

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

REGENERACE LEDVIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Dorota Hájková

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Martina Hauschke, Ph.D.

KONZULTANT: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

THE KIDNEY REGENERATION

BACHELORS THESIS

AUTHOR: Dorota Hájková
SUPERVISOR: Mgr. Martina Hauschke, Ph.D.
CONSULTANT: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dorota Hájková**
Osobní číslo: **C14203**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Regenerace ledvin**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zpracujte literární rešerši zaměřenou na tematiku regenerace ledvin. V kompilační práci se nejprve zaměřte na stručný popis anatomie a histologie ledvin. Následně detailněji popište mechanismy uplatňující se při regeneraci poškozených ledvinných buněk, dále se zaměřte na roli signálních molekul při těchto procesech a na využití různých terapeutických postupů při regeneraci poškozených ledvin.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martina Hauschke

Katedra biologických a biochemických věd

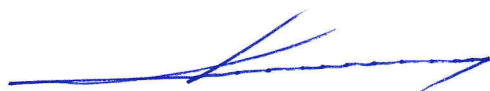
Konzultant bakalářské práce:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

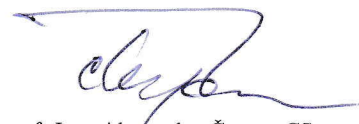
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 7. 2017

.....

Hájková Dorota

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hauschke, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady a drahocenný čas, který mi při zpracování této bakalářské práce věnovali. Dále bych ráda poděkovala svému příteli a rodině za to, že mi byli oporou při studiu a psaní této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá regenerací ledvin. V úvodu této práce je obecně popsána stavba ledvin, jednotlivých částí nefronu a funkce ledvin. Další část je zaměřena na poškození ledvin a možné přístupy k jejich následné regeneraci. V práci jsou podrobněji popsány signální dráhy a jednotlivé růstové faktory, které se mohou v procesu regenerace uplatňovat. Na závěr je diskutován možný vliv kmenových buněk při regeneraci ledvin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ledviny, akutní poškození ledvin, regenerace ledvin, růstové faktory, kmenové buňky.

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on the topic of kidney regeneration. At the beginning of this work are described the general structure of kidneys, individual parts of nephron and kidney functions. The next part of this work is focused on the kidney injury and possible approaches to the renal regeneration. The signal pathways and the individual growth factors that can be applied in the renal regeneration processes are described more detailed. Finally, the possible effect of stem cells in kidney regeneration is discussed.

KEYWORDS

Kidneys, acute kidney injury, kidney regeneration, growth factors, stem cells.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKI	<i><u>A</u>cute <u>K</u>idney <u>I</u>njury – akutní poškození ledvin</i>
Akt	<i><u>P</u>rotein <u>K</u>inase <u>B</u> (= PKB)</i>
Ang	<i><u>A</u>ngiopoetin</i>
EGF	<i><u>E</u>pidermal <u>G</u>rowth <u>F</u>actor – epidermální růstový faktor</i>
FGF	<i><u>F</u>ibroblast <u>G</u>rowth <u>F</u>actor – fibroblastový růstový faktor</i>
GSK-3	<i><u>G</u>lycogen <u>S</u>ynthase <u>K</u>inase-3</i>
HGF	<i><u>H</u>epatocyte <u>G</u>rowth <u>F</u>actor – růstový faktor hepatocytů</i>
IGF-1	<i><u>I</u>nsulin-like <u>G</u>rowth <u>F</u>actor 1 – růstový faktor-1</i>
JAK	<i><u>J</u>anus-<u>A</u>ctivated <u>K</u>inase</i>
KB	<i><u>K</u>menové <u>B</u>uňky</i>
MAPK	<i><u>M</u>itogen-<u>A</u>ctivated <u>P</u>rotein <u>K</u>inase</i>
mTOR	<i><u>M</u>ammalian <u>T</u>arget <u>O</u>f <u>R</u>apamycin</i>
PI3K	<i><u>P</u>hosphatidyl<u>I</u>nositol-<u>3</u>-<u>K</u>inase</i>
STAT	<i><u>S</u>ignal <u>T</u>ransducer and <u>A</u>ctivator of <u>T</u>ranscription</i>
TGFβ-1	<i><u>T</u>ransforming <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>B</u>eta 1 – transformující růstový faktor beta-1</i>
VEGF	<i><u>V</u>ascular <u>E</u>ndothelial <u>G</u>rowth <u>F</u>actor – vaskulární endoteliální růstový faktor</i>
Wnt	<i><u>W</u>ingless-type <u>M</u>MTV <u>i</u>ntegration site family</i>

OBSAH

1. <u>ÚVOD</u>	11
2. <u>Anatomie a histologie ledvin</u>	12
2.1 Struktura a funkce nefronu	13
2.1.1 <i>Ledvinné tělísko</i>	14
2.1.2 <i>Tubulární části nefronu</i>	16
3. <u>Regenerace ledvin</u>	19
3.1 Mechanismy regenerace ledvin	21
3.1.1 <i>Růstové faktory</i>	23
3.1.2 <i>Makrofágy a Wingless-type MMTV integration site family member 7b</i>	28
3.1.3 <i>Dediferenciace a proliferace</i>	29
3.1.4 <i>Signální dráhy</i>	30
3.2 Využití kmenových buněk při regeneraci ledvin	35
3.2.1 <i>Endoteliální kmenové buňky</i>	36
3.2.2 <i>Indukované pluripotentní kmenové buňky</i>	38
3.2.3 <i>Buňky odvozené z kostní dřeně</i>	39
3.2.4 <i>Renální progenitorové buňky</i>	41
3.3 Angiogenese a v regeneraci ledvin	42
3.4 Bioinženýrství	45
4. <u>ZÁVĚR</u>	47
5. <u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u>	48

1. ÚVOD

Ledviny hrají nezastupitelnou roli v procesu vylučování odpadních produktů metabolismu endo- a exogenních látek z těla. Tímto způsobem jsou z těla odváděny odpadní produkty. Vzhledem k tomu, že poškození ledvin nezřídka končí úmrtím, je velmi důležité studovat směry, které mohou napomoci při procesu jejich regenerace. I přes to, že je v ledvinách za fyziologických podmínek omezený obrat buněk, má tento orgán pozoruhodnou schopnost obnovit funkci a přežít různá poškození. Existují různé způsoby, jak přimět ledviny se regenerovat. Jednou z možností jsou růstové faktory či makrofágy, které tyto faktory mohou vylučovat. Schopnost dediferenciace, kterou mají zejména epitelové buňky proximálních tubulů, má také své zastoupení v této problematice. Dále lze při regeneraci využít modulaci signálních drah či faktory ovlivňující angiogenesi. Velmi perspektivním řešením v oblasti renální regenerace je také výzkum kmenových buněk a bioinženýrství.

2. Anatomie a histologie ledvin

Ledviny jsou párový orgán fazolovitého tvaru odpovědné za tvorbu moči (Krstić, 1991). V organismu plní především vylučovací funkci. Nezastupitelnou roli mají také v udržování homeostázy, ke které přispívají pohotovými změnami v množství a složení moči. Prostřednictvím moči se z těla odvádějí odpadní produkty metabolismu endogenních (močovina, kreatinin, kyselina močová aj.) a exogenních látek (léky, jedy či těžké kovy), či přebytek vody a solí. Dále ledviny přispívají k zabezpečení řady biologických funkcí organismu (udržování stálého objemu a osmolality extracelulární tekutiny, udržování acidobazické rovnováhy, regulace krevního tlaku prostřednictvím sekrece reninu, řízení krve tvorby tvorbou erythropoetinu, podíl na tvorbě aktivní formy vitamínu D₃ aj.) (Merkunová et al., 2008).

Tento párový orgán je uložen retroperitoneálně v dutině břišní po obou stranách bederní páteře (Merkunová et al., 2008). Ledviny jsou mobilní a jejich poloha se mění v průběhu dýchání. Pravá ledvina se však nachází o něco níže než levá, neboť jsou nad ní uložena játra (Wood et al., 2008). Každá ledvina je dlouhá přibližně 10 – 12 cm, široká 5 – 7 cm, tlustá 3 – 7 cm a váží průměrně 130 – 150 g (Moinuddin et al., 2015). Parenchym ledvin je rozdělen na vnější kůru a vnitřní dřev. Renální kůra je granulovaná blast, která je široká přibližně 7 – 10 mm. Skládá z renálních tělísek, proximálních a distálních stočených tubulů nefronů, obloukových sběrných kanálků a medulárních paprsků. Dřev ledvin je jemně pruhovaná oblast, která je složená z 8 – 18 renálních pyramid. Jejich papily pronikají do menších kalichů, jejichž základy sousedí s kůrou. Ze základny každé pyramidy se rozprostírají medulární paprsky, které jsou součástí kůry. Dřev je složena z přímých proximálních a distálních tubulů, Henleových kliček, sběrných kanálků a papilárních kanálků (Wood et al., 2008; Krstić, 1991; de Boer et al., 2016).

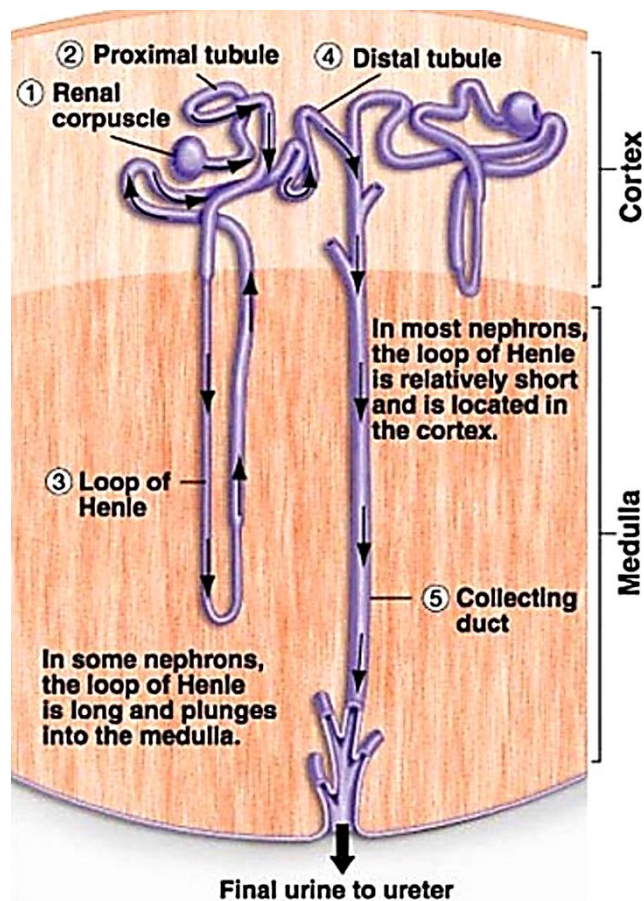
Mediální stranu ledviny tvoří oblast, která se nazývá hilus, kterým vstupují a vystupují lymfatické cévy, krev a nervové buňky, a ze kterého vychází močovod. Hilus se otevírá do zploštělé dutiny zvané ledvinový sinus, která je plná bílé adipózní tkáně, přes kterou prochází renální tepna a žíla, lymfatické cévy a nervové buňky. V renálním sinu je část, která se nazývá ledvinová pánvička, která je spojena s močovým měchýřem a malými a velkými kalichy. Stroma ledviny se skládá z vláknitého pouzdra, které je tvořeno hustou pojivovou tkání a volnou pojivovou tkání. Zvenčí je ledvina obalena tukovým pouzdem (Moinuddin et al., 2015; Krstić, 1991; de Boer et al., 2016).

2.1 Struktura a funkce nefronu

Základní funkční jednotkou ledvin jsou nefrony a v každé ledvině jich je více než milion. Nefron je členěn na heterogenní glomerulární (glomerulus, Bowmanovo poudro) a tubulární části (proximální tubulus, Henleova klička, distální tubulus, sběrací kanálek), které jsou tvořeny různými epiteliálními buněčnými populacemi. Jednotlivé buňky tvořící danou část nefronu mají vysoce specializované strukturální i funkční vlastnosti, které se v jednotlivých částech nefronu různí. Díky těmto rozdílům jsou jednotlivé části nefronu uzpůsobeny k vykonávání jednotlivých funkcí (*Pfaller et al., 1998*).

Existují dva typy nefronů – juxtamedulární a kortikální nefrony. Juxtamedulární nefrony jsou uloženy v kůře blízko dřene. Jsou charakterizovány renálním tělískem, které je větší než tělísko kortikálních nefronů dlouhou Henleovou kličkou a jejich dlouhým tenkým segmentem. Kortikální nefrony jsou uloženy v okrajové části kůry. Tento typ nefronů má kratší Henleovu kličku než nefrony juxtamedulární a velmi krátký tenký segment (obrázek 1) (*Zhuo et al., 2013; Toribio, 2008; Krstić, 1991*).

Počet nefronů je definitivní už při narození. Nové nefrony se v průběhu života netvoří. Existující nefrony se mohou pouze zvětšovat. K tomu může dojít v období růstu, při redukci počtu nefronů v důsledku poškození ledvin nebo odstraněním jedné ledviny. Za klidových fyziologických okolností nejsou všechny nefrony funkční, ve funkci se totiž střídají (*Merkunová et al., 2008*).



Obrázek 1 – Nefron – popis a rozdělení na kotikální a juxtamedulární nefrony (upraveno podle Sgouros et al., 2011).

2.1.1 Ledvinné tělísko

Ledvinné neboli Malpighiho tělísko je první částí nefronu a skládá se z glomerulu a Bowmanova pouzdra (obrázek 2) (Merkunová et al., 2008). Každé ledvinné tělísko se skládá z cévního a močového pólu. Přes cévní pól vstupují a vystupují aferentní a eferentní arterioly. Močový pól je lokalizován naproti cévnímu, kde začíná proximální stočený tubulus. Na vstupu do ledvinného tělísko se aferentní arteriola rozdělí do čtyř až osmi hlavních větví, z nichž se každá šíří do sítě glomerulárních kapilár. Kapiláry z každé primární větve tvoří glomerulární lalůček. Všechny kapiláry se scházejí a tvoří eferentní arteriolu (Krstić, 1991). V ledvinném tělísku dochází k filtraci krevní plasmy a tvoří se tak primární moč. Denně se vytvoří 180 l primární moči, kdežto objem moči definitivní se pohybuje v rozmezí 1 – 1,5 l (Merkunová et al., 2008; Eckardt et al., 2013).

