

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2023**

**Adéla Kuchařová**

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Buněčné linie jako nástroj pro studium poškození ledvin**  
**Bakalářská práce**

**2023**

**Adéla Kuchařová**

**University of Pardubice**  
**Faculty of Chemical Technology**

**Cell lines as a tool for studying kidney damage**  
**Bachelor thesis**

**2023**

**Adéla Kuchařová**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla Kuchařová**  
Osobní číslo: **C19250**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Buněčné linie jako nástroj pro studium poškození ledvin**  
Téma práce anglicky: **Cell Lines As A Tool For Studying Kidney Damage**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma buněčné linie jako nástroj pro studium poškození ledvin. V úvodní části bakalářské práce se věnujte popisu struktury, významu a funkce ledvin.
2. V hlavní části bakalářské práce charakterizujte, které buňky jsou v rámci ledvin nejvíce vystaveny působení nefrotoxických látek. Pokuste se zároveň charakterizovat k jakému poškození dochází nejčastěji. Dále se zaměřte na popis vybraných buněčných linií, které jsou používány k detekci nefrotoxicity, jako jsou např. buňky HK-2, LLC-PK1, HEK293 atd. U jednotlivých buněčných linií popište jejich původ, podmínky kultivace a jejich základní charakteristiky. Zároveň zhodnoťte, které buněčné linie jsou v rámci *in vitro* studií nefrotoxického působení nejpoužívanější a uveďte konkrétní příklady.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Buněčné linie jako nástroj pro studium poškození ledvin jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.6.2023

Adéla Kuchařová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Pavlíně Nývtové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a věnovaný čas při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována popisu buněčných kultur používaných k testování nefrotoxicity *in vitro*. V první části této práce je shrnuta základní fyziologie a patologie ledvin, navazuje popis nefrotoxických látek a léků způsobujících patologické stavy. V hlavní části jsou popsány jednotlivé buněčné linie používané na testování nefrotoxicity *in vitro* a jejich různorodé praktické využití ve vybraných studiích. V závěru této práce jsou rozebrány 3D buněčné kultury a jejich využití.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

buněčné kultury, nefrotoxicita, *in vitro*, patologie ledvin

## **TITLE**

Cell lines as a tool for studying kidney damage

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis is devoted to the description of cell cultures used to test nephrotoxicity *in vitro*. The first part of this work summarizes the basic physiology and pathology of the kidneys, following with the description of nephrotoxic substances and drugs causing pathological conditions. The main part describes the individual cell lines used for *in vitro* nephrotoxicity testing and their various practical uses with the help of selected studies. At the end of this work, 3D cell cultures and their use are discussed.

## **KEYWORDS**

Cell cultures, Nephrotoxicity, Kidney pathology



# OBSAH

Úvod.....	12
1 Ledviny .....	13
1.1 Stavba ledvin.....	13
1.2 Patologie Ledvin .....	14
1.2.1 Akutní poškození ledvin.....	15
1.2.2 Chronické poškození ledvin .....	17
1.2.3 Nefrotický syndrom.....	18
1.3 Nefrotoxické látky.....	18
1.4 Markery poškození ledvin.....	20
2 Buněčné kultury .....	21
3 Buněčné linie používané k testování nefrotoxicity .....	22
3.1 Buněčná linie HK-2.....	23
3.1.1 Studie 1: Evaluace biomarkerů nefrotoxicity na HK-2 buňkách.....	25
3.1.2 Studie 2: <i>In vitro</i> test k predikci toxicity APAP pro játra a ledviny.....	26
3.2 Buněčná linie HEK 293 .....	28
3.2.1 Studie 1: Ochranný účinek ginsenosidu Rk1 na CisPt indukovanou nefrotoxicitu .....	30
3.3 Buněčná linie LLC-PK1.....	32
3.3.1 Studie 1: Gentamicinem indukovaná apoptóza renálních buněk LLC-PK1 ....	34
3.3.2 Studie 2: Proliferativní reakce pozorované po léčbě vankomycinem na LLC-PK1 .....	36
3.4 Buněčná linie OK.....	37
3.4.1 Studie: Potencionální aktivace signálních drah C-peptidem v buňkách OK.....	38
4 Buněčné kultury 3D .....	40
4.1 Sféroidy.....	41

4.2 Organoidy.....	42
4.2.1 Studie: Schopnost 3D kultur reagovat na expozice acetonu a CisPt.....	43
Závěr .....	45
Použitá literatura .....	46

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Anatomie ledviny .....	13
Obrázek 2: HK-2 buněčná linie .....	24
Obrázek 3: Imunofluorescenční detekce izoformy FL-MMP-2 v buňkách HK-2.....	25
Obrázek 4: Změny exprese KIM-1, Kalbindinu a TIMP-1 v závislosti na cisplatině .....	26
Obrázek 5: Změna přechodu mitochondriální permeability .....	28
Obrázek 6: Buněčná linie HEK 293 .....	29
Obrázek 7: Fluorescenční snímky buněčné linie HEK 293 .....	29
Obrázek 8: Morfologie buněk po expozici s CisPt a Rk1 .....	31
Obrázek 9: Buňky HEK 293 pod fluorescenčním mikroskopem ošetřené CisPt a Rk1 .	31
Obrázek 10: Graf výsledků studie buněk HEK 293 ošetřených CisPt a Rk1 .....	32
Obrázek 11: Buněčná linie LLC-PK1 .....	33
Obrázek 12: Monovrstvy buněk LLC-PK1 divokého typu .....	34
Obrázek 13: Průtoková cytometrická analýza účinků GM.....	35
Obrázek 14: Grafy vlivu VAN na počet buněk a bílkovin .....	36
Obrázek 15: Diferenciovaná monovrstva buněk OK.....	37
Obrázek 16: Graf fosforylované a celkové ERK u buněk OK .....	39
Obrázek 17: Graf inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu v závislosti na koncentraci C-peptidu.....	39
Obrázek 18: Schémata technických metod kultivace sféroidů .....	42

## SEZNAM ZKRATEK

293 SFM II	Médium pro buňky HEK 293 bez séra a s nízkým obsahem proteinů
2D	Dvojměrný
3D	Trojměrný
Ad5	Lidský adenovirus 5
AKI	Akutní poškození ledvin
APAP	Acetaminofen
Bel-7402	Buňky lidského hepatomu
BUN	Dusík močoviny v krvi
CisPt	Cisplatina
CKI	Chronické poškození ledvin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
ERK	Extracelulárním signálem regulovaná kináza
FL-MMP-2	<i>Full-length isoform of matrix metalloproteinase-2</i>
FSC	Přední rozptyl světla
GM	Gentamicin
HEK293	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk
HK-2	Lidská ledvinová buněčná linie HPV 16 rekombinativní papilomavir
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
LLC-PK1	Buněčná linie tubulárních epitelálních buněk prasete <i>Hampshire</i>
MPT	Permeabilita buněčných membrán
MTT	Kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
OK	Buňky proximálního tubulu ledviny Vačice Severoamerické
RAS	Systém renin-angiotenzin
Rk1	Ginsenosid Rk1
SSC	Boční rozptyl světla
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
VAN	Vankomycin
WNT	<i>Wingless / Int-1</i>

## ÚVOD

Ledviny jsou párovým orgánem, který udržuje vnitřní homeostázu organismu a vylučuje nadbytečné toxické látky z organismu prostřednictvím moči. Krev je vedena do glomerulů. Glomerulus se skládá z klubka krevních vlásečnic obklopených Bowmanovým pouzdrém. Glomerulus filtruje krevní plazmu a vytváří primární moč, která je dále resorbována v distálních a proximálních tubulech. Resorbována je moč především o sodné ionty, draselné ionty, močovinu, vodu a další látky. Ve sběrném kanálku vzniká moč definitivní, která je dále transportována do ledvinné pánvičky a močovody do močového měchýře, odkud je později vyloučena z organismu.

Nefrotoxicita je závažným problémem. Mezi nejčastější typy se řadí léková nefrotoxicita, která může být způsobena léčivými látkami jako jsou například nesteroidní antiflogistika, chemoterapeutika, antineoplastika, imunosupresiva a další. Léčiva mohou přímo poškozovat strukturu ledvin (glomerulus, cévy, epitel) nebo mohou pouze podporovat rozvoj onemocnění. Mezi další nefrotoxické látky patří například radiokontrastní látky, kovy, návykové látky, aj. Nefrotoxicita jednotlivých léčiv a kontrastních látek se může testovat na buněčných liniích.

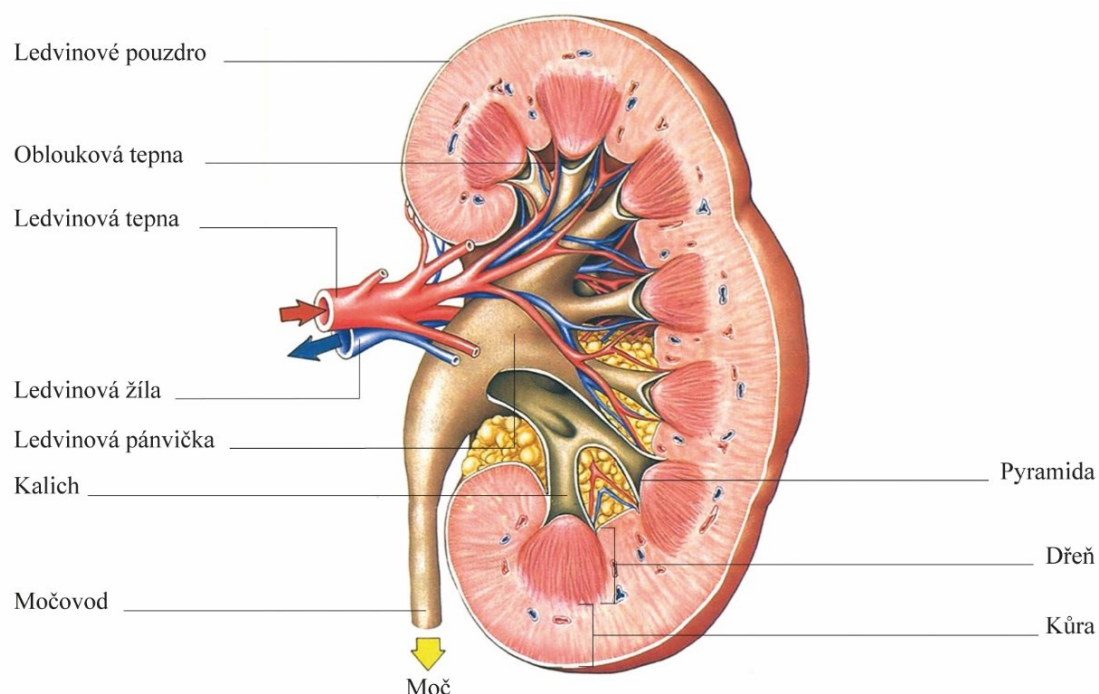
Buněčné linie mají v dnešní době mnoho využití. Využívají se při testování nových léčebných přípravků, ale také na testování látek potenciálně toxických pro lidský organismus. Buněčné linie *in vitro*, jsou linie pěstované v laboratorních podmínkách. Buňky jsou živeny a je s nimi zacházeno tak, aby co nejlépe odpovídaly fyziologickému stavu. Tato práce se věnuje přehledu savčích buněčných kultur, které se používají k testování nefrotoxicity *in vitro*. Mezi tyto buněčné linie patří například lidská ledvinová buněčná linie HK-2, buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk HEK293 a buněčná linie tubulárních epiteliálních buněk prasete *Hampshire LLC-PK1*.

# 1 Ledviny

Ledviny jsou párovým orgánem vylučovací soustavy. Ledviny jsou umístěny v retroperitoneu neboli v zadní stěně břišní, kde jsou mechanicky i termostaticky dobře chráněny před vnějšími vlivy. Ochranu zajišťuje jak zádové svalstvo, tak tukový polštář. Další ochranu ledvin zajišťuje jejich pevné pouzdro, které zabraňuje větším objemovým změnám tohoto orgánu a pomáhá tím udržení stabilního intersticiálního tlaku. Pouze při fyziologickém stavu jsou ledviny schopny udržovat homeostázu v organismu, a to pomocí filtrace a vylučování nepotřebných, nadbytečných nebo škodlivých látek (Radi ZA., 2019).

## 1.1 Stavba ledvin

Základní funkční jednotkou ledvin je nefron (obr. 1), který se skládá ze souvislé trubice vysoce specializovaných heterogenních buněk. Na jednu ledvinu připadá přibližně milion nefronů. Do slepého konce nefronu je vchlípeno klubíčko kapilár, nazývané jako glomerulus. Glomerulus je částí Malpighiho tělíska, též nazývaného ledvinové tělísko. Toto tělísko je složeno z celkem čtyř částí: vaskulární, renální – Bowmanovo pouzdro, mesangium a juxtaglomerulární aparát. V glomerulu dochází k filtraci krve přiváděné do ledviny právě klubíčkem kapilár, přednostně dochází k filtraci krve o nízkém hematokritu, hovoříme o tzv. *skimming* efektu. *Skimming* efekt oddělí erytrocyty od plazmy a plazma se filtruje kapilárami (Eaton DC. et al., 2009).



**Obrázek 1:** Anatomie ledviny.

Vzniká glomerulární filtrát se stejnými vlastnostmi jako plazma, pouze s rozdílem v absenci bílkovin a sníženém onkotickém tlaku filtrátu. Z glomerulu pokračuje filtrát na tubulární procesy dvojího typu, reabsorpci nebo tubulární sekreci. Tubulární procesy probíhají za určitých osmotických podmínek (*Radi ZA., 2019*).

Renální proximální tubul se nejvíce podílí v sekreci endogenních metabolitů a xenobiotik. Sekrece je dvoustupňovým procesem, který se skládá z příjmu látek přes bazolaterální membránu do buňky a z výstupu látek přes apikální membránu. Tohoto procesu lze dosáhnout pouze pomocí transportních proteinů, které jsou distribuovány k bazolaterální nebo apikální membráně (*Jenkinson SE. et al., 2012*).

Jelikož ledviny filtrují krev a vylučují nepotřebné látky, jsou běžně vystaveny vysokým koncentracím léků a jejich metabolitů. Proximální renální tubul představuje velkou oblast pro vazbu nefrotoxinu a transport do renálního epitelu. Reabsorpce glomerulárního filtrátu progresivně zvyšuje intraluminální koncentrace nefrotoxinu, zatímco specifické transportní cesty v ledvinách mohou vyvolat místně specifickou toxicitu (*Tiong HY. et al., 2014*).

## 1.2 Patologie ledvin

Důležitým pro odhalení poškození ledvin byl koncept buněčného poškození. Pohled na buňku jako základní jednotku struktury a funkce v lidském těle poprvé popsal Robert Remak v roce 1855. Na základě svých pozorování určil, že buněčné dělení vede k obnově buněk. Tento pohled na buňku v roce 1858 aplikoval Robert Virchow na svůj koncept buněčné patologie, ačkoli Remakov názor neuznával. Koncept buněčné patologie byl platný nejen pro ledviny, ale i pro jakýkoliv jiný orgán (*Remak R., 1855; Weening JJ. et al., 2012*). Trvalo více než sto let, než vědci odhalili charakteristiky různě diferencovaných buněk nefronu a jejich role v renální patologii. Renální patologie mezi roky 1950-1970 díky souběžnému vývoji technik pro získání tkáně a analýzy, náhle poskytla strukturální základ pro diagnostiku mnoha různých ledvinových onemocnění. Pro příklad se sem řadila onemocnění zánětlivá a nezánětlivá, akutní a chronická, proteinurická a hematurická, hypertenzní a hypotenzní a všechna další ledvinová onemocnění, která doposud nebylo možné řádně klasifikovat. V letech 1970 až 2010 byla stanovena etiologie, patogeneze, klinicko-patologická korelace a klasifikace pro renální onemocnění tak různorodá, jako je lupusová nefritida, postinfekční glomerulonefritida, hereditární onemocnění ledvin, poškození ledvin u pacienta po transplantaci ledviny a mnoho dalších (*Weening JJ. et al., 2012*).

Dnešní renální patologové nadále staví na pevných základech, které položili průkopníci renální patologie, aby rozšířili naše znalosti o patologii a patogenezí onemocnění ledvin a využili je ke zlepšení léčby pacientů (*Weening JJ. et al., 2012*).

Mezi patologií obecně patří všechny typy poškození ledvin od lehkých až po závažné, ať už se jedná o vývojové vady, poškození způsobené léčivem, nemocí nebo látkou toxickou. Základními formami renálního poškození jsou akutní poškození ledvin, chronické poškození ledvin a nefrotický syndrom (*Tiong HY. et al., 2014*).

