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.