Bowmanovo pouzdro je dvojitěnný obal obklopující glomerulus. Jeho parietální stěna se nazývá kapsulární epitel. Jedná se o jednoduchý dlaždicovitý epitel, který se skládá

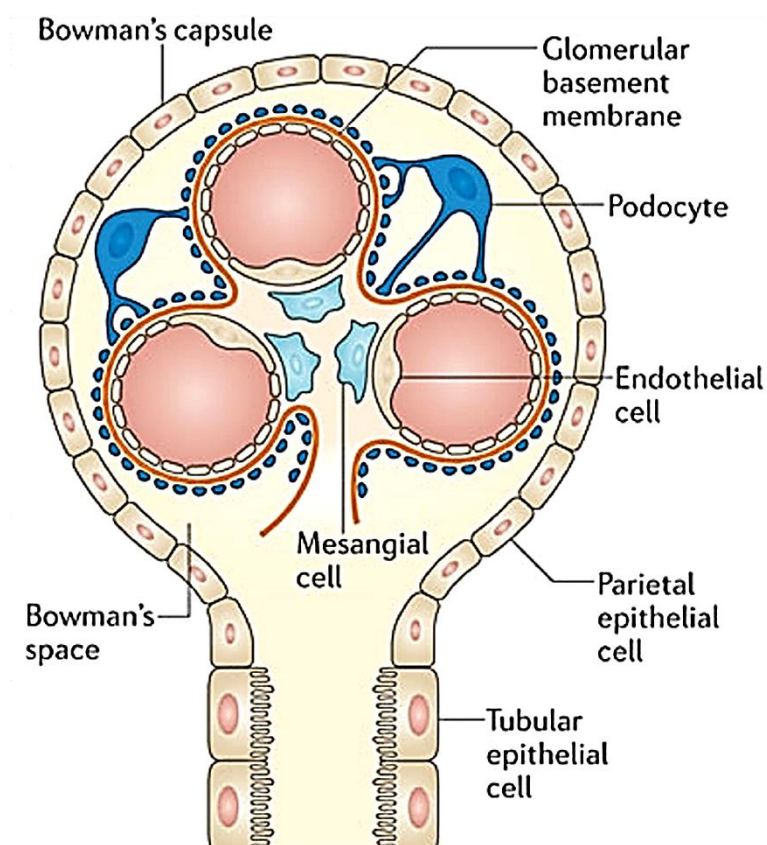
z velmi zploštělých polygonálních buněk ležících na bazální membráně. Kapsulární epitel plynule přechází na kubický epitel proximálního stočeného tubulu. Vnitřní stěna Bowmanova pouzdra dospělé ledviny je tvořena podocyty, které u cévního pólu ledvinného tělíska přechází na kapsulární epiteliální buňky, tzv. peripolární epitelové buňky, jež mají granulovanou cytoplasmu. Mezi glomerulem a kapsulárním epitelem je štěrbina, která připomíná Bowmanův prostor, do které se filtruje primární moč (Krstić, 1991; Kurts et al., 2013).

Glomerulus představuje klubko tvořené 10 – 50 kapilárními vlásečnicemi, které jsou uzavřené v Bowmanově pouzdře, a je pokryt jeho viscerální stěnou. Kromě kapilár se v glomerulu nacházejí podocyty a mesangiální buňky. Kapilární kličky glomerulu odstupují z *vas afferens* a krev po průtoku klubíčkem odtéká do *vas efferens*. Glomerulární kapiláry jsou terminálním odvětvím aferentní arterioly. Jsou fenestrovaného typu a některé póry mají větší než ty, které jsou v jiných fenestrovaných kapilárách. Celková plocha všech glomerulárních kapilár je přibližně 1,5 m² (Toribio, 2008; Kurts et al., 2013; Krstić, 1991).

Endotelové buňky obklopuje hustá glomerulární bazální lamina. Perikaryon endotelových buněk se vyboulí do lumenu kapiláry, ten se obvykle nachází směrem k mesangiálním buňkám. Vnitřní struktura těchto endotelových buněk je podobná ostatním endotelovým buňkám. Podocyty jsou velké hvězdicovité buňky, které obklopují glomerulární kapiláry. Jejich perikaryon může být kulatý nebo protáhlý a může být vyboulený do Bowmanova prostoru. Jádro je oválné s jemně rozptýleným chromatinem a má výrazné jádro. Cytoplasma podocytů je jasná, obsahuje kulaté nebo protáhlé mitochondrie, dobře vyvinutý Golgiho aparát, krátké cisterny z drsného endoplasmatického retikula, lysozomy, mikrotubuly, mikrofilamenta a několik volných ribozomů. Pedikly podocytů se rozmisťují po vnějším aspektu glomerulární bazální laminy. Všechny procesy probíhající v podocytech vytváří pedikly, které se ve velké míře prolínají s pedikly jiných podocytů. Přes jemné štěrby, které jsou mezi pedikly se filtruje primární moč z glomerulárních kapilár. Mesangiální buňky jsou vřetenovité nebo nepravidelné buňky, které se nachází mezi glomerulárními kapilárními kličkami (Krstić, 1991).

Glomerulární filtrační membrána je třívrstvá stěna, která separuje glomerulární kapiláry od Bowmanova prostoru. Tato membrána se skládá z fenestrovaného endotelu glomerulárních kapilár, glomerulární bazální laminy a glomerulární štěrbinové

membrány. První zmíněná část je tvořena kulatými a oválnými póry, které mají v průměru 65 – 100 nm a pouze několik pórů je uzavřeno jemnou membránou. Glomerulární bazální lamina je kontinuální třívrstvá vláknitá síť jemných vláken, která je 250 – 450 nm silná, a obklopuje vnější aspekt glomerulárních kapilár. Glomerulární štěrbinová membrána je velmi tenká membrána, která se nachází mezi pedikly. Normálně tato membrána následuje rozložení pediklů, ale mezi některými pedikly může chybět. Krevní plasma je filtrována přes tuto membránu filtračním tlakem. Větší proteinové molekuly, jako jsou například globuliny, jsou zadržovány glomerulární bazální laminou (Kurts et al., 2013; Krstić, 1991).

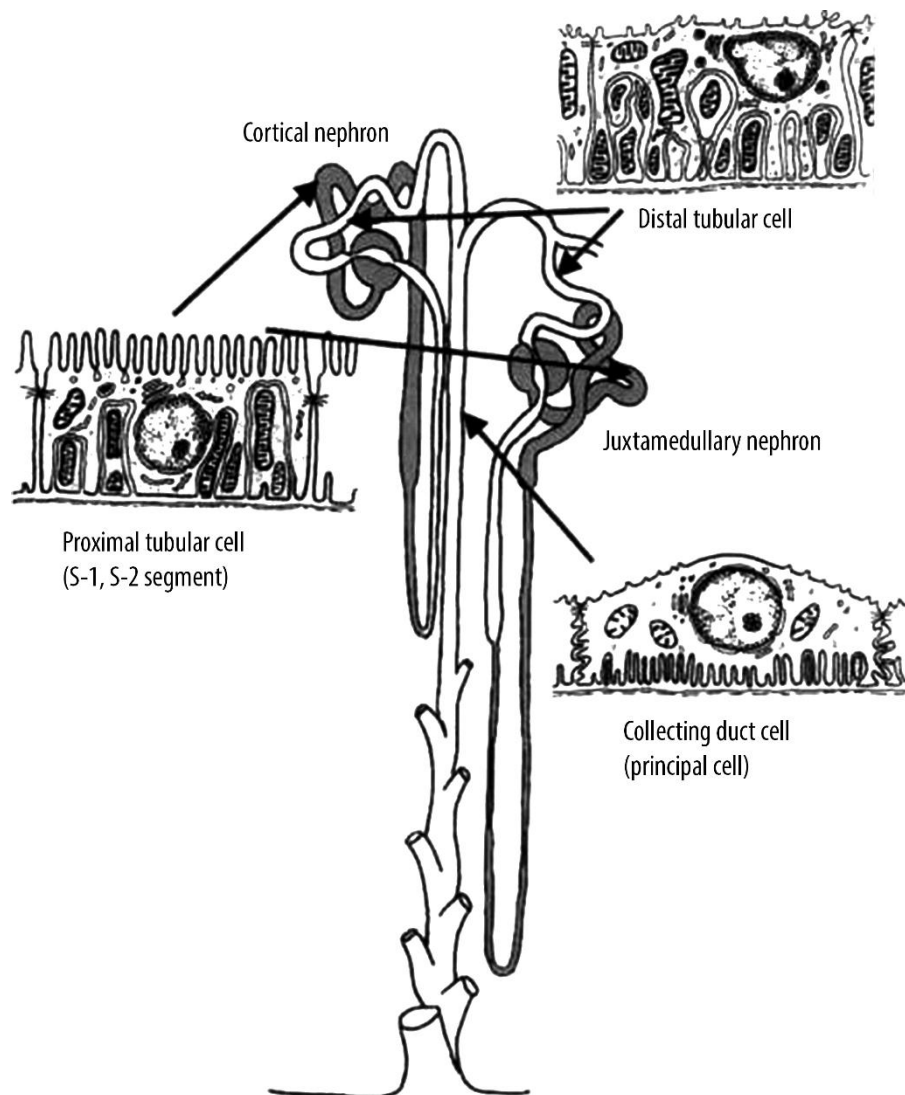


Obrázek 2 – Popis morfologie renálního tělíska (upraveno podle Kurts et al., 2013).

2.1.2 Tubulární části nefronu

Mezi tubulární části nefronu patří proximální tubulus, Henleova klička, distální tubulus a sběrný kanálek (obrázek 3). Proximální tubulus je dlouhý asi 10 – 12 mm, široký 30 – 60 μm a nachází se mezi ledvinným tělískem a začátkem tenkého segmentu

Henleovy kličky. Skládá se z proximálního stočeného tubulu, který je umístěný mezi medulárními paprsky v kortikálním labyrintu, a přímého úseku, který je umístěný uvnitř medulárních paprsků a částečně uvnitř meduly. V určité hloubce se proximální přímý tubulus náhle zužuje, a právě v tomto místě začíná tenký segment, který také míří hlouběji do dřene. Různé tenké segmenty pronikají do různých hloubek, pak se otočí vlásenkovou kličkou zpět směrem ke kůře a náhle se zvětší do distálního přímého tubulu. Ze dřene pokračuje tento tubulus do medulárního paprsku, opouští ho a vstupuje do kortikálního labyrintu jako distální stočený tubulus, kde tvoří těsně zhuštělé kličky v blízkosti ledvinného tělíska (Krstić, 1991).



Obrázek 3 – Popis morfologie tubulární části nefronu (upraveno podle Pfaller et al., 1998).

Epitel proximálního tubulu je jednoduchý kubický, který tvoří buňky s centrálním kulatým jádrem a kartáčovitým okrajem na apikálním pólu (*Krstić, 1991*). Každý proximální tubulus se skládá ze tří propojených segmentů. S₁ segment tvoří počátek a střední část stočeného proximálního tubulu. S₂ segment zahrnuje konečnou část stočeného proximálního tubulu a začátek přímého proximálního tubulu. Poslední S₃ segment tvoří zbývající část přímého proximálního tubulu. Kortikální a juxtamedulární nefrony jsou tvořeny S₁ a S₂ segmenty proximálního tubulu. U kortikálních nefronů jsou proximální přímé tubuly tvořeny z S₂ a S₃ segmentů, zatímco u juxtamedulárních nefronů jsou přímé proximální tubuly tvořeny pouze segmentem S₃. Buňky S₁ segmentu mají v porovnání s S₂ a S₃ segmenty rozvinutější membránu kartáčovitého lemu s větším počtem mikroklků, obsahují větší množství mitochondrií a dobře vyvinuté Golgiho aparáty v cytoplasmě. Díky těmto charakteristickým morfologickým a funkčním vlastnostem, jež jsou dány značnou expresí řady specifických transportních proteinů a enzymů, mají tyto buňky největší kapacitu pro metabolismus endo- a exogenních látek, aktivní transport sodíku, aminokyselin ze těchto renálních tubulárních segmentů (*Zhuo et al., 2013*) V proximálním tubulu je zpětně vstřebávána většina primárního filtrátu vytvořeného v glomerulu a snižuje se zde celkový objem této tekutiny. Kromě toho se proximální tubuly podílejí také na reabsorpci cukrů a glukoneogenezi (*Zhuo et al., 2013; Krstić, 1991*).

Henleova klička tvoří spojku mezi proximálním a distálním tubulem. Skládá se z tlusté a tenké sestupné části a tenké a tlusté vzestupné části. Tato klička proniká do různých hloubek dřeně podle toho, zda se jedná o nefron kortikální či juxtamedulární. Nejvýznamnější funkcí Henleovy kličky je zpětné vstřebávání vody a sodíku (*Palm et al., 2005; Krstić, 1991*).

Mezi koncem vzestupné části tenkého segmentu Henleovy kličky je lokalizován přímý úsek distálního tubulu, zatímco do sběracího kanálku ústí úsekem stočeným. Distální tubuly jsou tvořeny jednoduchým kubickým epitelem ležícím na bazální membráně. Jádra těchto epitelálních buněk, nazývaných také jako nefrocyty, se nacházejí u apikálního pólu buněk blízko lumen tubulu. Distální buňky nemají na apikální straně kartáčovitý lem, ale pouze nepravidelně rozmístěné mikroklky a řasinky. Distální tubulus obvykle přichází do kontaktu s cévním pólem ledvinného tělíska mezi dvěma arterioly. V tomto bodě se epitel tubulu mění na sloupcovitý, čímž se tvoří macula densa (*Krstić, 1991*). Macula densa spolu s extraglomerulárními mesangialními buňkami a

juxtaglomerulárními buňkami ve stěně aferentní arterioly tvoří juxtaglomerulární aparát. Dochází zde opět ke zpětné resorpci významného množství tekutiny, která sem přitéká z předchozích úseků nefronu. V distálním tubulu jsou sodné ionty pumpovány ven z lumen, voda a chloridové ionty jsou transportovány do dřevného intersticia, což přispívá ke koncentrování moči (Krstić, 1991; Toribio, 2008).

Poslední částí je sběrací kanálek. Touto částí nefronu je odváděna definitivní moč do renální pánvičky (de Boer et al., 2016). Různé segmenty sběracího kanálku hrají různé role v ovlivňování koncentrace moči. Segmentace tohoto kanálku je odlišná od ostatních částí nefronu, neboť je založena na poloze, nikoli na typu buňky. První částí je kortikální sběrný kanálek, který začíná na spojení s kortikálním spojovacím segmentem a běží relativně rovně a nerozvětveně směrem ke spojení kůry a dřene. V tomto spojení vzniká další část, která se nazývá vnější medulární sběrací kanálek. Ten sestupuje až k místu spojení vnitřní a vnější dřene. Vnější medulární sběrací kanálek je rovný segment bez rozvětvení. Poslední částí je vnitřní medulární kanálek, který je terminálním nefronovým segmentem, a začíná spojením vnější a vnitřní dřene. Hlavním úkolem kortikálního sběrného kanálku je nárůst koncentrace močoviny v průběhu jeho délky a dodávat moč s vysokou koncentrací močoviny do další části kanálku. To je důsledkem adsorpce soli a vody. V této části dochází k aktivní resorpci sodíku a sekreci draslíku. Ve vnějším medulárním sběrném kanálku nedochází k transportu solí. Tato část je nepropustná pro močovinu, ale je vysoce propustná pro vodu. Proto je transport tekutiny s vysokou koncentrací močoviny do další části kanálku hlavní funkcí vnějšího medulárního sběrného kanálku. Hlavní funkcí vnitřního sběrného kanálku je transport močoviny do papilárního intersticia a vytvoření koncentrované moči (Kokko, 1987).