### 1.2.1 Akutní poškození ledvin

Akutní poškození ledvin (AKI) je charakterizováno rychlým (hodiny až dny) reverzibilním snížením schopnosti ledvin vylučovat z organismu nepotřebné, nadbytečné nebo škodlivé látky. Projevuje se zejména vzestupem hladiny kreatininu v séru a často i snížením produkce moči. AKI není jediné onemocnění, ale spíše syndrom zahrnující více klinických stavů. Rozvoj onemocnění je důsledkem komplexních interakcí mezi skutečným poškozením a následnou aktivací zánětu a koagulace. Mezi expozice způsobující AKI u citlivých jedinců patří sepsa, ischemie, srdeční selhání, onemocnění jater, velké chirurgické zákroky (zejména cévní a srdeční), myonekróza, obstrukce močových cest, *diabetes mellitus* a různé nefrotoxiny. Ačkoli některé projevy AKI jsou přímo spojeny s poruchou glomerulární/tubulární funkce a jsou snadno rozpoznatelné u lůžka ve formě hyperkalemie, plicního edému, perikarditidy nebo encefalopatie, jiné účinky jsou méně zřejmé nebo se nemusí projevit dříve, než pacient onemocní. Zajímavým faktem zůstává, že ke ztrátě funkce ledvin může dojít i bez histologických známek tubulárního poškození nebo dokonce nekrózy (*Singbartl K. et al., 2012*).

Několik klinických studií poskytlo důkazy o souvislosti mezi AKI, chronickým poškozením ledvin a následnou progresí do konečného stádia renálního onemocnění (*Wald R. et al., 2009; Thakar CV. et al., 2010*). Za normálních okolností probíhá regenerace tubulárního epitelu po AKI kaskádovitě, včetně počáteční dediferenciace, migrace, proliferace přežívajících buněk, rediferenciace a posledního kroku, čímž je úplná obnova tubulárního epitelu. Nekompletní oprava po AKI je naopak charakterizována přetrvávající tubulo-intersticiální fibrózou a zánětem, a to i bez předchozího onemocnění ledvin. Přetrvávající tubulární intersticiální fibróza je patologickým korelátem ztráty funkce ledvin. Závažnost AKI významně určuje míru zotavení a může vést k problémům, které mohou přesáhnout až k progresi na chronické onemocnění ledvin a zhoršení vrozené imunity (*Gueler F. et al., 2004; Singbartl K. et al., 2012*).



Akutní poškození ledvin mohou vyvolat i různé léky, které způsobují toxické účinky jedním nebo několika mechanismy, včetně změny systémové nebo lokální hemodynamiky, přímých toxických účinků na renální buňky, vzniku zánětu nebo nefropatie. Léky mohou způsobit akutní selhání ledvin celkem tří typů: prerenální, vnitřní renální a obstrukční (Rahman M. et al., 2012).

Prerenální selhání se vyznačuje poruchou prokrvení ledvin, která vede k poklesu glomerulární filtrace. Snížení objemu nebo tlaku krve dodávané do ledvin zapříčiňují nejen léky, ale také nemoci a poškození kardiovaskulárního systému. Nejvíce riziková jsou pacienti s již sníženým průtokem krve ledvinami, tedy pacienti trpící např. nefrotickým syndromem, městnavým srdečním selháním nebo pacienti se sníženým efektivním oběhovým objemem jako u cirhózy. Další možné příčiny prerenálního selhání jsou uvedeny v následující tabulce 1 (Rahman M. et al., 2012).

**Tabulka 1:** Příčiny prerenálního akutního poškození ledvin. Upraveno dle Mercado MG. et al., 2019.

<b>Příčiny prerenálního poškození</b>	<b>Příklady vzniku příčin prerenálního poškození</b>
Deplece intravaskulárního oběhu	Větší ztráta krve, dehydratace
Snížený srdeční výdej	Kardiogenní šok, perikarditida, plicní embolie
Systémová vazokonstrikce	Anestézie, vysoké dávky dopaminu
Systémová vazodilatace	Anafylaktický šok, sepse, hypotenziva
Hyperviskózní syndrom	Myelom, makroglobulinemie

Inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu, blokátory receptorů pro angiotenzin a nesteroidní protizánětlivé léky jsou nejčastějšími léky, které snižují perfuzi ledvin. Ledviny aktivují mechanismy pro kompenzaci snížené renální perfuze ve snaze udržet glomerulární filtraci. Avšak pacienti s poruchou těchto mechanismů, jako jsou pacienti s chronickým onemocněním ledvin, mají zvýšené riziko AKI (Mercado MG. et al., 2019).

Vnitřní renální selhání se na rozdíl od prerenálního selhání týká především poškození parenchymu ledvin, tj. glomerulů, tubulů a intersticia. Vnitřní renální selhání vyžaduje včasnou identifikaci a řešení. Nejčastější vnitřní poškození ledvin je akutní tubulární nekróza. Akutní tubulární nekróza je poškození tubulárních buněk ledvin z ischemických nebo nefrotoxických příčin. Ischemické příčiny zahrnují prodloužené období těžké hypotenze, hypovolémie nebo hypoperfuzi ledvin (např. krvácení, šok, sepse, cirhóza, peritonitida nebo infarkty), které se nezlepšují rehydratací. Nefrotoxické příčiny zahrnují endogenní a exogenní toxiny. Další častou příčinou AKI je akutní intersticiální nefritida

a je nejčastěji způsobena hypersenzitivní reakcí na léky, obvykle antibiotika nebo nesteroidní protizánětlivé léky. Akutní intersticiální nefritida související s inhibitory protonové pumpy je stále častější, zejména u starších lidí (*Mercado MG. et al., 2019*).

Posledním možným typem je obstrukční nebo také postrenální poškození a je způsobeno nedostatečným odtokem moči z ledvin. V tomto případě léky mohou způsobit vznik ledvinových kamenů nebo retroperitoneální fibrózu, díky kterým vzniká již zmíněná extrarenální obstrukce (*Rahman M. et al., 2012*).

### 1.2.2 Chronické poškození ledvin

Podle definice je diagnóza chronické poškození ledvin (CKI) stanovena pouze v případě, kdy poškození ledvin trvá déle než 3 měsíce a je potvrzené biopsií ledvin nebo detekcí markerů poškození ledvin. Mezi používané markery patří  $\beta$ 2-mikroglobulin, kalbindin, cystatin C, aj. Glomerulární filtrace u CKI může, ale nemusí být striktně snížena. Kvantitativně nejvýznamnějšími příčinami chronického poškození ledvin jsou diabetická nefropatie a následné poškození arteriální hypertenzí (*Vallianou NG. et al., 2019*).

V případě, že dojde ke stanovení CKI, měli by lékaři určit stádium, do kterého pacient patří. U CKI je definováno celkem 5 stádií, a to podle hodnocení glomerulární filtrace. První dvě stádia mohou mít normální glomerulární filtraci nebo jen mírně sníženou, ale často jsou doprovázeny pozitivními markery poškození ledvin – obvykle abnormálním poměrem albuminu ke kreatininu v moči (*Vallianou NG. et al., 2019*). Onemocnění je často detekováno až v pozdějších stádiích, protože je u prvních dvou stádií asymptomatické povahy. Od 3. stádia je již poměrně patrné snížení glomerulární filtrace a ledvinová nedostatečnost. Pokud úbytek funkce ledvin přesáhne 80 % původní kapacity, hovoříme již o pátém a posledním stádiu CKI. Tím je úplné selhání a ztráta funkce ledvin, nazývané také jako chronické selhání ledvin. Bylo potvrzeno, že pacienti s pokročilým onemocněním ledvin, stádiem 4 nebo 5, jsou vystaveni vysokému riziku morbidit a mortality na kardiovaskulární onemocnění (*Perk J. et al., 2012*). Ve všech případech, i pokud je specifická léčba opožděna, je nutná terapie k oddálení progresu. Chronické poškození ledvin má tendenci progradovat, tzn. zhoršovat se i při absenci primárního mechanismu poškození, a to do pokročilého nebo konečného stádia onemocnění nebo dokonce i smrti. Progresi lze oddálit různými opatřeními. Mezi nejdůležitější opatření spadá terapie krevního tlaku, snížení proteinurie, omezení expozice nefrotoxinům, zabránění dalšímu snížení glomerulární filtrace a přípravu na renální substituční terapii (*Girndt M., 2017*). Stojí za zmínku fakt, že pacienti s CKI častěji zemřou

na kardiovaskulární příhody místo toho, aby se u nich rozvinulo selhání ledvin a skončili na renální substituční terapii (*Vallianou NG. et al., 2019*).

### 1.2.3 Nefrotický syndrom

Ledviny využívají komplexní filtrační systém známý jako glomerulární filtrační bariéra. Ta se skládá z fenestrovaných endotelií, glomerulární bazální membrány a glomerulární epitelové vrstvy tvořené podocyty. Nefrotický syndrom je závažná porucha glomerulární bazální membrány (*Wang CS. et al., 2019*).

Nefrotický syndrom je charakterizován čtyřmi hlavními znaky, které se používají při stanovení diagnózy: proteinurie, hypoalbuminémie, edém a hyperlipidémie. U nefrotického syndromu dochází k porušení podocytů, které vedou k selektivní proteinurii. Proteinurie je způsobena důsledkem zvýšené permeability glomerulární filtrační bariéry, jejíž výsledkem je zvýšená propustnost pro bílkovinné makromolekuly (*Wang CS. et al., 2019*).

Možné komplikace při nefrotickém syndromu mohou být žilní trombóza způsobená ztrátou koagulačních faktorů močí, infekce způsobená ztrátou imunoglobulinů taktéž močí a akutní selhání ledvin. Již zmíněná infekce je možnou komplikací nefrotického syndromu, avšak objevuje se především u dětí a u osob, které mají recidivu nefrotického syndromu nebo vyžadují dlouhodobou léčbu kortikosteroidy. Akutní selhání je bráno spíše jako vzácná spontánní komplikace nefrotického syndromu. Nejvyššímu riziku selhání jsou vystaveni v tomto případě starší lidé, děti a lidé s výraznou hypotenzí, renální žilní trombózou, sepsí a nadměrnou diurézou. Nefrotický syndrom může být mimo jiné zhoršen použitím diuretik, které jsou podávány ke kontrole edému (*Wang CS. et al., 2019; Kodner C., 2009*).

## 1.3 Nefrotoxické látky

Nefrotoxické látky mají toxické účinky na ledviny jedním nebo více mechanismy, jak již bylo zmíněno (*Tiong HY. et al., 2014*). Mezi nejčastěji zmiňované nefrotoxické látky se řadí cisplatina, cyklosporin, acetaminofen, gentamicin a vankomycin.

Cisplatina (CisPt) je sloučenina platiny používaná jako cytostatikum na léčbu nádorových onemocnění s hlavním vedlejším účinkem způsobujícím nefrotoxicitu. A to z důvodu, že ledviny akumulují CisPt ve vyšší míře než ostatní orgány, jelikož jsou hlavní cestou jejího vyloučení z těla. V ledvinách CisPt způsobuje apoptózu a nekrózu tubulárních buněk tím, že vstupuje do buněk a poškozuje jadernou a mitochondriální DNA (*Yao X. et al., 2007*). Mechanismus nefrotoxicity vyvolané CisPt je multifaktoriální a nebyl plně objasněn,

apoptóza a oxidační stres jsou považovány za klíčové aktéry v patogenezi nefrotoxicity. V současnosti bylo navrženo několik terapeutických strategií včetně intenzivní hydratace a využívání alternativních analogů jako možné přístupy k prevenci nefrotoxicity vyvolané CisPt. Nicméně tyto renoprotektivní přístupy zůstávají neuspokojivé. Hledání nových způsobů, jak zmírnit nefrotoxicitu vyvolanou CisPt je proto v terapeutickém výzkumu rakoviny naléhavě nutné (Hu JN. et al., 2020).

Cyklosporin působí jako imunosupresivum. Cíleně se tento lék využívá k tlumení imunitní reakce zvláště po orgánových transplantacích, ale mimo jiné aktivuje systém renin-angiotenzin (RAS) a zvyšuje vazokonstrikční faktory. K aktivaci RAS pomocí cyklosporinu dochází dvěma mechanismy, přímým účinkem na juxtaglomerulární buňky a nepřímo prostřednictvím arteriální vazokonstrikce a snížením průtoku plazmy ledvinami. Nefrotoxicita cyklosporinu je závislá na dávce a je reverzibilní po snížení dávky, nebo vysazení léku (Dustin T. et al., 2012).

Acetaminofen (APAP) je nejčastěji používané antipyretikum a analgetikum též známé jako paracetamol. Toto léčivo působící proti bolestem je považováno za bezpečné při používání v terapeutických dávkách. Při předávkování může mít za následek poškození jater a ledvin. APAP je metabolizován primárně v játrech glukuronidací a sulfatací, výsledkem jsou metabolity rozpustné ve vodě vylučované ledvinami. V terapeutických dávkách je část podávaného APAP oxidována mikrozomálním cytochromem P-450 na toxický meziproduct N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI). Tento meziproduct je redukován glutathionem a následně je vylučován jako kyselina merkapturová. Při nadbytku APAP se zásoby sulfátu a glutathionu vyčerpávají a tvorba NAPQI je významně zvýšena. Při požití velkých dávek léku dochází k závažnějšímu vyčerpání glutathionu a k masivní produkci metabolitů, což zvyšuje toxicitu a zanechává velké množství reaktivních látek nenavázaných. Tento proces narušuje homeostázu a aktivuje kaspázy, které vedou k apoptóze a následně k dysfunkci orgánu. APAP nejčastěji poškozuje proximální a distální tubuly ledvin (Mazer M. et al., 2008; Vrbová M. et al., 2016).

Gentamicin (GM) se řadí do třídy aminoglykosidových baktericidních antibiotik. Jeho klinické využití je často spojováno s indukcí nefrotoxicity. I přes navození nefrotoxicity je GM klinicky využíván díky svému širokému spektru aktivit proti bakteriálním infekcím způsobených bakteriemi rodů *Pseudomonas*, *Proteus* a *Serratia*. K nefrotoxicitě vyvolané GM dochází selektivní kumulací v renálních proximálních tubulech, což vede ke ztrátě integrity kartáčového lemu. Zahrnuje však mnohá další poškození ledvin jako je tvorba volných radikálů v ledvinách, akutní tubulární nekróza a glomerulární kongesce. Následkem

zmíněných poškození je snížení glomerulární filtrace a možná dysfunkce ledvin (*Choi KH. et al., 2000; Balakumar P. et al., 2010*).

Vankomycin (VAN) je dalším lékem, který za určitých podmínek může způsobovat nefrotoxicitu. Nečistoty přítomné v dřívějších formulacích VAN byly považovány za zodpovědné za nežádoucí účinky. Avšak moderní složení VAN bez nečistot zůstává i nadále ototoxické a nefrotoxické. VAN vyvolaná nefrotoxicita se vyskytuje u 5-25 % pacientů. Tento lék je glykopeptidovým antibiotikem používaným při léčbě infekcí rezistentních na penicilin, způsobených především gram pozitivními bakteriemi *Clostridium difficile* a meticilin-rezistentním *Staphylococcus aureus*. VAN může ovlivňovat mitochondriální funkci a indukovat na dávce závislou proliferaci proximálních tubulárních buněk *in vitro* (*King DW. et al., 2004; Filippone EJ. et al., 2017*).

## 1.4 Markery poškození ledvin

Marker nebo také biomarker je měřitelným indikátorem biologického stavu živých organismů. Nejčastěji se biomarkery detekují a vyhodnocují ze vzorků krve, moči nebo měkkých tkání. Používají se především ke zkoumání fyziologických biologických procesů, patogenních procesů nebo farmakologických reakcí na terapeutickou intervenci (*Ix JH. et al., 2021*).

