přípravy.

Přestože byly publikovány výsledky různých studií transportu albuminu do ledvinných buněk (Schwegler et al., 1991; Gekle et al., 1996; Sidaway et al., 2000; Zhai et al., 2000), nebyly dosud uveřejněny žádné srovnávací studie posuzující in vitro endocytární transport albuminu v tubulárních ledvinných buňkách různých živočišných

druhů a také možný vliv věku (tedy doby kultivace) buněk linií. Také proto byly provedeny v rámci této práce akumulační studie u mladých a starších ledvinných buněk prasete získaných různě dlouhou kultivací LLC-PK1 buněk. Výsledky ukázaly, že akumulace albuminu v mladých tubulárních buňkách prasete je oproti buňkám starším přibližně 2,5× nižší. Tento fakt svědčí o tom, že u mladých buněk nejsou pravděpodobně ještě zcela vyvinuty membránové receptorové transportní systémy, a proto je transportní kapacita těchto buněk nižší než buněk dospělých. Zajímavé je rovněž mezidruhové srovnání - experimenty ukázaly cca 3× větší vychytávání albuminu v buňkách potkaních než u buněk prasečích, což svědčí o vyšší výkonnosti transportních mechanizmů potkaních buněk. Z toho je patrné, že nativní izolované ledvinné buňky potkana mohou v tomto případě v některých parametrech převyšovat standardní ledvinnou buněčnou linii a jeví se z tohoto pohledu jako využitelný model pro posuzování transmembránového transportu proteinů v buňkách ledvin.

Albumin a jiné proteiny tubulární tekutiny jsou s vysokou efektivitou transportovány do tubulárních ledvinných buněk pomocí specifických endocytárních receptorů megalinu a cubilinu. Endocytární aparát tubulárního epitelu je vysoce vyvinut a disponuje vysokou transportní kapacitou (Christensen et al., 2009). Akumulační studie s $^{99m}$Tc-albuminem s použitím izolovaných potkaních ledvinných buněk in vitro měly za cíl objasnit závislost míry uptake na množství buněk, na inkubační koncentraci albuminu, teplotě a dalších faktorech. Výsledky experimentů ukázaly, že uptake albuminu buňkami je v rámci našich inkubačních podmínek přímo úměrný množství buněk v inkubační směsi a že narůstá s prodlužující se dobou inkubace. Při přepočtu na 1 milion buněk a inkubační koncentraci albuminu 1 mg/ml se uptake pohyboval něco málo nad 1% z přidané dávky. Výrazně vyšší akumulace byla u inkubační koncentrace albuminu 0,1 mg/ml, kdy se pohybovala nad 4 %.

Výsledky experimentů s FITC-albuminem byly přesvědčivé z hlediska porovnání akumulace FITC-albuminu s $^{99m}$Tc-albuminem. Míra vychytávání FITC-albuminu je v porovnání s $^{99m}$Tc-albuminem velmi podobná, což potvrzuje předpoklad, že vazba izothiokyanátových skupin či radioaktivního technecia-99m na molekulu albuminu by neměla pozměnit strukturu či náboj molekul albuminu v takové míře, aby tím byly ovlivněny vlastnosti látky a míra transportu do buněk. Příznivým faktorem je i to, že obě použité formy albuminu jsou deriváty hovězího sérového albuminu.

Při inkubační teplotě 2°C poklesl uptake $^{99m}$Tc-albuminu i FITC-albuminu ledvinnými buňkami potkana přibližně na 20 – 25% ve srovnání s inkubací při teplotě 37 °C, což potvrzuje skutečnost, že transportní mechanizmy pro transport albuminu do ledvinných buněk jsou z velké části aktivního charakteru. Vypadá to ale, že pasivní transport hraje v těchto procesech určitou roli, protože určitý influx albuminu do buněk při nízké inkubační teplotě inhibující energeticky závislé procesy byl zachován i při opakovaných experimentech a důkladném chlazení zkumavek při inkubaci. Byly tak potvrzeny nálezy, že ledvinné buňky přijímají albumin i nespecifickými mechanizmy, ale že míra těchto procesů je v porovnání s aktivním transportem výrazně nižší (Pollock a Poronnik, 2007).