3. Regenerace ledvin

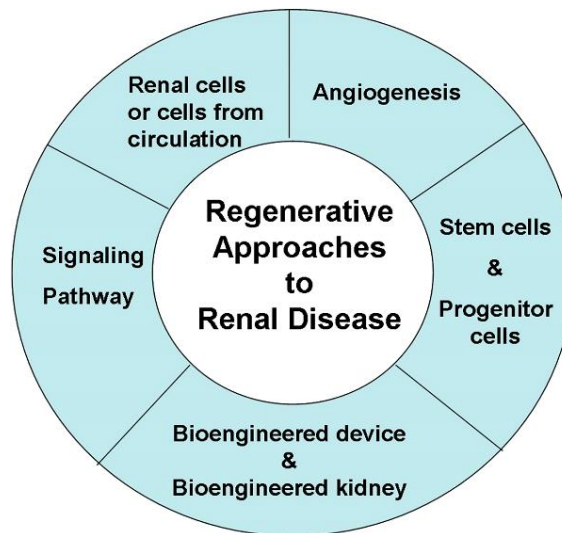
Onemocnění ledvin je definováno jako heterogenní skupina poruch, které ovlivňují strukturu a funkci ledvin. Dokonce i mírné změny v parametrech jsou spojeny se zvýšeným rizikem jejich selhání. Onemocnění ledvin může být definováno jako akutní nebo chronické podle závislosti na délce trvání (≤ 3 měsíce vs > 3 měsíce) (Eckardt et al., 2013). Akutní poškození ledvin (AKI – *Acute Kidney Injury*), dříve známé také jako akutní selhání ledvin, je syndrom, který je charakterizován rychlým (hodiny až dny) snížením renální vylučovací funkce. Dochází při něm k hromadění produktů dusíku (kreatin a močovina) a jiných klinicky naměřených odpadních produktů

(Bellomo et al., 2012). Tento patologický stav je spojen se špatnou prognózou, která vede k dlouhodobým pobytům v nemocnici a na jednotkách intenzivní péče, a nezřídka může také skončit úmrtím pacienta. Prognóza pro pacienty s AKI závisí na základní etiologii od úplného uzdravení až po konečné selhání ledvin (Raina et al., 2017). Souvislost mezi AKI a chronickým onemocněním je složitá. AKI může vést k chronickému onemocnění ledvin, ale i chronické onemocnění ledvin může nakonec vyústit v AKI (Eckardt et al., 2013).

Příčiny AKI lze rozdělit na prerenální, renální a postrenální. Při prerenálním AKI vede snížená hypoperfuze ke snížené glomerulární filtraci jako adaptivní reakce na různé extrarenální poškození (systémová hypotenze, renální vaskulární stenóza, trombóza, systolické nebo diastolické srdeční selhání či hepatorenální syndrom) (Lameire et al., 2013). Tento typ AKI je nejběžnější u dětí a aktivuje homeostatické kompenzační mechanismy pro obnovení prokrvení ledvin. Renální forma AKI zahrnuje akutní, často rychle progresivní glomerulopatie, akutní vaskulitidy, akutní intersticiální nefritidy a akutní tubulární nekrózy (Lameire et al., 2013). Dochází k ní při poškození vnitřní renální struktury, jejíž příčinou mohou být například ischemie, nefrotoxické léky, glomerulární onemocnění nebo mikrovaskulární onemocnění. Tubulární buňky přímého segmentu proximálního tubulu a tlustého vzestupného raménka Henleovy kličky jsou obzvláště citlivé na ischemické poškození díky vysokým nárokům na ATP (Raina et al., 2017). Postrenální AKI může být způsobena vrozenými nebo získanými obstrukcemi močových cest. Odstranění překážky obvykle vede k obnově funkce ledvin s výjimkou pacientů trpících renální dysplázií. U pacienta s oběma funkčními ledvinami musí být obstrukce oboustranná, aby vedla k rozvoji AKI (Sengupta, 2013).

Mezi rizikové faktory AKI patří *diabetes mellitus*, kardiovaskulární onemocnění, chronické onemocnění jater a rakovina. Syndrom zhmoždění je reperfuze poškození, ke kterému dochází po ischemii kosterního svalstva způsobené dlouhodobým stálým tlakem. Po uvolnění tlaku může dojít k objemové depleci a k oběhovému selhání, což vede k tomu, že je velké množství myoglobinu a draslíku uvolněno do oběhu, čímž může následně dojít k akutnímu tubulárnímu poškození a hyperkalemii. Mezi nejvýznamnější rizikové faktory patří preexistující chronické onemocnění ledvin, které se může projevovat jako snížení glomerulární filtrace nebo proteinurie (Lameire et al., 2013).

Dospělá ledvina má pozoruhodnou schopnost přežít poškození a obnovit funkci i přes to, že je v ledvinách za fyziologických podmínek omezený obrat buněk (Meyer–Schwesinger, 2016). Ledvinné buňky mají schopnost regenerovat za předpokladu, že je toto poškození omezeno a struktura ledviny zůstává beze změny (Eymael et al., 2016). Oproti jiným orgánům má ledvina jen omezenou regenerační schopnost. Regenerace ledvin zahrnuje opravy ledvin nebo opětovný růst jednotlivých částí nebo celého nefronu při jejich onemocnění. Neonephrogenesis neboli schopnost regenerovat tkáň ledvin není obvykle charakteristickým rysem savců. (Benigni et al., 2010). Rekonstrukce lidské ledviny je obtížnější než regenerace jiného orgánu, protože je tvořena vysoce heterogenními anatomickými strukturami. Mnoho studií v oblasti regenerace ledvin, které byly provedeny především na zvířecích modelech, odhalily možné způsoby modulace ledvinných buněk pomocí farmakologických nebo genetických přístupů. Některými dalšími slibnými strategiemi v regenerativní medicíně ledvin jsou terapie pomocí progenitorových a kmenových buněk (KB) nebo obnovení renální mikrocirkulace (obrázek 4) (Chou et al., 2014).



Obrázek 4 – Regenerativní přístupy k renálnímu poškození (Chou et al., 2014).

3.1 Mechanismy regenerace ledvin

Škála onemocnění ledvin je široká. Poškozeny mohou být různé typy buněk (podocyty, tubulární epitelové buňky, mesangiální buňky nebo endoteliální buňky). Subletální poškození ovlivňuje funkci ledvin v různých stupních, ale také aktivuje

mechanismy odpovědné za regeneraci poškozených tkání ledvin. Podle současných studií existují čtyři klíčové procesy uplatňující se významně v regeneraci ledvin - přeprogramování endogenní ledvinné buňky, migrace makrofágů a buněk odvozených z kostní dřeně do ledvin, renální diferenciaci, neboli vývojové rozrůznění, progenitorových buněk a neoangiogeneze (Chou et al., 2014). Podle výsledků některých studií se zdá, že v důsledku dediferenciačních (dediferenciaci je ztráta specifických vlastností) procesů v ledvinách během jejich reparace, je regenerační proces podobný samotnému vývoji ledvin. Některé důležité geny ovlivňující neonefrogenezi se mohou totiž podílet na regulaci regenerace renálních buněk a tkáně po jejich poškození (Martin et al., 2004; Monte et al., 2007).

Na regeneraci ledvin se může podílet celá řada buněk. Například poškozené proximální tubulární buňky se mohou množit a dediferencovat se do předchozího diferenciacního stavu (Chou et al., 2014; Hendry et al., 2012). Použití technologie *fate-mapping*, což je technika, která slouží ke sledování osudu buněčné populace, ukázala, že přežívající tubulární epitelové buňky jsou hlavním zdrojem nových buněk při opravě postischemického poškození nefronu (Chou et al., 2014; Benigni et al., 2010). Dalším typem buněk, které se mohou podílet na regeneraci ledvin, jsou také distální tubulární buňky. Bylo dokázáno, že tyto buňky mohou uvolňovat určité růstové faktory jako například epidermální růstový faktor (EGF – *Epidermal Growth Factor*), insulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor-1*) nebo hepatocytární růstový faktor (HGF – *Hepatocyte Growth Factor*). Tyto opravné růstové faktory mohou působit na receptory v proximálních tubulárních epitelových buňkách a podporovat jejich regeneraci díky parakrinnímu efektu. Za zmínku při regeneraci ledvin stojí také makrofágy, které podporují hojení ran a reparaci díky produkci celé řady růstových faktorů, z nichž jeden z nich je nazývaný *Wingless-type MMTV integration site family* (WNT) *member 7b* (Chou et al., 2014).

Integrita cévního zásobení také může mít vliv na regeneraci ledvin po jejich poškození. Studie Zhuang et al. (2010) zjistila, že nový vývojový gen *signal peptide-(complement protein C1r/C1s, Uegf, and bone morphogenetic protein)-EGF domain-containing protein 1* je exprimován v endotelových buňkách. Jeho *in vitro* suprese může inhibovat proliferaci tubulárních epitelových buněk. Normální renální pericyty mohou udržovat stabilitu mikrocirkulace. Trvalá aktivace pericytů/perivaskulárních fibroblastů podporuje renální fibrózu, nicméně přechodná

aktivace pericytů obklopující poškozené tubuly může být fyziologickým procesem opravy, a může být prospěšná pro funkční zotavení po akutním poškození ledvin. Ledvinné fibroblasty produkují cytokiny (fibroblastové růstové faktory-1 a -7), které stimulují proliferaci renálních tubulárních epitelových buněk podporujících prospěšnou úlohu aktivovaných pericytů v průběhu opravy ledvin po AKI (*Chou et al., 2014*).

3.1.1 Růstové faktory

Zásadní roli v regulaci procesu regenerace ledvin hrají různé růstové faktory a cytokiny (tabulka 1) (*Tarloff et al., 2004*). Při studiích AKI na zvířecích modelech byly podány růstové faktory - EGF, HGF nebo IGF-1. Po podání těchto faktorů byl pozorován pokles úmrtnosti zvířete, neboť došlo k obnovení funkce ledvin a jejich uvedení do normálu. Růstové faktory mohou být vylučovány tubulárními epitelálními buňkami, které přežily poškození. Tyto renální buňky jsou tímto způsobem zřejmě zapojené do regeneračního mechanismu ledvin. Dalším typem buněk, který může exprimovat růstové faktory jsou mezenchymální KB, které sekretují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*), HGF či IGF-1, a tím usnadňují zotavení ledvin po jejich poškození. Mechanismus účinku sekrece růstových faktorů lze rozdělit na 1) autokrinní, kdy ledvinné buňky samy sobě vylučují růstové faktory, 2) parakrinní, kdy růstové faktory působí na blízké buňky a 3) endokrinní, kdy je faktor vylučován do krve a tím je transportován k cílové buňce (*Flaquer et al., 2010; Vona-Davis et al., 2007*).

Tabulka 1 – Přehled růstových faktorů účastnících se regenerace ledvin.

Růstový faktor	Účinek
Epidermální růstový faktor	Stimuluje regeneraci konfluenci proximálních tubulárních buněk králíků, indukuje buněčné proliferace a migrace mesenchymálních KB.
Vaskulární endoteliální růstový faktor	Zachovává renální mikrovaskulaturu, zlepšuje funkci ledvin a snižuje renální fibrózy.
Hepatocytární růstový faktor	Hraje důležitou roli při mitogenezi, motogenezi, morfogenezi, má anti-fibrogenní a anti-apoptotické účinky.
Insulinu podobný růstový faktor-1	Urychluje opravu a regeneraci poškozeného epitelu po ischemicko/reperfuzním poškození, snižuje akutní nefrotoxicitu cyklosporinu, je cytoprotektivní.
Fibroblastový růstový faktor-1 a -7	Hrají důležitou roli v buněčné proliferaci a diferenciaci.
Transformující růstový faktor beta-1	Reguluje proliferaci a diferenciaci zraněných tubulárních buněk.

3.1.1.1 Epidermální růstový faktor

Epidermální růstový faktor je produkován ve velkém množství v ledvinách ve formě prekursoru s vysokou molekulovou hmotností, který je vázán na membránu buněk (Nouwen *et al.*, 1994). Tento růstový faktor je přítomen zejména v distálním stočeném tubulu a v tlustém vzestupném raménku, zatímco receptory pro EGF se nachází v proximálních tubulech (Tarloff *et al.*, 2004).

Ke snížení exprese EGF dochází po vystavení renálních buněk gentamicinu a HgCl₂, důsledkem čehož může dojít k rozvoji AKI. Ke snížení hladiny EGF prekursoru, EGF a jeho receptorů také dochází po ischemicko/reperfuzním poškození, kdy je pozorována jejich nejnižší exprese 48 hodin po ischemii. Normální exprese EGF je dosaženo až po úplné regeneraci ledvin. Snížení renální exprese EGF koreluje ve všech případech se snížením jeho koncentrace v moči. EGF potlačuje apoptózu v renálních tubulárních buňkách a zvyšuje proliferaci těchto buněk např. po obstrukční nefropatii *in vivo*. Tento účinek je pravděpodobně spojen se sníženou indukcí proteinů (jako je vimentin), které jsou spojeny se stresem (Tarloff *et al.*, 2004).

In vitro bylo u králičích proximálních tubulárních buněk pozorováno, že po vystavení těchto buněk *tert*-butylhydroperoxidu nebo *S*-(1,2-dichlorvinyl)-L-cysteinu, došlo díky EGF ke stimulaci regenerace těchto buněk. Regenerace buněk v důsledku tohoto faktoru byla sledována nárůstem konfluency neboli souvislé vrstvy buněk na dně kultivační nádoby. Dále bylo také prokázáno, že může tento faktor ovlivňovat indukci buněčné proliferace a migrace mesenchymálních KB *in vitro* (Flaquer et al., 2010; Tarloff et al., 2004).

3.1.1.2 Vaskulární endoteliální růstový faktor

Tento faktor je prominentní enogenní angiogenní cytokin, který se podílí na regulaci růstu cév ve zdravé i poškozené tkáni. Hlavním zdrojem vaskulárního endoteliálního růstového faktoru jsou v ledvinách tubulární epitelové buňky a podocyty, které jsou zároveň i hlavními cíli tohoto růstového faktoru (Chade, 2015). Renální ischemie inhibuje expresi VEGF prostřednictvím různých mechanismů např. přesunutím rovnováhy z proangiogenního k antiangiogennímu prostředí, čímž může inhibovat opravu ledvin (Flaquer et al., 2010).

Dalším zdrojem mohou být také mezenchymální buňky, které tento faktor exprimují, a mohou ho využít k renoprotekci prostřednictvím parakrinního působení, (Flaquer et al., 2010). U zvířecího modelu bylo prokázáno, že intrarenální terapie pomocí VEGF může vést k zachování renální mikrovaskulatury, zlepšení funkce ledvin a také snížení renální fibrózy (Chade, 2015). U modelů endoteliální léze byl ke stimulaci progenitorových buněk použit erythropoetin. Bylo zjištěno, že selektivní poškození endoteliálních buněk vede k výrazné stimulaci endotelových progenitorových buněk, hematopoetických kmenových buněk a různých faktorů pro angiogenesi, včetně VEGF, které tak přispívají k mikrovaskulární opravě (Hohenstein et al., 2010)

3.1.1.3 Hepatocytární růstový faktor

Hepatocytární růstový faktor je ve tkáních přítomen v inaktivní formě. K jeho uvolnění z buněk dochází díky určitým podmínkám, jako je například i poškození tkáně ledvin. Po AKI, které je způsobené glycerolem, bývá množství HGF receptorů zvýšené. To vede ke zvýšení hladin volného HGF v játrech, slezině a plicích (Tarloff et al., 2004).

HGF hraje roli v různých buněčných procesech, jako jsou například mitogeneze, motogeneze a morfogeneze. V ledvinách je HGF velmi důležitý zejména při vývoji ledvin

a jejich regeneraci (Tarloff et al., 2004). Interakce HGF a jeho receptorů vede k aktivaci tyrosinkinasy, což má za následek stimulaci mitogenní a angiogenní aktivity zejména v epiteliálních a endotelových buňkách. Kromě toho má HGF anti-apoptotické a anti-fibrogenní účinky. Anti-apoptotický efekt je v přímém vztahu k fosfatidylinositol-3-kinasa/Akt signální cestě, zatímco anti-fibrogenní účinek je spojen s jeho antagonistickým působením na transformující růstový faktor beta-1 (TGFβ-1 - *Transforming Growth Factor Beta-1*). HGF je schopen působit proti profibrotickému působení TGFβ-1 v různých renálních buňkách prostřednictvím různých mechanismů účinku, z nichž vyniká inhibice epitel-mezechymální tranzice, kdy tento buněčný program vede ke změně epiteliálního fenotypu buňky v mezenchymální typ (Matějka et al., 2017)). Je také známo, že HGF způsobuje snížení exprese TGFβ-1 receptorů *in vivo*. HGF má také vliv na buňky kostní dřeně, jelikož podněcuje pohyb KB do místa poškození. Není však známo, zda má HGF efekt na buněčnou mobilizaci a/nebo lokalizaci na tyto buňky. Ze všech jeho popsanych funkcí je zřejmé, že inhibice aktivity tohoto růstového faktoru, může pravděpodobně vést ke zhoršení obnovy tkání (Flaquer et al., 2010).