Již po více než 70 let jsou sérový kreatinin a jeho odvozené deriváty markerem pro detekci a monitorování poškození ledvin. Bohužel tradiční sérové markery ledvin, jako jsou kreatinin nebo dusík močoviny v krvi (BUN), nejsou citlivé ke všem typům poškození ledvin, jakým je například AKI (*Ix JH. et al., 2021*). Biomarkery, které se uvolňují přímo do krve nebo do moči v ledvinách, mohou být v reakci na poškození ledvin významně lepším markerem, než již zmíněný kreatinin a BUN. Např. močový albumin, protein v moči a močové markery *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1),  $\beta$ 2-mikroglobulin, cystatin C a kalbindin jsou uznávány jako vysoce citlivé a specifické močové biomarkery pro sledování poškození ledvin. Tyto biomarkery zastupují důležitou roli ve studiu a vývoji léků tím, že umožňují dřívější detekci nefrotoxického poškození ledvin. Detekce nefrotoxicity během preklinických experimentů umožňuje vyloučení některých léků nebo změnu složení léků, které vyvolávají výše uvedenou toxicitu. Mezi další používané biomarkery nefrotoxicity, které byly zjištěny v moči hlodavců nebo pacientů patří interleukin-18, netrin-1, močové exozomy a *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1* (TIMP-1) (*Griffin BR et al., 2019*).

Sérový kreatinin a BUN se často využívaly k diagnostice AKI. Avšak sérový kreatinin je závislý především na nerenálních faktorech, jako jsou např. věk, pohlaví, stav svalové

hmoty a celkový nutriční stav pacienta, které nejsou nijak závislé na funkci ledvin. BUN také není optimální pro diagnózu AKI. BUN je stejně jako sérový kreatinin závislý na faktorech, které nejsou nijak závislé na funkci ledvin. U BUN jsou těmito faktory např. příjem bílkovin, katabolický stav a léčba vysokými dávkami steroidů. Tudíž ani jeden z těchto dvou markerů nejsou vhodnými markery pro včasnou detekci AKI. Opakem sérového kreatininu a BUN je marker KIM-1 (*Edelstein CL., 2008*).

## 2 Buněčné kultury

Buněčná kultura je základním nástrojem pro výzkum. Využívá se zejména jako zdroj materiálu – buněk. Buněčné kultury mohou být vytvořeny ze vzorků tkáně lidské i zvířecí, nebo z buněčné linie vytvořené dříve. Historicky byly 2D jednovrstvé buněčné kultury kultivovány na různých substrátech a ukázaly se jako vhodný a účinný prostředek k testování nově vyvinutých léčiv. V současné době mohou být 2D buněčné modely použity k efektivní predikci *in vivo* lékových odpovědí a jsou stále užitečné při objevování léků (*Antoni D. et al., 2015*). Je však evidentní, že tyto 2D kultury trpí nevýhodami spojenými se ztrátou specifčnosti, mechanických a biochemických podnětů a interakcí mezi jednotlivými buňkami. Tento fakt z nich dělá méně spolehlivé modely pro předpověď lékové reakce u některých onemocnění např. nádorových (*Fang Y. et al., 2017*).

K získání buněk ze vzorků lidské nebo zvířecí tkáně se provádí enzymové či mechanické rozrušení tkáně. Podle stáří dělíme živočišné buněčné kultury na primární kultury, buněčné kmeny a buněčné linie (*Antoni D. et al., 2015*). Primární buněčné kultury jsou tvořeny buňkami, které jsou odebrány přímo z organismu a jsou kultivovány v kultivačním médiu. Tyto kultury vydrží pouze v rámci dní, jelikož se nejčastěji nachází v G0 fázi, ve které nejsou schopny proliferace. Musí se tedy pasážovat (*Nema RA. et al., 2012*). U primárních kultur rozlišujeme odkud buňky pochází. Může jít o buňky nádorového typu, které nepodléhají stárnutí a mají lepší množící schopnosti než buňky z fyziologické tkáně, ale na druhou stranu disponují jinými vlastnostmi než již zmíněné buňky z tkáně fyziologické. Nebo může jít o normální buňky, které podléhají stárnutí a nejsou schopny proliferace po množství pasážování. Dalším rozlišením, které se používá, je, zdali pochází buňky z dospělého jedince nebo embrya. Opět je tu rozdíl v schopnosti proliferace (*Jedrzejczak-Silicka MA., 2017*).

Buněčné kmeny jsou vytvářeny z primárních buněčných kultur již jednou pasážovaných. Tyto buňky se již dokáží v *in vitro* podmínkách proliferovat, a to až 40-50krát a poté zanikají (*Nema RA. et al., 2012*).

Buněčné linie (imortalizované nebo taktéž permanentní) jsou linie buněk, které jsou prakticky neomezeně dělitelné a lze je tedy kultivovat časově neomezeně. Tyto buňky pocházejí z buněčných kmenů, u kterých došlo k transformaci, nebo se izolují z nádorů. Používáme je např. k testování léčiv *in vitro* (Jedrzejczak-Silicka MA., 2017). Poskytují fyziologické prostředí pro studium fyziologie buněk, účinků léků a toxických sloučenin na orgány. Buněčné linie jsou neocenitelné zejména při testování xenobiotik způsobujících toxické poškození ledvin. A to zejména proto, že detekovat poškození ledvin *in vivo* je velice složité a často je diagnostikováno příliš pozdě (Aschauer L. et al., 2015).

Aby bylo možné s buněčnými liniemi pracovat, je potřeba je vhodně kultivovat. Složení kultivačního média (hormony růstové faktory, kultivační substráty) ovlivňuje podstatně stupeň rozlišnosti morfologie a funkce buněk. Je zapotřebí kultivovat za přesně stanovených podmínek pro každou linii a pro jednotlivé studované parametry (Pfaller W. et al. 1998; Jedrzejczak-Silicka MA., 2017).

Nedávné pokroky v buněčné biologii a tkáňovém inženýrství umožnily vývoj široké škály trojrozměrných (3D) buněčných kultur. Mezi ně patří mnohobuněčné sféroidy, organoidy a 3D biotisky, z nichž každý má své výhody i nevýhody. 3D buněčné kultury se v dnešní době využívají jako nový nástroj při raném objevu léčiv, ale také jako potenciální terapeutika k léčbě onemocnění (Fang Y. et al., 2017).

### **3 Buněčné linie používané k testování nefrotoxicity**

Pro testování nefrotoxicity *in vitro* se často používají buňky proximálních tubulů ledvin. Ledviny jsou přirozeně vystaveny většímu podílu cirkulujících léčiv a chemikálií v krvi. Používají se jak buněčné linie zvířecí, tak lidské. Názvy vybraných buněčných linií s jejich původem jsou uvedeny v následující tabulce 2. Avšak existují velké mezidruhové rozdíly, díky kterým je prognóza ze zvířecích buněčných modelů omezená v rámci nefrotoxicity u lidí, a tudíž se více užívají lidské buněčné linie. Buněčné linie jsou používány zvláště v preklinickém stanovení, a to z důvodu vývoje a testování léků s nižším nefrotoxickým potenciálem (Tiong HY. et al., 2014).

**Tabulka 2:** Buněčné linie proximálních tubulů ledvin. Upraveno dle Pfaller W. et al., 1998.

Buněčné linie	Původ	Zdroj segmentu
HK-2	Člověk	Proximální tubulární buňky
HEK 293	Člověk	Embryonální ledvinné buňky
LLC-PK1	Prase Hampshire	Proximální nefron
OK	Vačice Severoamerická	Proximální nefron
JTC-12	Opice	Proximální nefron
MDCK	Pes (Kokršpaněl)	Sběrný kanálek
A6	Drápatka vodní	Distální tubuly / sběrný kanálek

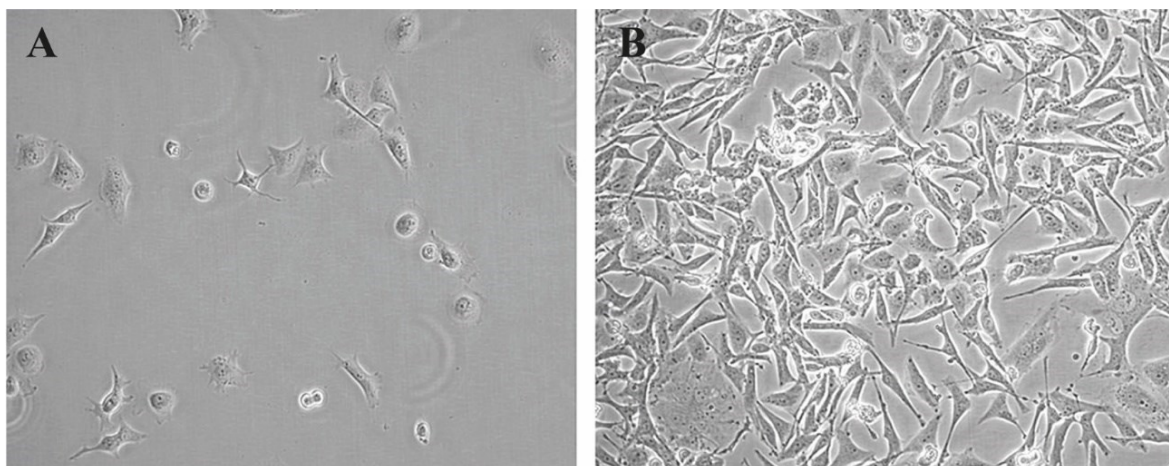
### 3.1 Buněčná linie HK-2

Lidská ledvinová buněčná linie *Human kidney - 2* (HK-2) (obr. 2), je vytvořena imortalizací buněk proximálních tubulů dospělého člověka. Buňky byly imortalizovány pomocí rekombinantního papilomaviru (HPV 16). Buněčnou linii vytvořil Ryan MJ. a kol. v roce 1994 (Ryan MJ. et al., 1994; Vrbová M. et al., 2016).

Primární buněčná kultura buněk proximálních tubulů ledvin byla vystavena rekombinantnímu viru, který obsahoval HPV 16 E6/E7 geny. Proteiny HPV16 E6 a E7 spolupracují na dlouhodobém až neomezeném prodloužení životnosti lidských keratinocytů. Samotný gen E7 je schopen transformovat buněčné linie fibroblastů a mohl by stimulovat proliferaci keratinocytů při stárnutí, ale tyto kultury buněk proximálních tubulů se nepodařilo imortalizovat. Bylo zjištěno, že k imortalizaci je nutná konstrukce obsahující oba geny E6 a E7 (Hawley-Nelson P. et al., 1989). Produkty genů se vážou na regulační proteiny DNA a výsledkem je usnadnění proliferace.

Buňky HK-2 si zachovávají stále stejný fenotyp a funkční charakteristiky, jakými jsou enzymy, membránové transportéry, adenylátcykláza reagující na příštítná tělíska, ale ne na antidiuretický hormon aj. Hlavní výhodou této buněčné linie je původ z ledvin dospělého člověka a zachovaná funkční i morfologická část proximálních tubulárních buněk, zároveň s imortalizací. Možnou nevýhodou je doba zdvojnásobení buněk, která je průměrně stanovena na 54 hodin (Ryan MJ. et al., 1994; Vrbová M. et al., 2016).



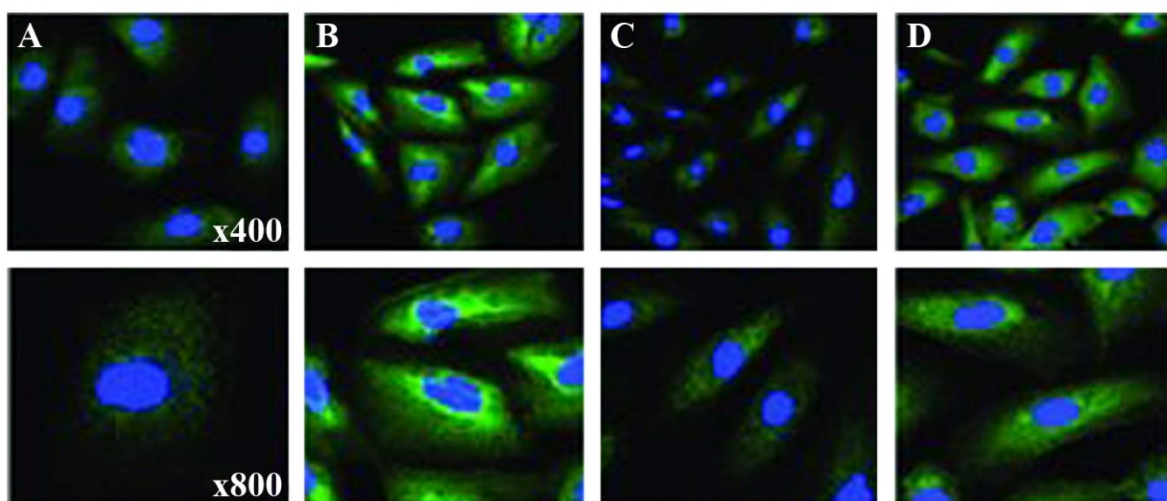


**Obrázek 2:** HK-2 buňky o rozdílné denzitě. (A) buňky HK-2 o nízké denzitě; (B) buňky HK-2 o vysoké denzitě (upraveno dle Priante G. et al., 2019).

Buňky lze kultivovat v DMEM F-12, což je směs *Dulbecco's Modified Eagle's medium* a živin F12 v poměru 1:1. Tato směs kombinuje vysoké koncentrace glukózy, aminokyselin a vitamínů. Jelikož tato směs média a živin neobsahuje růstové faktory, proteiny ani lipidy, je obvykle vyžadováno doplnění média sérem. Autoři studie Vrbová M. a kol. (2016) půdu DMEM F12 (1:1) doplnili 5% fetálním hovězím sérem, penicilinem (50 µg/ml), pyruvátém (1 mM), streptomycinem (50 µg/ml), inzulinem (10 µg/ml) a epidermálním růstovým faktorem (5 ng/ml). Kultivaci následně prováděli při 37 °C a tenzi CO<sub>2</sub> (5 %). Jelikož DMEM F12 obsahuje hydrogenuhličitan sodný, který slouží jako pufrovací systém, je vyžadováno prostředí 5-10% tenze CO<sub>2</sub>. Tenze CO<sub>2</sub> udržuje fyziologické pH pro kultivované buňky.

Avšak ne vždy je kultivace prováděna tímto způsobem, postupy se mohou lišit v druhu a množství reagentů. Příkladem rozdílné kultivace je studie Xu ZH. a kol. (2021), kde autoři použili ke kultivaci HK-2 buněk DMEM F-12 v poměru 3:1. Půda byla doplněna o 10% fetální hovězí sérum, 1% penicilin a 1% streptomycin. Oproti uváděné kultivaci podle Vrbové M. a kol., autoři studie Xu ZH. a kol. použili půdu s jiným poměrem směsi živin a nedoplňovali půdu o inzulin a růstový faktor. Kultivaci následně prováděli při 37 °C.

Další z možných kultivací byla popsána studií Kim SS. a kol. v roce 2017. Autoři v této studii využili ke kultivaci buněk DMEM doplněný o různé koncentrace D-glukózy (5 mM, 30 mM), 10 % tepelně inaktivované fetální hovězí sérum a antibiotika. Buňky byly následně inkubovány při 37 °C, 5% tenzi CO<sub>2</sub> a to po dobu 24 a 48 hodin. Výsledek účinku různé koncentrace glukózy v médiu vyplýval z imunofluorescenční detekce exprese izoformy matrixmetaloproteinázy-2 v plné délce (FL-MMP-2) v buňkách HK-2 (obr. 3). Mikroskopické nálezy potvrdily, že izoforma FL-MMP-2 je indukována vysokou glukózovou stimulací buněk HK-2 (Kim SS. et al., 2017).



**Obrázek 3:** *Imunofluorescenční detekce izoformy FL-MMP-2 v buňkách HK-2. (A,C) Buňky kultivovány v standardní (5mM) glukóze po dobu 24 a 48 hodin; (B,D) Buňky kultivovány ve vysoké (30mM) glukóze po dobu 24 a 48 hodin. Zvětšení 400x (horní řádek), zvětšení 800x (spodní řádek). Pro detekci bylo použito imunofluorescenční barvení na izoformu FL-MMP-2 buněk HK-2 (upraveno dle Kim SS. et al., 2017).*

### 3.1.1 Studie 1: Evaluace biomarkerů nefrotoxicity na HK-2 buňkách

Studie Sohn SJ. a kol. (2013) byla zaměřena na možné použití známých *in vivo* biomarkerů nefrotoxicity ledvin jako prediktivních nástrojů pro hodnocení nefrotoxicity také *in vitro*. Práce zkoumá změny exprese biomarkerů KIM-1, kalbindinu a TIMP-1 po vystavení HK-2 buněk CisPt.

Prvním testovaným biomarkerem pro detekci nefrotoxicity ledvin byl KIM-1. Jedná se o transmembránový protein a specifický citlivý biomarker poškození ledvin, jehož exprese je za fyziologického stavu buněk velice nízká (Bonventre JV., 2009).

