

4. SUMMARY

Buněčná řada R3/1 odvozená z krysích embryí, vykazuje několik fenotypových znaků vlastních buňkám alveolárního epitelu I. řádu. Cílem této práce bylo dále popsat vlastnosti R3/1 buněčné linie vzhledem k jejímu případnému využití jako *in vitro* drug disposition model, tj. model popisující veškeré procesy zahrnující absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci léčiva do organismu. R3/1 buňky byly kultivovány na Transwell filtrech a transepitheliální elektrický odpor (TEER) byl měřen jako parametr integrity buněčných vrstev. Přítomnost proteinů důležitých pro vytvoření funkčních buněčných spojení (tight junction, TJ) - E-cadherinu, occludinu a proteinů ZO-1 a ZO-2 byla analyzována na úrovni mRNA pomocí polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR) a na úrovni antigenu pomocí imunofluorescenční mikroskopie (IFM). Dále byla sledována přítomnost katabolických peptidáz, konkrétně karboxypeptidázy M, aminopeptidáz A, B, N a P, γ -glutamyltransferázy, dipeptidylpeptidázy IV, angiotensin konvertujícího enzymu a endopeptidáz 24.11 a 24.15. Zároveň s R3/1 buňkami byly tyto peptidázy stanoveny v primárních kulturách alveolárního epitelu potkanů a výsledky byly porovnány.

Hodnoty TEER dosáhly maximální hodnoty $\sim 99 \pm 17 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pátého dne kultivace, obohacení živného media o dexametazon (v koncentraci $0.1 \mu\text{M}$) společně s dvojnásobným množstvím séra v médiu (zvýšení z 10 na 20 %) mělo za výsledek vzestup TEER o 65 %. I přesto se TEER R3/1 buněk nepřiblížil k hodnotám, které vykazovaly primární kultury krysích pneumocytů.

Výsledky RT-PCR odhalily absenci transkriptů kódujících E-cadherin and occludin, oproti tomu byly nalezeny mRNA transkripty pro ZO-1 a -2. IFM používající monoklonální protilátku proti occludinu potvrdila nepřítomnost antigenu v R3/1 buňkách. Ze spektra proteolytických enzymů analyzovaných metodou RT-PCR byla zjištěna přítomnost mRNA transkriptů pro aminopeptidázy A a B a rovněž pro endopeptidázy 24.11 a 24.15. Při porovnání peptidáz přítomných v R3/1 buněčné řadě s peptidázami nalezenými v krysích pneumocytech I. a II. řádu je patrná podobnost R3/1 buněk s epitelem I. řádu.

Ačkoli R3/1 buněčná řada disponuje několika charakteristickými znaky typickými pro alveolární epiteliální buňky I. řádu, jako je T1 α , ICAM-1, connexin-43, caveoliny-1 a -2, není schopná vytvářet dostatečně pevná TJ a tudíž nemůže být vhodným *in vitro* modelem pro studování absorpce léčiv. Tato buněčná linie může najít uplatnění jako model pro stabilitní studie inhalovaných léčiv – peptidů.