3.1.1.4 Insulinu podobný růstový faktor-1

K produkci insulinu podobného růstového faktoru-1 dochází převážně ve sběrných kanálcích. Obdobně jako v případě EGF, se i hladina IGF-1 po ischemicko/reperfuzním poškození snižuje, i když autofosforylace receptoru IGF-1 zůstává normální. Aktivita IGF-1 je závislá nejen na expresi faktoru samotného, ale také na expresi IGF vazebných proteinů a IGF-1 receptorů (Tarloff et al., 2004).

Tento růstový faktor může indukovat hypertrofický buněčný nárůst glomerulárních buněk a proximálních tubulárních buněk během renální regenerace po AKI. Léčba rekombinantním IGF-1 urychluje opravu a regeneraci poškozeného epitelu po ischemicko/reperfuzním poškození, pokud je podáván 24 hodin před/po tomto patologickém stavu. Tento růstový faktor také zmírňuje akutní nefrotoxicitu cyklosporinu. U potkaniho modelu ischemicko/reperfuzního poškození, anoxie či reoxygenace bylo nalezeno, že je rekombinantní lidský IGF-1 cytoprotektivní. Tento jeho účinek byl totiž spojen se zvýšenou mitogenezí a sníženou apoptózou (Tarloff et al., 2004).

3.1.1.5 Fibroblastový růstový faktor

Fibroblastový růstový faktor (FGF – *Fibroblast Growth Factor*) patří do rodiny růstových faktorů, která je tvořena přibližně 14 členy. Tyto faktory hrají důležitou roli v buněčné proliferaci a diferenciaci, přičemž pouze některé z nich jsou exprimovány v ledvinách. FGF-1 je za fyziologických podmínek přítomen v distálních tubulech, kůře a dřeni sběrných kanálků, či glomerulech. Není však exprimován v proximálních tubulárních buňkách (Tarloff *et al.*, 2004).

Pro určení role FGF v regeneraci proximálních tubulárních buněk byla zkoumána proliferace, diferenciaci a FGF-1 exprese *in vivo* u ledvin potkanů před a po nefrotoxickém vlivu S-(1,1,2,2-tetrafluorethyl)-L-cysteinu k těmto buňkám. Jeden den po poškození došlo ke zvýšení proliferace přežívajících buněk proximálního tubulu a také ke zvýšení exprese FGF-1 v zasahujících mononukleárních buňkách. Po tomto počátečním vypuknutí proliferace byla exprese FGF-1 zvýšena ve špatně diferencovaných vimentin-pozitivních regeneračních epitelových buňkách. Výsledky této studie pravděpodobně ukazují, že autokrinní FGF-1 exprese v regeneračním epitelu je pozdější fáze v procesu regenerace (Ichimura *et al.*, 1995).

Významnější roli při renálním růstu a vývoji hraje pravděpodobně FGF-7 než FGF-1. FGF-7 je přítomen především v renálním intersticiu a jeho exprese může být zvýšena např. po léčbě S-(1,1,2,2-tetrafluorethyl)-L-cysteinem. Tento faktor nebyl exprimován v primární kultuře epitelových buněk proximálního tubulu. Toto kombinované pozorování naznačuje úlohu pro FGF-1 a pro FGF-7 v mitogenních reakcích a morfogenních změnách, které mohou nastat v průběhu procesu regenerace ledvin (Tarloff *et al.*, 2004).

3.1.1.6 Transformující růstový faktor beta-1

Izoforna transformujícího růstového faktoru, beta-1, je nejdůležitější z rodiny TGF, která hraje důležitou roli v reakci ledviny na vážné poškození. TGFβ-1 je produkován v lymfocytech, monocytech/makrofázích a krevních destičkách (Branton *et al.*, 1999). Jeho činnost je regulována hyperglykemií a aktivací glukózových transportérů, angiotensinem II, oxidačním stresem nebo hemodynamickými silami (Garud *et al.*, 2014; Tarloff *et al.*, 2004).

Zvýšení volného TGFβ-1 bylo pozorováno po ischemicko/reperfuzním poškození a při nefropatii způsobené nefrotoxickými látkami. Po expozici kultivovaných myších proximálních tubulárních buněk cyklosporinem došlo ke zvýšení exprese a aktivity

TGFβ-1 v těchto buňkách. Nicméně ne všechny toxické látky způsobují zvýšení hladin TGFβ-1. Například vliv CdCl₂ a HgCl₂ může vést ke snížení hladiny TGFβ-1 v imortalizovaných proximálních tubulárních buňkách *in vitro* (Tarloff *et al.*, 2004).

Studie prokázaly, že TGFβ-1 reguluje proliferaci a diferenciaci poškozených tubulárních buněk. Nepřetržitě zvýšení hladin TGFβ-1 souvisí s porušením regeneračních procesů, eventuálně může skončit fibrózou. Po vystavení terc-butyldydroperoxidu má TGFβ-1 negativní účinek na proliferaci a regeneraci králičích proximálních tubulárních buněk. Takovýto účinek TGFβ-1 byl také pozorován v trojrozměrné kultuře primárních proximálních tubulárních buněk potkanů, což bylo spojeno se zvýšenou apoptózou (Tarloff *et al.*, 2004).

In vitro studie prokázaly, že naopak nízké hladiny TGFβ-1 stimulují buněčnou proliferaci (Branton *et al.*, 1999). V případě potkanního modelu byla po vystavení renálních buněk cyklosporinu indukována v ledvinách fibróza. Při použití anti-TGFβ-1 protilátky došlo k zabránění renální fibróze (Tarloff *et al.*, 2004).

3.1.2 Makrofágy a Wingless-type MMTV integration site family member 7b

Makrofágy hrají důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi a také při poškození různých typů tkání (Lin *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že právě po poškození buněk mohou nabrané makrofágy přímo poškodit tkáň prostřednictvím působení jejich M1 fenotypu, který může produkovat kyslíkové radikály, peroxid vodíku, oxid dusnatý interleukin-1. Z tohoto důvodu nedostatku makrofágů před nebo v průběhu prvních kroků po poškození buněk může podporovat opravy tkáně (Chazaud, 2014).

Naproti tomu, pozdější fáze opravy jsou spojeny především s M2 makrofágy, jejichž vyčerpání je spojeno s přetrvávajícím poškozením ledvin, zvýšenou apoptózou, poruchou proliferace buněk a trvalým tubulárním zánětu. M2 makrofágy totiž aktivně podporují opravu poškozených renálních tubulů. Funkční *in vivo* studie ukázaly, že infúze interferony-stimulovaných makrofágů odvozených z kostní dřeně zhoršuje poškození ledvin, zatímco interleukinem-10 transdukované makrofágy upraví prostředí zánětu miliea indukují proliferaci renálních tubulárních buněk, čímž je ochrání před apoptózou. Také interleukinem-4 stimulované M2 makrofágy mohou podporovat proliferaci renálních tubulárních buněk. Terapie makrofágy, které jsou odvozené od kolonie stimulujícího faktoru 1, zvyšuje epiteliální buněčnou proliferaci a snižuje tak jejich apoptózu (Chazaud, 2014).

Makrofágy také vylučují *Wnt family member 7b* protein. Tento podporuje regeneraci ledvin tím, že nasměruje epiteliální progresi buněčného cyklu, a podporuje membránové opravy (Chazaud, 2014). Při indukovaném odebrání makrofágů z poškozené tkáně ledviny, dojde v renálních buňkách ke snížení odpovědi kanonické Wnt neboli Wnt/ β -catenin dependentní dráhy. *Wnt family member 7b* protein stimuluje epitelové odpovědi během vývoje ledvin, což naznačuje, že makrofágy jsou schopné rychle napadnout poškozené tkáně a obnovit vývojový program, který je prospěšný pro jejich opravu a regeneraci (Lin et al., 2010).

Protizánětlivé (interleukinem-10 stimulované) makrofágy chrání epitelové buňky před apoptózou a stimuluji jejich proliferaci prostřednictvím zvýšení koncentrace intracelulárního železa a zvýšení exprese lipokalinu-2. Dvoufázová reakce makrofágů (M1 a M2 typu) vzniká během regenerace ledvin díky přepínání jejich fenotypu. Sledování interferony-stimulovaných makrofágů, které byly aplikovány příjemci s poškozenou tkáně, ukazuje, že se tyto buňky mohou přeměnit na makrofágy M2 typu na začátku regenerace ledvin (Chazaud, 2014).

3.1.3 Dediferenciace a proliferace

Během zotavování z ischemicko/reperfuzního poškození přežívající tubulární buňky jsou schopny se dediferencovat a proliferovat, případně nahradit nevratně poškozené buňky a obnovit tubulární integritu. Oprava ledvin se podobá renální organogenezi vzhledem k vysoké rychlosti syntézy DNA, apoptózy a skladbě genové exprese. Rozsáhlá proliferační kapacita je interpretována tak, aby odrážela vnitřní schopnost přežívajících epiteliálních buněk přizpůsobit se ztrátě sousedních buněk dediferenciací a proliferací. Mnoho mechanismů a látek může mít vliv na tyto procesy. Adhezní molekuly, cytokiny a chemokiny pravděpodobně hrají také důležitou roli v regulaci migrace renálních buněk, proliferace a diferenciaci (Bonventre, 2003).

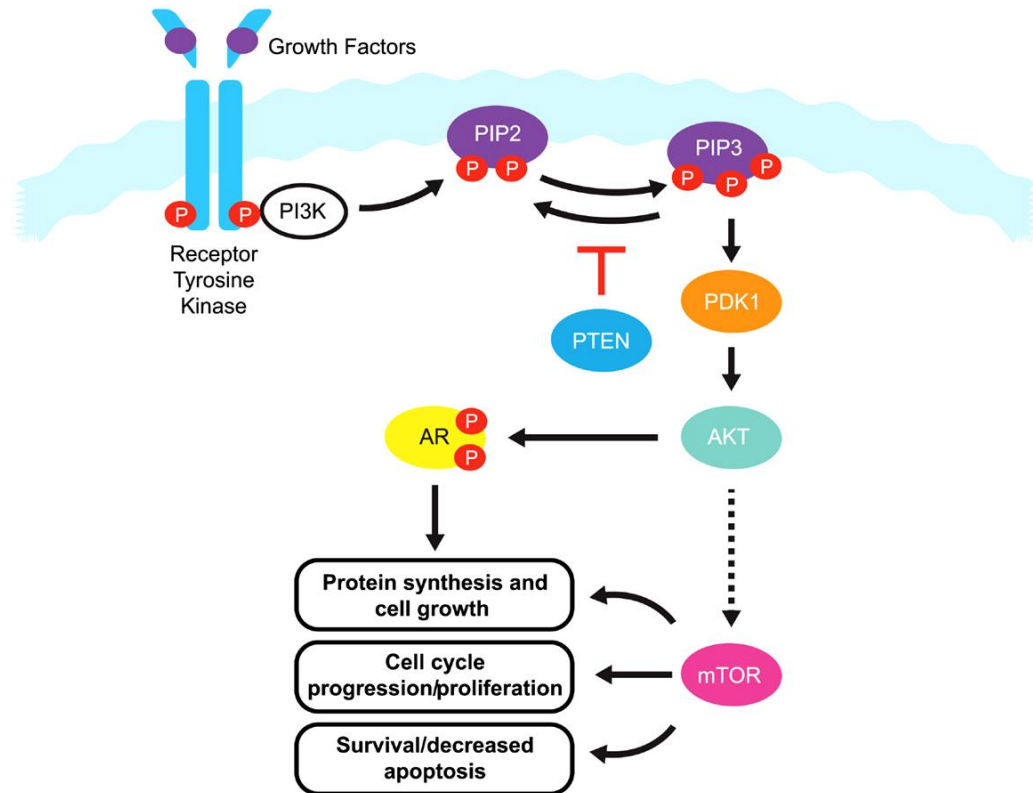
Při studii Kusaba et al. (2014) byly u myši označeny plně diferencované buňky proximálního tubulu a bylo testováno jejich přispění k regeneraci po poškození renálního epitelu. Je zajímavé, že po poškození ledvin zůstaly všechny tubulární buňky označeny, což znamená, že by nové tubulární buňky mohly pocházet pouze z proliferujících přežívajících diferencovaných buněk. Bylo zjištěno, že určitý stupeň dediferenciace se projevuje zvýšenou expresí markerů renálních kmenových buněk, kterými jsou například transkripční faktor Pax2 a protein vimentin (Dziedzic et al., 2014). Důležité je, že tyto jsou buňky v G1 fázi buněčného cyklu plně diferencovaným epitelem. Neexistuje tedy

menšina populace, která by neexprimovala markery terminální diferenciaci (Kusaba et al., 2014). Ukázalo se tedy, že oprava ledvin probíhá přes dediferenciaci a proliferaci plně diferencovaného epitelu. Bylo také zjištěno, že velká část tubulárních buněk je v G1 fázi. Jejich mitotická stimulace tak může přispět k opětovnému vstoupení do buněčného cyklu, čímž mohou buňky zřejmě připraveny reagovat na poškození rychlou reakcí proliferace (Dziedzic et al., 2014).

3.1.4 Signální dráhy

Na regeneraci ledvin se podílí několik signálních drah. První takovou dráhou je PI3K/Akt/mTOR dráha (PI3K – *Phosphatidyl Inositol-3-Kinase*/Akt – *proteinkinase b*/mTOR – *Mammalian Target Of Rapamycin*) (obrázek 5). PI3K tvoří rodinu lipidových kinas, které jsou charakterizovány svou schopností fosforylovat inositolový kruh 3'-OH skupiny u fosfatidylinositolů. Tato rodina má tři třídy. I. třída jsou heterodimery složené z katalytické podjednotky a regulační podjednotky. Tato třída se dále dělí na podtřídy IA, které jsou aktivovány receptorovými tyrosinkinasami, a podtřídu IB, která je aktivována G-proteiny. Substrát pro I. třídu PI3K je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. II. třída se skládá z jedné katalytické podjednotky, která přednostně využívá jako substráty fosfatidylinositol a fosfatidylinositol-4-fosfát. III. třída se skládá z jedné katalytické *homolog of the yeast vacuolar protein-sorting defective 34* podjednotky a produkuje pouze fosfatidylinositol-3-fosfát. Tato třída může mít pravděpodobně vliv na regulaci buněčného růstu (Liu et al., 2009; Vara et al., 2004).