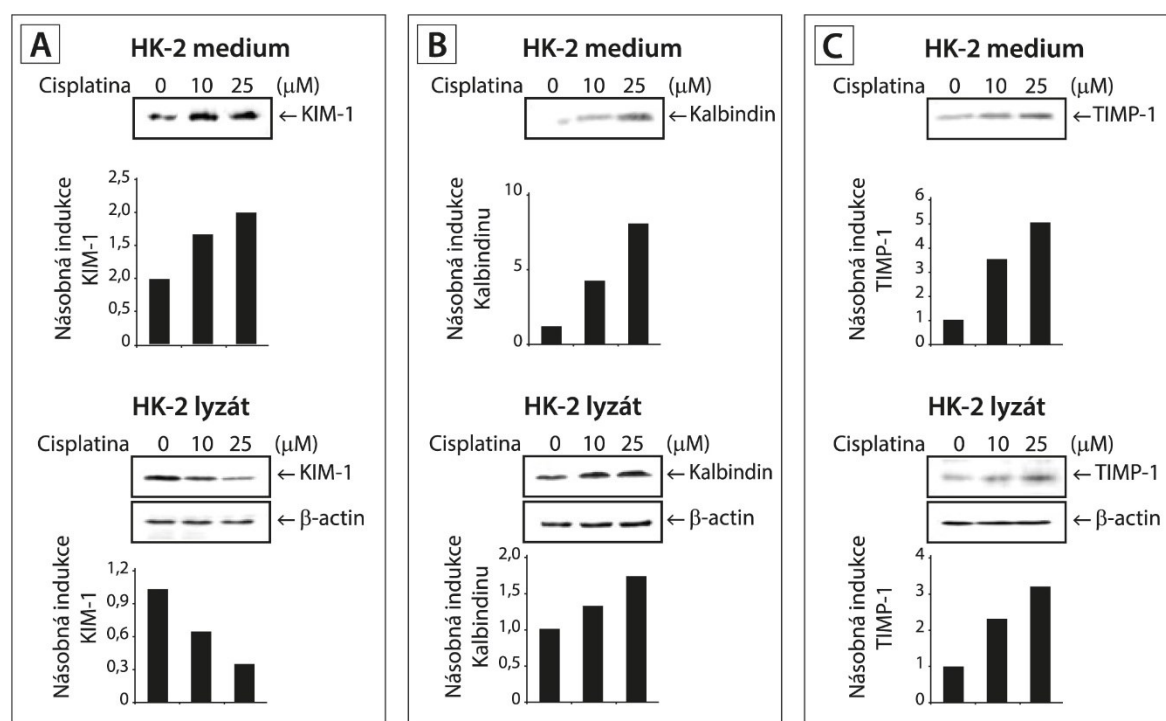
Dalším testovaným biomarkerem byl kalbindin D28K, jedná se o intracelulární protein vázající vápník závislý na vitamínu D, který je exprimován v epiteliálních buňkách distálních tubulů ledvin. Specifická lokalizace kalbindinu D28K v distálních tubulech a sběrném kanálku poskytuje jasnou představu o poškozené části ledvin (Sourial S. et al., 2009).

Posledním testovaným biomarkerem byl TIMP-1. Jedná se o glykoprotein regulující syntézu a degradaci extracelulární matrix. Také je zodpovědný za inhibici matrix metaloproteináz. Různé expozice toxickým látkám zvyšují hladinu TIMP-1 (Murphy G., 2011; Sohn SJ. et al., 2013).

Ve studii Sohn SJ. a kol. (2013) bylo potvrzeno, že KIM-1, kalbindin i TIMP-1 jsou skutečně více exprimovány po působení CisPt na buňky HK-2 v porovnání s buňkami kontrolními. Hladiny těchto biomarkerů byly detekovány pomocí imunoblotové analýzy

a výsledky byly zpracovány do grafů porovnávající hladiny exprese jednotlivých testovaných biomarkerů po inkubaci HK-2 buněk s různými koncentracemi CisPt (obr. 4). Analýza byla vždy prováděna z buněčného média a lyzátu HK-2 buněk. Buňky HK-2 byly vystaveny CisPt po dobu 24 hodin. U KIM-1 (obr. 4A) CisPt způsobila významné zvýšení jeho exprese v médiu již při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . V buněčných lyzátech se hladina proteinu se zvyšující se koncentrací CisPt snižovala, což je vysvětlováno tím, že buňky působením CisPt pouze neexprimují KIM-1 protein, ale i zvyšují jeho štěpení a uvolňování ektodomény. U kalbindinu a TIMP-1 autoři detekovali zvýšenou úroveň exprese, jak na buněčné linii HK-2, tak v lyzátu buněk, jak je znázorněno na obrázku 4B a 4C (Sohn SJ. et al., 2013).

Výsledky autorů Sohn SJ. a kol. na HK-2 buňkách tedy naznačují, že KIM-1, kalbindin a TIMP-1 původně identifikovány jako *in vivo* biomarkery nefrotoxicity, mohou být použity i jako *in vitro* biomarkery pro hodnocení renální toxicity indukované CisPt (Sohn SJ. et al., 2013).



**Obrázek 4:** Změny exprese KIM-1, kalbindinu a TIMP-1 v závislosti na koncentraci CisPt. HK-2 buňky byly ovlivněny CisPt (0-25  $\mu\text{M}$ ) po dobu 24 hodin. Změny exprese KIM-1, kalbindinu a TIMP-1 byly analyzovány v médiu (horní řádek) a v lyzátech (dolní řádek). Jako referenční protein byl použit  $\beta$ -aktin (upraveno dle Sohn SJ. et al., 2013).

### 3.1.2 Studie 2: *In vitro* test k predikci toxicity APAP pro játra a ledviny

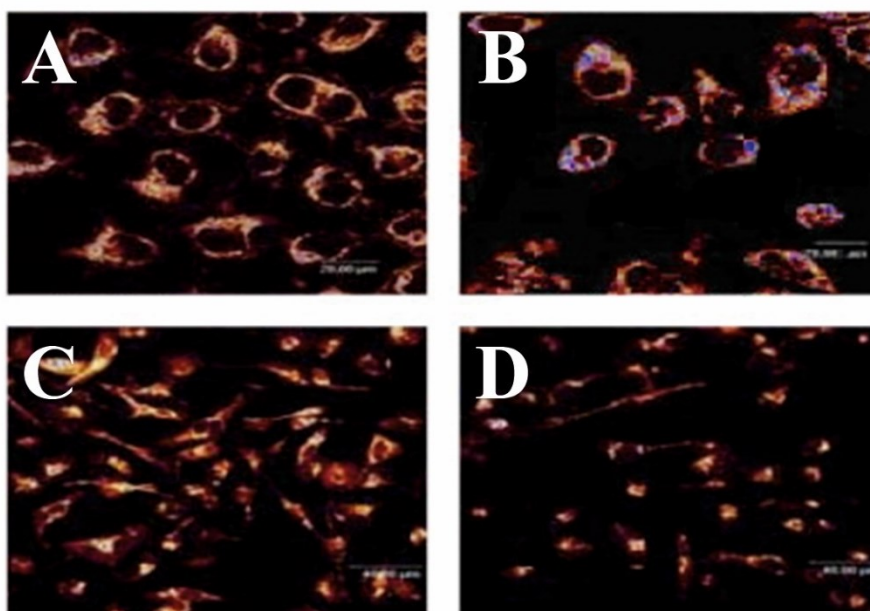
Studie Zhang L. a kol. (2007) byla zaměřena na možné objasnění proveditelnosti předpovědi toxicity pro cílový orgán jater a ledvin pomocí *in vitro* testů. Studie použila buňky HK-2 a buňky lidského hepatomu (Bel-7402) pro porovnání míry toxicity APAP působící

na ledviny a játra. Ke stanovení výsledků využili autoři Zhang L. a kol. mimo jiné detekci změny membránové permeability, která úzce souvisí s buněčnou smrtí. Výsledky byly stanoveny testem neutrální červeně a laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem.

Test neutrální červeně je založen na příjmu neutrální červeně, supravitálního barviva, a jeho akumulaci v lysozomech životaschopných neporaněných buněk. Pomocí lineární regresní analýzy je možné vypočítat koncentraci vybrané látky potřebné ke snížení absorbance neutrální červeně o 50 %, označované jako hodnota IC50. Tato hodnota je poté využívána pro výběr koncentrace dané látky u dalších stanovení (Zhang L. et al., 2007).

Změna membránové permeability je dalším testovaným faktorem. Permeabilita buněčných membrán (MPT) hraje důležitou roli při udržování mitochondriální struktury a funkce, avšak změna membránové permeability může vést k apoptóze a nekróze. Buněčná smrt je nejčastěji spojována s kolapsem MPT (Bonora M. et al., 2022).

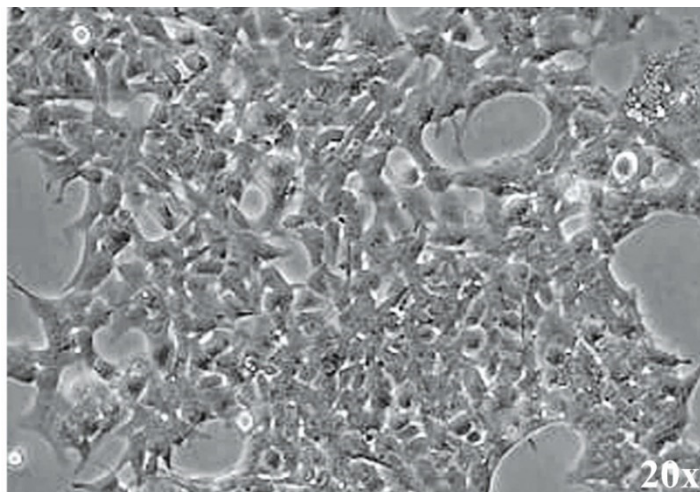
Buňky byly inkubovány s APAP o koncentraci 1000 µg/l po dobu 24 hodin a byly hodnoceny testem neutrální červeně. Výsledky testu ukázaly, že toxicita APAP byla vyšší na buňkách jater než na buňkách ledvin. Změna MPT byla detekována obarvením buněk fluorescenční barvou Rh123 a pozorováním laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem. APAP narušil MPT obou buněčných linií způsobem závislým na dávce. Studie prokázala, že APAP zvýšila MPT v buňkách Bel-7402, ale u buněk HK-2 měla opačný efekt a MPT snížila (obr. 5). Dle autorů Zhang L. a kol. výsledky prokazují, že test *in vitro* na buňkách HK-2 a Bel-7402 může předpovídat toxicitu pro játra a ledviny. Ze studie dále vyplývá, že APAP více působí na játra než na ledviny a je tedy primárně brán jako hepatotoxická látka. Nefrotoxický účinek APAP je nižší, ale ne zanedbatelný.



**Obrázek 5:** Změna mitochondriální permeability u buněk Bel-7402 a HK-2 po expozici APAP. Bel-7402 (A, B) a HK-2 buňky (C, D) byly ovlivněny APAP (1000 µg/l) po dobu 24 hodin. Změny v permeabilitě mitochondriální membrány byly detekovány pomocí fluorescenční sondy Rh123. (A,C) Kontrolní buňky; (B,D) buňky ovlivněné APAP (upraveno dle Zhang L. et al., 2007).

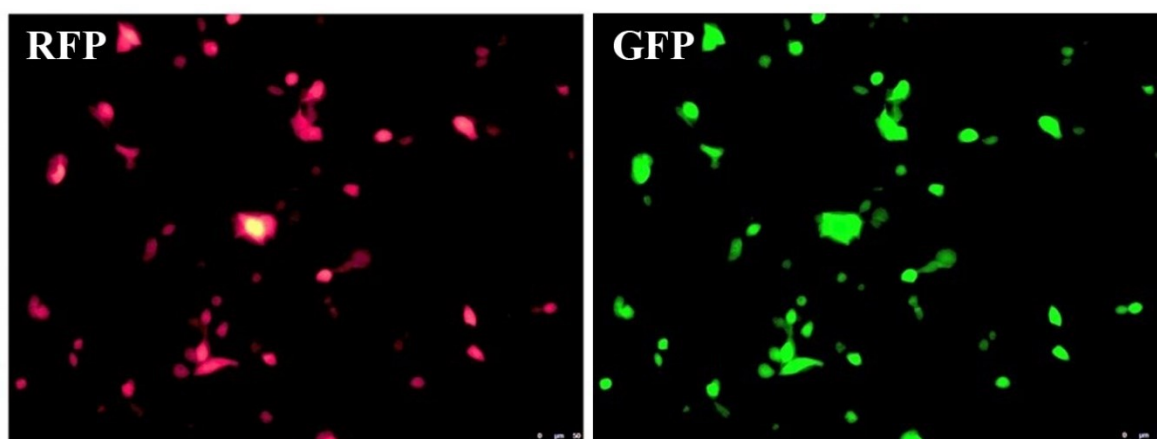
### 3.2 Buněčná linie HEK 293

Buněčná linie *Human embryonic kidney 293* (HEK 293) (obr. 6) je odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk pěstovaných v tkáňové kultuře. Zdrojem původní linie HEK byl jediný elektivně potracený zdravý plod neznámého původu (Lin YC. et al., 2014). HEK 293 byla poprvé vytvořena v 70. letech Frankem Grahamem, holandským biologem, transformací a kultivací buněk HEK pomocí střížených fragmentů DNA adenoviru 5 (Ad5) (Abaandou LA. et al., 2021). Fragment adenovirového genomu se integroval do chromozomu 19 a kódoval proteiny E1A/E1B, které interferovaly s dráhami řízeného buněčného cyklu a působily proti apoptóze (Lin YC. et al., 2014). Výsledkem byla buněčná linie s kontinuální produkcí. Pro její mnohostranné využití a nenáročnost je kultivována v mnoha laboratořích po celém světě. Je považována za robustní a nenáročnou buněčnou linii. Doba zdvojnásobení buněk běžně trvá mezi 34-36 hodinami. Další předností je možnost pěstovat ji na adherentních nebo suspenzních platformách. Tyto buňky však nemusí být nutně pouze buňky linie HEK 293. Z původní linie buněk byla vytvořena řada odvozených buněčných linií, lépe vyhovujících řadě různých aplikací (Abaandou LA. et al., 2021).



**Obrázek 6:** Buněčná linie HEK 293. 20x zvětšeno (upraveno dle Yin R et al., 2014).

Navzdory tomu, že pocházejí z ledvinové tkáně, buňky HEK 293 (obr. 7) vykazují vlastnosti nezralých neuronů. Tato zvláštní vlastnost vedla k mnoha výzkumům a důkladné charakterizaci této buněčné linie, které nakonec ukázaly, že genomika buněk se nejvíce podobá buňkám nadledvin (Lin YC. et al., 2014).



**Obrázek 7:** Fluorescenční snímky buněčné linie HEK 293. Buňky s fluorescenčním proteinem RFP „red fluorescent protein“ (vlevo), a s fluorescenčním proteinem GFP „green fluorescent protein“ (vpravo), značen celkový protein v buňkách HEK 293; zobrazeno pod fluorescenčním mikroskopem (upraveno dle Mori Y. et al., 2020).

HEK 293 je možné kultivovat podobným způsobem jako HK-2 buněčnou linií. Používá se DMEM doplněné o 10% fetální hovězí sérum. Následná kultivace se provádí při teplotě 37 °C a s 5% tenzí CO<sub>2</sub> (Jiang PE. et al., 2021).

Buněčná linie HEK 293 je epiteliálního původu a je svou povahou adherentní. Linie byla uzpůsobena pro růst v suspenzi v bezsérovém nebo chemicky upraveném médiu. Kultivace HEK 293 může tudíž probíhat i odlišným způsobem, který popsali autoři ve studii Malm M. a kol. z roku 2020 (Malm M. et al., 2020). Pro kultivaci buněk HEK 293 autoři této studie využili médium bez séra a s nízkým obsahem proteinů (293 SFM II).