V rámci provedených experimentů jsme se pokusili stanovit i typ transportu albuminu přes biologické membrány použitých ledvinných buněk. Vycházíme-li ze skutečnosti, že transport albuminu do ledvinných buněk je z velké míry zprostředkován specifickým transportem (Schwegler et al., 1991; Pollock a Poronnik, 2007; Christensen et al., 2009) měl by být po přidání řádově vyšších koncentrací albuminu k označenému albuminu kompetitivně snížen jeho transport do buněk. Během provedených experimentů se potvrdilo, že za takové situace byla akumulace FITC-albuminu značně inhibována. Za námi použitých inkubačních podmínek byl tímto způsobem snížen uptake FITC-albuminu do izolovaných ledvinných buněk potkana o cca 75%. Svědčí to o faktu, že jsou endocytární mechanizmy ledvinných buněk vytíženy transportem neznačeného albuminu a více FITC-albuminu zůstává v inkubačním médiu. Tento nález dále potvrzuje výraznou úlohu aktivního transportu při reabsorpci albuminu v ledvinných tubulech.

# 7. ZÁVĚR

1. Experimenty prokázaly, že optimalizovanou metodou značení sérového hovězího albuminu radioaktivním techneciem-99m při nízkém pH a vysoké koncentraci albuminu lze připravit velmi čistý preparát $^{99m}$Tc-albuminu s dostatečnou stabilitou, který je vhodný k použití u biologických experimentů. Stabilita preparátu ovšem významně klesá již během 6 hodin po přípravě a je proto třeba pracovat jen s čerstvě připravenými preparáty.

2. Pokusy provedené s FITC-albuminem podávají důkaz o obdobném průběhu a míře akumulace v potkaních buňkách jako při použití $^{99m}$Tc-albuminu. Uptake buňkami je při použití obou preparátů albuminu téměř stejný a pohybuje se okolo 1% vložené dávky na 1 milion buněk. Akumulace FITC-albuminu je stejně jako akumulace $^{99m}$Tc-albuminu úměrně závislá na čase a teplotě inkubace stejně tak, jako na množství buněk ve vzorku.

3. Akumulační studie s prasečími ledvinnými buňkami LLC-PK1 ukázaly, že míra akumulace albuminu v mladých buňkách (kultivace 1 den) je oproti buňkám starším (kultivace 4 dny) nižší. Z toho lze usuzovat, že aktivní endocytární transportní procesy jsou zřejmě u mladých buněk exprimovány v nižší míře.

4. V experimentech s potkaními nativními ledvinnými buňkami bylo zjištěno, že je u těchto buněk vychytávání albuminu zhruba 3× větší než u linie prasečích ledvinných buněk LLC-PK1 a tento rozdíl se ještě prohlubuje s rostoucí dobou inkubace. Tato skutečnost by mohla ukazovat na poněkud vyšší kapacitu transportních mechanismů pro albumin v nativních buňkách.

5. Při nízké inkubační teplotě 2°C klesl uptake ledvinnými buňkami přibližně na 20 – 25% normálního stavu. Přidání nadbytku neznačeného albuminu vedlo též k významné inhibici míry akumulace FITC-albuminu v ledvinných buňkách. Potvrzuje to, že vychytávání albuminu ledvinnými buňkami je z velké části zprostředkováno aktivním transportním mechanismem (či mechanismy), protože dochází k jeho inhibici při nízké inkubační teplotě a působením transportního kompetitoru. Pasivní transport albuminu však bude hrát také určitou roli, protože při inhibici energeticky závislého transportu je stále patrný transport do buněk.