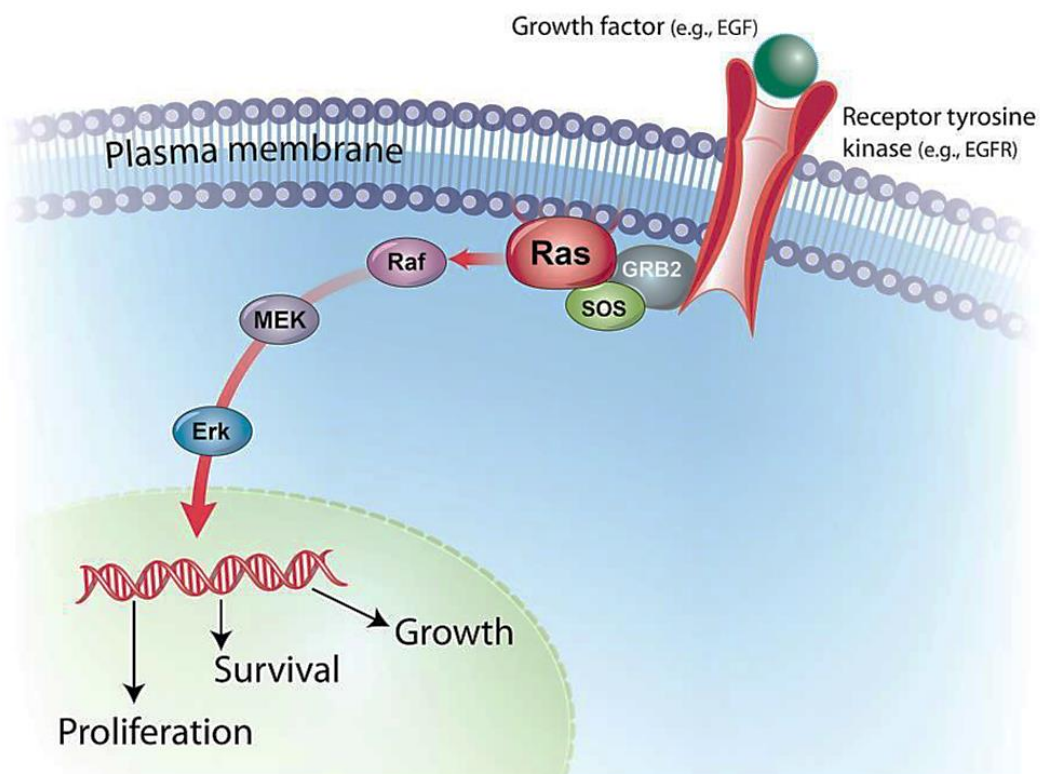
Růstové faktory ovlivňující regeneraci ledvin po AKI (EGF, HGF a IGF-1) aktivují lipidovou PI3K, která následně fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za vzniku fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu. Ten fosforyluje a aktivuje Akt, která má za následek stimulaci mTOR tím, že reguluje aktivitu zprostředkujících kinas. Aktivace mTOR vede k fosforylaci sestupných substrátů, čímž indukuje regeneraci buněk. Bylo prokázáno, že inhibice mTOR rapamycinem podstatně zpožďuje obnovu funkce ledvin. Akt může inaktivovat některé pro-apoptické faktory (Bcl-2, prokaspasu-9 či *forkhead* rodinu transkripčních faktorů). Akt také umožňuje aktivaci anti-apoptických genů. Delece receptoru EGF v renálních proximálních tubulárních buňkách narušuje PI3K/Akt signalizaci, čímž může zpomalovat regeneraci po AKI (Chou et al., 2014).



Obrázek 5 – PI3K/AKT/mTOR signální dráha
 (PIP2 – fosfatidylinositol-4,5-difosfát; PIP3 – fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát;
 PDK1 – proteinkinasa 1; AKT – proteinkinasa b; PTEN – fosfatasový a tensinový homolog;
 AR – androgenový receptor; mTOR – Mammalian Target Of Rapamycin) (Phin et al., 2013).

Další signální dráhou, která se může podílet na regeneraci ledvin je MAPK/ERK dráha (MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase* / ERK – *Extracellular signal-Regulated Kinase*) (obrázek 6). MAPK jsou rodinou kinas, které byly běžně studovány při onemocnění ledvin (Chou et al., 2014). *Extracellular signal-regulated kinase* je aktivována zejména extracelulárními signály regulovanými kinasou-1 a -2 a růstovými faktory, které se váží na své receptory (Chou et al., 2014). Aktivovaný tyrosinkinasaový receptor fosforyluje a aktivuje Ras proteiny (Chou et al., 2014; Mochizuki et al., 2015). Ras proteiny patří do velké rodiny GTPas, které jsou aktivovány různými extracelulárními stimuly, jako jsou například růstové faktory. Tyto proteiny kontrolují buněčné signální dráhy, které jsou zodpovědné za růst, migraci, adhezi cytoskeletární integritu, přežití a diferenciaci. Jejich hlavním úkolem je sestavit přechodné signalizační komplexy v membráně, které aktivují tyto dráhy (Rajalingam et al., 2007). Aktivované Ras proteiny aktivují serin/threonin kinasovou funkci rapidně akcelerované fibrosarkomy, která dále fosforyluje mitogenem aktivovanou proteinkinasa kinasu. Ta

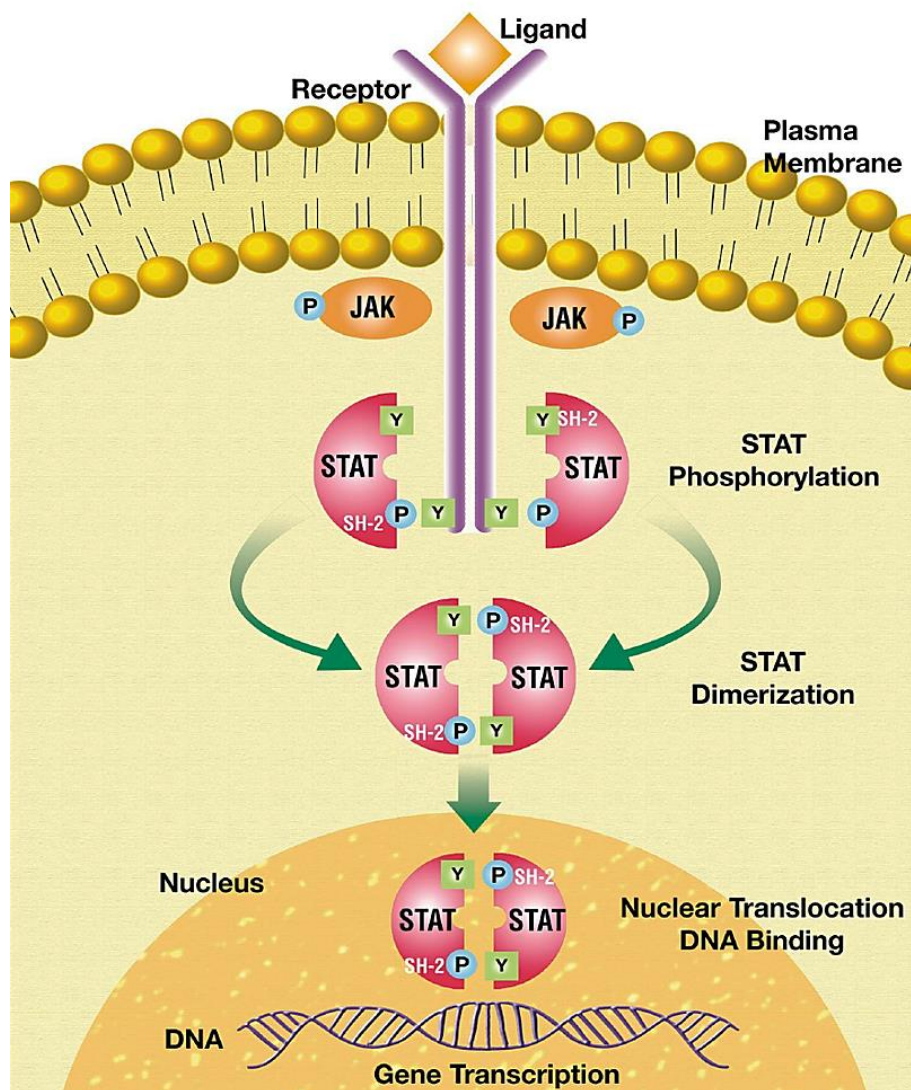
následně fosforyluje a aktivuje *extracellular signal-regulated kinase*, důsledkem čehož dojde k iniciaci signální transdukce mnoha genů, které se podílejí na různých buněčných procesech. *In vitro* byla aktivace *Extracellular signal-Regulated Kinase* zkoumána při regeneraci ledvin, neboť by mohla zvýšit přežití renálních buněk v průběhu oxidačního poškození. Aktivace signálního transduktoru a aktivátoru transkripce-3 v průběhu oxidačního stresu může zmírnit EGF aktivaci *extracellular signal-regulated kinase* zprostředkovanou receptory a přežití renální tubulární buňky. *In vivo* měla inhibice *extracellular signal-regulated kinase* vliv na snížení regenerace ledin u potkanů s myogloglobinurií vedoucí až k AKI (Chou et al., 2014; Mochizuki et al., 2015).



Obrázek 6 – MAPK/ERK signální dráha
 (EGF – epidermální růstový faktor; EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru;
 GRB2 – receptor pro růstový faktor vázající protein 2; SOS – syn sevenless homologu;
 Ras = protein vázající guaninový nukleotid; Raf – rapidně urychlený fibrosarkom;
 MEK – mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinas; Erk – extracellular signal-regulated kinase)
 (Mochizuky et al., 2015).

Třetí signální dráhou, která má zřejmě významný vliv v regeneračním procesu ledvin je JAK/STAT dráha (JAK – *Janus-Activated Kinase* / STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*) (obrázek 7). Po navázání růstového faktoru (např. EGF)

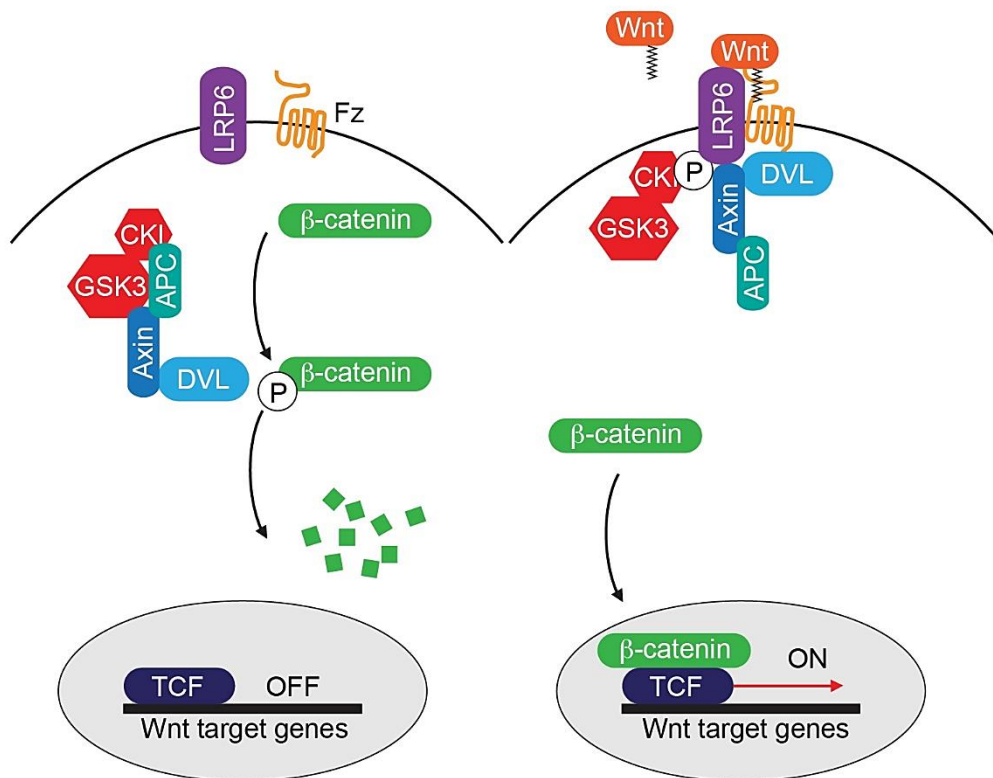
na svůj receptor, se JAK aktivují a fosforylují intracelulární oblast receptoru. Tím umožní přijímání a fosforylaci STAT. Aktivované STAT tvoří dimery, které se následně přesouvají do jádra, kde se váží na specifické elementy v promotorech cílových genů, čímž aktivují v těchto genech transkripci (Heim, 1999). Prostřednictvím aktivace JAK/STAT dráhy mohou proteiny stimulující erytropoézu potlačovat apoptózu v renálních tubulárních buňkách *in vitro* a zlepšovat regeneraci ledvin u AKI vyvolaného cisplati. Inhibice JAK/STAT dráhy může také vést ke snížení apoptózy tubulárních buněk (Chou *et al.*, 2014).



Obrázek 7 – JAK/STAT signální dráha
 (JAK – Janus-activated kinase; STAT – signal transducer and activator of transcription;
 SH-2 – Src homolog 2; P – fosfát; Y – tyrosin) (Benekli *et al.*, 2002).

Poslední zmíněnou dráhou, jejíž vliv se může uplatňovat při regeneraci ledvin, je Wnt – GSK-3 – β -katenin dráha (GSK-3 – *Glycogen Synthase Kinase 3*) (obrázek 8). Tyto Wnt jsou sekretované a glykosylované proteinové ligandy. Wnt signály mohou inhibovat fosforylací. Je-li GSK-3 inhibována, β -katenin je stabilizován a přemístí se do jádra, kde působí jako koaktivátor transkripce faktoru T-buněk/lymfoidní faktory vázající se na zesilovač a řídí expresi cílových genů (Chou et al., 2014). Tato dráha se podílí na regulaci buněčného osudu, syntéze bílkovin, metabolismu glykogenu, pohyblivosti, proliferaci a přežití buněk. Wnt odpovědi dráhy jsou indukovány v ledvinách po AKI. Bylo prokázáno, že genetická inaktivace Wnt signalizace zhoršuje regeneraci ledvin a obnovení jejich funkce. Bylo také prokázáno, že Wnt ligand – makrofágy derivovaný *Wnt family member 7b* podporuje regeneraci tubulárních buněk a opravu ledvin. Ve směru proudění Wnt signalizace, GSK-3 je normálně inhibována Wnt ligandy a také mnoha dalšími proliferativními signály kontrolujícími přežití, které zvyšují serinovou fosforylací (IGF, EGF a růstové faktory fibroblastů 16, 19 a 23) (Chou et al., 2014).

U AKI může GSK-3 podporovat systémovou zánětlivou odpověď a účastnit se řady apoptotických signálních drah pomocí fosforylace transkripčních faktorů, které regulují apoptózu. Thiazolidiny-8, inhibitory GSK-3, mohou inaktivovat ischemicky indukovanou aktivaci GSK-3, čímž se zmírní apoptóza tubulárních buněk a ochrání se renální funkce. Exprese β -kateninu může být indukována v AKI a renální specifický *knockout* endogenního β -kateninu zhoršuje AKI u myší. Dále bylo zjištěno, že inhibice GSK-3 může zlepšit AKI, které je indukováno nesteroidními protizánětlivými léky. Aktivace Wnt/GSK-3/ β -katenin dráhy je výhodná pro mnoho onemocnění ledvin, jelikož inhibitory GSK-3 mohou být v budoucnosti cílem mnoha terapeutických prostředků (Chou et al., 2014).



Obrázek 8 – Wnt-GSK3-β-katenin dráha

(http://wormbook.org/chapters/www_wntsignaling.2/wntsignal_fig1.jpg)

Wnt – wingless-type MMTV integration site family; LRP6 – protein 6 příbuzný s receptorem nízkodenzitního lipoproteinů; CK1 – kaseinkinasa 1; GSK-3 – glycogen synthase kinasa 3; Fz – Frizzled; APC – adematózní polyposa Coli; DVL – Dishevelled; TCF – transkripční faktor; P – fosfát

3.2 Využití kmenových buněk při regeneraci ledvin

Kmenové buňky jsou populace nediferencovaných buněk, které se mohou dělit a diferenciovat do různých specializovaných buněčných typů. Jsou schopny sebeobnovy a mohou generovat funkční progenitory vysoce specializovaných buněk (Chou *et al.*, 2014; Suresh, 2012). Terapie KB může při poškození ledvin zahrnovat indukci opravy pomocí endogenních a exogenních buněk, nebo přeprogramování orgánu k obnovení vývoje (Hopkins *et al.*, 2009).