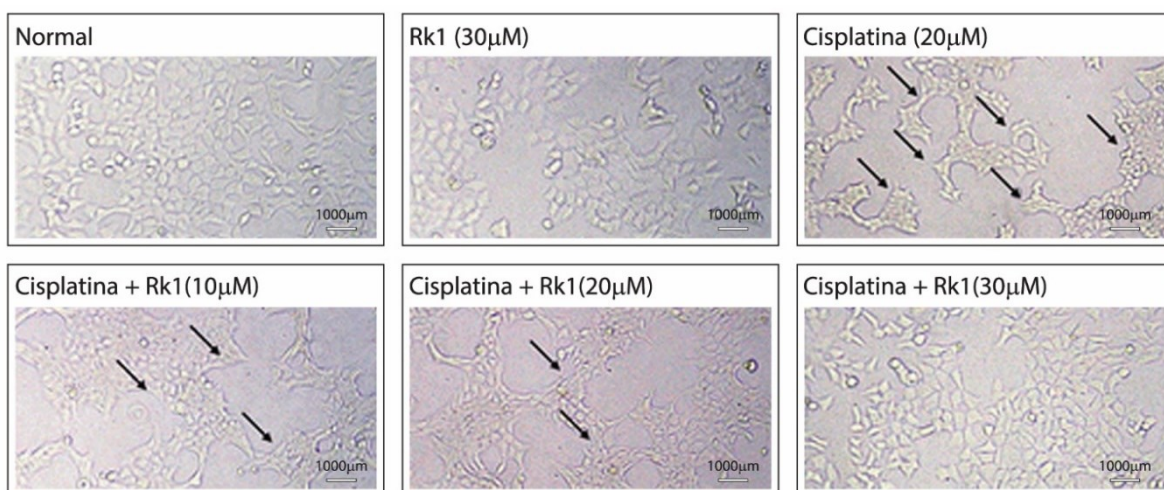
Toto médium je bez složek živočišného původu, upravené pro kultivaci suspenzní buněčné linie HEK 293-F s vysokou hustotou. Médium je takto kompletně připraveno pro kultivaci, bez potřeby doplňování antibiotik, sér nebo jiných látek. Na rozdíl od médií, která využívají např. fetálního bovinního séra s nepřesným složením, má 293 SFM II plně definované složení. Nemůže tedy dojít k nechtěným interakcím s jinými látkami (*Jang M. et al., 2022*). Buněčná linie HEK 293-F je odvozená od lidských embryonálních ledvinových buněk HEK 293 a je adaptována na kultivaci v SFM II. Tento klonový izolát 293-F je rychle rostoucí variantou buněčné linie 293. Médium bylo doplněno o 4 mM Glutamax (dipeptid L-alanyl-L-glutamin) a kultivováno ve 125ml Erlenmeyerově třepací baňce při 37 °C, 120 otáčkách za minutu a s 8% tenzí CO<sub>2</sub> (*Malm M. et al., 2020*).

### 3.2.1 Studie 1: Ochranný účinek ginsenosidu Rk1 na CisPt indukovanou nefrotoxicitu

Cílem studie Hu a kol. (2020) bylo zkoumat potenciální ochranný účinek ginsenosidu Rk1 z ženšenu pravého na nefrotoxicitu vyvolanou CisPt v buňkách HEK 293. Účinek Rk1 na životaschopnost buněk HEK 293 ošetřených CisPt byl zkoumán kolorimetrickým testem pro hodnocení buněčné metabolické aktivity (MTT) (*Hu JN. et al., 2020*).

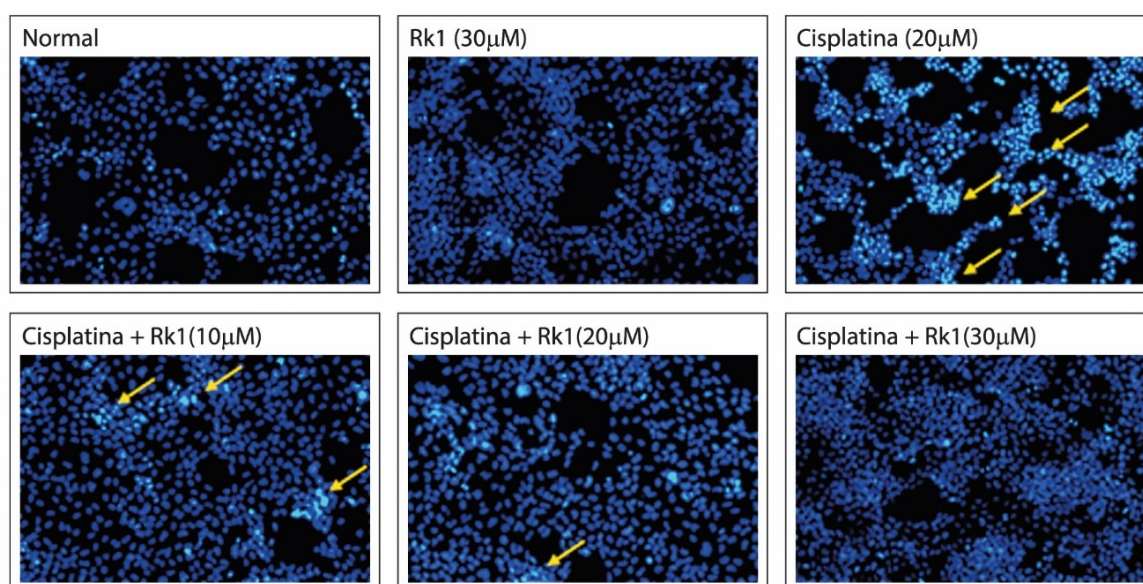
Přírodní sloučeniny z bylin nebo léčivých rostlin se široce používají k léčbě a prevenci onemocnění ledvin. V této studii využili Rk1, který je hlavní aktivní složkou kořene ženšenu pravého (*Panax ginseng C.A. Meyer*). Ginsenosidy v ženšenu procházejí postupně deglykosylací, dehydratací a izomerací za vzniku mnoha vzácných ginsenosidů, z nichž hlavní je Rk1. Ginsenosidy připomínají z hlediska struktury steroidní hormony a mají různé farmakologické účinky včetně protirakovinných, protizánětlivých a účinkům proti agregaci krevních destiček (*Fuzzati N., 2004; Hu JN. et al., 2020*).

Autoři Hu JN. a kol. (2020) nejprve testovali samotné účinky Rk1 na buňkách HEK 293. Ve studii bylo prokázáno, že buňky ošetřené Rk1 v koncentraci mezi 50 až 125 μM vykazují značnou cytotoxicitu. Proto byly pro další analýzy vybrány koncentrace Rk1 10 až 30 μM, které nevykazují tak značnou toxicitu. Při zkoumání ochranného účinku Rk1 byly buňky HEK293 vystaveny účinkům CisPt s koncentrací 20 μM a Rk1. CisPt způsobila dramatický pokles životaschopnosti buněk. Velká část buněk HEK 293 se po léčbě CisPt zmenšila a u většiny buněk došlo i k rozpadu jádra (obr.8 – Cisplatina). U buněk, které byly zároveň ošetřeny CisPt a Rk1, nezaznamenali autoři Hu JN. a kol. tak výrazné poškození. Morfologické změny způsobené CisPt se po ošetření Rk1 (10, 20 a 30 μM) výrazně snížily (*Hu JN. et al., 2020*). Výsledek zkoušky potvrdil ochranný efekt Rk1 na buňkách HEK 293 (obr. 8).



**Obrázek 8:** Morfologie buněk po expozici CisPt a Rk1 v různých koncentracích. Normal – kontrolní buňky HEK 293; Rk1 (30  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené Rk1 o koncentraci 30  $\mu\text{M}$ ; Cisplatina (20  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené CisPt o koncentraci 20  $\mu\text{M}$ , koncentrace, při které dochází k významnému poškození buněk; Cisplatina + Rk1 (10, 20 a 30  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené CisPt o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a Rk1 v různých koncentracích (10, 20 a 30  $\mu\text{M}$ ). (upraveno dle Hu JN. et al., 2020).

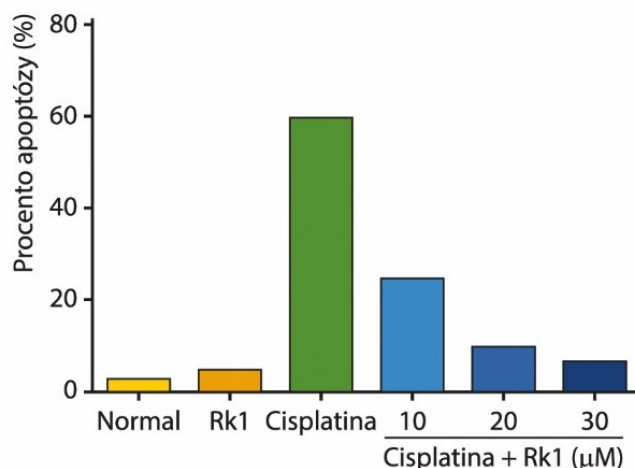
Ve studii Hu JN. a kol. (2020) byly následně použity buňky na barvení a následné hodnocení pomocí fluorescenční mikroskopie. Podle výsledků barvení Hoechst 33258 (obr. 9) bylo jádro buněk HEK 293 a buněk HEK 293 s Rk1 morfologicky intaktní a úhledně uspořádané s jasným obrysem spolu s rovnoměrně a mírně obarveným chromatinem.



**Obrázek 9:** Buňky HEK 293 pod fluorescenčním mikroskopem ošetřené CisPt a Rk1. Normal – kontrolní buňky HEK 293; Rk1 (30  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené Rk1 o koncentraci 30  $\mu\text{M}$ ; Cisplatina (20  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené CisPt o koncentraci 20  $\mu\text{M}$ , koncentrace, při které dochází k významnému poškození buněk; Cisplatina + Rk1 (10, 20 a 30  $\mu\text{M}$ ) – buňky HEK 293 ošetřené CisPt o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a Rk1 v různých koncentracích (10, 20 a 30  $\mu\text{M}$ ), Rk1 snížil morfologické změny vyvolané CisPt, nejvíce u Rk1 s koncentrací 30  $\mu\text{M}$ . Šipky ukazují nekrotické a poškozené buňky (upraveno dle Hu JN. et al., 2020).



U buněk s CisPt byl však jasně zřetelný velký podíl a vysoká hustota modré apoptózy buněk a malých kousků jader, což ukazuje na závažnou apoptózu způsobenou CisPt. Nejdůležitějším výsledkem této studie zůstává fakt, že po předběžném ošetření Rk1 byly účinně zmírněny jak apoptóza, tak poškození buněk (Hu JN. et al., 2020). Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 10.



**Obrázek 10:** Graf detekce apoptózy buněk HEK 293 ošetřených CisPt a Rk1. Normal – kontrolní buňky HEK 293; – téměř žádná apoptóza; Rk1 – buňky HEK 293 ošetřené Rk1 o koncentraci 30 μM; Cisplatina – buňky HEK 293 ošetřené 20 μM CisPt Cisplatina + Rk1 (10, 20 a 30 μM) – buňky HEK 293 ošetřené CisPt o koncentraci 20 μM a Rk1 v různých koncentracích (10, 20 a 30 μM) (upraveno dle Hu JN. et al., 2020).

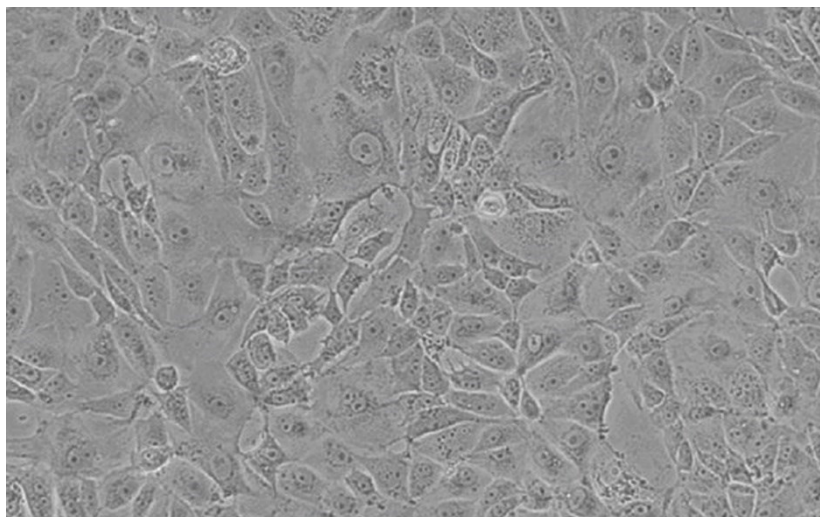
Výsledky autorů Hu JN. a kol. (2020) jasně ukázaly, že Rk1 může být silným činidlem proti toxicitě CisPt v buňkách ledvin. Mechanismy, které jsou základem renoprotektivního účinku Rk1, by se mohly podílet na snížení oxidačního stresu a apoptózy potlačením kaspázových signálních drah v buňkách HEK 293. Jedná se tedy o atraktivní doplňkovou terapeutickou látku pro léčbu a prevenci poškození ledvin.

### 3.3 Buněčná linie LLC-PK1

Buněčná linie tubulárních epitelálních buněk je izolovaná z ledvin prasete *Hampshire*. Plemeno *Hampshire* bylo původně do Ameriky dovezeno z Anglického hrabství Hampshire na počátku 19 století. *Lilly laboratories cell-Porcine Kidney* (LLC-PK1) je linie buněk s jedinečnými morfologickými vlastnostmi. Mezi jedny z těchto vlastností se řadí 3D růst a tvorba agregátů. Imortalizované buňky LLC-PK1 vytváří 3D sféroidy (rotační elipsoidy) a na apikální membráně kartáčový lem. Sféroidy přirozeně napodobují různé aspekty pevných tkání, tj. účinná difuze kyslíku nebo odstraňování metabolických odpadů. Ačkoli je buněčná linie považována za linii proximálních tubulů, nachází se zde

i charakteristiky, které do proximálního původu nezapadají. Mezi takové charakteristiky patří např. tvar a lokalizace mitochondrií v buňce (Vrbova M. et al., 2016).

Buňky LLC-PK1 (obr. 11) produkují řadu enzymů (alkalická fosfatáza) a membránových transportérů (transportéry aminokyselin, hexózy, fosfatázy a jiné). Buněčné produkty mimo jiné zahrnují i aktivátor plazminogenu, látku, která stimuluje fibrinolýzu. Tato látka byla součástí léků používaných při trombóze, jelikož usnadňovala rozpouštění malých krevních sraženin. Buněčná linie je díky svému 3D růstu vhodným modelem použitelným pro různé studie, do kterých se řadí např. studie nefrotoxicity *in vitro* (Vrbova M. et al., 2016). Jednou z těchto studií je studie Choi KH. a kol. (2000), ve které autoři sledovali mechanismy smrti buněk LLC-PK1 po chronické léčbě gentamicinem. Další vhodnou vlastností buněčné linie je rychlost zdvojnásobení počtu buněk. Počet buněk se zdvojnásobí průměrně za 24 hodin (Choi KH. et al., 2000).

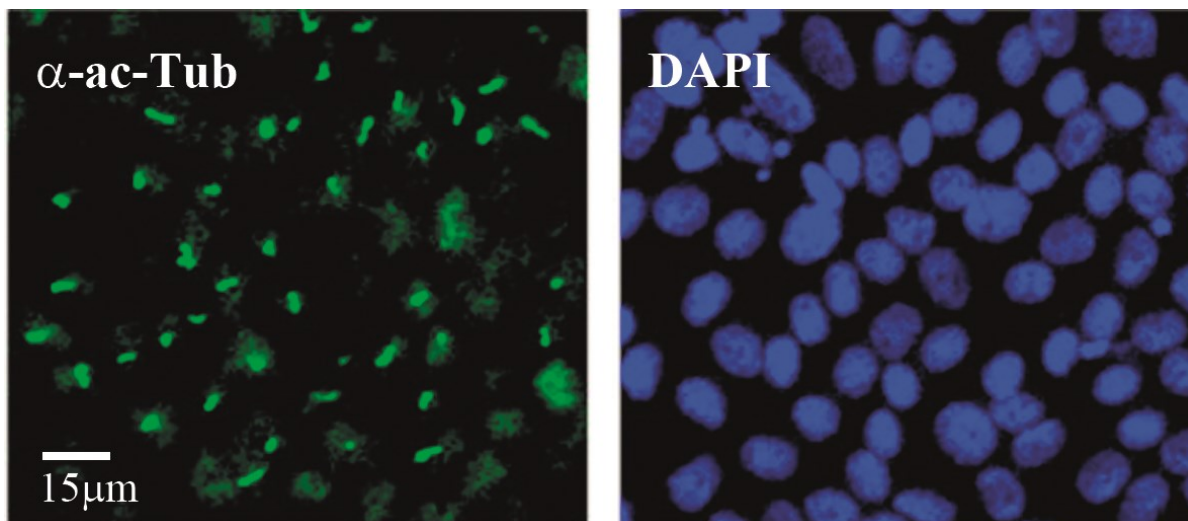


**Obrázek 11:** Buněčná linie LLC-PK1. Buňky LLC-PK1; zobrazeno v zástinu, 10x zvětšeno (upraveno dle Negrette-Guzmán M. et al., 2013).