# 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Birn H., Christensen E.: Renal albumin abrorption in physiology and pathology. Kidney International. 69:440-449 (2006)

Boldt J., Heesen M., Mueller M., Pabsdorf M., Hempelmann G.: The effects of albumin versus hydroxyethyl starch solution on cardiorespiratory and circulatory variables in critically ill patiens. Anesth Analg. 83:245-261 (1996)

Boldt J., Mueller M., Heesen M., Neumann K., Hempelmann G.[1]: Influence of different volume therapies and pentoxifylline infusion on circulating soluble adhesion molecules in critically ill patients. Crit Care Med. 24:385-391 (1996)

Brown C.D., Sayer R., Windass A.S., Haslam I.S., De Broe M.E., D'Haese P.C., Verhulst A.: Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. Toxicol Appl Pharmacol. 233:428-438 (2008)

Carter D.C., Ho J.X.: Structure of serum albumin. Adv Protein Chem. 45:153-203 (1994)

Comper W.D., Hilliard L.M., Nikolic-Paterson D.J., Russo L.M.: Disease-dependent mechanisms of albuminuria. Am J Physiol Renal Physiol. 295:F1589-F1600 (2008)

Das, U.N.: Albumin Infusion Therapy in Stroke, Sepsis and the Critically Ill. Current Nutrition & Food Science. 4:217-226 (2008)

De Feo P., Horber F.F., Haymond M.W.: Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. Am J Physiol. 263:E794-9 (1992)

Doweiko J.P., Nompleggi D.J.: Role of albumin in human physiology and pathophysiology. J Parent Enteral Nutr. 15:207-211 (1991)

Doweiko J.P., Nompleggi D.J.[1]: Use of albumin as a volume expander. J Parent Enteral Nutr. 15:484-487 (1991)

Eckelman W.C., Meinken G., Richards P.: 99mTc-Human serum albumin. J Nucl Med. 11:707-710 (1971)

Ganong W.F.: Dynamics of blood and lymf flow. In Ganong W.F.: Review of Medical Physiology, 17th edition, Connecticut: Appleton and Lange, 1995, p. 525-541, ISBN 0-07-144040-2

Gines A., Fernandez-Esparrach G., Monescillo A., Vila C., Domenech E., Abecasis R. et al.: Randomised trial comparing albumin, dextran 70, and polygelin in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. Gastroenterology. 111:1002-10 (1996)

Hilgendorf C., Ahlin G., Seithel A., Artursson P., Ungell A.L., Karlsson J.: Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. Drug Metab Dispos. 35:1333-1340 (2007)

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

Christensen E.I., Birn H.: Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3:258-268 (2002)

Christensen E.I., Verroust P.J., Nielsen R.: Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. Eur J Physiol. 458:1039-1048 (2009)

Jorgensen K.A., Stoffersen E.: Heparin like activity of albumin. Thromb Res. 16:569-574 (1979)

Kaufmann M.A., Castelli I., Pargger H., Drop L.J. Nitric oxide dose-responce study in the isolated perfused rat kidney after inhibition of endothelium-derived relaxing factor synthesis: the role of albumin. J Pharmacol Exp Ther. 273:855-862 (1995)

Kohler J.P., Rice C.L., Zarins C.K., Cammack B.F., Moss G.S.: Does reduced colloid oncotic pressure increase pulmonary dysfunction in sepsis? Crit Care Med. 9:90-93 (1981)

Koch-Weser J., Sellers E.M.: Binding of drugs to serum albumin. N Engl J Med. 294:311-316 (1976)

Lafaye P., Lapresle C.: Fixation of penicilloyl groups to albumin and appearance of anti-penicilloyl antibodies in penicillin-treated patients. J Clin Invest. 82:7-12 (1988)

Manelli J.C.: Is albumin administration useful in critical care for burnt patients? Ann Fr Anesth Reanim. 15:507-513 (1996)