KB můžeme rozdělit podle schopnosti diferenciaci na totipotentní, pluripotentní a multipotentní KB. Z totipotentní KB se mohou tvořit všechny buněčné linie včetně placenty. Příkladem totipotentní KB je zygota. Pluripotentní KB mohou tvořit většinu buněčných linií. Příkladem těchto KB jsou embryonální KB a indukované pluripotentní KB. Multipotentní KB mají omezenou diferenciací schopnost a mohou tvořit pouze

jeden typ buněk, jako jsou například krevní buňky, neurony, monocyty a endoteliální buňky (Suresh, 2012; Osafune, 2010).

Dále můžeme KB rozdělit na fyziologicky se vyskytující KB, patologické buňky (např. nádorové KB) a buňky indukované, které byly cíleně (uměle) na KB přeměněné přeprogramováním diferencovaných somatických buněk (Ptáček *et al.*, 2014). Během posledních let byly za účelem možného využití při regeneraci ledvin zkoumány různé typy kmenových buněk, z nichž některé by mohly vést ke zlepšení této problematiky.

3.2.1 Endoteliální kmenové buňky

Endoteliální KB jsou pluripotentní KB, které jsou odvozené z vnitřní buněčné hmoty oplodněných vajíček savců. Myši i lidské endoteliální KB mají prakticky neomezenou replikační kapacitu (Osafune, 2010). Tyto buňky mají schopnost diferenciaci do několika buněčných typů v mesodermální, endodermální a ektodermální linii (Chou *et al.*, 2014).

Endoteliální KB mají velký potenciál pro regeneraci ledvin právě díky jejich pluripotenci a schopnosti se diferencovat do buněk ektodermálních, mesodermálních a endodermálních linií (Pino *et al.*, 2010; Little, 2006). Právě potenciál odvodit mesodermální tkáň vytváří dobré podmínky pro renální diferenciaci (Little, 2006). Mnoho studií se zabývalo využitím těchto KB při regeneraci ledvin.

Při studii vědci zjistili, že vytvořené Wnt4-embryoidní tělíska (Wnt4 je renální vývojový gen exprimovaný v mezenchymu a metanefrických ledvinách) mají schopnost diferencovat se do renální tubulárních buněk, a to *in vitro* i *in vivo*. V jedné studii byly po transfekci Wnt4 cDNA do myších endoteliálních KB, nediferencované endoteliální KB inkubovány pomocí metody *hanging-drop* kultury pro indukci diferenciaci na embryoidních tělískách. V průběhu kultivace embryoidních tělísek odvozených z Wnt4-endoteliálních KB, byl aquaporin-2 mRNA spolu s proteinem exprimován během 15–20 dnů. Exprese aquaporinu-2 v Wnt4-embryoidních tělískách byla zvýšena v přítomnosti HGF a aktivinu A. Při pokusech *in vivo* byla prováděna transplantace Wnt4-embryoidních tělísek do myšího renálního kortexu. Čtyři týdny po transplantaci byly některé části buněk odvozených z embryoidních tělísek exprimující aquaporin-2 v ledvinách sestaveny do formace, která byla podobná tubulární. Během této studie bylo také *in vivo* a *in vitro* zjištěno, že Wnt4 a aktivin A mohou podporovat diferenciaci endoteliálních KB do tubulárních buněk ledvin (Kobayashi *et al.*, 2005).

V jiné studii *Kim et al. (2005)* použili nervové růstové faktory k diferenciaci těchto KB do renálních epitelových buněk, které jsou schopné integrovat se do vyvíjejících se ledvin s vysokou účinností. Pomocí kombinace kyseliny retinové, aktivinu A a kostní morfogenický protein-7 (jehož podávání je v průběhu progresu fibrotického onemocnění přínosné pro omezení fibrózy ledvin) mohou být indukovány k expresi markerů specifických pro intermediální mezoderm, ze kterého vznikají ledviny. Embryoidní tělíska, která jsou kultivována v přítomnosti nefrogenních faktorů, mohou reagovat na indukční signály a tvořit epitelové struktury *in vitro*. Po injikaci do rozvíjejícího se ledvinného rudimentu jsou ošetřené endoteliální KB schopny se 100% začlenit do rozvíjejících se renálních tubulů (*Hopkins et al., 2009; Kim et al., 2005; Morrissey et al., 2002*).

Při další studii *Steenhard et al. (2005)* dosáhli 50% integrace nediferencovaných endoteliálních KB do tubulů embryonálních ledvin (*Hopkins et al., 2009*). Tato studie měla za cíl zjistit, zda tyto KB mohou reagovat na vývojové signály v myším embryonálním dnu 12 až 13 ledvinného mikroprostředí a začlenit je do ledvinových struktur. Endoteliální KB ROSA26 jevíly známky exprese beta-glukosidasy ubikvitárně při kultivaci v přítomnosti faktoru inhibující leukemii k potlačení diferenciaci. Když byly tyto buňky injikovány do embryonálního dne ledvin 12 až 13 a poté se umístily do transwell orgánové kultury, derivované endoteliální KB, beta-galaktosidasa pozitivní buňky byly identifikovány v epitelálních strukturách připomínající tubuly. Ve vzácných případech byly jednotlivé endoteliální KB pozorovány u struktur připomínajících glomerulární chomáče. Elektronová mikroskopie ukázala, že endoteliální KB derivované tubuly byly obklopeny bazální membránou a měly apikální mikrokilky a junkční komplexy (*Steenhard et al., 2005*).

Bylo také prokázáno, že kromě výroby renálních buněk, mohou tyto KB vyvinout teratom (*Chou et al., 2014*). Ureterální pupen epitelální buňky a metanefrické mezenchymální buňky, které tvoří primordium metanefrických ledvin, jsou schopny produkovat nefrony a sběrné kanálky prostřednictvím vzájemné induktivní interakce. Jakmile jsou tyto buňky indukovány z endoteliálních KB, mají potenciál stát se výkonnými nástroji pro regeneraci ledvinových tkání. Exprese genu – zásadní pro vývoj časných ledvin, byla zkoumána pomocí RT-PCR ve výrůstcích embryoidních tělísek a jejich transplantace do dospělých myší. Histochemické detekce ledvinových primordiálních konstrukcí a analýzy genové exprese spojené s laserovou mikrodisekcí

byly provedeny v transplantovaných tkáních. RT-PCR analýza detekovala genové exprese Pax-2, Lim-1, c-Ret, EMX2, Sall1, WT-1, EYA-1, GDNF a Wnt-4 ve výrůstcích embryoidních tělísek ze dnů 6–9 expanze kupředu a také v teratomové tkáni 14 a 28 dní po transplantaci. Histochemická analýza 14 dnů po transplantaci ukázala, že některé kanály byly pozitivní na Pax-2, endo A cytokeratin, ledvinově specifický cadherin a Dolichos biflorus aglutininu a že došlo k odbočení těchto kanálů. Tyto skvrnitě vzory a morfologické znaky jsou podstatné pro Wolffův vývod a ureterální pupeny. Při dlouhodobém přežití 28 dní a uvedení diferenciací ledvinových struktur podobných imordiím, zmizela Pax-2-imunoreaktivita z některých těchto struktur. Některé kanály byly doprovázeny stočenými tubuly, které byly podobné metanefrickým nefronům. RT-PCR analýza těchto struktur shromážděných mikrodisekcí potvrdily, že exprimují s vývojem související geny (Yamamoto *et al.*, 2005).

I přes úspěchy v tomto směru regenerace ledvin, tato strategie naráží stále na několik problémů, jako jsou právní a etické otázky (Little, 2006).

3.2.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Dalším typem buněk, které byly zkoumány v oblasti regenerace ledvin byly indukované pluripotentní kmenové buňky. Tento typ buněk se získává přeprogramováním již z diferencovaných buněčných typů zpět do pluripotence (Yu *et al.*, 2010). Svým původem jde tedy o somatické buňky (Ptáček *et al.*, 2014). Tyto buňky jsou podobné endoteliálním KB a jsou schopné se vyvinout do všech typů buněk v těle (Chou *et al.*, 2014; Pino *et al.*, 2010).

Tyto buňky byly objeveny japonskými vědci, kteří přeprogramovali myší embryonální nebo dospělé fibroblasty, aby se staly pluripotentními KB zavedením čtyř transkripčních faktorů – OCT3/4, Sox2, c-Myc a Klf4 za podmínek buněčné kultivace těchto endoteliálních. Lidské indukované pluripotentní KB byly později indukovány s použitím stejné technologie (Takahashi *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2010) Diferencované buňky mohou být přeprogramovány do podobného stavu, jako je embryonální, převodem nukleárního obsahu do oocytů, což je postup, ve kterém je jádro z dospělé buňky injikováno do neoplodněného vajíčka, jehož chromozomy byly odstraněny. Další možností je fúze somatických buněk s endoteliálními KB, kde výsledné tetraploidní hybridní buňky umlčely expresi somatických genů a stanovily program transkripce, který je nerozeznatelný od endoteliálních KB, což dokazuje, že ty endoteliální obsahují nezbytné přeprogramovací činnosti pro dosažení této transkripce

(Osafune, 2010; Takahashi et al., 2006). Studie ukázala, že indukované pluripotentní KB vykazují morfologické a růstové vlastnosti endoteliálních KB a expresi jejich markerových genů. Po injekci do blastocyt, indukované pluripotentní KB přispěly k myšimu embryonálnímu vývoji (Takahashi et al., 2006). Další vlastností těchto buněk je, že mohou diferencovat do všech třech embryonálních zárodečných listů (Yu et al., 2010). Pluripotence těchto buněk byla potvrzena tvorbou teratomu a globální profily genové exprese ukázaly, že indukované pluripotentní KB jsou velmi podobné těm endoteliálním, ale nejsou s nimi identické (Pino et al., 2010).

Studie Morizane et al. 2009, ve které byly srovnávány endoteliální a indukované pluripotentní KB ukázala, že oba typy KB mají účinnost na diferenciaci na zralé renální buňky, nicméně indukované pluripotentní KB mají tendenci zůstat bez rozlišení a mají menší citlivost na renální diferenciacní podněty ve srovnání s endoteliálními KB (Pino et al., 2010). Použití indukovaných pluripotentních KB má několik výhod – žádné etické otázky a není zde problém s odmítnutím imunitního systému. Existují však zde i rizika. Klf4 a c-Myc jsou onkogenní faktory. Výzkum však ukázal, že onkogenní riziko spojené s použitím těchto KB získaných z lidských renálních buněk proximálního tubulu může být sníženo expresí jen dvou transkripčních faktorů – Oct4 a Sox2. Kromě toho, některé buňky diferencované z indukovaných pluripotentních KB mohou vyjádřit abnormální gen, a indukovat T-buňky závislé na imunitní odpovědi u syngenních příjemců (Chou et al., 2014).

3.2.3 Buňky odvozené z kostní dřene

Kostní dřev obsahuje dvě hlavní populace KB – hematopoetické KB a mesenchymální stromální KB, které poskytují podporu pro stromální hematopoetické KB (Chou et al., 2014). Mesenchymální KB jsou multipotentní buňky, které se diferencují na osteoblasty, monocyty, chondrocyty, adipocyty či buňky produkující inzulín – jsou k nalezení prakticky v každé tkáni. Základní mechanismus pro jejich *in vivo* diferenciaci není jasný, předpokládá se, že je způsoben spontánní buněčnou fúzí nebo faktory, které jsou přítomny v mikroprostředí. Tento typ KB je považován za subpopulaci perivaskulárních buněk nebo pericytů (Dziedzic et al., 2014; Kode et al., 2009).

Role mesenchymálních KB byla nejprve analyzována ve studii, při které byly tyto buňky izolovány z myši kostní dřene a následně byly transplantovány do myši, které měly cisplatinou indukované AKI. Čtvrtý a jedenáctý den po ošetření mesenchymálními KB bylo zjištěno zlepšení renální struktury a výrazné zvýšení tubulární buněčné proliferace,

což naznačuje stimulaci tubulárního buněčného růstu faktory, které jsou uvolňovány mesenchymální KB, jako je například IGF-1. Zlepšení renální struktury bylo doprovázeno zrychlenou obnovou renální funkce, která byla indikována nižší hladinou dusíku močoviny v krvi, což nebylo pozorováno po léčbě hematopoetickými KB. Mesenchymální KB mohou diferencovat do tubulárních epitelových buněk a podporovat proliferaci epitelových buněk, což bylo pozorováno u myší, které měly glycerolem vyvolané AKI. Nicméně, další studie ukázaly, že zlepšení funkce ledvin po infúzi těchto KB se vztahuje k parakrinnímu nebo endokrinnímu mechanismu (*Sagrinati et al., 2008*).

Tögel et al. (2005) uvádí, že renální ochrana mesenchymálních KB u kryš s AKI byla zprostředkována spíše přes inhibici protizánětlivých cytokinů a stimulaci anti-zánětlivých cytokinů v postischemických ledvinách než diferenciací mesenchymálních KB na renální tubulární buňky, což naznačuje, že mohou vykazovat imunomodulační vlastnosti (*Sagrinati et al., 2008*). Zásadním průlomem bylo zjištění, že mesenchymální KB mají hluboký inhibiční účinek na proliferaci T-buněk *in vitro* a *in vivo*. Následně bylo také zjištěno, že mohou mít podobný účinek i na B-buňky, dendritické buňky a na buňky, které jsou nazývány přirozenými zabíječi. Tyto výsledky naznačují, že by tyto KB mohly být použity k tlumení imunitně zprostředkovaného onemocnění a odmítnutí transplantátu. Je možné, že některé jejich příznivé účinky mohou odrážet z části trofické a ochranné činnosti, které vyvíjejí na poraněných buňkách a tkáních, spíše než v důsledku skutečné transdiferenciace. U imunitně zprostředkovaných onemocnění, jako je glomerulonefritida, mohou ochranné účinky fungovat ve shodě s imunosupresivními a protizánětlivými účinky (*Uccelli et al., 2007; Sagrinati et al., 2008*).

Novější studie vědců *Tögel et al. (2007)* ukázala, že mesenchymální KB produkují VEGF, HGF a IGF-1, což naznačuje, že parakrinní účinek na renální vaskulaturu by mohl přispět k ochraně ledvin. Kromě toho, jejich intraperitoneální podávání kondicionovaného média z kultivovaných do myší injikovaných cisplatinou vedlo ke zmenšení apoptózy tubulárních buněk, zvýšení přežití a zmenšení poškození ledvin. Mesenchymální KB mohou tedy chránit ledviny před toxickým poškozením tím, že vylučují faktory, které omezují apoptózu a zvyšují proliferaci endogenních tubulárních buněk. Ačkoli tento typ KB představují zajímavý terapeutický potenciál při akutním tubulárním poškození, některé studie naznačují, že celá transplantace kostní dřeně, ale ne

transplantace mesenchymálních KB má blahodárny účinek v modelech glomerulárního poškození (*Sagrinati et al., 2008*).