Buněčnou linii LLC-PK1 můžeme kultivovat stejně jako již zmíněnou linii HK-2 v médiu DMEM F12, postup se liší pouze ve druhu a množství reagensů. Autoři studie Wang X. a kol. (2023) do média přidali 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu a 10% teplem inaktivovaného fetálního hovězího séra.

Stejné médium DMEM F12 bylo použito i v rámci studie Scarinci N. a kol. (2022). Autoři použili buňky LLC-PK1 divokého typu a přidali do média oproti první studii pouze 3% fetálního hovězího sérum, ale vůbec nepřidávali antibiotika. Buňky naočkovali na skleněná krycí sklička a pěstovali je při 37 °C a 5% tenzi CO<sub>2</sub>. Takto byly buňky kultivovány, aby dosáhly plné konfluency během dvou až tří týdnů. Konfluentní buňky byly autory studie

Scarinci N. a kol. použity pro imunocytochemické studie vlivu extracelulárních vápenatých iontů na délku primární řasinky u buněk LLC-PK1 (obr. 12).



**Obrázek 12:** Monovrstvy buněk LLC-PK1 divokého typu pod fluorescenčním mikroskopem. Buňky LLC-PK1 označené protilátkou proti acetylovanému  $\alpha$ -tubulinu (zelená, levá část) zobrazuje primární motilní řasinky; DAPI (modrá, pravá část) zobrazuje buněčná jádra LLC-PK1 (upraveno dle Scarinci N. et al., 2022).

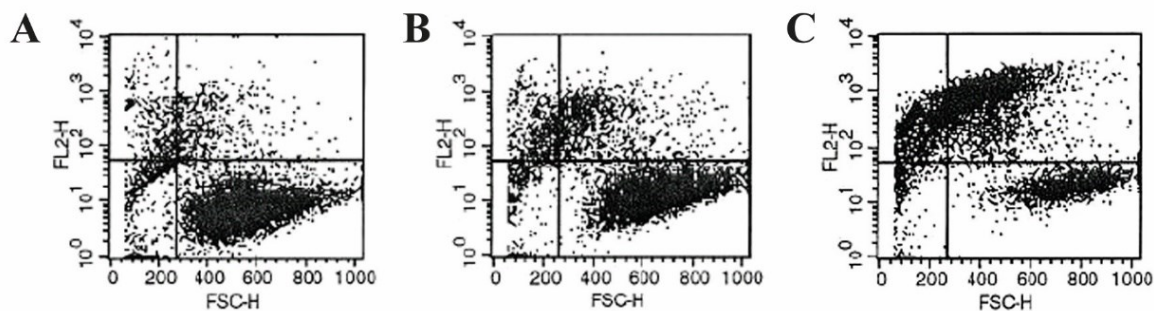
Další možnou kultivací LLC-PK1 je kultivace na  $\alpha$ -modifikovaném Eaglově médiu. Toto médium bylo vyvinuto v roce 1959 a sloužilo k vytvoření DMEM, které obsahuje na rozdíl od původního Eaglova média vyšší koncentrace aminokyselin a glukózy. Eaglovo médium se doplňuje 3% fetálním telecím sérem. Kultivace poté probíhá při 37 °C a 5% tenzi CO<sub>2</sub> (Choi KH. et al., 2000).

### 3.3.1 Studie 1: Gentamicinem indukovaná apoptóza renálních buněk LLC-PK1

Autoři studie Choi KH. a kol. (2000) se snažili objasnit mechanismy smrti renálních tubulárních buněk indukovaných aminoglykosidy. Použili k tomu buněčnou linii LLC-PK1, kterou zkoumali po dlouhodobé expozici GM. Zároveň šlo o první studii, která byla zaměřena na možný vznik apoptózy indukované GM.

Autoři Choi KH. a kol. pro hodnocení apoptózy využili průtokovou cytometrii, která pomocí měření rozptylu světla rozlišila apoptické buňky. Průtoková cytometrie používá dva detektory. Prvním je FSC, který měří přední rozptyl světla a výsledek měření je úměrný průměru buňky. A druhý detektor SSC měří boční rozptyl světla, který nám poskytuje informace o granularitě buňky. Výsledek cytometrie pro apoptózu je charakteristický (snížený FSC a zvýšený SSC) oproti normálním buňkám. Ve srovnání s kontrolou, léčba GM po dobu delší než 12 dní významně zvýšila podíl buněk v apoptotické oblasti v závislosti

na dávce (Obr. 13). Maximální apoptózu zaznamenali po 15denní léčbě GM. Léčba GM v uvedených koncentracích po dobu 15 dní zvýšila podíl buněk v apoptotické oblasti způsobem závislým na dávce (Obr. 13B – 1mM, 13C – 10mM). Naopak u buněk ošetřených GM po dobu kratší 12 dní nebyla pozorována žádná významná apoptóza (Choi KH. *et al.*, 2000).



**Obrázek 13:** Průtoková cytometrická analýza účinků GM. (A) – kontrolní buňky LLC-PK1, bez GM; (B) – buňky LLC-PK1 ošetřené 1 mM GM po dobu (15 dní); (C) – buňky LLC-PK1 ošetřené 10 mM GM po dobu (15 dní), pozorovaná maximální apoptóza buněk (upraveno dle Choi KH. *et al.*, 2000).

Studie Choi KH. a kol. (2000) byla dále zaměřena na změny v expresi Fas po expozici GM. Byly provedeny Western bloty na buňkách vystavených 10mM GM po dobu 7 až 15 dní, každých 24 hodin. Přestože došlo k významnému zvýšení počtu apoptotických buněk, neexistuje žádný významný rozdíl v expresi 45 kD proteinu Fas mezi buňkami ošetřenými GM a kontrolními buňkami.

V této studii autoři Choi KH. a kol. prokázali, že k apoptóze dochází na buňkách LLC-PK1 po léčbě GM po dobu 15 dní. Na základě těchto zjištění autoři předpokládají, že k apoptóze dochází v renálních tubulárních epiteliálních buňkách po dlouhodobé expozici GM a tento proces může být rozhodující pro poškození buněk, následnou a případnou regeneraci. Autoři nadále ve své práci uvedli, že proces vedoucí k apoptóze je složitý. A to s předpokladem že existují různé biochemické děje, které mohou iniciovat proces apoptózy, včetně deprivace růstových faktorů, mitochondriálního poškození, oxidačního stresu a narušení intracelulární homeostázy.

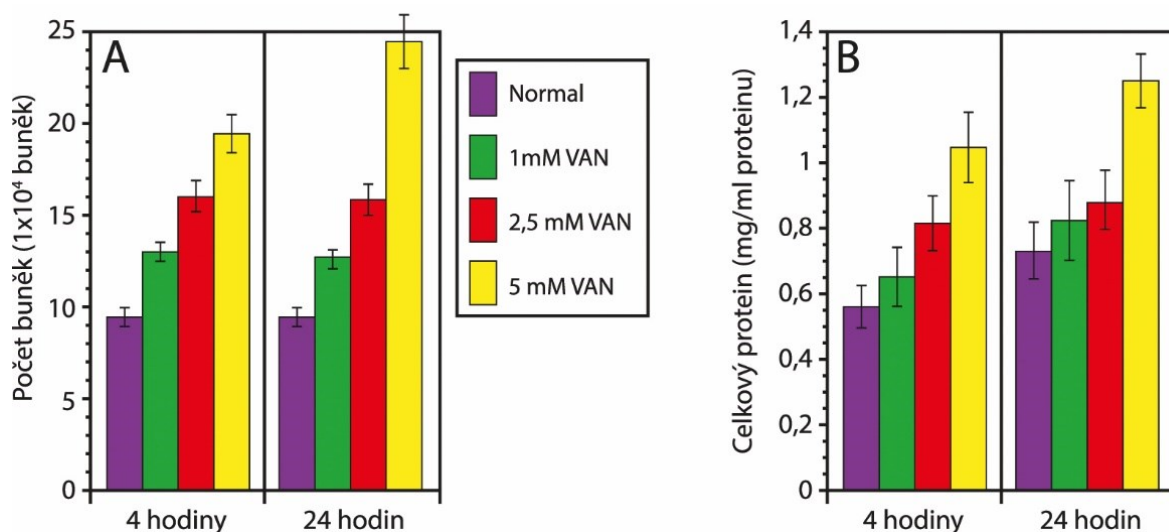
Výsledky a předpoklady studie Choi KH. a kol. (2000) byly potvrzeny studií Balakumar P. a kol. (2010), ve které bylo uvedeno, že patologické mechanismy související s nefrotoxitou vyvolanou GM, zahrnují zvýšenou regulaci transformačního růstového faktoru (TGF- $\beta$ ), elevaci endotelinu-1, výrazné zvýšení infiltrace monocytů/makrofágů do renální kůry a dřeně, indukci oxidačního stresu a apoptózu s nekrózou (Balakumar P. *et al.*, 2010).

### 3.3.2 Studie 2: Proliferativní reakce pozorované po léčbě vankomycinem na LLC-PK1

Zkoumání účinků VAN na buněčnou proliferaci a mitochondriální funkci v epitelálních buňkách proximálního tubulu ledvin LLC-PK1 se věnovali ve studii King DW. a kol. (2004). Autoři této studie dále zkoumali a hodnotili účinky VAN na syntézu proteinů.

Renální regenerace po subletálním poškození se vyznačuje charakteristickými kroky dediferenciace, migrace a proliferace nepoškozených renálních buněk, což v konečném důsledku podporuje obnovu renální funkce. Proliferativní odpověď po subletálním poškození ledvin může být zprostředkována aktivací dráhy mitogenem-aktivované proteinkinázy (MAPK) (King DW. et al., 2004).

Autoři King DW. a kol. vystavili buňky LLC-PK1 VAN o koncentracích 1, 2,5 a 5 mM po dobu 4 a 24 hodin. Následné hodnocení účinků VAN na počet buněk probíhalo pomocí hemocytometrové metody po ukončení expozice. Dle studie King DW. a kol. (2004) bylo pozorováno významné zvýšení počtu buněk v obou časových expozicích VAN ve srovnání s kontrolními buňkami (obr. 14A). Dále bylo pozorováno významné zvýšení celkového proteinu v obou časových expozicích VAN ve srovnání s kontrolními buňkami (obr. 14B). Z dat studie vyplývá, že zvýšení celkového počtu proteinů a buněk naznačuje, že expozice VAN na buňkách LLC-PK1 byla mitogenní (King DW. et al., 2004).



**Obrázek 14:** Grafy vlivu VAN na počet buněk a bílkovin. (A) Graf znázorňuje počty buněk po ošetření vankomycinem (VAN) v koncentracích (0mM; 1mM; 2,5mM; 5mM) po dobu 4 a 24 hodin. (B) Graf znázorňuje hodnotu celkového proteinu po ošetření VAN v koncentracích (0mM; 1mM; 2,5mM; 5mM) po dobu 4 a 24 hodin. (Upraveno dle King DW. et al., 2004).

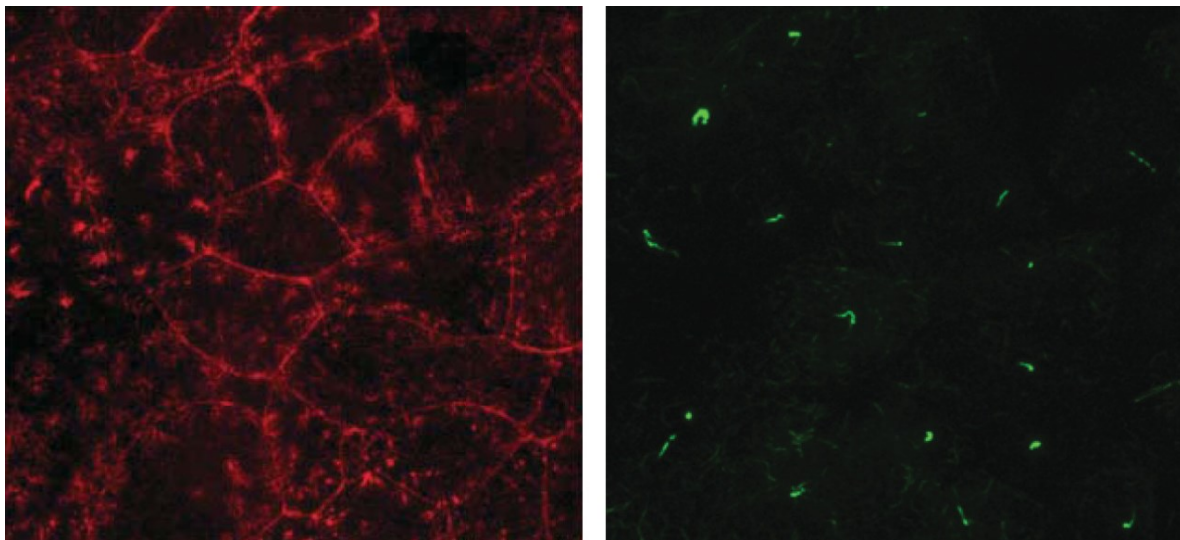
Výsledky získané v této studii ukázaly, že expozice VAN může být schopna vyvolat proliferativní odpověď v epitelálních buňkách ledvin, která může být spojena se změnou

mitochondriálních funkcí. Buněčná proliferace může být dle údajů pravděpodobně zprostředkována signální drahou MAPK (King DW. et al., 2004).

### 3.4 Buněčná linie OK

Buňky proximálního tubulu ledviny Vačice Severoamerické (OK) jsou spontánně immortalizovanou buněčnou linií. Tato linie byla odvozena v roce 1975 z ledvinové tkáně získané ze samice Vačice Severoamerické *Didelphis Virginiana*. I když buňky byly původně připraveny pro studie mechanismu inaktivace chromozomu X, další charakterizace odhalily, že představují vynikající model buněčné kultury, ve kterém lze zkoumat membránový transport a transport iontů v proximálních tubulech (Liapis H. et al., 1997; Eshbach ML. et al., 2017).

OK buňky si mimo jiné zachovávají mnoho morfologických a funkčních charakteristik proximálních tubulů, včetně kartáčového lemu (obr. 15), tvorby epiteliální monovrstvy snadno propustné pro ionty a vodu a vysoké apikální endocytární kapacity vzhledem k jiným buněčným liniím ledvin. Studie uskutečněné na OK buňkách významně přispěly k pochopení toho, jak je funkce proximálních tubulů regulována a udržována. Mezi další ne méně významné studie patří studie Prozialeck WC. a kol. (2006), ve které autoři potvrdili podobnost vlastností OK buněčné linie a proximálního tubulu *in vivo* (Eshbach ML. et al., 2017; Prozialeck WC. et al., 2006).



**Obrázek 15:** Diferenciovaná monovrstva buněk OK značena fluorescenčním barvením. OK buňky barveny rhodamin faloidinem a protilátkou proti acetylovanému tubulinu pro vizualizaci mikroklků (levá část) a primárních řasinek (pravá část); zobrazeny konfokální mikroskopií; s měřítkem 10  $\mu\text{m}$  (upraveno dle Eshbach ML. et al., 2017).

Buňky OK linie jsou nejčastěji kultivovány v DMEM F12 doplněném o 10% fetální hovězí sérum, 2 mmol/l L-glutamin, 100 U/ml penicilin a 100 µg/ml streptomycin (*Liapis H. et al., 1997; Al-Rasheed NM. et al., 2004*). Ve studii Eshbach ML. a kol. (2017) použili také ke kultivaci DMEM F12 doplněné o 10% fetální hovězí sérum, ale další přídavek činil již pouze 5mM Glutamaxu.