Miller L.L., Bly C.G., Watson M.L., Bale W.F.: The domint role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-CE-$C^{14}$. J Exp Med. 94:431-453 (1951)

Moshage H.J., Janssen J., Franssen J.H., Hafkenscheid J.C.M., Yap S.H.: Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. J Clin Invest. 79:1635-41 (1987)

Nicholson J.P., Wolmarans M.R., Park G.R.: The role of albumin in critical illness. Br J Anaesth. 85:599-610 (2000)

Oratz M., Rothschild M.A., Schreiber S.S., Burks A., Mongelli J., Matarese B.: The role of the urea cycle and polyamines in albumin synthesis. Hepatology. 3:567-571 (1983)

Peters T.J.: Ligand binding by albumin. In Peters T.J.: All about albumin. Biochemistry, Genetics And Medical Application, 1st edition, San Diego: Academic Press, 1996, p. 76-132, ISBN 0-12-552110-3

Peters T.J.[1]: Metabolism: albumin in the body. In Peters T.J.: All about albumin. Biochemistry, Genetics And Medical Application, 1st edition, San Diego: Academic Press, 1996, p. 188-250, ISBN 0-12-552110-3

Peters T.J.[2]: The albumin molecule: its structure and chemical properties. In Peters T.J.: All about albumin. Biochemistry, Genetics And Medical Application, 1st edition, San Diego: Academic Press, 1996, p. 9-75, ISBN 0-12-552110-3

Pollock C.A., Poronnik P.: Albumin transport and processing by the proximal tubule: physiology and pathophysiology. Curr Opin Nephrol Hypertens. 16:359-364 (2007)

Racusen L.C., Monteil C., Sgrignoli A., Lucskay M., Marouillat S., Rhim J.G., Morin J.P.: Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. J Lab Clin Med. 129:318-329 (1997)

Schnitzer J.E., Bravo J.: High affinity binding, endocytosis and degradation of comformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavanger receptors. J Biol Chem. 268:7562-70 (1993)

Schwegler J.S., Heppelmann B., Mildenberger S., Silbernagl S.: Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. Pflugers Arch. 418(4):383-392 (1991)

Sidaway J.E., Davidson R.G., McTaggart F., Orton T.C., Scott R.C., Smith G.J., Brunskill N.J.: Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in opossum kidney cells. J Am Soc Nephrol. 15(9):2258-2265 (2004)

Stockwell M.A., Scott A., Day A., Riley B., Soni N.: Colloid solutions in the critically ill. A randomised comparison of albumin and polygelin 2. Serum albumin concentration and the incidences of pulmonary oedema and acute renal failure. Anaesthesia. 47:7-9 (1992)

Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N.: The characterisation of two specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol. 11:824-832 (1975)

Suchan M.: Příprava radioaktivně značeného albuminu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009, s. 45-47

Tonessen A.S., Gabel J.C., McLeavey C.A.: Relation between lowered colloid osmotic pressure, respiratory failure, and death. Crit Care Med. 5:239-240 (1977)

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

Verhulst A., D'Haese P.C., De Broe M.E.: Inhibitors of HMG-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in human kidney proximal tubular cells. J Am Soc Nephrol. 15(9):2249-2257 (2004)

Yedgar S., Carew T.E., Pittman R.C., Beltz W.F., Steinberg D.: Tissue sites of catabolism of albumin in rabbits. Am J Physiol. 244:E101-107 (1983)

Zhai X.Y., Nielsen R., Birn H., Drumm K., Mildenberger S., Freudinger R., Moestrup S.K., Verroust P.J., Christensen E.I., Gekle M.: Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. Kidney Int. 58(4):1523-1533 (2000)

Zoellner H., Hofler M., Beckmann R., Hufnagl P., Vanyek E., Bielek E. et al.: Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. J Cell Sci. 109:2571-80 (1996)