3.2.4 Renální progenitorové buňky

Při mnoha studiích byly v dospělých ledvinách objeveny buňky podobné pluripotentním, které se nazývají renální progenitorové buňky. Na rozdíl od kmenových buněk, mohou renální progenitorové buňky diferencovat pouze do určitého konkrétního buněčného typu, a neprojevuje se u nich buď žádný, anebo omezený potenciál sebeobnovy (*Chou et al., 2014*). Dospělé progenitorové buňky byly úspěšně izolovány z renálních tubulů, intersticia a Bowmanova pouzdra a obecně mají podobné vlastnosti. Tyto buňky se vyznačují expresí CD24, CD133 znaků a transkripčního faktoru Pax2 (*Pavyde et al., 2016*).

Renální progenitorové buňky jsou identifikovány podle buněčných markerů CD133 a CD24. CD133, známý také jako prominin-1, je membránový glykoprotein, který je na chromozomu 4p15.32. Má úlohu při spojení kmenových buněk a zachování polarity. Tento glykoprotein je markerem několika typů dospělé tkáně kmenových buněk. Tepelně stabilní antigen CD24 je buněčný povrchový sialoglykoprotein, který je exprimován v lidském metanefrickém mezenchymu (*Nosrati et al., 2016; Chou et al., 2014; Ivanova et al., 2010*). V savčím nefronu se dospělé renální progenitorové buňky shromažďují u močovém pólu a rozptylují se přes Bowmanovo pouzdro, proximální tubulus, tenké vzestupné raménko a distální tubulus v místě spojení s močovodem. Renální progenitorové buňky mohou v močovém pólu diferencovat na glomerulární nebo tubulární buňky. Tubulární progenitorové buňky představují 2 – 6 % všech tubulárních buněk u zdravých dospělých ledvin a exprimují CD133 a CD24, dále vimentin, cytokeratin 7 a 19, Pax2 a nestin, které nejsou exprimovány diferencovanými tubulárními buňkami. Tento typ buněk se nachází v proximálních i distálních stočených tubulech. Tubulární progenitorové buňky vykazují nižší proliferační schopnost a vykazují oddaný fenotyp k tubulární linii. Glomerulární progenitorové buňky lokalizované uvnitř Bowmanova pouzdra vykazují vysokou proliferační schopnost a mohou diferencovat k fenotypu podocyty nebo tubulárním buňkám. Glomerulární progenitorové buňky mohou, na rozdíl od těch tubulárních, exprimovat povrchový marker zvaný CD106 (*Chou et al., 2014; Angelotti et al., 2012*).

Lee et al. (2010) a jejich studie ukázala, že myší renální progenitorové buňky vykazují plasticitu, což bylo prokázáno schopností diferencovat se do endotelových

buněk a osteoblastů *in vitro* a endoteliálních buněk a tubulárních epitelových buněk *in vivo*. Původ těchto izolovaných progenitorových buněk byl z intersticia dřeně a papily. Důležité je, že intrarenální injekce renálních progenitorových buněk myším s ischemickým poškozením zachránily zvířata před poškozením ledvin. To se projevilo snížením koncentrace sérového dusíku močoviny, infarktové zóny a nekrotického poškození. Sedm dní po poškození vytvořily některé myši z renální progenitorové buňky cévy s červenými krvinkami, zatímco některé se začlenily do renálních tubulů. Kromě toho, terapie těmito buňkami snižovala také úmrtnost po ischemicko/reperfuzním poškození (Lee et al., 2010).

Pokud jde o glomerulární poškození, jiná studie uvádí, že CD133+ a CD24+ buňky mohou nahradit podocyty a zlepšit chronické poškození glomerulů při adriamycinové nefropatii (Chou et al., 2014). Renální progenitorové buňky vykazují vyšší odolnost vůči poškození ve srovnání se všemi ostatními diferencovanými renálními buňkami. Po podání myším trpícím těžkou kombinovanou imunodeficiencí afektovanou akutním tubulárním poškozením projevily obě populace progenitorových buněk schopnost začlenit se do ledvin, generovat nové tubulární buňky a zlepšit tak renální funkce (Angelotti et al., 2012).

KB nemohou být snadno ovlivněny, aby diferencovaly do požadovaných renálních buněk, a proto se jeví renální progenitorové buňky více použitelné pro účely regenerativní medicíny, i přes to, že mají nižší účinnost. Ve srovnání s kmenovými buňkami spočívají výhody použití renálních progenitorových buněk ve znalosti intermediálních podmínek buněčné kultivace. Další výhodou je, že renální progenitorové buňky mohou přejít přímo z jednoho fenotypu do jiného (Chou et al., 2014).

3.3 Angiogenese a v regeneraci ledvin

Angiogenese je komplexní proces, který se vyznačuje vznikem nových krevních cév z již existujících, a to buď příjmem nebo místní diferenciací endoteliálních progenitorových buněk odvozených z kostní dřeně. Do tohoto procesu se zapojuje několik typů buněk, zejména pak endoteliální buňky, buňky vaskulárního hladkého svalstva a pericyty. Tyto buňky se podílejí na sledu událostí, mezi které patří proliferace endoteliálních buněk, migrace a diferenciaci, jež jsou regulovány pro- a anti-angiogenními faktory (Duarte et al., 2011). Integrita cévního systému je nezbytná pro regeneraci ledvin či snížení jejich poškození, zejména však při chronickém onemocnění ledvin. Bez ohledu na to, jaké jsou příčiny chronického onemocnění ledvin,

společným výsledkem je progresivní ztráta mikrocirkulace, což vede ke tkáňové hypoxii a zánětu, dále k fibrotickým změnám a ztrátě nefronů. Tkáňová fibróza vede k dalšímu prořídnutí tkáně a tento bludný kruh způsobuje nevratné poškození ledvin. Kromě VEGF mají na angiogenesi vliv angiopoetiny (Ang) (Chou et al., 2014).

Ang jsou rodina růstových faktorů, které působí na Tie receptor na endoteliálních buňkách a která má čtyři Ang členy – Ang-1, -2, -3 a -4. Ang-1 je známý jako angiogenní faktor, funkce Ang-2, -3 a -4 však není dobře známa. Receptory Ang se skládají ze dvou receptorových tyrosinkinasy – tyrosinkinasy s imunoglobuliny a EGF homologní domény 1 a 2 (Tie1 a Tie2). Receptory Tie jsou výhradně exprimovány endotelovými buňkami a hematopoetickými buňkami, Tie2 dále také v makrofázích, eozinofilech a hematopoetických KB. Tato tyrosinkinasa může být detekována v kapilárách nefrogenní kůry, glomerulárním klubíčku, korovém intersticiu a dřeni včetně cév ve vasa recta. Přesná úloha Tie1 není přesně známa. Ang-1 a -2 se váží na stejné místo v Tie2 a uvádí se, že Ang-2 je antagonistou Ang-1 (Kim, 2008; Woolf et al., 2009).

Ang-1 je široce exprimovaný ligand pro Tie2 a je detekovatelný v podocytech ve fyziologických glomerulech. Tento Ang reguluje vaskulární růst, vývoj, zrání a propustnost. Bylo také prokázáno, že tento Ang vykazuje protizánětlivé účinky a má potenciální terapeutické využití v indukci angiogenese, podpoření přežití endotelových buněk a při prevenci vaskulárního prosakování. Poruchy endoteliální integrity v ledvinách mohou vést ke snížení rychlosti glomerulární filtrace nebo k proteinurii. Studie prokázala, že Ang-1 v glomerulech nebo renálních epitelových buňkách může hrát roli v udržování glomerulárního nebo peritubulárního endotelu v ledvinách a při udržování normálního vývoje ledvin. To dokazuje fakt, že patofyziologické podmínky, konkrétně nefropatie vyvolaná kyselinou listovou je spojena se zvýšenou Ang-1 proteinovou expresí v epitelu a cévách. Bylo také dokázáno, že ztráta glomerulárních kapilár v průběhu glomerulonefritidy u myši byla časově spojená s poklesem přežívajících molekul Ang-1 (Kim, 2008).

Vědci vyvinuli rozpustnější, stabilnější a účinnější Ang-1 variantu – oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1. Při studii byl do diabetických myši podáván rekombinantní adenovirus exprimující oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1. To mělo za následek snížení albuminurie, dále snížení mesangiální expanze, poškození podocytů doprovázené sníženou infiltrací makrofágů, útlum chemokinů a adhezních molekul a ztlustění glomerulární bazální membrány oligomerní protein chrupavkové

matrix-Ang-1 tlumí jak renální renální expresi intracelulární adhezní molekuly-1, tak monocytárního chemoatraktivního proteinu 1 a infiltraci monocytů/makrofágů u diabetických myší. Oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1 také snižuje renální tkáňové hladiny TGF β -1, α -aktin hladkého svalstva a fibronektin. Během této studie se zjistilo, že oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1 zpozdil fibrotické změny v ledvinách diabetických myší, a to svými protizánětlivými nebo metabolickými účinky. Při jiné studii byl podáván oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1 myším s jednostrannou ureterální obstrukcí indukované renální fibrózou. Po terapii byl renální povrch mikrovaskulatury a renální průtok krve vyšší než po léčbě vehikulem. Opět došlo k potlačení infiltrace monocytů/makrofágů a snížení tkáňové hladiny TGF β -1. Tyto výsledky naznačují, že léčba oligomerním proteinem chrupavkové matrix-Ang-1 může zabránit progresi renální fibrózy u myší s jednostrannou ureterální obstrukcí. Při cyklosporinem indukovaném poškození ledvin, oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1 snížil cyklosporinem indukované tubulární poškození a tubulointersticiální fibrózu u histologického vyšetření. Po podání byl také snížen počet infiltrovaných makrofágů, došlo ke snížení exprese adhezních molekul a klesla hladina indukovaně zvýšeného TGF β -1. Během vyšetření bylo zjištěno, že oligomerní protein chrupavkové matrix-Ang-1 během tohoto poškození ledvin měl ochranný účinek na peritubulární vaskulatury a intrarenální hemodynamické změny (*Lee et al., 2007; Kim, 2008; Chou et al., 2014*).

Naopak zvýšené hladiny plasmatického Ang-2 jsou spojeny s kardiovaskulárním onemocněním u pacientů s chronickým onemocněním ledvin v jehož progresi může hrát roli (*Chou et al., 2014*). Zvýšené hladiny Ang-2 v plasmě byly popisovány při chronickém poškození ledvin a v konečném stádiu onemocnění ledvin. Právě vysoké hladiny tohoto Ang předvídají dlouhodobé mortality u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Ang-2 destabilizuje klidový endotel a připravuje ho reagovat na exogenní podněty, a tím moduluje aktivitu zánětlivých a angiogenních, například VEGF, cytokinů. Ve spojení s VEGF je Ang-2 důležitým angiogenním stimulem destabilizovaných cév. Když je VEGF signalizace inhibována, nebo chybí, Ang-2 vede k buněčné apoptóze a vaskulární regresi. V reakci na ligand *Wnt family member 7b* z makrofágů, vaskulární endoteliální buňky vstupují do buněčného cyklu a v nepřítomnosti přežívajícího signálu, který byl blokován Ang-2, dochází k apoptóze těchto buněk (*Chang et al., 2013*).

Ukázalo se, že endotelové progenitorové buňky se účastní rekonstrukce mikrocévního intersticia a glomerulů (*Chou et al., 2014*). Endotelové progenitorové buňky mohou být v přítomnosti angiogenních stimulů mobilizovány z kostní dřeně do oběhu, potom se dostávají na poškozený endotel, kde se mohou diferencovat na zralé endotelové buňky (*González-Pecchi et al., 2015*). Studie prokázala, že u myši s adriamycinovou nefropatií adoptivní transfer intaktních endotelových progenitorových buněk zlepšil proteinurii a renální funkce s trojnásobným poklesem úmrtnosti. Infúze endotelových progenitorových buněk do těchto myši snížila plasmatické hladiny IL-1 α a - β a faktor stimuluje kolonie granulocytů, jakož i zvýšení VEGF při současném zlepšení vaskulární hustoty a apoptózy. Vědci zjistili, že lipoproteiny s vysokou hustotou mohou zvýšit úroveň a funkčnost (proliferace, migrace, diferenciace, angiogenní kapacita) cirkulujících endotelových progenitorových buněk (*González-Pecchi et al., 2015*).

3.4 Bioinženýrství

Vzhledem k tomu, že přibývá pacientů s terminální fází poškození ledvin, kteří jsou na dialýze, a je nedostatek dárců ledvin, jsou vědci nuceni zkoumat možnost bioinženýrství ledvin (*Chou et al., 2014*). Tkáňové a bioinženýrské přístupy jsou obecně na základě *in vitro* manipulace buněk zájmu a jejich spojení s biomateriály, které mohou být buď biologicky odbouratelné, nebo mohou být trvalé povahy k vyvinutí buněčného implantátu či zabudování do mimotělního oběhu. V současné době je strategií pro buněčnou terapii ledvin vyvinutí jediného diferencovaného buněčného typu, který by nahradil jejich specifické metabolické nebo katabolické funkce. Je ovšem ještě nutné, důkladně prostudovat a vyvinout biotechnologické nástroje potřebné pro výrobu kompletního fungujícího orgánu vhodného k transplantaci (*Pino et al., 2010*).

Mezi možné přístupy k léčení selhání ledvin může patřit použití buněčných implantátů, které odstraní toxiny, které způsobují chorobný stav, nebo je možno dodat terapeutická činidla do oběhu. Při jedné studii byla použita kolagenová houba na bázi implantátu naočkována s buňkami, které exprimovaly megalin, aby degradoval cirkulující β 2-mikroglobulin, jehož ukládání způsobuje s dialýzou související amyloidózu (*Pino et al., 2010; Saito et al., 2003*). Pro klinické začlenění implantátů je nutné využití metod pro zlepšení hostitelské imunologie nebo je nutné použít autologní buněčné zdroje. Zapouzdření je metoda, která se využívá k obejití problémů, které jsou spojeny s buněčnými implantáty. Zapouzdření do semipermeabilní nedegradované polymerní membrány má tu výhodu, že imunoizolace alogenních nebo xenogenních

buněk umožňuje větší stupeň kontroly nad jejich cíli uvnitř těla a zároveň umožňuje kontakt s tělními tekutinami, které jsou potřebné k vyvolání fyziologické odpovědi (Pino *et al.*, 2010).

Dřívější studie navrhly hemofiltrační zařízení, která jsou vybavena bioinženýrskými kanálky (Chou *et al.*, 2014). I když je tento systém život udržující, klinické výsledky byly stále špatné u pacientů s AKI nebo v terminální fázi poškození ledvin. Tento proud terapie využívá syntetické membrány, které nahrazují clearanci renálních glomerulů, ale nenahrazuje transportní, metabolické a endokrinní funkce tubulárních buněk. Tento problém byl vyřešen přidáním zařízení buněčné terapie renálních tubulů, které obsahovalo prasečí renální tubulární buňky a které v kombinaci se syntetickou hemofiltrací nahradilo filtrační, transportní, metabolické a endokrinní funkce u akutně uremických psů. Došlo také k dočasnému zlepšení funkce ledvin u pacientů s AKI (Humes *et al.*, 1999; Chou *et al.*, 2014).