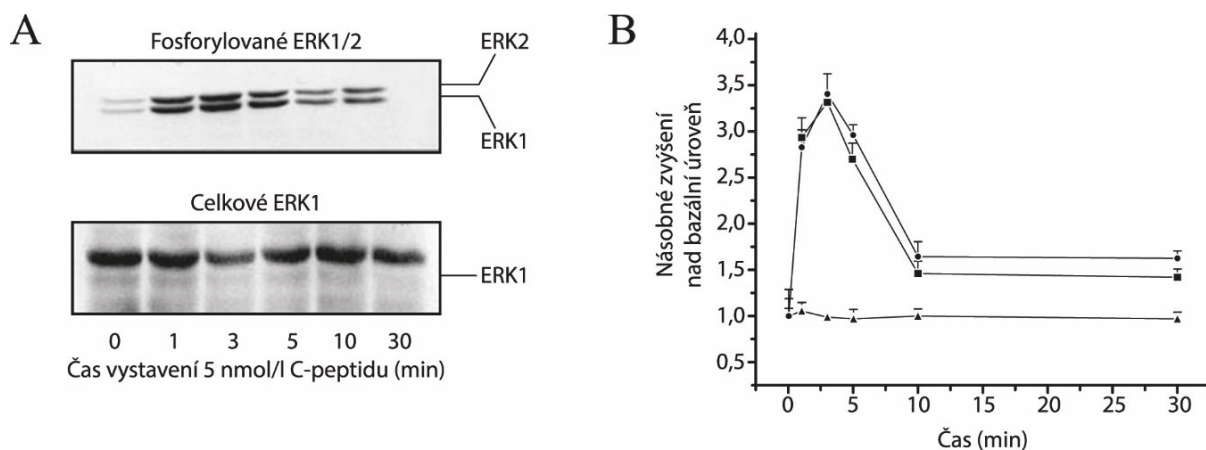
### 3.4.1 Studie: Potencionální aktivace signálních drah C-peptidem v buňkách OK

Zkoumat schopnost C-peptidu stimulovat intracelulární signální dráhy v buňkách proximálních tubulárních ledvin, jejichž změněná aktivace může pravděpodobně souviset s rozvojem diabetické nefropatie, bylo hlavní náplní studie Al-Rasheed NM. a kol. (2004). Výsledky byly stanoveny pomocí analytické techniky Western Blot detekující specifický protein ve směsi proteinů.

Proinzulinový peptid (C-peptid) je produkt enzymatického štěpení vznikající během biosyntézy inzulínu. Inzulin a C-peptid jsou uloženy společně v sekrečních granulích pankreatických beta buněk, a nakonec jsou uvolňovány současně a v ekvimolárních množstvích do portálního oběhu. C-peptid tvoří spojku mezi řetězci A a B inzulínu, což usnadňuje správné skládání a tím vytvoření disulfidových vazeb mezi sousedními cysteinovými zbytky (*Al-Rasheed NM. et al., 2004*).

K tomuto výzkumu byla použita immortalizovaná buněčná linie OK. Buňky byly ošetřeny 5 nmol/l C-peptidu po uvedené době 0-30 minut. Následně byly promyty pufrům, separovány a přeneseny na nitrocelulózové membrány, kde byly následně blokovány a imunoblotovány pomocí antiséra proti extracelulárnímu signálem regulované kináze (ERK) a proti fosforylované ERK. Primární protilátky byly následně vizualizovány pomocí sekundárních protilátek konjugovaných s peroxidázou. Celková ERK a fosforylovaná ERK byla detekována imunoblotem. Levý panel ukazuje reprezentativní skvrnu (obr. 16A). Pásky byly kvantifikovány a hodnoty vyjádřeny graficky v následujícím grafu (obr. 16B) (*Al-Rasheed NM. et al., 2004*).

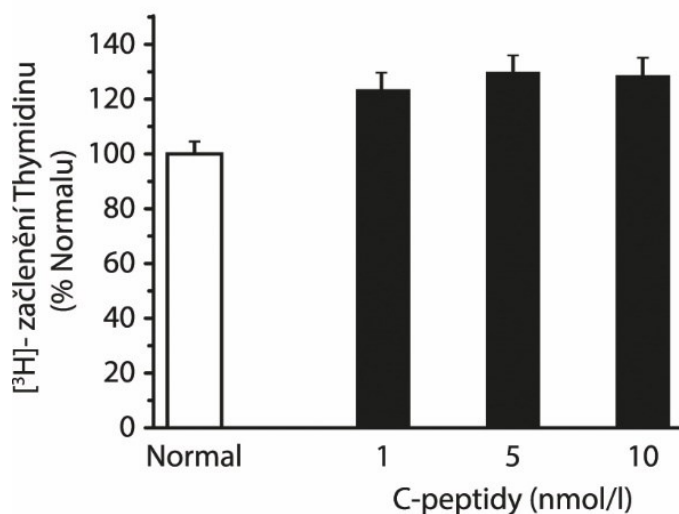
Inkubace OK buněk s C-peptidem vedla ke zvýšení fosforylované ERK v závislosti na čase. Maximální stimulace fosforylace oproti bazální stimulaci nastala po 3 minutách, která nadále klesala na plató mezi 10 a 30 minutami. Zvýšením ERK dochází k aktivaci mitogenní signální dráhy (*Al-Rasheed NM. et al., 2004*).



**Obrázek 16:** Graf fosforylované a celkové ERK u buněk OK. (A) Časový průběh stimulace ERK (celkové a fosforylované) při ošetření OK buněk C-peptidem o koncentraci 5 nmol/l v různých časových intervalech (0-30 minut), detekováno imunoblotem; (B) Fosforylované pásy po kvantifikaci, hodnoty vyjádřeny graficky v závislosti na čase. Trojúhelníky představují celkovou ERK, čtverce představují fosforylovanou ERK (upraveno dle Al-Rasheed NM. et al., 2004).

Po prokázání schopnosti C-peptidu aktivovat mitogenní signální dráhy v OK buňkách, autoři Al-Rasheed NM. a kol. pokračovali ve studii vlivu C-peptidu na buněčnou proliferaci. Inkubace OK buněk s C-peptidem po dobu 24 hodin vedla k zvýšení inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu (obr. 17). Toto zvýšení bylo maximální při 5 nmol/L C-peptidu. C-peptid tedy indukoval významné zvýšení proliferace OK buněk ve srovnání s kontrolou bez jakékoli stimulace.

#### Potencionální aktivace signálních drah C-peptidem



**Obrázek 17:** Graf inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu v závislosti na koncentraci C-peptidu. Bílý sloupec – kontrola, buňky OK bez ošetření C-peptidem; Černé sloupce – buňky OK stimulovány koncentracemi (1, 5, 10 nmol/l) C-peptidu po dobu 24 hodin (upraveno dle Al-Rasheed NM. et al., 2004).



V předchozí studii Li ZG. a kol. (2003) bylo uvedeno, že podobné koncentrace C-peptidu jsou mitogenní pro buňky lidského neuroblastomu (Li ZG. et al., 2003). Toto poslední zjištění je kompatibilní s výsledky studie Al-Rasheed NM. a kol. (2004) a naznačují, že ERK se podílí na proliferaci buněk a aktivaci mitogenní signální dráhy indukované C-peptidem. Nepřítomnost mitogenního účinku u diabetu může přispívat k hypertrofickým abnormalitám růstu ledvin pozorovaným u diabetické nefropatie. Závěrem autoři této studie doporučili další studie C-peptidu, jakožto terapeutického činidla při léčbě diabetu mellitu (Al-Rasheed NM. et al., 2004).

## 4 Buněčné kultury 3D

3D buněčná kultura je uměle vytvořená kultura, kde je umožněno biologickým buňkám růst a interagovat se svým okolím. Oproti 2D kulturám mohou 3D kultury *in vitro* růst ve všech směrech podobně jako v *in vivo* prostředí (Fang Y. et al., 2017).

V roce 2009 v přelomové studii Sato T. a kol. (2009) bylo prokázáno, že dospělé střevní kmenové buňky exprimující leucin s obsahem receptoru 5 a G proteinem (Lgr5) mohou tvořit 3D střevní organoidy v Matrigelu. Buňky se samy organizují a diferencují do struktur krypt a klků přesně jako v *in vivo* případě. Jednalo se o první zprávu týkající se vytvoření 3D organoidní kultury odvozené z jediné dospělé kmenové buňky. Tato práce připravila scénu pro mnoho následných organoidních prací v jiných systémech (např. žaludek, játra, plíce a ledviny).

Nedávný vývoj 3D kultivačních systémů umožnil částečně rekapitulovat složitost savčí organogeneze *in vitro* a také umožnil generování transplantovatelných tkání. Kultivace lidských derivátů ve 3D otevřela nové obzory pro zkoumání lidského vývoje a vývoj použití regenerativní medicíny (Huch M. et al., 2015). V posledních letech se zrychlila implementace 3D buněčných kultur při objevování léků, hlavně díky potřebě neustále vylepšovat produktivitu farmaceutického vývoje a výzkumu. Použití 3D buněčných kultur umožňuje větší předvídatelnost účinnosti a toxicity léčiv u lidí, předtím než se léčivo přesouvá do klinických studií. 3D modely buněčných kultur jsou výhodné v tom, že umožňují nejen hodnocení bezpečnosti a účinnosti léčiva *in vitro*, ale také eliminují mezidruhové rozdíly (Antoni D. et al., 2015; Fang Y. et al., 2017).

## 4.1 Sféroidy

Mnohobuněčné kultury původně vyvinuty Sutherlandem a kol. v roce 1970, byly vytvořeny, aby rekapitulovaly funkční fenotyp lidských nádorových buněk a jeho reakci na radioterapii. Od té doby byly sféroidní kultury aplikovány na mnoho dalších typů buněk včetně kmenových buněk, hepatocytů atd. Došlo také k adaptaci nádorových sféroidních monokultur s imunitními nebo endoteliálními buňkami, pro experimentální výzkum rakoviny a pro screening onkologických léků. Sféroidy jsou typem 3D modelu buněk, které kompenzují nedostatky pozorované u jednovrstevných kultur. Příkladnou kompenzací je schopnost sféroidu vyvinout gradient kyslíku, živin a metabolitů, a tak vytvořit heterogenní buněčnou populaci (Fang Y. et al., 2017).

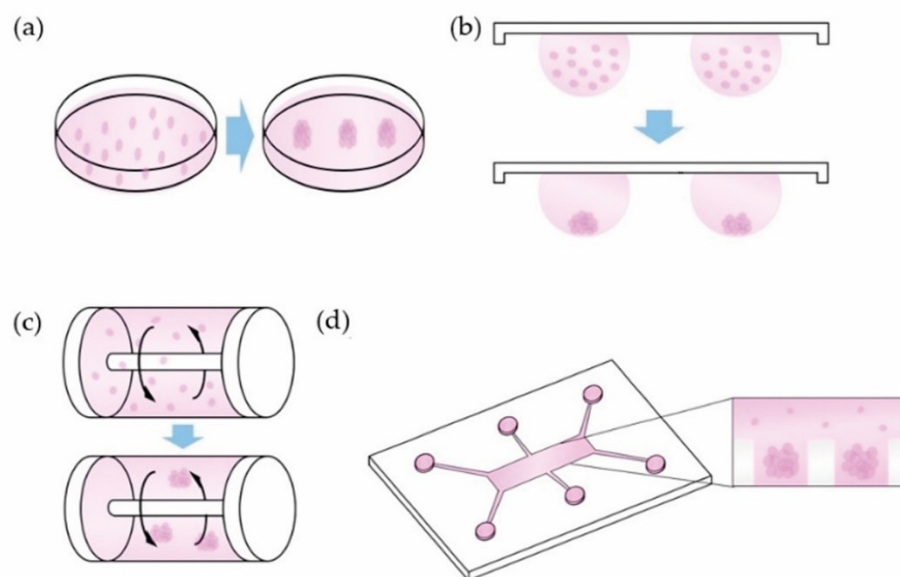
Toxikologické studie dokázaly, že 3D buněčné kultury jsou téměř na stejné úrovni jako studie *in vivo* pro testování toxicity léčiv. Autoři ve studii Fey SJ a kol. (2012) porovnávali hodnoty 6 běžných léků (acetaminofen, amiodaron, diklofenak, metformin, fenformin a kyselinu valproovou) s hodnotami ze studií *in vivo*. Výsledkem byla korelace hodnot 3D sferoidů s hodnotami ze studií *in vivo*. Ačkoli 2D buněčné kultury byly a nadále jsou používány k testování toxicity, 3D sféroidy se ukázaly jako lepší nástroj při testování chronické expoziční toxicity, protože mají delší životaschopnost (Fey SJ et al., 2012).

Existují celkem čtyři možné typy, jak umožnit kultivaci sféroidů. První možností je použití destiček s povrchovým potahem (Obr. 18a), který má nízkou přilnavost, k podpoře samoagregace buněk do sféroidů. Mimo jiné mají destičky přesně definovanou geometrii – mají kulatý tvar se zkoseným dnem. Klíčovou výhodou tohoto typu kultivace je tvorba, propagace a testování sféroidů na stejné destičce, umožňující vysoce výkonný screening (Corrò C. et al., 2020; Fang Y. et al., 2017).

Druhou možností je použití závěsných desek k podpoře tvorby mnohobuněčných sféroidů (obr. 18b). Buňky v médiu jsou dávkovány do horní části závěsných desek, buňky jsou segregovány do samotné kapičky média vytvořené pod otvorem dna jamky závěsné desky. Zásadní nevýhodou je nutnost přenosu sféroidu na druhou destičku pro případné testy.

Třetím možným postupem je použití bioreaktoru (např. rotační baňky) k pohonu samoagregace buněk do sféroidů za podmínek dynamické kultivace (obr. 18c). Tento typ umožňuje produkci sféroidů ve velkém měřítku. Nevýhodou je nestejnomyšlnost velikosti produkovaných sféroidů.

Čtvrtým a posledním postupem je použití povrchů s mikro nebo nano vzorem jako oporou pro řízení adheze a migrace buněk (obr. 18d). Jedná se o destičky s natištěnými mikro vzory, s výhodou malé variace mezi jamkami a destičkami. Avšak nevýhodou je možná tvorba bublinek během kultivace a pipetování, které často poškozuje povrchový vzorek destičky (Fang Y. et al., 2017).



**Obrázek 18:** Schémata technických metod kultivace sféroidů. (A) Destičky s povrchovým potahem; (B) Závěsná deska; (C) Rotující nástěnná nádoba (bioreaktor); (D) Destička s natištěným mikro vzorem (upraveno dle Ryu NE. et al., 2019).

## 4.2 Organoidy

Moderní termín organoid se týká buněk rostoucích v definovaném 3D prostředí *in vitro* za vzniku mini-shluků buněk. Tyto buňky se samy organizují a diferencují na funkční typy buněk, rekapitulují strukturu a funkci orgánu *in vivo*. Proto je možné je nazývat také mini-orgány nebo orgánové pupeny. Organoidy mohou být odvozeny z embryonálních kmenových buněk, indukovaných pluripotentních kmenových buněk, neonatálních nebo dospělých kmenových buněk. A to procesem podobným způsobu, jakým orgán získává svou typickou organizaci (Corrò C. et al., 2020).

3D kultivační systém je založen na suspenzní kultivaci, aby nedošlo k přímému kontaktu s miskou. Toho lze dosáhnout pomocí techniky s nebo bez podpory tzv. Scaffold technika. Podporami jsou biologické nebo syntetické hydrogely, které se podobají přirozené extracelulární matrix. Nejčastěji používanou směsí je Matrigel, heterogenní želatinovo-proteinová směs vylučovaná buňkami myšího sarkomu *Engelbreth-Holm-Swarm*.

Hlavní výhodou podpory je, že obsahuje adhezivní proteiny jako je kolagen, enlaktin, laminin a heparinsulfátové proteoglykany, které se podobají extracelulárnímu prostředí a poskytují tudíž buňkám strukturální oporu a signály extracelulární matrix. V opačném případě, kdy není podpora využita jsou buňky kultivovány v kapičkách definovaného kultivačního média visícího na misce gravitací a povrchovým napětím (Astashkina AI. *Et al.*, 2012; Corró C. *et al.*, 2020).

Vývoj fyziologicky a funkčně vysoce přesné náhrady ledvinové tkáně je obzvláště zajímavý pro klinické požadavky na transplantaci ledvin. Ledvina vzniká z intermediárního mezodermu prostřednictvím signalizace *Wingless / Int-1* (Wnt) a fibroblastového růstového faktoru (Fgf), která se vyvine do uterického pupenu a metanefrického mezenchymu za vzniku časných renálních tubulů. Wnt je důležitou signalizační kaskádou, která reguluje buněčnou proliferaci a podílí se na vývoji orgánů (Corró C *et al.*, 2020).

#### 4.2.1 Studie: Schopnost 3D kultur reagovat na expozice acetonu a CisPt

Ve studii Astashkina AI. a kol. (2012) bylo hodnoceno schopnost 3D kultur zvýšit regulaci enzymu CYP2E1 a Kim-1 proteinu v reakci na známé nefrotoxiny, aceton a CisPt. Výsledky byly stanoveny pomocí spektrálního konfokálního mikroskopu.