Při jiném výzkumu se vědci pokoušeli vyvinout ledviny, které by měly stejné morfologické a funkční vlastnosti ledvin a zároveň by umožňoval perfuzi, filtraci, sekreci, absorpci a odvod moči (Chou *et al.*, 2014). Vytvoření transplantovatelného štěpu, který by trvale nahradil funkci ledvin, by řešilo nedostatek dárců ledvin a problém morbiditu spojený s imunosupresí. Takový štěp by právě musel mít strukturu a funkci ledvin, aby umožňoval perfuzi, filtraci, sekreci, adsorpci a odvod moči. Při tomto výzkumu vědci decelularizovali potkanní, prasečí a lidské ledviny, čímž získali acelulární *scaffold* neboli lešení s cévními, kortikálními a dřevnými architekturami kanálků a močovodů. Pro regeneraci funkční tkáně bylo renální potkanní *scaffolds* naočkováno epitelálními a endotelálními buňkami a tyto buněčné konstrukce byly perfundovány v bioreaktoru celého orgánu. Prostřednictvím svého vnitřního cévního řečiště produkovaly při perfuzi výsledné štěpy elementární moč. Při transplantaci v orthotopické poloze u potkanů byly štěpy perfundovány cirkulací příjemce a následně došlo k produkci moči přes močový kanál *in vivo* (Song *et al.*, 2013). Přestože regenerované ledviny mohou nahradit pouze dílčí funkce ledvin, tato technika je stále dominantou při regenerativní medicíně u poškození ledvin (Chou *et al.*, 2014).

4. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla problematika regenerace ledvin, ke které byl vypracován podrobný přehled přístupů. Jednou z možností je využití růstových faktorů produkovaných buňkami. Mezi tyto faktory patří epidermální růstový faktor, vaskulární endoteliální růstový faktor, hepatocytární růstový faktor, insulinu podobný růstový faktor-1, fibroblastový růstový faktor a transformující růstový faktor, které mohou indukovat buněčnou proliferaci a migraci buněk, zachovat renální mikrovaskulaturu, snižovat renální fibrózu, a tím zlepšovat funkci ledvin.

Makrofágy a růstový faktor *Wnt family member 7b*, který tyto buňky produkují, se také mohou podílet na regeneraci ledvin. Tento růstový faktor podporuje regeneraci ledvin tím, že indukuje epiteliální progresi buněčného cyklu a podporuje membránové opravy. Různé druhy makrofágů indukují proliferaci renálních tubulárních a epiteliálních buněk a snižují v nich apoptózu.

Signální dráhy mají také využití v této problematice. Bylo popsáno uplatnění například PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK a Wnt-GSK-3- β -katenin drah, které mohou stimulovat buněčnou progresi a proliferaci. JAK/STAT dráha může regulovat genovou transkripci.

Na regeneraci ledvin se může podílet několik typů kmenových buněk. Patří mezi ně endoteliální a indukované pluripotentní kmenové buňky, dále buňky odvozené z kostní dřeně a renální progenitorové buňky. V problematice regenerace ledvin mají své využití díky jejich schopnosti dělit se a diferenciovat do různých specializovaných buněčných typů. Mezi další významné vlastnosti patří schopnost sebeobnovy. Také mohou generovat funkční progenitory vysoce specializovaných buněk, či podporovat zvýšení tubulární buněčné proliferace.

Angiogeneze je také nezbytná pro regeneraci ledvin a pro inhibici poruchy funkce ledvin při chronickém onemocnění ledvin. Bioinženýrství se zabývá spojením biomateriálů s buňkami zájmu. Mezi možné přístupy patří použití buněčných implantátů, které odstraní toxiny. Dále je možné využít hemofiltrační zařízení, která nahrazují clearanci renálních glomerulů. Nejpoužívanější technikou v medicíně při regeneraci ledvin je použití štěpu z bioinženýrských ledvin, které mohou produkovat moč přes močový kanál.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ANGELOTTI M. L., RONCONI E., BALLERINI L., PEIRED A. et al.: Characterization of Renal Progenitors Committed Toward Tubular Lineage and Their Regenerative Potential in Renal Tubular Injury. *Stem Cells*, 2012, 30, 1714–1725.
2. BELLOMO R., KELLUM J. A. a RONCO C.: Acute kidney injury. *The Lancet*, 2012, 380, 756-766.
3. BENEKLI M., BAER M. R., BAUMANN H. a WETZLER M.: Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, 2002, 101, 2940-2954.
4. BENIGNI A., MORIGI M. a REMUZZI G.: Kidney regeneration. *The Lancet*, 2010, 375, 1310–1317.
5. BONVENTRE J. V.: Dedifferentiation and Proliferation of Surviving Epithelial Cells in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, 14, 55-61.
6. BRANTON M. H. a KOPP J. B.: TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1999, 1, 1349–1365.
7. CRAVEN R. F. a HIRNLE C. J.: *Fundamentals of nursing: Human Health and Function*. 4th edition, 2003, 1063-1065.
8. DE BOER A., HOOGDUIN J. M., BLANKESTIJN P. J., LI. X. et al.: 7 T renal MRI: challenges and promises. *Magma (New York, NY)*, 2016, 29, 417-433.
9. DUARTE D., SANTOS-ARAÚJO C. a LEITE-MOREIRA A. F.: Hypertension and angiogenesis in the aging kidney: A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2011, 52, 93-102.
10. DZIEDZIC K., PLENICEANU O. a DEKEL B.: Kidney stem cells in development, regeneration and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 36, 57–65.
11. ECKARDT K. U., CORESH J., DEVUYST O., JOHNSON R. J. et al.: Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 2013, 382, 158–169.
12. EYMAEL J. a SMEETS B.: Origin and fate of the regenerating cells of the kidney. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 790, 62-73.
13. FLAQUER M, CRUZADO J. M. a ROMAGNANI P.: Growth factors and renal regeneration. *Nefrología*, 2010, 30, 385-93.

14. GARUD M. a KULKARNI Y.: Hyperglycemia to Nephropathy via Transforming Growth Factor Beta. *Current Diabetes Reviews Aims & Scope*, 2014, 10, 182-189.
15. GONZÁLEZ-PECCHI V., VALDÉS S., PONS V., HONORATO P. et al.: Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase. *Microvascular Research*, 2015, 98, 9-15.
16. GURDON J. B. a MELTON D. A.: Nuclear Reprogramming in Cells. *Science*, 2008, 322, 1811-1815.
17. HEIM M. H.: The Jak-Stat Pathway: Cytokine Signalling from the Receptor to the Nucleus. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 1999, 19, 75-120.
18. HENDRY C. E. a LITTLE M. H.: Reprogramming the kidney: a novel approach for regeneration. *Kidney International*, 2012, 82, 138-146.
19. HOHENSTEIN B., KUO M. C., ADDABBO F., YASUDA K., SCHWARZENBERGER C. et al.: Enhanced progenitor cell recruitment and endothelial repair after selective endothelial injury of the mouse kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2010, 298, 1504–1514.
20. HOPKINS C., LI J., RAE F. a LITTLE M. H.: Stem cell options for kidney disease. *The Journal of Pathology*, 2009, 217, 265-281.
21. http://wormbook.org/chapters/www_wntsignaling.2/wntsignal_fig1.jpg (5.5.2017)
22. HUMES H. D., BUFFINGTON D. A., MACKAY S. M., FUNKE A. J. a WEITZEL W. F.: Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 451-455.
23. CHADE A. R.: Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for the Kidney: Are We There Yet? *Journal of the American Society of Nephrology*, 2015, 27, 1-3.
24. CHANG F. CH. a LIN S. L.: The role of angiopoietin-2 in progressive renal fibrosis. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2013, 112, 175-176.
25. CHAZAUD B.: Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*, 2014, 219, 172-178.
26. CHOU Y. H., PAN S. Y., YANG C. H. a LIN S. L.: Stem cells and kidney regeneration. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2014, 113, 201-209.
27. ICHIMURA T., MAIER J. A., MACIAG T., ZHANG G. a STEVENS J. L.: FGF-1 in normal and regenerating kidney: expression in mononuclear, interstitial, and

- regenerating epithelial cells. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 1995, 269, 653-662.
28. IVANOVA L., HIATT M. J., YODER M. C., TARANTAL A. F. a MATSELL D. G.: Ontogeny of CD24 in the human kidney. *Kidney International*, 2010, 77, 1123-1131.
 29. KIM D. a DRESSLER G. R.: Nephrogenic Factors Promote Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Renal Epithelia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16, 3527-3534.
 30. KIM W.: The Role of Angiotensin-1 in Kidney Disease. *Electrolytes & Blood Pressure*, 2008, 6, 21-26.
 31. KOBAYASHI T., TANAKA H., KUWANA H., INOSHITA S. et al.: Wnt4-transformed mouse embryonic stem cells differentiate into renal tubular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336, 585-595.
 32. KODE J. A., MUKHERJEE S., JOGLEKAR M. V. a HARDIKAR A. A.: Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 2009, 11, 377-391.
 33. KOKKO J. P.: The role of the collecting duct in urinary concentration. *Kidney International*, 1987, 31, 606-610.
 34. KRSTIĆ R. V.: *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology*. 3., 1991, 296-327.
 35. KURTS CH., PANZER U., ANDERS H. J. a REES A. J.: The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13, 738-753.
 36. KUSABA T., HUMPHREYS B. D., KRAMANN R., KOBAYASHI A. a HUMPHREYS B. D.: Controversies on the origin of proliferating epithelial cells after kidney injury. *Pediatric Nephrology*, 2014, 29, 673-679.
 37. LAMEIRE N. H., BAGGA A., CRUZ D., De MAESENEER J. et al.: Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet*, 2013, 382, 170-179.
 38. LEE P. T., LIN H. H., JIANG S. T., LU P. J. et al.: Mouse Kidney Progenitor Cells Accelerate Renal Regeneration and Prolong Survival After Ischemic Injury. *Stem Cells*, 2010, 28, 573-584.

39. LEE S., KIM W., MOON S. O., SUNG M. J. et al.: Renoprotective effect of COMP-angiopoietin-1 in db/db mice with type 2 diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, 22, 396-408.
40. LIN S. L., LI B., RAO S., YEO E. J. et al.: Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107, 4194-4199.
41. LITTLE M. H.: Regrow or Repair: Potential Regenerative Therapies for the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006, 17, 2390-2401.
42. LIU P., CHENG H., ROBERTS T. M. a ZHAO J. J.: Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 2009, 8, 627-644.
43. MARTIN P. a PARKHURST S. M.: Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, 2004, 131, 3021-3034.
44. MATĚJKA V. M., FÍNEK J. a KRÁLÍČKOVÁ M.: Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 2017, 30, 20-27.
45. MERKUNOVÁ A. a OREL M.: Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory, 2008, 165-171.
46. MEYER-SCHWESINGER C.: The Role of Renal Progenitors in Renal Regeneration. *Nephron*, 2016, 132, 101-109.
47. MOCHIZUKI H. a BREEN M.: Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers. *Veterinary Sciences*, 2015, 2, 231-245.
48. MOINUDDIN Z. a DHANDA R.: Anatomy of the kidney and ureter. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2015, 16, 247-252.
49. MONTE J. C., SAKURAI H., BUSH K. T. a NIGAM S. K.: The developmental nephrome: systems biology in the developing kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2007, 16, 3-9.
50. MORRISSEY J., HRUSKA K., GUO G., WANG S. et al.: Bone Morphogenetic Protein-7 Improves Renal Fibrosis and Accelerates the Return of Renal Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002, 13, 14-21.
51. NOSRATI A., NAGHSHVAR F., MALEKI I. a SALEHI F.: Cancer stem cells CD133 and CD24 in colorectal cancers in Northern Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 2016, 9, 132-139.

52. NOUWEN E. J., VERSTREPEN W. A. a DE BROE M. E.: Epidermal Growth Factor in Acute Renal Failure. *Renal Failure*, 1994, 16, 49-60.
53. OSAFUNE K.: In vitro regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research*, 2010, 316, 2571-2577.
54. PALM F. a CARLSSON P. O.: Thick ascending tubular cells in the loop of Henle: Regulation of electrolyte homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37, 1554–1559.
55. PAVYDE E., USAS A. a MACIULAITIS R.: Regenerative pharmacology for the treatment of acute kidney injury: Skeletal muscle stem/progenitor cells for renal regeneration? *Pharmacological Research*, 2016, 113(Pt B), 802-807.
56. PFALLER W. a GSTRAUNTHALER G.: Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106, 559–569.
57. PFALLER W. a GSTRAUNTHALER G.: Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environmental Health Perspectives*, 1998, (106), 559–569.
58. PHIN S., MOORE M. W. a COTTER P. D.: Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 2013, 3, 240.
59. PINO CH. J. a HUMES H. D.: Stem cell technology for the treatment of acute and chronic renal failure. *Translational Research*, 2010, 156, 161-168.
60. PREUSS H. G.: Basics of renal anatomy and physiology. *Clinical Laboratory Medicine*, 1993, 13, 1-11.
61. PTÁČEK R., BARTŮNĚK P. a kolektiv: Etické problémy medicíny na prahu 21. století, 2014, 95-96.
62. RAINA R., CHAUVIN A. a DEEP A.: Acute kidney injury (AKI) in paediatric critical care. *Paediatrics a Child Health*, 2017, 27, 233–237.
63. RAJALINGAM K., SCHRECK R., RAPP U. R. a ALBERT Š.: Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2007, 1773, 1177-1195.
64. SAGRINATI C., RONCONI E., LAZZERI E., LASAGNI L. a ROMAGNANI P.: Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, 14, 277–285.

65. SAITO A., KAZAMA J. J., IINO N., CHO K. et al.: Bioengineered Implantation of Megalin-Expressing Cells: A Potential Intracorporeal Therapeutic Model for Uremic Toxin Protein Clearance in Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, 14, 2025-2032.
66. SENGUPTA J.: Pediatric AKI and management. *Clinical Queries: Nephrology*, 2013, 2, 91-95.
67. SGOUROS G., HOBBS R. F. a SONG H.: Modelling and Dosimetry for Alpha-Particle Therapy. *Current Radiopharmaceuticals*, 2011, 4, 261–265.
68. SONG J. J., GUYETTE J. P., GILPIN S. E., GONZALEZ G., VACANTI J. P. a OTT H. C.: Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature Medicine*, 2013, 19, 646-651.
69. STEENHARD B. M., ISOM K. S., CAZCARRO P., DUNMORE J. H. et al.: Integration of Embryonic Stem Cells in Metanephric Kidney Organ Culture. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16, 1623-1631.
70. SURESH A. V. S.: Stem-cell therapy in medicine—how far we came and what we can expect? *Apollo Medicine*, 2012, 9, 41-43.
71. TAKAHASHI K. a YAMANAKA S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 2006, 126, 663–676.
72. TARLOFF J. B. a LASH L. H.: *Toxicology of the Kidney*, CRC Press, 3rd edition, 2004, 320-325.
73. TORIBIO R. E.: *Essentials of Equine Renal and Urinary Tract Physiology*. *The Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 2008, 23, 533-561.
74. UCCELLI A., PISTOIA V. a MORETTA L.: Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in Immunology*, 2007, 28, 219-226.
75. VARA J. Á. F., CASADO E., DE CASTRO J., CEJAS P., BELDA-INIESTA C. a GONZÁLEZ-BARÓN M.: PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 2004, 30, 193–204.
76. VONA-DAVIS L. a ROSE D. P.: Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, 2007, 14, 189-206.
77. WOOD D. a GREENWELL T.: *Surgical anatomy of the kidney and ureters*. *Surgery (Oxford)*, 2008, 26, 133-135.

78. WOOLF A. S., GNUDI L. a LONG D. A.: Roles of Angiopoietins in Kidney Development and Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20, 239-244.
79. YAMAMOTO M., CUI L., JOHKURA K., ASANUMA K. et al.: Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2005, 290, 52-60.
80. YU R. N. a ESTRADA C. R.: Stem Cells: A Review and Implications for Urology. *Urology*, 2010, 75, 664–670.
81. ZHUO J. L. a LI X. C.: Proximal Nephron. *Comprehensive Physiology*, 2013, 3, 1079–1123.