Aby bylo možné využít vyvinuté 3D organoidní kultury, bylo nutné stanovit buněčnou schopnost reagovat na expozice nefrotoxických látek s ukazateli toxicity měřitelnými pouze *in vivo*. Cytochrom CYP2E1 byl studií vybrán, protože je jedním z nejhojněji exprimovaných enzymů v myších ledvinách a společným cílem pro detoxikaci exogenních látek. Kromě toho *in vivo* aceton indukuje nefrotoxicitu u hlodavců a je také dobře zavedeným substrátem pro biotransformaci CYP2E1. Podobně je Kim-1 jedním z nejcitlivějších markerů nefrotoxicity a běžně se používá jako charakteristický znak obecného poškození ledvin *in vivo*. Kim-1 up-regulace v reakci na cisplatinou indukovanou toxicitu je dobře charakterizovaný jev jak u hlodavců, tak u lidí. CisPt, silné chemoterapeutické léčivo omezené v klinickém použití těžkou toxicitou tubulárních buněk, byla v této práci aplikována na 3D organoidní kulturu v koncentraci odpovídající běžné klinické dávce u myši (20 mg/kg). Tato dávka způsobuje poškození ledvin za 3 dny a byla použita, aby se zajistilo nejrelevantnější srovnání mezi *in vivo* a *in vitro* systémy.

Organoidy byly vystaveny 1% acetonu nebo 1,7 mM cisplatině po dobu 3 dnů. Expres CYP2E1 a Kim-1 v epitelálních buňkách proximálního tubulu byla stanovena pomocí imunofluorescence. Pozitivní barvení CYP2E1 i Kim-1 v reakci na aceton a CisPt

potvrdilo dříve publikované údaje o nefrotoxicitě acetonu a Cispt. A tím ve studii Astashkina AI. a kol. (2012) byla potvrzena schopnost 3D organoidní kultury reagovat na endogenní toxické látky s biomarkery relevantními *in vivo* (Astashkina AI. *et al.*, 2012).

## ZÁVĚR

I když je v dnešní době kladen důraz na vývoj léků bez vedlejších účinků, existuje řada klinicky významných léků, které se i přes závažné vedlejší účinky stále používají. Jedním z příkladů nefrotoxických léků popsaných v této práci je cisplatina. Cisplatina, jakožto cytostatikum používané v onkologii k léčbě nádorových onemocnění, má právě zmíněné nefrotoxické účinky na ledviny, způsobující apoptózu a nekrózu tubulárních buněk. Na druhou stranu existují studie s cílem nalézt nebo zkoumat látky s ochranným účinkem nebo látky s prediktivním charakterem nefrotoxicity.

Tato bakalářská práce je zaměřená na popis vybraných savčích buněčných kultur a jejich využití, obzvláště zaměřené na studium poškození ledvin. Praktické použití jednotlivých buněčných kultur je podloženo vědeckými studiemi. V současné době zlatý standard pro modely kultur podobných ledvinám zahrnuje použití právě primárních nebo imortalizovaných buněčných linií kultivovaných na běžných 2D plastových površích. Na druhou stranu jsou tyto buněčné linie omezené z hlediska některých buněčných mechanismů, a nejsou proto přirozeně schopné reagovat na složité vnější patofyziologické stimuly. Vzhledem k omezeným buněčným mechanismům jsou údaje testů získané z reakce buněčné kultury na toxické léčivo omezeny na jednoduchá pozorování změn životaschopnosti buněk a jejich proliferace.

Tenhle problém však řeší novější buněčné kultury (3D), které věrně napodobují přirozené fyziologické vlastnosti a podmínky a zároveň také podporují vývoj nových léčebných postupů v preklinické fázi. Jejich základnímu shrnutí včetně rozdělení se věnuje závěr mé práce.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Abaandou LA, Quan D, Shiloach J. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells*, 10,1667; 2021. doi: 10.3390/cells10071667.
- [2] Al-Rasheed NM, Meakin F, Royal EL, et al. Potent activation of multiple signalling pathways by C-peptide in opossum kidney proximal tubular cells. *Diabetologia*, 47(6): 987-997; 2004. doi: 10.1007/s00125-004-1404-9.
- [3] Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *International journal of molecular sciences*, 16(3): 5517-27; 2015. doi: 10.3390/ijms16035517.
- [4] Aschauer L, Limonciel A, Wilmes A, Stanzel S, Kopp-Schneider A, Hewitt P, Lukas A, Leonard MO, Pfaller W, Jennings P. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: A transcriptomic study. *Toxicology in vitro*, 30(1): A106-116; 2015. doi: 10.1016/j.tiv.2014.10.005.
- [5] Astashkina AI, Mann BK, Prestwich GD, Grainger DW. A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays. *Biomaterials*. 33(18): 4700-11; 2012. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.063.
- [6] Balakumar P, Rohilla A, & Thangathirupathi A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: do we have a promising therapeutic approach to blunt it?. *Pharmacological research*, 62(3): 179-186; 2010. doi: 10.1016/j.phrs.2010.04.004.
- [7] Bonora M, Giorgi C, Pinton P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23(4): 266-285; 2022. doi: 10.1038/s41580-021-00433-y.
- [8] Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11): 3265–3268; 2009. doi: 10.1093/ndt/gfp010.

- [9] Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1;319(1):C151-C165; 2020. doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [10] Choi KH, Kim TI, Chong DL, Lee HY, Han DS. Gentamicin induced apoptosis of renal tubular epithelial (LLC-PK1) cells. *Korean J Intern Med*, 15(3):218-23; 2000. doi: 10.3904/kjim.2000.15.3.218.
- [11] Dustin T, Lukas H. Cyclosporine: A Review. *Journal of Transplantation*, Article 7; 2012. doi: 10.1155/2012/230386.
- [12] Eaton DC, Pooler JP. *Vander's renal physiology*. Mc Graw Hil Medicall, 1,2 (24-38); 2009. ISBN: 978-0-07-161304-0.
- [13] Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis*, 15(3): 222-234; 2008. doi: 10.1053/j.ackd.2008.04.003.
- [14] Eshbach ML, Sethi R, Avula R, Lamb J, Hollingshead DJ, Finegold DN, Locker JD, Chandran UR, Weisz OA. The transcriptome of the *Didelphis virginiana* opossum kidney OK proximal tubule cell line. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1,313(3): F585-F595; 2017. doi: 10.1152/ajprenal.00228.2017.
- [15] Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov*, 22(5): 456-472; 2017. doi: 10.1177/1087057117696795.
- [16] Fey SJ, Wrzesinski K. Determination of drug toxicity using 3D spheroids constructed from an immortal human hepatocyte cell line. *Toxicol Sci*, 127(2): 403-11; 2012. doi: 10.1093/toxsci/kfs122.
- [17] Filippone EJ, Kraft WK, Farber JL. The Nephrotoxicity of Vancomycin. *Clin Pharmacol Ther*, 102(3): 459-469; 2017. doi: 10.1002/cpt.726.



- [18] Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 812(1–2): 119-133; 2004. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.07.039.
- [19] Girndt, M. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. *Internist* 58(243–256); 2017. doi: 10.1007/s00108-017-0195-2.
- [20] Griffin BR, Faubel S, Edelstein CL. Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Ther Drug Monit*, 41(2): 213-226; 2019. doi: 10.1097/FTD.0000000000000589.
- [21] Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int*, 66(2): 523-527; 2004. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.761\_11.x.
- [22] Handl JI, Čapek JA, Majtnerová PA, Báčová JA, Roušar TO. The Effect of Repeated Passagigng on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds. *Physiol. Res.* 69(4): 731-738; 2020. doi: 10.33549/physiolres.934491.
- [23] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 1(8,12): 3905-10; 1989. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08570.x.
- [24] Hu JN, Xu XY, Jiang S, Liu Y, Liu Z, Wang YP, Gong XJ, Li KK, Ren S, & Li W. Protective effect of ginsenoside Rk1, a major rare saponin from black ginseng, on cisplatin-induced nephrotoxicity in HEK-293 cells. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 36(9); 2020. doi: 10.1002/kjm2.12220.
- [25] Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, 15,142(18): 3113-25; 2015. doi: 10.1242/dev.118570.
- [26] Ix JH, Shlipak MG. The Promise of Tubule Biomarkers in Kidney Disease: A Review. *Am J Kidney Dis*, 78(5): 719-727; 2021. doi: 10.1053/j.ajkd.2021.03.026.

- [27] Jang M, Pete ES, Bruheim P. The impact of serum-free culture on HEK293 cells: From the establishment of suspension and adherent serum-free adaptation cultures to the investigation of growth and metabolic profiles. *Front Bioeng Biotechnol.* 6;10:964397; 2022. doi: 10.3389/fbioe.2022.964397.
- [28] Jedrzejczak-Silicka MA. History of Cell Culture. In *New Insights into Cell Culture Technology*, InTech; 2017. doi: 10.5772/66905.
- [29] Jenkinson SE, Chung GW, van Loon E, Bakar NS, Dalzell AM, Brown CD. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflugers Arch*, 464(6): 601-11; 2012. doi: 10.1007/s00424-012-1163-2.
- [30] Jiang PE, Ren LE, Zhi LI, Hu XI, Xiao RP. Protocol for cell preparation and gene delivery in HEK293T and C2C12 cells. *Star protocol*, 2021. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100497.
- [31] Kim SS, Shin N, Bae SS, Lee MY, Rhee H, Kim IY, Seong EY, Lee DW, Lee SB, Kwak IS, Lovett DH, Song SH. Enhanced expression of two discrete isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental and human diabetic nephropathy. *PLoS One*, 8;12(2):e0171625; 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0171625.
- [32] King DW, Smith MA. Proliferative responses observed following vancomycin treatment in renal proximal tubule epithelial cells. *Toxicol In vitro*, 18(6): 797-803; 2004. doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.013.
- [33] Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 80(10): 1129-1134; 2009. PMID: 19904897.
- [34] Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab Res Rev*, 19(5): 375-385; 2003. doi: 10.1002/dmrr.389.

- [35] Liapis H, Vogler G, Steinhardt GF. North American opossum *Didelphis virginiana* as a fetal nephrotoxicity model: histologic and ultrastructural assessment of uranyl nitrate (UN)-induced damage. *Microsc Res Tech*, 1;39(3):285-96; 1997. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19971101)39:3<285::AID-JEMT7>3.0.CO;2-J.
- [36] Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767; 2014. doi: 10.1038/ncomms5767
- [37] Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R, Varley GP, Hatton D, Grassi L, Svensson T, Nielsen J, Rockberg J. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Sci Rep* 10, 18996; 2020. doi: 10.1038/s41598-020-76137-8.
- [38] Mazer M, Perrone J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology clinical manifestations, and management. *Journal of Medical Toxicology*, 4: 2-6; 2008. doi: 10.1007/BF03160941.
- [39] Mercado MG, Smith DK, Guard EL. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*, 100(11): 687-694; 2019. PMID: 31790176.
- [40] Mori Y, Yoshida Y, Satoh A, Moriya H. Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells. *Sci Rep*. 16;10(1):4798; 2020. doi: 10.1038/s41598-020-61646-3.
- [41] Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology*, 12(11): 233; 2011. doi: 10.1186/gb-2011-12-11-233.
- [42] Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Medina-Campos ON, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Torres I, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:135314; 2013. doi: 10.1155/2013/135314.

- [43] Nema RA, Khare SA. An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3: 219-226; 2012. doi: 10.4236/abb.2012.33030.
- [44] Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*, 33(13):1635-1701; 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehs092.
- [45] Pfaller W, Gstraunthaler G. Nephrotoxicity testing *in vitro* – what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect*, 106(2): 2 559-69; 1998. doi: 10.1289/ehp.98106559.
- [46] Priante G, Ceol M, Giancesello L, Furlan C, Del Prete D, Anglani F. Human proximal tubular cells can form calcium phosphate deposits in osteogenic culture: role of cell death and osteoblast-like transdifferentiation. *Cell Death Discov*, 5:57; 2019. doi: 10.1038/s41420-019-0138-x.
- [47] Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, Smith CS. Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for *in vitro* toxicity studies. *Toxicol In vitro* 20: 942–953; 2006. doi: 10.1016/j.tiv.2005.11.006.
- [48] Radi ZA. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *Int J Toxicol*, 38(3): 215-227; 2019. doi: 10.1177/1091581819831701.
- [49] Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute kidney injury: a guide to diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 1;86(7): 631-9, 2012. PMID: 23062091.

- [50] Remak R. Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbelthiere. Reimer, 1855.
- [51] Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*, 45(1): 48-57; 1994. doi: 10.1038/ki.1994.6.
- [52] Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8(12): 1620; 2019. doi: 10.3390/cells8121620.
- [53] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244): 262-5; 2009. doi: 10.1038/nature07935.
- [54] Scarinci N, Perez PL, Cantiello HF, Cantero MDR. Polycystin-2 (TRPP2) regulates primary cilium length in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Front Physiol*; 4; 13:995473; 2022. doi: 10.3389/fphys.2022.995473.
- [55] Sourial S, Marcusson-Ståhl M, Cederbrant K. Meso Scale Discovery and Luminex Comparative Analysis of Calbindin D28K. *Biomed Research International*; 2009. doi: 10.1155/2009/187426.
- [56] Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int*, 81(9): 819-825; 2012. doi: 10.1038/ki.2011.339.
- [57] Sohn SJ, Kim SY, Kim HS, Chun YJ, Han SY, Kim SH, Moon A. *In vitro* evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicology Letters*, 217(3): 235-242; 2013. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.12.015.
- [58] Thakar CV, Quate-Operacz M, Leonard AC, Eckman MH. Outcomes of hemodialysis patients in a long-term care hospital setting: a single-center study. *Am J Kidney Dis*, 55(2): 300-306; 2010. doi: 10.1053/j.ajkd.2009.08.021.

- [59] Tiong HY, Huang P, Xiong S, Li Y, Vathsala A, Zink D. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical *in vitro* models. *Molecular Pharmaceutics*, 11 (7): 1933-1948; 2014. doi: 10.1021/mp400720w.
- [60] Vallianou NG, Mitesh S, Gkogkou A, Geladari E. Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Is there Any Relationship?. *Current cardiology reviews*, 15(1): 55-63; 2019. doi: 10.2174/1573403X14666180711124825.
- [61] Vrbova M, Dastychova E, Rousar T. Renal cell lines for study of nephrotoxicity *in vitro*. *Mil Med. Sci. Lett*, 85(2): 69-74; 2016. doi: 10.31482/mmsl.2016.013.
- [62] Vrbová M, Roušarová E, Brůčková L, Česla P, Roušar T. Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological research*, 65(4): 627-635; 2016. doi: 10.33549/physiolres.933158.
- [63] Wald R, Quinn RR, Luo J, Li P, Scales DC, Mamdani MM, Ray JG. Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA*, 302(11): 1179-1185; 2009. doi: 10.1001/jama.2009.1322.
- [64] Wang CS, Greenbaum LA. Nephrotic Syndrome. *Pediatr Clin North Am*, 66(1): 73-85; 2019. doi: 10.1016/j.pcl.2018.08.006.
- [65] Wang X, Wang X, Zhang J, Shan Q, Zhu Y, Xu C, Wang J. Prediction and Verification of Curcumin as a Potential Drug for Inhibition of PDCoV Replication in LLC-PK1 Cells. *Int J Mol Sci*, 20;24(6):5870; 2023. doi: 10.3390/ijms24065870.
- [66] Weening JJ, Jennette JC. Historical milestones in renal pathology. *Virchows Arch*, 461(1): 3-11; 2012. doi: 10.1007/s00428-012-1254-7.
- [67] Xu ZH, Jia KE, Wang HU, Gao FE, Zhao SO, Li FA, Hao JU. METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway via PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease. *Cell Death Dis*, 4;12(1):32; 2021. doi: 10.1038/s41419-020-03312-0.

- [68] Yao CL, Moggane B, Leander M, Irma L, Nadine VR, Arne S, Joke R, Matthieu M, Stéphane P, Radoje D, Jason Ch, Frank S, Diether L, Yves VP, Jan T, Nico C. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5: 4767; 2014. doi: 10.1038/ncomms5767.
- [69] Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *The American journal of the medical sciences*, 334(2): 115-124; 2007. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
- [70] Yin R, Gu L, Li M, Jiang C, Cao T, Zhang X. Gene expression profiling analysis of bisphenol A-induced perturbation in biological processes in ER-negative HEK293 cells. *PLoS One*, 9(6): e98635; 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0098635.
- [71] Zhang L, Mu X, Fu J, Zhou Z. *In vitro* cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict terget-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicology in vitro*, 21: 4; 2007. doi: 10.1016/j.tiv.2007.01.013.